بررسی مقاومت ژنتیکی برخی ارقام نخود (*Cicer arietinum* L.) ایرانی به علف‌کش پرسوئیت

سید محسن سهرابی[۱] و سید کریم موسوی[۲،*]

۱- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۲- استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۶)

چکیده

نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی در سطح جهان است. نخود پس از لوبیا و نخود فرنگی مهم‌ترین لگوم دانه‌ای فصل سرد است. علف‌های هرز یکی از مهم‌ترین تهدید کنندگان تولید نخود در سرتاسر جهان هستند. به‌علت حساسیت نخود به علف‌کش‌ها، عمده‌ی مصرف علف‌کش‌ها به‌صورت پیش‌رویشی بوده و استفاده از علف‌کش‌های پس رویشی محدود است. بنابراین، ارقام بومی نخود متحمل به علف‌کش که انعطاف‌پذیری بالاتری برای استفاده علف‌کش‌های پس‌رویشی دارند، برای بهبود بازده این محصول مورد نیاز هستند. در این پژوهش، با استفاده از روش زیست‌سنجی بذر و واکنش PCR، مکانیسم‌های مقاومت ارقام نخود ایرانی نسبت به علف‌کش پرسوئیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی قابل‌توجهی را برای تحمل به علف‌کش پرسوئیت بین ارقام مختلف نخود ایرانی نشان داد. نتایج بررسی مکانیسم مقاومت ژنتیکی نسبت به علف‌کش پرسوئیت نشان داد که پروتئین‌های هدف این علف‌کش یعنی ALS1 و ALS2 در تمامی ارقام مورد بررسی با هم و با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن تفاوتی نداشته و این اثبات می‌کند که مقاومت موجود در ارقام مختلف گیاه نخود نسبت به علف‌کش پرسوئیت در اثر مکانیسم مقاومت محل هدف ایجاد نشده و احتمالاً از مکانیسم مقاومت غیرمحل هدف پیروی می‌کند. ارقام برتر (Bivanij، Aksou، Mansour، TDS-Maragheh90-400 و TDS-Maragheh90-358) حاصل از این پژوهش می‌توانند به کشاورزان توصیه شده و همچنین به‌عنوان والد در آزمایش‌های بهنژادی برای ایجاد ارقام نخود با مقاومت طبیعی به علف‌کش پیشنهاد شوند.

واژگان کلیدی: ارقام مقاوم، پروتئین‌های هدف، علف‌کش‌های پس‌رویشی، علف‌های هرز، مقاومت محل هدف

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **k.mousavi@areeo.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]

[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

مقدمه

نخود زراعی با نام علمی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی خودگشن و دیپلوئید ($2n = 2x = 16$) از زیر خانواده Faboideae از خانواده Fabaceae و یک لگوم خوراکی است (Shabani *et al.*, 2016). نخود زراعی تنها گونه از جنس Cicer است که به‌طور وسیع در سرتاسر جهان کشت می‌شود (Yadav and Chen, 2007). نخود پس از لوبیا و نخود فرنگی مهم‌ترین لگوم دانه‌ای فصل سرد است. در سال ۲۰۱۸، نخود حدود ۲۳/۱۶ درصد از کل حبوبات تولیدی جهان را تشکیل داده و از نظر تولید جهانی بعد از لوبیا و نخود فرنگی در رتبه‌ی سوم قرار گرفته است (FAOSTAT, 2018).

علف‌های هرز یکی از مهم‌ترین تهدید کنندگان تولید نخود در سرتاسر جهان هستند (Singh *et al.*, 2014; Toker *et al.*, 2014). به‌علت قدرت رقابت کم گیاه نخود با علف‌های هرز، عملکرد آن در رقابت با علف‌های هرز باعث کاهش شدیدی در عملکرد آن می‌شود (Gaur *et al.*, 2013; Jefferies, 2014; Singh *et al.*, 2014). با وجود سیستم‌های مختلف کنترل علف‌های هرز مانند وجین دستی و مکانیکی، به‌دلیل کارآیی و صرفه‌ی اقتصادی، هنوز کنترل علف‌های هرز هنوز با استفاده از سموم شیمیایی علف‌کش رایج است (Tahmasbali *et al.*, 2020). به‌علت حساسیت نخود به علف‌کش‌ها، عمده‌ی مصرف علف‌کش‌ها به‌صورت پیش رویشی بوده و استفاده از علف‌کش‌های پس‌رویشی محدود است (Gaur *et al.*, 2013; Lyon and Wilson, 2005; Yasin *et al.*, 1995). علف‌کش‌های پیش رویشی در کنترل علف‌های هرز در مراحل اولیه‌ی رشد گیاهچه مؤثر بوده، اما در مزرعه علف‌های هرزی که بعد از جوانه‌زنی محصول جوانه می‌زنند غالب هستند و باعث کاهش قابل توجهی در بازده محصول می‌شوند (Gaur *et al.*, 2013). بنابراین، ارقام بومی متحمل به علف‌کش نخود که انعطاف پذیری بالاتری برای استفاده علف‌کش‌های پس رویشی دارند، برای بهبود بازده این محصول مورد نیاز هستند (Gaur *et al.*, 2013). تاکنون ارقام طبیعی متحمل به علف‌کش مختلفی در گیاهان زراعی شناسایی و توسعه داده شده‌اند که از آن جمله می‌توان به برخی لگوم‌های دانه‌ای اشاره کرد (Powles, 2018; Vencill *et al.*, 2012). مقاومت به علف‌کش یکی از خصوصیات ذاتی در محصولات زراعی است. این امر آن‌ها را قادر می‌سازد که بقا و تولیدمثل خود را حتی در حضور مقادیر کشنده‌ی علف‌کش‌ها در اطرافشان تضمین کنند (Powles, 2018; Vencill *et al.*, 2012). به‌طور کلی، مکانیسم‌های مقاومت در مقابل علف‌کش‌ها به دو گروه عمده مکانیسم‌های مقاومت محل هدف (Target site resistance: TSR) و مکانیسم‌های مقاومت غیر محل هدف (Non-target-site resistance: NTSR) تقسیم‌بندی می‌شوند. مکانیسم‌های مقاومت محل هدف شامل افزایش میزان بیان پروتئین‌های هدف علف‌کش‌ها و یا ایجاد تغییرات ساختاری در محل اتصال علف‌کش‌ها هستند. در حالی‌که، مکانیسم‌های مقاومت غیر محل هدف شامل کاهش نفوذ علف‌کش‌ها، تغییر محل انتقال و استقرار علف‌کش‌ها، جبران خسارت با روش‌های مختلف و افزایش متابولیسم علف‌کش‌ها در گیاه هستند. گیاهان مقاوم به علف‌کش مصنوعی در کنار مزایایی که دارند، نگرانی‌های زیست محیطی را نیز ایجاد کرده‌اند. این در حالی است که ارقام با مقاومت ژنتیکی ذاتی گیاهان زراعی این نگرانی‌ها را تا حد زیادی برطرف کرده‌اند (Rizwan and Akhtar, 2015; Tan *et al.*, 2005).

علف‌کش ایمازتاپیر (Imazethapyr) با نام تجاری پرسوئیت و فرمول شیمیایی $C_{15}H_{19}N_3O_3$ علف‌کشی سیستمیک و انتخابی از گروه Imidazole است. علف‌کش پرسوئیت در طیف وسیعی از محصولات زراعی و باغی برای کنترل علف‌های هرز پهن برگ و گونه‌های علفی استفاده می‌شود. این علف‌کش را می‌توان به‌صورت محلول پاشی روی گیاهان پس از جوانه‌زنی و همچنین قبل از جوانه‌نی در خاک استفاده کرد. علف‌کش پرسوئیت با مهار آنزیم کلیدی استوهیدروکسی اسید سینتاز (ALS یا AHAS) باعث اختلال در تولید و کاهش اسیدهای آمینه‌ی آلیفاتیک لوسین، ایزولوسین و والین می‌شود. این امر باعث کاهش ساخت پروتئین در سلول و اختلال در رشد سلول خواهد شد (Beste, 1983; Wexler *et al.*, 2014). تاکنون گیاهان زراعی

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

مختلفی با مقاومت نسبت به علف‌کش پرسوئیت شناسایی شده‌اند (Rizwan and Akhtar, 2015). گوآر و همکاران با بررسی ارقامی مختلف گیاه نخود بومی کشور هند، تعداد ۸ رقم مقاوم به علف‌کش پرسوئیت بر مبنای میانگین امتیازهای تحمل علف‌کش را شناسایی کردند (Gaur *et al.*, 2013). در پژوهش دیگری، تعدادی از ارقامی گیاه نخود (دسی و کابلی) برای مقاومت به علف‌کش پرسوئیت در سطح مزرعه مورد غربالگری قرار گرفتند و تعداد ۹ رقم مقاوم شناسایی شدند (Prakash *et al.*, 2017). گوپتا و همکاران تعداد ۲۸۸ رقم مختلف گیاه نخود را برای مقاومت به علف‌کش‌های پرسوئیت در سطح مزرعه مورد غربالگری قرار دادند و تعداد ۳۰ رقم مقاوم به علف‌کش پرسوئیت را شناسایی کردند (Gupta *et al.*, 2018). شارما (Sharma, 2017) تعداد ۱۸۰ رقم مختلف گیاه عدس را برای مقاومت به علف‌کش پرسوئیت در سطح مزرعه مورد غربالگری قرار داد و موفق به شناسایی ۱۲ رقم مقاوم به علف‌کش شدند. رخا و همکاران (Rekha *et al.*, 2017) تعداد ۳۰ رقم مختلف گیاه نخود را برای مقاومت به علف‌کش پرسوئیت در سطح مزرعه مورد غربالگری قرار دادند و تعداد ۹ رقم با میزان مقاومت بالا به علف‌کش پرسوئیت را شناسایی کردند (Rekha *et al.*, 2017).

شناسایی ارقام با مقاومت ژنتیکی نسبت به علف‌کش‌ها با استفاده از غربال‌گری و انتخاب از بین ارقام و ارقامی مختلف یک گیاه زراعی صورت می‌گیرد. در این روش، تعدادی از ارقام یک گیاه زراعی در سطح جوانه‌زنی در محیط آزمایشگاه و یا به‌صورت گیاه کامل در گلدان و مزرعه در معرض مقادیر کشنده‌ی علف‌کش‌های مختلف قرار گرفته و گیاهانی که نسبت به علف‌کش مقاومت نشان داده‌اند، به‌عنوان گیاهان با مقاومت ژنتیکی نسبت به علف‌کش شناخته و انتخاب می‌شوند و پارامترهای رشدی آن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد (Jefferies, 2014; Rizwan and Akhtar, 2015). از طرفی، با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر PCR می‌توان نوع مکانیسم مقاومت گیاهان حاصل را نسبت به علف‌کش مورد نظر تعیین کرد.

با توجه به میزان رقابت کم گیاه نخود با علف‌های هرز و کاهش شدید محصول این گیاه در صورت عدم کنترل علف‌های هرز و همچنین حساسیت نخود به کاربرد پس رویشی علف‌کش‌ها، شناسایی ارقامی بومی متحمل به علف‌کش ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی و ارزیابی ارقامی بومی و ارقام معرفی شده مختلف گیاه زراعی نخود نسبت به علف‌کش پرسوئیت صورت گرفت. در این پژوهش، از روش زیست‌سنجی بذر و ارزیابی مقاومت در سطح جوانه‌زنی برای بررسی و ارزیابی میزان مقاومت ژنتیکی ارقام نخود نسبت به کاربرد علف‌کش پرسوئیت استفاده شد. همچنین با استفاده از واکنش PCR، مکانیسم‌های مقاومت محل هدف و غیر محل هدف نسبت به علف‌کش‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و علف‌کش: تعداد ۳۳ رقم مختلف نخود شامل TDS-Maragheh90-30 (کد B1)، TDS-Maragheh90-92 (کد B2)، TDS-Maragheh90-164 (کد B3)، TDS-Maragheh90-217(کد B4)، TDS-Maragheh90-281 (کد B5)، TDS-Maragheh90-333 (کد B6)، TDS-Maragheh90-358 (کد B7)، TDS-Maragheh90-400 (کد B8)، TDS-Maragheh90-427 (کد B9)، FLIP 86-6C (کد B10)، TDS-Maragheh90-453 (کد B11)، Sameen (کد B12)، Azad (کد B13)، Nosrat (کد B14)، Hashem (کد B15)، Ana (کد B16)، Saral (کد B17)، ILC 482 (کد B18)، Jam (کد B19)، ILC 533 (کد B20)، Mansour (کد B21)، Aksou (کد B22)، ILC 72 (کد B23)، Kaka (کد B24)، Pyrooz (کد B25)، Grit (کد B26)، Dehpir (کد B27)، USAPB (کد B28)، Abi (کد B29)، Noorabad (کد B30)، Lablabi (کد B31)، Ghermez (کد B32) و Bivanij (کد B33)، از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، بانک بذر و مراکز بوجاری و فروش بذور در سطح استان لرستان تهیه شدند. همچنین در این پژوهش از علف‌کش ایمازتاپیر (Imazethapyr) با نام تجاری پرسوئیت به شکل مایع قابل حل در آب (SL 10%)

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

استفاده شد. کارایی این علف‌کش با کاربرد روی گیاهان غیرهدف ارزیابی شد.

آزمایش زیست سنجی جوانه‌زنی در حضور علف‌کش: آزمایش بررسی پاسخ جوانه زنی ۳۳ رقم نخود به کاربرد علفکش پرسوئیت به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار در ژرمیناتور انجام شد. ابتدا بذور ارقام نخود به‌مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم پنج درصد استریل شدند، سپس پنج مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند تا بقایای هیپوکلریت سدیم به‌طور کامل حذف شود. بذور نخود به تعداد ۱۰ عدد درون پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری استریل روی یک لایه کاغذ صافی استریل قرار گرفتند. هر پتری به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. علف‌کش پرسوئیت با غلظت ۰/۱ درصد حجمی/حجمی به مقدار ۵ میلی‌لیتر به هر پتری اضافه شد. پتری‌های حاوی بذور پس از آماده‌سازی و اعمال تیمار در ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. خروج ریشه‌چه از بذور به‌عنوان معیار جوانه‌زنی بذور در نظر گرفته شد. شمارش بذور جوانه‌زده هر روز انجام شد و تا جوانه‌زنی کامل بذور در تیمار شاهد، ادامه یافت. در پایان جوانه‌زنی، طول گیاهچه‌ها با خط‌کش مدرج میلی‌متری اندازه‌گیری شد. در نهایت، سرعت جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی، شاخص بنیه و سرعت رشد گیاهچه اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها و مقایسات میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام شد. در نهایت، ضرایب تنوع ژنوتیپی و تنوع فنوتیپی برای صفات مورد بررسی محاسبه گردید. پس از اندازه‌گیری‌های مختلف، گیاهچه کامل ارقام مختلف نخود به‌صورت جداگانه جداسازی و در فریزر نگهداری شدند.

بررسی ژن‌های هدف علف‌کش پرسوئیت و طراحی آغازگرها: به‌منظور بررسی مکانیسم ژنی مقاومت نسبت به علف‌کش پرسوئیت، ابتدا با استفاده از مرور منابع مکانیسم عمل این علف‌کش مشخص شد. در مرحله‌ی بعد، ژن‌های هدف علف‌کش پرسوئیت (ALS1 و ALS2)، که جهش در آن‌ها باعث ایجاد مقاومت در برابر این علف‌کش می‌شود (Sathasivan *et al.*, 1991)، از بانک ژن پایگاه NCBI با شماره‌های دسترسی NC_021164 و NC_021160 دریافت شده و با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. چارچوب‌های خوانش باز (ORFs) موجود در ژن‌های هدف و خصوصیات آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۰/۳) و ORF finder مشخص شدند. بررسی انواع جهش‌های ایجاد کننده‌ی مقاومت محل هدف در پروتئین‌های هدف علف‌کش پرسوئیت با استفاده از مرور منابع و نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۰/۳) انجام شد. در نهایت، با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن‌های ALS1 و ALS2، آغازگرهایی برای تکثیر کامل و تشخیص وجود جهش‌های احتمالی در آن‌ها طراحی شد (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر و توالی‌یابی ژن‌های هدف علف‌کش

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of herbicide target genes

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال (°C) Tm (°C)	کاربرد Application
ALS1-F	5′-ATATTCGCATTACCATCACACAC-3′	58	تکثیر ژن Gene amplification
ALS1-R	5′-ACCGTATCTAGTTTAGCCCAATC-3′		
ALS2-F	5′-TGTTTGTTTTGGACTAATTTTATC-3′	56	
ALS2-R	5′-AACCTGGCTCGGGAAATC-3′		
ALS1I-F	5′-TTATATGTTGGAGGTGGTTGTTTG-3′	60	توالی‌یابی Sequencing
ALS1I-R	5′-AGTTTCTAATTTCCCAGTTACACG-3′		
ALS2I-F	5′-TTATATGTTGGTGGTGGTAGTTTG-3′	58	
ALS2I-R	5′-GTAACACGATCATCAAACCGAACC-3′		

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

استخراج DNA و انجام PCR: بافت‌های ارقام مختلف نخود به‌صورت جداگانه در ازت مایع و با استفاده از هاون چینی به خوبی پودر شدند. استخراج DNA با استفاده از روش استاندارد CTAB انجام گرفت (Doyle, 1987). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد ارزیابی و تعیین شد. به‌منظور تکثیر توالی کامل ژن‌های ALS1 و ALS2، از واکنش PCR به‌همراه آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای هر ژن استفاده شد. تیوب‌های حاوی اجزاء واکنش PCR به‌صورت جداگانه به دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad منتقل گردید و واکنش PCR با استفاده از برنامه دمایی اختصاصی هر جفت آغازگر انجام شد. از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد به‌منظور بررسی بررسی محصولات واکنش PCR استفاده شد.

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی: قطعات تکثیر شده ژن‌های با استفاده از کیت استخراج و تخلیص از ژل شرکت سیناژن از ژل آگارز تخلیص شده و برای توالی‌یابی ارسال شدند. به‌منظور افزایش دقت، توالی‌یابی به‌صورت دو طرفه و با استفاده از آغازگرهای داخلی طراحی شده (جدول ۱) و توسط شرکت بایونیر انجام گرفت. نتایج توالی‌یابی به‌طور جداگانه برای هر رقم توسط نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۰/۳) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و به‌منظور تشخیص وجود جهش‌های احتمالی، با ژنوم مرجع گیاه نخود مقایسه گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفت درصد جوانه‌زنی نشان داد که این صفت به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر علف‌کش پرسوئیت قرار گرفته است (جدول ۲). مقایسه میانگین صفت درصد جوانه‌زنی در اثر متقابل تیمار علف‌کش پرسوئیت و ارقام نخود با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد نشان داد که تنها ارقام B1، B3، B6، B7، B29 و B30 دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بوده و سایر ارقام تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس صفت سرعت جوانه‌زنی نشان داد که این صفت به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر علف‌کش پرسوئیت قرار گرفته است (جدول ۲). مقایسه میانگین صفت سرعت جوانه‌زنی در اثر متقابل تیمار علف‌کش پرسوئیت و ارقام نخود با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد نشان داد که تنها ارقام B1، B6 و B30 دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بوده و سایر ارقام تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس صفت متوسط زمان جوانه‌زنی نشان داد که این صفت به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر علف‌کش پرسوئیت قرار گرفته است (جدول ۲). مقایسه میانگین صفت متوسط زمان جوانه‌زنی در اثر متقابل تیمار علف‌کش پرسوئیت و ارقامی نخود با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد نشان داد که تنها ارقام B1 و B6 دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بوده و سایر ارقام تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات بررسی شده در آزمایش زیست سنجی جوانه‌زنی

Table 2. The analysis of variance of investigated traits in germination test

منابع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی	میانگین مربعات Mean squares				
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی Speed of germination	متوسط زمان جوانه‌زنی Average germination time	طول گیاهچه Seedling length	شاخص بنیه‌ی بذر Seed vigor index
تیمار Treatment	32	1450*	716.3*	476.592*	896*	12062*
اشتباه آزمایشی Error	99	58.4	102.5	113.007	177	1354
ضریب تنوع فنوتیپی Phenotypic coefficient of variation	-	8.69	31.69	25.6	48.89	55.57
ضریب تنوع ژنوتیپی Genotypic coefficient of variation	-	8.4	31.4	25.12	48.3	55.1

*: معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

*: Significance at the %5 probability level

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات بررسی شده در آزمایش زیست سنجی جوانه‌زنی به روش LSD ($P < 0.05$)

Table 3. The means comparison of investigated traits in germination test using LSD method ($P < 0.05$)

کد رقم	شاخص بنیه‌ی بذر	طول گیاهچه	متوسط زمان جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی
Cultivar code	Seed vigor index	Seedling length	Average germination time	Speed of germination	Germination percentage
B1	487*	24.33	1.9667*	19.333*	20*
B2	2577*	33.83*	1.8333	54.333	76.67
B3	2853*	38.33*	1.8333	63.333	73.33*
B4	2020*	33.67*	1.6667	50	60
B5	2370*	35.33*	1.8333	59.333	66.67
B6	695*	26.5*	1.6667*	37.667*	30*
B7	1420*	23.67*	1.4333	53.667	60*
B8	2166*	25.17*	2.1333	72	85
B9	2767*	27.67*	3.5667	83.333	100
B10	1553*	29.67*	1.2333	57.333	53.33
B11	1533*	31.67*	1.6	50	46.67
B12	4200*	42*	3.6	86.667	100
B13	5067*	50.67*	3.9	87	100
B14	4000*	40*	3.8667	84.333	100
B15	3283*	32.83*	4.1333	84.333	100
B16	4527*	47*	3.3	82.667	93.33
B17	2767*	31.67*	2.9	75.333	86.67
B18	5150*	51.5*	3.7667	88.333	100
B19	3317*	33.17*	3.2667	85.333	100
B20	3533*	35.33*	3.8333	87	100
B21	4500*	45*	3.8	83.333	100
B22	5500*	55*	4.0667	87.667	100
B23	4533*	45.33*	3.6	85	100
B24	4100*	41*	3.8	82.333	100
B25	3800*	38*	3.4333	84	100
B26	3933*	39.33*	3.7	84	100
B27	2050*	34.17*	1.6	57.333	60
B28	3180*	41.5*	2.9667	71.667	86.67
B29	1993*	22.33*	4.1	84	93.33*
B30	967*	40.5*	1.6	25.667*	33.33*
B31	4700*	44.5*	3.6	85.333	100
B32	3667*	26.67*	4.0333	89	100
B33	2970*	33.83*	2.7667	78.333	86.67

*: اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نسبت به شرایط کنترل

*: Significant difference at the 5% probability level compared to the control condition.

نتایج تجزیه واریانس صفت طول گیاهچه نشان داد که این صفت به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر علف‌کش پرسوئیت قرار گرفته است (جدول ۲). مقایسه میانگین صفت طول گیاهچه در اثر متقابل تیمار علف‌کش پرسوئیت و ارقام نخود با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد نشان داد که تمامی ارقام به استثناء رقم B1 دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بودند (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس صفت شاخص بنیه‌ی بذر نشان داد که این صفت به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر علف‌کش پرسوئیت قرار گرفته است (جدول ۲). مقایسه میانگین صفت شاخص بنیه‌ی بذر در اثر متقابل تیمار علف‌کش پرسوئیت و ارقام نخود با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد نشان داد که تمامی ارقام دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بودند (جدول ۳).

بیشترین مقادیر ضرایب فنوتیپی و ژنوتیپی به‌ترتیب برای صفات شاخص بنیه بذر و طول گیاهچه مشاهده شد که نشان دهنده میزان بالای تنوع فنوتیپی و ژنتیکی ارقام نخود برای صفات مذکور است (جدول ۲). از طرفی، کمترین مقدار ضرایب مذکور برای صفت درصد جوانه‌زنی مشاهده شد که نشان دهنده میزان پایین تنوع فنوتیپی و ژنتیکی ارقام نخود برای صفات مذکور است (جدول ۲). نتایج رتبه‌بندی نهایی صفات جوانه‌زنی تحت تیمار علف‌کش پرسوئیت نشان داد که از ۳۳ رقم مورد بررسی، ارقام B31، B22، B21، B8 وB27 بالاترین رتبه‌ها (مقاومت بالا به علف‌کش) و ارقام B6، B1، B5، B3 و B14 پایین‌ترین رتبه‌ها (مقاومت پایین به علف‌کش)

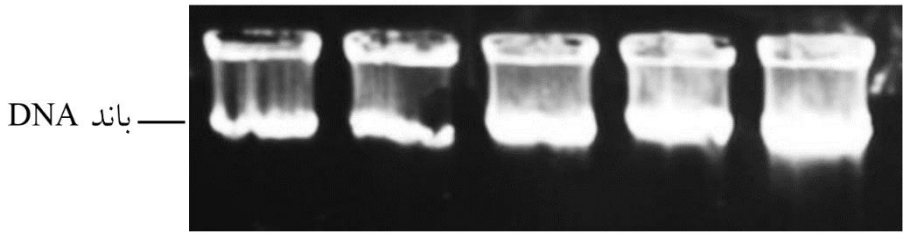
[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

را از نظر جوانه‌زنی بهینه را تحت تیمار این علف‌کش کسب کرده‌اند.

نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده از ارقام مختلف گیاه نخود نشان داد که DNA مورد نظر دارای کمیت و کیفیت قابل قبولی بوده و برای انجام واکنش PCR و تکثیر ژن‌ها مناسب است (شکل ۱).

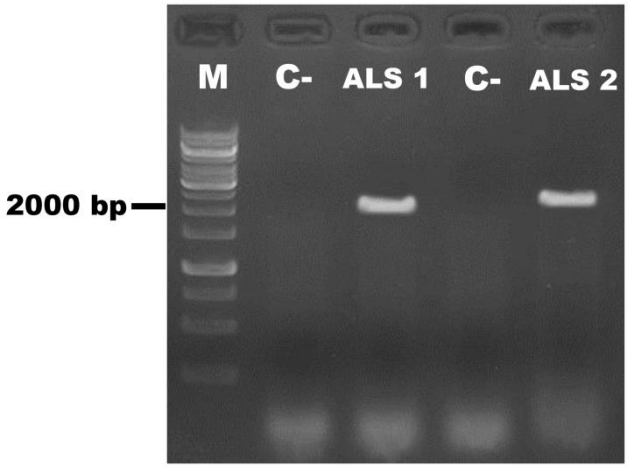
نتایج PCR با آغازگرهای اختصاصی باندهایی به اندازه ۲۰۶۱ و ۲۱۱۲ جفت‌باز را به ترتیب برای ژن‌های ALS1 و ALS2 نشان داد و تکثیر موفق این ژن‌ها را مشخص کرد (شکل ۲). باند ژن‌های ALS1 و ALS2 در تمام ارقام مورد آزمایش نخود به یک اندازه بوده و هیچ تفاوتی از لحاظ طول قطعه تکثیری بین ارقام مختلف مشاهده نشد.

تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی ژن‌های ALS1 و ALS2 در ارقام مختلف گیاه نخود، نتایج PCR را مورد تأیید قرار داد و مشابه اندازه باندهای تکثیری بود. بررسی ژن ALS1 در تمام ارقام مورد بررسی نشان داد که این ژن فاقد اینترون بوده و دارای چارچوب خوانش بازی (ORF) به طول ۱۹۸۰ جفت باز است که با کدون ATG شروع و با کدون TGA خاتمه می‌یابد. این چارچوب خوانش باز، پروتئینی به طول ۶۵۹ اسید آمینه را تولید می‌کند (شکل ۳). بررسی توالی پروتئینی ژن ALS1 نشان داد که این ژن فاقد سیگنال پپتید بوده و در میتوکندری یا کلروپلاست تجمع پیدا می‌کند. جستجوی دمین‌های عملکردی، وجود دمین عملکردی محافظت شده Acetolactate synthase را در ساختار این پروتئین نشان داد که از اسید آمینه‌ی ۷۶ تا ۶۵۹ امتداد یافته بود (شکل ۳). بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین ALS1، جرم مولکولی ۷۱/۸ کیلودالتون، pH ایزوالکتریک ۸/۱۳، شاخص ناپایداری ۴۰/۴۶ (ناپایدار)، شاخص آلیفاتیک ۹۱/۷۳ و GRAVY برابر با ۰/۰۸۵- را برای این پروتئین نشان داد.



شکل ۱- الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از برخی ارقام گیاه نخود

Figure 1. Gel electrophoresis of genomic DNA extracted from some chickpea cultivars



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های ALS1 و ALS2 در رقم B33

Figure 2. Electrophoresis of PCR products of ALS1 and ALS2 genes in one of chickpea cultivars (B33)

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

```
  1  MAATTTTTPS RSAFSSSSHP IFPKSNTKLT FSLSPIFNKP KLISSRPFKI
 51  SSSLSKSPTA PSSITTTTTT TTTSTFISRF SPTEPRKGSD ILVEALEREG
101  VTNVFAYPGG ASMEIHQALT RSKIIRNVLP RHEQGGIFAA EGYARSSGLP
151  GVCIATSGPG ATNLVSGLAN ALMDSIPIIA ITGQVPRRMI GTDAFQETPI
201  VEVTRSITKH NYLILEVDDI PRVVREAFFV ANSGRPGPVL IDVPKDVQQQ
251  LAVPNWAQPI KLTGYLSRLP KIPIEAQLEQ VVRLLLESKK PVLYVGGGCL
301  NSSEELKRFV EITGIPVAST LMGLGSYPVG GEHSLQMLGM HGTVYANYAV
351  DKSDLLLAFG VRFDDRVTGK LETFASRANI VHIDIDSAEI GKNKLPQVSV
401  CADMKFALQG LNRILESKGI KDKLDFESWR EELNVVKIKF PLGFKTFEDA
451  ISPQYAIQVL DELTNGDAIV STGVGQHQMW AAQFYKYKRP RQWLTSGGLG
501  AMGFGLPAAM GAAVANPDAV VVDIDGDGSF MMNVQELATI KVEKLPVKIL
551  LLNNQHLGMV VQWEDRFYKS NRAHTYLGDP SRENEIFPNM LGFADACGIP
601  AARVTKKEEL RDAIQKMLDT PGPYLLDVIV PHQEHVLPMI PSNGSFKDVI
651  TDGDGRRSY
```

شکل ۳- توالی پروتئینی کامل ژن ALS1 گیاه نخود. دمین عملکردی با رنگ خاکستری مشخص شده است.

Figure 3. The full-length protein sequence of the ALS1 gene of chickpea. The functional domain is marked in gray.

بررسی ژن ALS2 در تمام ارقام مورد بررسی نشان داد که این ژن دارای اینترون بوده و حاوی چارچوب خوانش بازی (ORF) به طول ۱۹۷۱ جفت باز است که با کدون ATG شروع و با کدون TGA خاتمه می‌یابد. این چارچوب خوانش باز پروتئینی به طول ٦٥٦ اسید آمینه را تولید می‌کند (شکل ٤). بررسی توالی پروتئینی ژن ALS2 نشان داد که این ژن فاقد سیگنال پپتید بوده و در میتوکندری تجمع پیدا می‌کند. جستجوی دمین‌های عملکردی، وجود دمین عملکردی محافظت شده Acetolactate synthase را در ساختار این پروتئین نشان داد که از اسید آمینه‌ی ۷۱ تا ٦٥٦ امتداد یافته بود (شکل ٤). بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین هدف ALS2، جرم مولکولی ۷۱/٦٦ کیلودالتون، pH ایزوالکتریک ٦٧٣٤، شاخص ناپایداری ٤٢/٩٨ (ناپایدار)، شاخص آلیفاتیک ۹۱/۳۰ و GRAVY برابر با ۰/۱۳۸- را برای این پروتئین نشان داد.

تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی ژن ALS1 در ارقام مختلف گیاه نخود و مقایسه آنها با توالی مرجع ALS1 موجود در بانک ژن شباهت و همسانی کامل را نشان داد. همردیفی توالی ژن ALS1 در ارقام مختلف گیاه نخود با توالی مرجع ALS1 موجود در بانک ژن مشخص کرد که توالی این ژن در تمام ارقام مشابه هم است و هیچ تغییر نوکلئوتیدی در آن مشاهده نمی‌شود (شکل ۵).

تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی ژن ALS2 در ارقام مختلف گیاه نخود و مقایسه آنها با توالی مرجع ALS2 موجود در بانک ژن شباهت و همسانی کامل را نشان داد. همردیفی توالی ژن ALS2 در ارقام مختلف گیاه نخود با توالی مرجع ALS2 موجود در بانک ژن مشخص کرد که توالی این ژن در تمام ارقام مشابه هم بوده و هیچ تغییر نوکلئوتیدی در آن مشاهده نمی‌شود (شکل ٦).

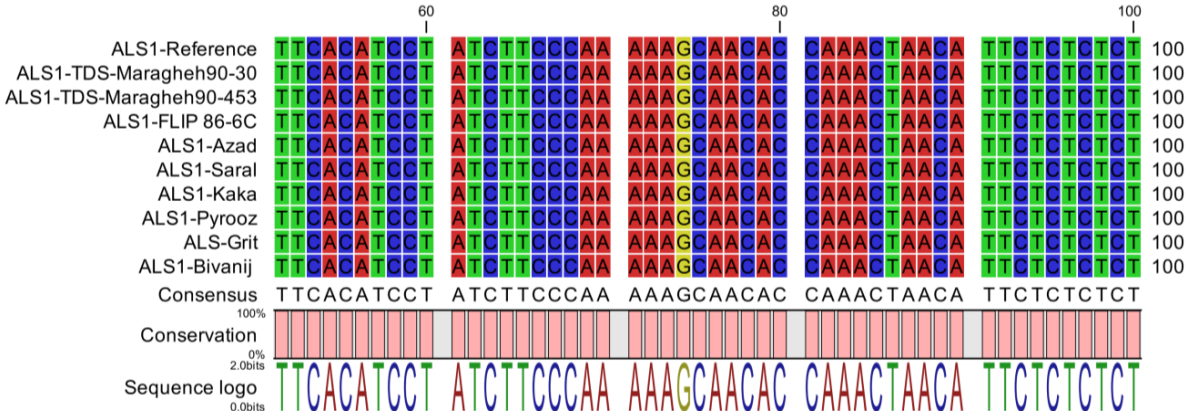
امروزه روش‌های مختلفی برای شناسایی و سنجش میزان مقاومت گیاهان زراعی مختلف و همچنین علف‌های هرز نسبت به علف‌کش‌ها ابداع شده است. از این روش‌ها می‌توان به ارزیابی مقاومت مزرعه‌ای، ارزیابی مقاومت در گلخانه، زیست‌سنجی بذر و ارزیابی مقاومت در سطح جوانه‌زنی، کلروفیل فلورسانس، غوطه‌ورسازی دیسک‌های برگی در علف‌کش و استخراج آنزیم هدف و مطالعه مستقیم اثر علف‌کش بر آنزیم اشاره کرد. همچنین از واکنش PCR برای تشخیص جهش‌های احتمالی ایجاد کننده مقاومت علیه آفت‌کش‌ها نیز استفاده می‌شود (Beckie *et al.*, 2000). شناسایی ارقام با مقاومت ژنتیکی نسبت به علف‌کش‌ها با استفاده از غربال‌گری و انتخاب از بین ارقام و ارقامی مختلف یک گیاه زراعی صورت می‌گیرد. در این روش، تعدادی از ارقام یک گیاه زراعی در سطح جوانه‌زنی در محیط آزمایشگاه و یا به‌صورت گیاه کامل در گلدان و مزرعه در معرض مقادیر کشنده‌ی علف‌کش‌های مختلف قرار گرفته و گیاهانی که نسبت به علف‌کش مقاومت نشان داده‌اند، به‌عنوان گیاهان با مقاومت ژنتیکی نسبت به علف‌کش شناخته و انتخاب می‌شوند و پارامترهای رشدی آن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد (Jefferies, 2014; Rizwan and Akhtar, 2015).

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

```
  1  MATNAARAAF TTVPLSSPHS PNPNSIFRFT VPFSSHLNTP SKLQLQLRSL
 51  RISASLSNNP THQLTPLPST EQFISRFALD EPRKGADILV EALERQGVTN
101  VFAYPGGASM EIHQALTRST TIRNVLPRHE QGGIFAAEGY ARSSGLPGVC
151  IATSGPGATN LVSGLADAML DSVPLVAITG QVPRRMIGTD AFQETPIVEV
201  TRSITKHNYL VLDIDDIPRI VNEAFFLATS GRPGPVLIDI PKDIQQQLSV
251  PNWEQPMKLS GYMARLPKSP SESHLEQIVR LIMESKKPVL YVGGGSLNSS
301  EELRRFVELT GVPVASTLMG LGSYPTSDEN SLQMLGMHGT VYANYAVDKS
351  DLLLAFGVRF DDRVTGKLEA FASRAKIVHI DIDSAEIGKN KQPHVSVCGD
401  LKLALRGINR ILESKGIESK LDFGAWREEL NEQKRRFPLS FKTFGEAIPP
451  QYAIQVLDEL TNGDAIISTG VGQHQMWSAQ FYSYKRPRQW LTSGGLGAMG
501  FGLPAAMGAA VANPDSVVVD IDGDGSFMMN VQELATIKVE NLPVKILLLN
551  NQHLGMVVQW EDRFYKANRA HTYLGDPANE KEIFPNMLKF ADACGIPAAR
601  VTKKADLRAA IQKMLDTPGP YLLDVIVPHQ EHVLPMIPSN GAFEDVITEG
651  DGRRSY
```

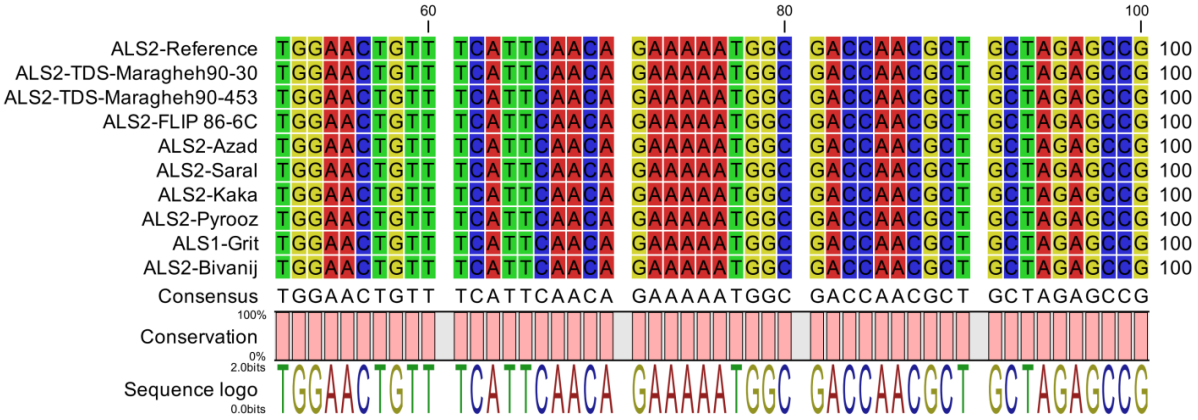
شکل ٤- توالی پروتئینی کامل ژن ALS2 گیاه نخود که در آن دمین عملکردی با رنگ خاکستری مشخص شده است.

Figure 4. The full-length protein sequence of the ALS2 gene of chickpea. The functional domain is marked in gray.



شکل ٥- بخشی از هم‌ردیفی چندگانه توالی ژن ALS1 در برخی از ارقام نخود مورد آزمایش

Figure 5. The multiple sequence alignment of the ALS1 gene sequence in some tested chickpea cultivars



شکل ٦- بخشی از همردیفی چندگانه توالی ژن ALS2 در برخی از ارقام نخود مورد آزمایش

Figure 6. The multiple sequence alignment of the ALS2 gene sequence in some tested chickpea cultivars

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

بررسی تحمل به علف‌کش‌ها بر اساس تماس مستقیم علف‌کش با گیاه، یکی از سریع‌ترین و بهترین روش‌های اندازه‌گیری میزان تحمل به علف‌کش‌ها در نخود است (Taran *et al.*, 2010). نتایج این مطالعه تنوع ژنتیکی قابل توجهی را برای تحمل به علف‌کش پرسوئیت بین ارقام مختلف نخود ایرانی نشان داد. در رتبه‌بندی کلی ارقام تحت شرایط تیمار علف‌کش پرسوئیت، ارقام B31، B22، B21، B8 وB27 به ترتیب بهترین رتبه‌ها را کسب کردند و به عنوان ارقام برتر انتخاب شدند. از طرفی بر اساس رتبه‌بندی کلی، ارقام B6، B1، B5، B3 و B14 به ترتیب حساس‌ترین ارقام نسبت به کاربرد علف‌کش پرسوئیت در سطح جوانه‌زنی بودند.

نتایج بررسی مکانیسم ژنی مقاومت نسبت به علف‌کش پرسوئیت نشان داد که ژن‌های هدف این علف‌کش یعنی ALS1 و ALS2 در تمامی ارقام مورد بررسی با هم و با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن تفاوتی نداشته و این اثبات می‌کند که مقاومت موجود در ارقام مختلف گیاه نخود نسبت به علف‌کش پرسوئیت در اثر مکانیسم مقاومت محل هدف ایجاد نشده و احتمالاً از مکانیسم مقاومت غیر محل هدف پیروی می‌کند. بررسی مقاومت جایگاه محل هدف نسبت به علف‌کش پرسوئیت در نخود نشان داده است پنج جایگاه جهش عمده در ژن‌های ALS1 و ALS2 باعث تغییرات اسیدهای آمینه‌ی و ایجاد مقاومت نسبت به علف‌کش مذکور می‌شوند. این جهش‌ها در ژن ALS1 باعث تغییر اسیدهای آمینه‌ی پرولین ۱۸٦، آلانین ۱۹٤، آسپارتیک اسید ۳٦۵، تریپتوفان ۵٦۳ و سرین ٦٤۲ به سایر اسیدهای آمینه می‌شوند. در این بین، اسید آمینه‌ی پرولین ۱۸٦ متحمل تغییرات بیشتری شده و بخش عمده‌ای از مقاومت ایجاد شده نسبت به علف‌کش پرسوئیت را ایجاد می‌کند. همین تغییرات اسید آمینه‌ای در ژن هدف ALS2 با تغییر شماره جایگاه اسید آمینه‌ها قابل مشاهده هستند (Dong *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2005).

مکانیسم‌های مقاومت محل هدف به‌طور معمول در اثر تغییرات تک‌ژنی ایجاد می‌شوند ولی بر خلاف آنچه که تصور می‌شود خیلی ساده نیستند. مکانیسم‌های مقاومت محل هدف توسط آلل‌های غالب یا نیمه غالب ایجاد می‌شوند، ولی ایجاد و کنترل آن‌ها توسط آلل‌های مغلوب نیز در برخی موارد گزارش شده است (Délye *et al.*, 2013; Powles, 2018). مکانیسم‌های مقاومت محل هدف به‌طور عمده توسط تغییرات در ساختار سه بعدی پروتئین‌های هدف علف‌کش‌ها و همچنین تغییر در توزیع گروه‌های قطبی در محل اتصال علف‌کش‌ها به پروتئین هدف در موقعیت‌هایی که برای پایداری اتصال علف‌کش حیاتی هستند، ایجاد می‌شوند (Dayan *et al.*, 2010; Linda *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). تغییرات ساختاری عموماً به‌علت جایگزینی‌های اسید آمینه‌ای در یکی از چندین موقعیت احتمالی روی پروتئین هدف علف‌کش هستند (Avila-Garcia *et al.*, 2012; Beckie and Tardif, 2012; Powles, 2018; Shaner *et al.*, 2012). به عنوان یک قانون عمومی، چندین جایگزینی ایجاد کننده‌ی مقاومت می‌توانند در یک کدون حیاتی ایجاد شوند. به‌طور مثال، تعداد ۱۲ جایگزینی ایجاد کننده‌ی مقاومت در کدون ۱۹۷ پروتئین هدف استوهیدروکسی اسید سینتاز شناسایی شده‌اند (Beckie and Tardif, 2012). میزان کاهش میل علف کش به محل اتصال آن به تغییر ساختاری پروتئین هدف و همچنین به مولکول علف کش بستگی دارد. بسته به نوع علف‌کش، یک تغییر ساختاری مشخص در پروتئین هدف می‌تواند مقاومت بالا یا متوسطی را ایجاد کند یا در موارد نادری باعث افزایش حساسیت نسبت به علف‌کش شود (Délye *et al.*, 2004; Délye *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007). مطالعات نشان داده‌اند که مقاومت محل هدف نسبت به علف‌کش‌ها می‌تواند در اثر تغییرات ژنتیکی پیچیده‌ای مانند حذف کامل یک کدون، جایگزینی پی در پی آمینو اسیدی ناشی از دو جایگزینی نوکلئوتیدی در یک کدون مشابه، وجود دو جایگزینی آمینو اسیدی در کدون‌های مجزا که سطح مقاومت را در مقایسه با یک جهش تکی افزایش می‌دهد و افزایش ساخت و تجمع پروتئین هدف در گیاهان ایجاد شود (Gaines *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012; Patzoldt *et al.*, 2006; Salas *et al.*, 2012). این مکانیسم‌ها تاکنون به‌طور

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

محدودی در گیاهان وجود داشته‌اند زیرا تغییرات ایجاد کننده‌ی آن‌ها با احتمال بسیار پایینی رخ می‌دهند.

در پژوهشی که روی مکانیسم مقاومت غیر محل هدف نسبت به علف‌کش پرسوئیت در گیاه نخود انجام گرفت، وجود تعداد زیادی از ژن‌های با بیان متفاوت را بین ارقام مقاوم و حساس مشخص کرد (Iquebal *et al.*, 2017). مقایسه‌ی ترنسکریپتوم دو رقم حساس و مقاوم به علف‌کش نخود در شرایط بدون تیمار علف‌کش، وجود ۱۴۷۴ ژن با بیان متفاوت را بین این دو رقم نشان داد در حالی‌که، مقایسه‌ی ترنسکریپتوم این دو رقم تحت تیمار علف‌کش، وجود ۱۵۶۸ ژن با بیان متفاوت را مشخص کرد. وجود تعداد متفاوت ژن‌های با بیان متفاوت در ارقام حساس و مقاوم به علف‌کش نخود، وجود مکانیسم مقاومت غیر محل هدف را برای این گیاه اثبات کرد (Iquebal *et al.*, 2017).

مقاومت غیر محل هدف، مقاومتی چندژنی بوده و اخیراً اهمیت آن اثبات شده است. این نوع مقاومت در حال حاضر نوع غالب مقاومت در برابر مهم‌ترین علف‌کش‌ها در سراسر جهان هستند (Délye *et al.*, 2013; Powles, 2018; Shaner *et al.*, 2012). در واقع به نظر می‌رسد که مقاومت غیر محل هدف یک پاسخ سازگاری عمومی‌تر به علف‌کش‌ها در مقایسه‌ی با مقاومت محل هدف است. مکانیسم‌های مقاومت غیر محل هدف زیر مجموعه‌ای از پاسخ‌های گیاهی به تنش‌های غیر زیستی هستند (Délye, 2013). این نوع مقاومت می‌تواند دائمی، القاء شونده با تنش و یا مجموعه‌ای از هر دو باشد. مشخص شده است که مقاومت غیرمحل هدف دائمی با متابولیسم ثانویه‌ی بالاتر در گیاهان همراه است (Petit *et al.*, 2010). فرضیه فعلی در مورد القاء مقاومت غیر محل هدف این است که کاربرد علف‌کش به نوعی باعث ایجاد تنش در گیاه شده و مسیرهای پاسخ به تنش را در همه‌ی گیاهان فارغ از میزان حساسیت آن‌ها به نسبت به علف کش فعال می‌کند (Délye, 2013). تنوع ژنتیکی در اندازه‌ی پاسخ گیاهان مختلف باعث تنوع در حساسیت شده و این مبنای تکامل مقاومت غیر محل هدف القاء شده است. مکانیسم‌های مقاومت غیر محل هدف دارای تنوع بین گونه‌ای و درون گونه‌ای هستند که ثابت می‌کنند این نوع مقاومت عموماً چندژنی و پیچیده بوده، هر چند ممکن است که مقاومت غیر هدف تک ژنی نیز وجود داشته باشد (Busi *et al.*, 2011; Mithila *et al.*, 2012; Petit *et al.*, 2010). مکانیسم‌های مقاومت غیر محل هدف می‌توانند نسبت به نوع علف‌کش نیز متفاوت باشند و شامل تغییر محل علف‌کش، افزایش متابولیسم و محافظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو متغیر باشند (Beckie and Tardif, 2012; Cummins *et al.*, 2009; Cummins *et al.*, 1999; Cummins *et al.*, 2013; Powles, 2018).

تاکنون گیاهان زراعی مقاوم به علف‌کش مختلفی شناسایی و یا به‌صورت مصنوعی تولید شده‌اند (Rizwan and Akhtar, 2015). گیاهان مقاوم به علف‌کش مصنوعی در کنار مزایایی که دارند، نگرانی‌های زیست محیطی را نیز ایجاد کرده‌اند. این در حالی است که ارقام با مقاومت ژنتیکی ذاتی گیاهان زراعی این نگرانی‌ها را تا حد زیادی برطرف کرده‌اند (Rizwan and Akhtar, 2015; Tan *et al.*, 2005). نتایج حاصل از این آزمایش به خوبی توانست پاسخ ۳۳ رقم ایرانی گیاه نخود را نسبت به کاربرد علف‌کش پرسوئیت در سطح جوانه‌زنی بررسی و ثبت کنند. همچنین این نتایج، ۳۳ رقم ایرانی گیاه نخود را برای مقاومت به علف‌کش پرسوئیت رتبه‌بندی کرده و مقاوم‌ترین و حساس‌ترین ارقام را مشخص نمودند. در نهایت، نتایج این پژوهش وجود یک مکانیسم مقاومت غیر محل هدف احتمالی را در ارقام نخود مقاوم به علف‌کش پرسوئیت نشان داد. ارقام برتر حاصل از این آزمایش می‌توانند در آزمایش‌های مزرعه‌ای در زمان و مکان دیگر بررسی شوند. در صورت پاسخ مناسب در آن آزمایش‌ها، ارقامی مورد نظر می‌توانند به کشاورزان توصیه شده و همچنین به عنوان والد در آزمایش‌های اصلاحی برای ایجاد گیاهان نخود مقاوم به علف‌کش طبیعی به کار برده شوند.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی موسسه آموزش و ترویج کشاورزی (سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی) انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

References

Avila-Garcia, W.V., Sanchez-Olguin, E., Hulting, A.G. and Mallory-Smith, C. (2012). Target-site mutation associated with glufosinate resistance in Italian ryegrass (*Lolium perenne* L. ssp. multiflorum). *Pest Management Science*, **68:** 1248-1254.

Beckie, H.J., Heap, I.M., Smeda, R.J. and Hall, L.M. (2000). Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology*, **14:** 428-445.

Beckie, H.J. and Tardif, F.J. (2012). Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, **35:** 15-28.

Beste, C. (1983) *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*. Weed Science Society of America, KS, USA.

Busi, R., Vila-Aiub, M.M. and Powles, S. (2011). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity*, **106:** 817-824.

Cummins, I., Bryant, D.N. and Edwards, R. (2009). Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Biotechnology Journal*, **7:** 807-820.

Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R. (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *The Plant Journal*, **18:** 285-292.

Cummins, I., Wortley, D.J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C.R., Straker, H.E., Sellars, J.D., Knight, K., Edwards, L. and Hughes, D. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110:** 5812-5817.

Dayan, F.E., Daga, P.R., Duke, S.O., Lee, R.M., Tranel, P.J. and Doerksen, R.J. (2010). Biochemical and structural consequences of a glycine deletion in the α-8 helix of protoporphyrinogen oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1804:** 1548-1556.

Délye, C. (2013). Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science*, **69:** 176-187.

Délye, C., Jasieniuk, M. and Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, **29:** 649-658.

Délye, C., Menchari, Y., Michel, S. and Darmency, H. (2004). Molecular bases for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail. *Plant Physiology*, **136:** 3920-3932.

Délye, C., Zhang, X.Q., Michel, S., Matéjicek, A. and Powles, S.B. (2005). Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiology*, **137:** 794-806.

Dong, H., Wang, D., Bai, Z., Yuan, Y., Yang, W., Zhang, Y., Ni, H. and Jiang, L. (2020). Generation of imidazolinone herbicide resistant trait in Arabidopsis. *Plos One*, **15:** e0233503.

Doyle, J.J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19:** 11-15.

FAOSTAT. (2018). FAOSTAT statistical database. http://faostat.fao.org. Accessed 10 January 2022.

Gaines, T.A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S.T., Shaner, D.L., Nissen, S.J., Patzoldt, W.L., Tranel, P.J. and Culpepper, A.S. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107:** 1029-1034.

Gaur, P., Jukanti, A., Samineni, S., Chaturvedi, S., Singh, S., Tripathi, S., Singh, I., Singh, G., Das, T. and Aski, M. (2013). Large genetic variability in chickpea for tolerance to herbicides imazethapyr and metribuzin. *Agronomy*, **3:** 524-536.

Gupta, M., Bindra, S., Sood, A., Singh, I., Singh, G., Gaur, P., Chaturvedi, S., Dixit, G. and Singh, S. (2018). Identifying new sources of tolerance to post emergence herbicides in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Legumes*, **31:** 5-9.

Han, H., Yu, Q., Purba, E., Li, M., Walsh, M., Friesen, S. and Powles, S.B. (2012). A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. *Pest Management Science*, **68:** 1164-1170.

Iquebal, M.A., Soren, K.R., Gangwar, P., Shanmugavadivel, P., Aravind, K., Singla, D., Jaiswal, S., Jasrotia, R.S., Chaturvedi, S.K .and Singh, N.P. (2017). Discovery of putative herbicide resistance genes and its regulatory network in chickpea using transcriptome sequencing. *Frontiers in Plant Science*, **8:** 958.

Jefferies, L. (2014). *Responses of selected chickpea cultivars to imidazoline herbicide*. M.Sc. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canada.

Linda, P., Kim, Y.S. and Tong, L. (2010). Mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by pinoxaden. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107:** 22072-22077.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

Lyon, D.J .and Wilson, R.G. (2005). Chemical weed control in dryland and irrigated chickpea. *Weed Technology*, **19:** 959-965.

Mithila, J., McLean, M.D., Chen, S. and Christopher Hall, J. (2012). Development of near-isogenic lines and identification of markers linked to auxinic herbicide resistance in wild mustard (*Sinapis arvensis* L.). *Pest Management Science*, **68:** 548-556.

Patzoldt, W.L., Hager, A.G., McCormick, J.S. and Tranel, P.J. (2006). A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103:** 12329-12334.

Petit, C., Bay, G., Pernin, F. and Delye, C. (2010). Prevalence of cross-or multiple resistance to the acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (Alopecurus myosuroides Huds.) in France. *Pest Management Science*, **66:** 168-177.

Powles, S.B. (2018). *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. CRC Press, FL, USA.

Prakash, N.R., Singh, R.K., Chauhan, S ,.Sharma, M.K., Bharadwaj, C., Hegde, V., Jain, P., Gaur, P. and Tripathi, S. (2017). Tolerance to post-emergence herbicide Imazethapyr in chickpea. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, **77:** 400-407.

Rekha, K.B., Jayalakshmi, V., T., Srinivas, M.S.R. and Umamaheswari, P. (2017). Genetic variability for selective tolerance to imazethpyr in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Legumes*, **30:** 30-35.

Rizwan, M. and Akhtar, S. (2015). Development of herbicide resistant crops through induced mutations. *Advancements in Life Sciences*, **3:** 01-08.

Salas, R.A., Dayan, F.E., Pan, Z., Watson, S.B., Dickson, J.W., Scott, R.C. and Burgos, N.R. (2012). EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum) from Arkansas. *Pest Management Science*, **68:** 1223-1230.

Sathasivan, K., Haughn, G.W. and Murai, N. (1991). Molecular basis of imidazolinone herbicide resistance in *Arabidopsis thaliana* var Columbia. *Plant Physiology*, **97:** 1044-1050.

Shabani, A., Zebarjadi, A., Mostafaei, A., Mohsen, S. and Poordad, S.S. (2016). Identification of drought stress responsive proteins in susceptible genotype of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Genetic Researches*, **3(1):** 1-12 (In Persian).

Shaner, D.L., Lindenmeyer, R.B. and Ostlie, M.H. (2012). What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us?. *Pest Management Science*, **68:** 3-9.

Sharma, S. (2017). Genetic Variation for Tolerance to Herbicide Imazethapyr in Lentil (*Lens culinaris* Medik). *Archives of Agronomy and Soil Science*, **64(13):** 1818-1830.

Singh, S., Singh ,I., Kapoor, K., Gaur, P., Chaturvedi, S., Singh, N. and Sandhu, J. (2014) *Chickpea* in *Broadening the Genetic Base of Grain Legumes.* Springer, Berlin Heidelberg, DE.

Tahmasbali, M., Darvishzadeh ,R. and Fayaz Moghaddam, A. (2020). Estimating breeding value of agronomic traits in oriental tobacco genotypes under broomrape stress and normal conditions. *Plant Genetic Researches*, **7(1):** 103-126 (In Persian).

Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K. and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops :history, current status and future. *Pest Management Science*, **61:** 246-257.

Taran, B., Warkentin, T., Vandenberg, A. and Holm, F. (2010). Variation in chickpea germplasm for tolerance to imazethapyr and imazamox herbicides. *Canadian Journal Of Plant Science*, **90:** 139-142.

Toker, C., Uzun, B., Ceylan, F. and Ikten, C. (2014) *Chickpea in Alien Gene Transfer in Crop Plants, Volume II*. Springer, Berlin Heidelberg, DE.

Vencill, W.K., Nichols, R.L., Webster, T.M., Soteres, J.K., Mallory-Smith, C., Burgos, N.R., Johnson, W.G. and McClelland, M.R. (2012). Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. *Weed Science*, **60:** 2-30.

Wang, J.G., Lee, P.K.M., Dong, Y.H., Pang, S.S., Duggleby, R.G., Li, Z.M. and Guddat, L.W. (2009). Crystal structures of two novel sulfonylurea herbicides in complex with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *The FEBS Journal*, **276:** 1282-1290.

Wexler, P., Anderson, B.D., Gad, S.C., Hakkinen, P.B., Kamrin, M., De Peyster, A., Locey, B., Pope, C., Mehendale, H.M. and Shugart, L.R. (2014) *Encyclopedia of Toxicology*. Academic Press, US National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA.

Yadav, S.S. and Chen, W. (2007) *Chickpea Breeding and Management*. CABI, Wallingford, UK.

Yasin, J., Al-Thahabi, S., Abu-Irmaileh ,B., Saxena, M. and Haddad, N. (1995). Chemical weed-control in chickpea and lentil. *International Journal of Pest Management*, **41:** 60-65.

Yu, Q., Collavo, A., Zheng, M.-Q., Owen, M., Sattin, M. and Powles, S.B. (2007). Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant Lolium populations: evaluation using clethodim. *Plant Physiology*, **145:** 547-558.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

Investigating The Genetic Resistance of Some Iranian Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars to Pursuit Herbicide

Seyyed Mohsen Sohrabi[1] and Seyed Karim Mousavi[2,*]

1-Assistant Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2-Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Lorestan Agricultural and Natural Resources, Research and Education Center, AREEO, Khorramabad, Iran

(Received: November 26, 2022 – Accepted: March 7, 2023)

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is one of the most important crops in the world. After bean and pea, chickpea is the most important cold season legume. Weeds are one of the most important threats to chickpea production worldwide. Due to the sensitivity of chickpea to herbicides, the majority of herbicides are used pre-emergence and the use of post-emergence herbicides is limited, and therefore weeds cause a significant decrease in chickpea yield. Therefore, herbicide-tolerant chickpea cultivars that have a higher flexibility for post-emergence herbicide application are needed to improve the chickpea yield. In this study, using seed bioassay and PCR method, resistance mechanism of Iranian chickpea cultivars to Pursuit herbicide was investigated. The results showed a significant genotypic and phenotypic variation among Iranian chickpea cultivars for tolerance to the Pursuit herbicide. The results did not show a difference between the target genes of Pursuit herbicide, ALS1 and ALS2, in all investigated cultivars with that of the reference sequences in the GenBank. This proves that the resistance observed in different chickpea cultivars to the herbicide Pursuit is not associated with the target site resistance mechanism and probably follows a non-target resistance mechanism. The superior genotypes of this study (Bivanij, Aksou, Mansour, TDS-Maragheh90-400 and TDS-Maragheh90-358) can be recommended to farmers and also suggested as parents to produce natural herbicide resistant chickpea plants in breeding programs.

Keywords: Resistant cultivars, Target proteins, Post-emergence herbicides, Weeds, Target site resistance

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.8.1]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.8]

* **Corresponding Author, E-mail: k.mousavi@areeo.ac.ir**