نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد یازدهم، شماره ۱(۴۱)، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۱۴۲-۱۲۷

بررسی مقاومت جمعیت‌های خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.) به علف‌کش تری بنورون متیل

مهدی افشاری[۱]، علی قنبری[۲*]، مهدی راستگو[۲]، جاوید قرخلو[۳] و گودرز احمدوند[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۹ **تاریخ بازنگری: ۱۳۹۵/۳/۲۴** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۴**

چکیده

تری بنورون متیل از علف‌کش‌های رایج برای کنترل علف‌های‌هرز پهن‌برگ در مزارع گندم می‌باشد. در این آزمایش واکنش علف‌های‌هرز مشکوک به مقاومت مزارع گندم، ۳۸ مزرعه از استان کرمانشاه در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفت. بذور خردل وحشی مشکوک به مقاومت از مزارع جمع‌آوری و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. در جهت تشخیص سریع بروز مقاومت جمعیت‌ها با مصرف دز تفکیک‌کننده علف‌کش تری بنورون متیل غربال اولیه شدند. تعیین درجه مقاومت سپس به کمک آزمون زیست سنجی با استفاده از منحنی‌های دز-پاسخ انجام گردید. برای بررسی مکانیزم مقاومت از روش‌های مولکولی، به‌ویژه از کلون ژن ALS با ناقل PJET1.2/blunt استفاده شد. طبق نتایج آزمایش تفکیک دز، ۱۰/۴ گرم ماده مؤثر در هکتار، جمعیت‌های حساس خردل وحشی را به میزان ۹۰ درصد کنترل کرد. در آزمایش‌های غربال‌گری نیز ۵۰ درصد از جمعیت‌ها به‌عنوان جمعیت مقاوم شناسایی شدند که بر اساس روش بکی و تاردیف، ۵۷/۸ درصد از آنها دارای درجه مقاومت خیلی بالا، ۳۱/۵ درصد از آنها به‌عنوان جمعیت‌هایی با درجه مقاومت بالا و ۱۰/۵ درصد دارای مقاومت کم شناسایی شدند. همچنین، GR_{50} علف‌های هرز مقاوم در مقایسه با علف‌هرز حساس افزایش یافت که بیانگر وجود مقاومت در این استان می‌باشد، به‌طوری‌که برای کنترل جمعیت مقاوم Z_{15}، این مقدار به ۱۳۰۹ گرم ماده مؤثر در هکتار افزایش یافت. توالی‌یابی DNA خردل وحشی نیز نشان داد که جهش در موقعیت آلانین ۱۲۲ با جایگزینی اسید آمینه پرولین سبب بروز مقاومت از نوع جهش مبتنی بر محل هدف شده است.

واژگان کلیدی: توالی یابی DNA، جهش، دز-پاسخ، ژن استولاکتات سینتاز، ناقل PJET1.2/blunt.

۱- دانشجوی دکتری علوم علف‌های هرز، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- دانشیار دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.(* نگارنده‌ی مسئول) ghambari@um.ac.ir
۳- دانشیار دانشگاه گرگان، گرگان، ایران.
۴- دانشیار دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران.

مقدمه

علف‌کش‌ها به عنوان یکی از اجزای مهم مدیریت تلفیقی علف‌های هرز در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و در طی دهه‌های گذشته به‌عنوان مؤثرترین ابزار کنترل علف‌های‌هرز شناخته شده‌اند (Beffa *et al.*, 2012). استفاده مکرر از علف‌کش‌هایی با جایگاه عمل مشابه و جایگاه‌های عمل محدود (Beffa *et al.*, 2012) سبب توسعه مقاومت به علف‌کش‌ها می‌شود و کنترل علف‌های هرز را مشکل‌تر می‌نماید. از اولین گزارش مقاومت به علف‌کش توفوردی در سال ۱۹۵۷ به هویج وحشی *Daucus carota* L. (Switzer, 1957)، مقاومت به علف‌کش‌ها به بیش از ۲۰۰ گونه در سرتاسر جهان با حداقل ۳۰ جایگاه عمل گسترش یافته است (Heap, 2016). مکانیزم مسئول بروز مقاومت به بازدارنده‌های ALS از طریق تغییر جایگاه آنزیم ALS و افزایش متابولیسم علف‌کش‌ها سبب بـروز مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده ALS می‌شود (Saari *et al.*, 1994). اخیراً گزارش شده که با جایگزینی تیروزین به جای آلانین ۱۲۲ در ژن ALS مقاومت بالایی به علف‌کش‌های سولفونیل‌اوره (بیشتر از ۱۰۰۰برابر)، تریازولوپیریمیدین‌ها (بیشتر از ۵۰۰ برابر) و ایمیدازولینون‌ها (بیشتر از ۱۶ برابر) به وجود می‌آید (Han *et al*, 2012). در تربچه وحشی (*Raphanus raphanistrum* L.)، جهش در گیاهان هموزیگوس و جایگزینی گلوتامین به جای آسپارتیک اسید ۳۷۶ دارای مقاومت بالایی (بیشتر از ۱۰۰ برابر) به علف‌کش‌های سولفونیل اوره و تریازولوپیریمیدین‌ها، و دارای مقاومت حد واسطی (کمتر مساوی ۱۰ برابر) به علف‌کش‌های ایمیدازولینون (ایمازاماکس و ایمازاتاپیر) بودند، در حالی‌که به علف‌کش ایمیدازولینونی ایمازاپیر حساس بودند (Yu *et al*, 2012).

تشخیص دقیق و به‌موقع مقاومت، نقش مهمی در مدیریت مقاومت به علف‌کش‌ها و به تعویق انداختن آن دارد. به طور مطلوب تولیدکننده‌گان باید مزارع تولید محصولات کشاورزی را با مدیریت مناسب به سمت تاخیر در ایجاد مقاومت به علف‌کش‌ها یا جلوگیری از به وجود آمدن گونه‌های مقاوم سوق دهند (Burgos *et al.*, 2013). در واقع تولید کننده‌گان محصولات کشاورزی به جای این‌که به عملیات‌های تلفیقی کنترل علف‌های‌هرز بیندیشند و از برنامه‌های پایش علف‌های هرز استفاده کنند و مقاومت به علف‌کش‌ها را سریع تشخیص دهند، به اتخاذ روش‌های راحت و اقتصادی برای تولید محصولات فکر می‌کنند (Burgos *et al.*, 2013).

با توجه به غالبیت خردل وحشی در مزارع گندم کرمانشاه، قدرت رقابتی بالای خردل وحشی با گندم و کاهش محسوس عملکرد گندم و ابراز نارضایتی مردم منطقه از کنترل عف‌هرز خردل وحشی توسط علف‌کش‌های رایج از جمله تری بنورون متیل، زمینه بررسی مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل از بازدارنده‌های آنزیم استولاکتات سینتاز را در این تحقیق به‌منظور پایش مزرعه‌ای استقرار مقاومت، ارزیابی سطوح مقاومت و بررسی مکانیزم مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل با روش‌های رایج و مولکولی به‌ویژه روش کلون PCR[1] (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) و انتقال ژن خردل وحشی در باکتری DH5α و انتقال به نافل PJET1.2/blunt به‌عنوان یک روش سریع، کارآمد و دقیق را فراهم آورد.

۱ - polymerase chain reaction

مواد و روش‌ها

مطالعات مزرعه‌ای

بررسی‌های مزرعه‌ای برای اثبات مقاومت علف‌های هرز مشکوک به مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل با بررسی مزارعی با سابقه مصرف حداقل ۵ تا ۷ سال از شهرستان‌های سرپل دهاب، قصرشیرین، گیلان‌غرب و کرمانشاه انجام شد. انتخاب مزارع سم‌پاشی نشده جهت جمع‌آوری بذور حساس در مزارع گندم انجام و نمونه‌گیری با الگوی W بر اساس روش پیشنهادی توماس (Thomas, 1985) انجام گرفت.

تعیین دز تفکیک کننده

آزمایش‌های تعیین دز تفکیک کننده، به صورت طرح بلوک کامل تصادفی با شش تکرار در گلخانه انجام شد. علف‌های‌هرز در مرحله ۴-۲ برگی (Beckie *et al.*, 2000) با نسبت‌های کسری (صفر، ۱/۳۲، ۱/۱۶، ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲، ۱ و ۲ برابر دز توصیه شده علف‌کش تری بنورون متیل (۲۰گرم در هکتار) (Granestar 75% DF, 750 g ai. Kg^{-1} tribenuron-methyl, DF, DuPont, France) با دستگاه سم‌پاش پشتی شارژری (مدل ماتابی الگانس پلاس) با نازل بادبزنی یکنواخت زرد رنگ (۸۰۰۲) و فشار ۲۰۰ کیلو پاسکال که بر اساس پاشش ۲۹۰ لیتر محلول سم در هکتار کالیبره شده بود، سم‌پاشی شدند (8002 Tee-jet; Spraying Systems Co., Wheaton, IL). سپس، اندازه‌گیری‌های لازم شامل، شمارش تعداد گیاهان زنده مانده در هر گلدان و اندازه‌گیری وزن خشک بوته‌های زنده مانده، ۲۸ روز پس از سم‌پاشی صورت گرفت.

غربال اولیه جمعیت‌های خردل وحشی

به‌منظور غربال اولیه جمعیت‌های مشکوک به مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل، با استفاده از دز تفکیک‌کننده علف‌کش تری‌بنورون متیل، آزمایش گلدانی به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه انجام شد. کلیه مراحل مشابه روش انجام شده در آزمایش تفکیک دز انجام گرفت و به منظور محاسبه آنها از معادلات (۱) و (۲) استفاده شد.

$$Y=N_1/N_0\times100 \qquad \text{معادله (۱)}$$

که در آن Y: درصد گیاهان زنده مانده پس از سم‌پاشی، N_1: تعداد گیاهان زنده مانده پس از سم‌پاشی و N_0: تعداد گیاهان قبل از سم‌پاشی می‌باشد.

$$Y=W_t/W_c\times100 \qquad \text{معادله (۲)}$$

که در آن Y: درصد وزن خشک گیاهان زنده مانده پس از سم‌پاشی نسبت به شاهد بدون علف‌کش، W_t: وزن خشک گیاهان زنده مانده پس از سم‌پاشی و W_c: وزن خشک گیاهان سم‌پاشی نشده است.

آزمایش‌های زیست سنجی در گلدان با استفاده از منحنی های دز-پاسخ

به‌منظور تعیین درجه مقاومت جمعیت‌های مقاوم به دز تفکیک‌کننده علف‌کش تری بنورون متیل، پس از اجرای آزمایش‌های غربال اولیه، جمعیت‌هایی با حداقل ۸۰ درصد بقاء، حفظ ۵۰ درصد وزن خشک و کسب نمره بیش از شش در ارزیابی چشمی بر اساس روش سیستم استاندارد اروپایی EWRC[1] (Beckie *et al.*, 2000)، به عنوان جمعیت‌های مقاوم در نظر گرفته شدند و به همراه جمعیت‌های حساس در آزمایش واکنش به دز برای هر جمعیت به‌صورت جداگانه ولی همزمان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار و ۱۱ دز (صفر، ۱/۱۶، ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲، ۱،

۱ - European Weed Research Council

۲، ۴، ۸ ، ۱۶،۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ برابر دز تفکیک کننده بر حسب گرم ماده مؤثره در هکتار) قرار گرفتند، تا با استفاده از ارزیابی منحنی‌های دز-پاسخ (شکل ۱) جمعیت‌های حساس و مقاوم، درجه یا فاکتور مقاومت هر یک از جمعیت‌های مشکوک به مقاومت نسبت به جمعیت حساس مشخص شود (معادله۳).

$$RF = \frac{GR50(R)}{GR50(S)}$$ معادله (۳)

که در آن RF: درجه مقاومت جمعیت مورد نظر، GR_{50} (R) و GR_{50} (R) دزی از علف‌کش که به‌ترتیب سبب اعمال ۵۰ درصد اثر بازدارندگی روی جمعیت‌های مقاوم و حساس می‌کند.

جهت تجـزیه و تحلیل داده‌های آزمایش‌های زیست سنجی از تجـزیه رگرسیونی با معادله‌های سه پارامتره (معادله ۴) و چهار پارامتره (معادله ۵) استفاده شد (Streibig *et al.*, 1993).

$$y = d\exp\{-\exp\{b(\log(x) - e)\}\}$$ معادله (۴)

$$y = c + (d - c)\exp\{-\exp\{b(\log(x) - e)\}\}$$ معادله(۵)

که در آنها Y: میزان پاسخ (درصد نسبت به شاهد) در دز، X: دز علف‌کش، d: حد بالای منحنی، c: حد پایین منحنی، b: شیب منحنی در نقطه GR_{50} و e: میزان GR_{50} می‌باشد.

تعیین مکانیزم مقاومت به علف‌کش‌ها

به‌منظور مطالعه ۸۳۵ جفت باز از ۱۷۳۰ جفت باز گیاه خردل وحشی استخراج DNA با روش دلاپورتا (Dellaporta *et al*, 1983) صورت گرفت. تهیه مخلوط واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق شرکت سازنده (شرکت سیناژن) با استفاده از کیت انجام شد. آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱) مورد استفاده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز طراحی شدند. تخلیص DNA مطابق با روش آزمایشگاه لامیتینا دانشگاه پنسیلوانیا (۲۰۰۷) انجام شد. همسانه‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت CloneJETTM PCR Cloning شرکت فرمنتاز (http://ir.thermofisher.com) انجام شد.

تهیه سلول های مستعد مطابق با روش سمبروک و همکاران (Sambrook *et al*, 1989) با کمی تغییر انجام شد. بعد از شناسایی کلنی‌های نوترکیب با روش کلنی PCR، به‌منظور تایید نوترکیبی از واکنش PCR با آغازگرهای یونیورسال pJET1.2F و pJET1.2R که در کیت وجود داشت، استفاده شد (طبق دستورالعمل شرکت دنا زیست آسیا). DENAzist Asia, Mashhad, Iran. Available at: http://www.denazist.com استخراج پلاسمید از باکتری DH5α با کیت NC (طبق دستورالعمل شرکت دنا زیست آسیا) انجام شد. تـوالی‌یابی DNA در شـرکت ماکـروژن کره‌جنوبی صورت گرفت.

تجزیه، تحلیل و ترسیم نمودارهای زیست سنجی در گلدان توسط نرم‌افزار R و بسته نرم افزاری drc نسخه ۲.۰.۱ انجام شد. طراحی پرایمر با نرم‌افزار Vector NTI ver8.0 انجام شد. الاین یا هم‌ردیفی توالی با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit انجام شد و در نرم‌افزار BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

ترجمه توالی‌ها به اسیدهای آمینه یا پروتیین، تغییر فرمت نمونه‌ها به فرمت فستا، انتخاب بهترین فریم (طویل‌ترین فریم یا ORF) برای بلاست پروتیین‌ها و تعیین محل‌های فعال در ژن ALS و مشخص کردن جهش‌های مؤثر و غیرمؤثر از نرم افزارهای آنلاین قابل دسترس در سایت‌های http://www.ebi.ac.uk/interpro و http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss

استفاده شد. برای تعیین نقاط حفاظت شده نیز از نرم‌افزار آنلاین M-Coffee در سایت http://www.tcoffee.org استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل مطالعات مزرعه‌ای و دز تفکیک کننده

بر اساس مطالعات انجام شده توسط ویسی و همکاران (Veisi *et al.*, 2012)، علف‌هرزِ خردلِ وحشی در شهرستان‌های قصرشیرین، هرسین، گیلان‌غرب، کنگاور، کرمانشاه، صحنه و سرپل ذهاب مطرح می‌باشد. لذا بر اساس تجزیه و تحلیل اطلاعات فوق، شروع به جمع‌آوری بذور مشکوک به مقاومت از شهرستان‌های سرپل ذهاب (۲۰)، گیلان‌غرب (۶)، قصر شیرین (۶) و کرمانشاه (۶) به‌ترتیب سابقه مصرف علف‌کش و نارضایتی کشاورزان و پراکنش آنها به‌صورت یکنواخت و لکه‌ای اقدام به نمونه‌برداری شد و موقعیت جغرافیایی مکان‌های نمونه‌برداری شده با دستگاه GPS ثبت شد (از آوردن داده‌ها خودداری شده است). با توجه به متفاوت بودن دز مصرفی علف‌کش‌ها در گلخانه در مقایسه با مزرعه، مقادیر دز تفکیک‌کننده علف‌کش تری بنورون متیل با استفاده از تابع گامپرتز سه پارامتره برای وزن خشک علف هرز خردل وحشی محاسبه شد. نتایج تفکیک دز نشان داد که دز تفکیک کننده علف‌کش تری بنورون متیل در گلخانه $۱۰/۴ g\ a.i\ ha^{-1}$ بود، به‌طوری که تقریباً یک سوم علف‌کش توصیه شده در مزرعه قادر به کنترل ۹۰ درصدی خردل وحشی حساس در شرایط گلخانه بود (جدول ۲).

آزمایش غربال اولیه جمعیت‌های خردل وحشی

برای اطمینان از مقاوم بودن بذور مشکوک به مقاومت خردل وحشی و اطلاع از درصد آلودگی مزارع به مقاومت، نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع در آزمایش‌های گلخانه‌ای، بر اساس درصد زنده‌مانی از شاهد و کاهش وزن خشک به صورت درصد از شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود جمعیت‌های Z_7, GI_4, S, Z_1, Z_2, Z_5, k_1,Z_6, k_2, k_3, k_4, k_5, k_6, GI_1, GI_4, GA_1, GA_2,GA_3, GA_4, GA_5 و GA_6 به دز تفکیک کننده حساسیت نشان دادند (جمعیت‌های هاشور خورده) و سایر جمعیت‌های GI_2, GI_3, GI_5, GI_6, Z_{11}, Z_{12},Z_{13}, Z_{14}, Z_{15}, Z_{16}, Z_{17}, Z_{18}, Z_{19}, Z_{20}, Z_4, Z_8, Z_9, Z_{10}و Z_3 مشکوک به مقاومت بودند. لذا جمعیت‌های مذکور طبق نتایج موس و همکاران (Moss *et al.*, 2007) به‌عنوان جمعیت‌های مشکوک به مقاومت در نظر گرفته شدند.

طبق نتایج فوق، بیشترین جمعیت‌های مشکوک به مقاومت به تری بنورون متیل در شهرستان سرپل ذهاب وجود داشت، به‌طوری که از ۲۰ مزرعه نمونه‌برداری شده، ۱۵ مزرعه (۷۵ درصد) دارای جمعیت‌های مشکوک به مقاومت به علف‌کش تری بنورون متیل بودند. همچنین، از ۶ مزرعه نمونه‌برداری شده از شهرستان گیلان‌غرب، ۴ مزرعه (۶۶/۶ درصد) دارای جمعیت‌های مشکوک به مقاومت به علف‌کش تری بنورون متیل بودند. در ضمن جمعیت‌های شهرستان‌های قصرشیرین و کرمانشاه به علف‌کش تری بنورون متیل حساس بودند که جمعیت‌های کرمانشاه از حساسیت بالایی در مقایسه با جمعیت‌های قصرشیرین برخوردار بودند (جدول ۳).

لذا طبق نتایج فوق و نتایج ویسی و همکاران (Veisi *et al.*, 2014) که درصد فراوانی و شاخص غالبیت خردل وحشی را در سال ۲۰۰۲ به‌ترتیب ۱۹/۵ و ۳۴/۸ درصد و در سال ۲۰۱۰ به‌ترتیب ۳۱/۱ و ۵۴/۸ درصد در استان کرمانشاه بیان کرد

و با توجه به اینکه اکثـر مزارع دارای پراکنش لکه‌ای می‌باشند، احتمال گسترش علف‌های هرز مقاوم در شهرستان‌های سرپل ذهاب و گیلان‌غرب بالا است و در شهرستان قصرشیرین نیز در مراحل ابتدایی می‌باشد. لذا، چنانچه روند گسترش مقاومت به علف‌کش‌ها مدیریت نشود، در آینده‌ای نزدیک شاهد روند گسترش مقاومت در تمامی شهرستان‌های کرمانشاه خواهیم بود.

با توجه به اینکه خردل وحشی گیاهی دگرگشن می‌باشد و کشاورزان در استقاده از ماشین‌های برداشت گندم، ماشین‌های برداشت را تمیز نمی‌کنند، این احتمال وجود دارد که بذور خردل وحشی از مزرعه‌ای به مزرعه دیگر و از شهرستانی به شهرستانی دیگر و حتی با عدم همزمانی فصل برداشت غلات و تردد ماشین‌های برداشت در سرتاسر کشور شاهد گسترش روز افزون مزارع کشور با مشکل جـدی مقـاومت علف‌های‌هرز نسبت به علف‌کش‌ها باشیم. بنابراین، با توجه به نقش و جایگاه عمده گندم در کشور و اهمیت اقتصادی و استراتژیک آن و بحران کم آبی در کشور لازم به نظر می‌رسد که در روش‌های مدیریت آن تجدید نظر اساسی صورت گیرد و از روش‌های تلفیقی مدیریت علف‌های‌هرز در این زمینه استقبال شود.

ضمناً با توجه به بروز مقاومت زود هنگام به علف‌کش تری بنورون متیل به دلیل کاربرد ۲۵ ساله (Zand *et al.*, 2012) آن در مزارع کشور ثبت علف‌کش‌هایی از سایر گروه‌های بازدارنده‌های ALS و سایر خانواده‌های شیمیایی و نهادینه کردن استفاده از روش‌های تلفیقی مانند تناوب زراعی و آیش در به تاخیر انداختن مقاومت نقش مؤثرتری ایفا خواهند نمود.

زیست سنجی در گلدان با استفاده از منحنی های دز-پاسخ

نتایج حاصل از تجزیه رگرسیونی با معادلات سه و چهار پارامتره گامپرتز بیانگر عدم معنی‌داری آزمون عدم برازش در تمامی جمعیت‌ها و صحت معادلات برازش داده بود (جدول ۴ و شکل ۱). به طوری که جمعیت‌های S, Z_1, Z_2, Z_5, Z_6, Z_7, GA_1, GA_2, GA_3, GA_4, GA_5, GA_6, GI_1, GI_4 با بیشترین شیب منحنی در منحنی دز-پاسخ دارای حساسیت بالا به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل (جدول ۴ و شکل ۱)، و جمعیت‌های Z_3,Z_4 , Z_8, Z_9, Z_{10}, Z_{11}, Z_{12}, Z_{13}, Z_{14}, Z_{15}, Z_{16}, Z_{17} , Z_{18}, Z_{19}, Z_{20}, GI_2 و GI_3 با شیب منحنی کمتر، درجات بالایی از مقاومت را نسبت به علف‌کش تری بنورون متیل نشان دادند (جدول ۴ و شکل ۱). با وجود اینکه نتایج حاصل از آزمون غربال اولیه نشان دهنده احتمال بروز مقاومت در جمعیت‌ها می‌باشد، اما برای تایید آن انجام آزمایش‌های دز-پاسخ یک امر ضروری به نظـر می‌رسد (Gherekhloo, 2008) و یکی از مرسوم‌ترین روش‌ها برای اثبات مقاومت به علف‌کش‌ها استفاده از روش دز-پاسخ است (Beckie *et al.*, 2000). طبق نتایج آزمایش‌های دز-پاسخ وزن خشک علف‌هرز خردل وحشی با افزایش دز علف‌کش، طی یک روند سیگموئیدی و با تابعیت از تابع گامپرتز یک روند کاهشی را طی کرد. قرخلو (Gherekhloo, 2008) نیز نتایج مشابهی گرفت و گزارش نمود که وزن خشک علف‌هرز یولاف وحشی مقـاوم با افـزایش دز علف‌کش کاهش می‌یابد. همچنین، اختلاف معنی‌داری بین جمعیت‌های مقاوم به علف‌کش و جمعیت‌های حساس مشاهده شد و جمعیت‌های Z_8 و GI_2 با حدود اطمینان ۸۵ درصدی تفاوت معنی‌داری با

جمعیت حساس نداشتند و اختلاف جمعیت‌های GI_5 و GI_6 نیز با جمعیت حساس معنی‌دار نشد (جدول ۵). اختلاف بین منحنی‌های دز-پاسخ جمعیت‌های مختلف بیانگر وجود اختلاف بین درجات مقاومت جمعیت‌ها می‌باشد که پارامترهای به‌دست آمده از توابع گامپرتز و مقایسه آماری آنها نیز مؤید این اختلاف می‌باشد (جدول ۴). همچنین، نتایج آزمایش دز-پاسخ به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل نشان داد که میزان علف‌کشی که لازم است وزن خشک جمعیت‌های مقاوم را در مقایسه با جمعیت حساس که مقدار آن۵/۰۴ گرم ماده مؤثره در هکتار می‌باشد، به میزان ۵۰ درصد کاهش دهد (GR_{50}) به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. به‌طوری‌که، این مقدار به‌ترتیب در جمعیت‌های (Z_3,Z_4 , Z_8, Z_9, Z_{10}, Z_{11}, Z_{12}, Z_{13} , Z_{14}, Z_{15}, Z_{16}, Z_{17} , Z_{18} , Z_{19}, Z_{20}, GI_2, GI_3، GI_5 و GI_6) ۴۶۹/۹، ۶۷/۳، ۳۴۲/۹، ۵۸۴/۴، ۵۴۹/۹، ۷۱۱، ۱۰۴۸/۱، ۳۶۷/۹، ۱۰۹۰/۱، ۱۳۰۹/۲، ۱۰۳۷/۵، ۱۰۷۳/۲، ۴۳۷/۳، ۵۸۳/۰، ۱۱۱۷/۰، ۴۲۹/۰، ۶۲۵/۰، ۴۰/۵و ۴۱/۳ گرم ماده مؤثر در هکتار می‌باشد که این نسبت‌ها از نظر آماری معنی‌دار بوده و بیانگر مقاومت معنی‌دار جمعیت‌های مورد مطالعه در آزمایش می‌باشد (جدول ۴). همچنین، همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، وزن خشک جمعیت حساس طی یک روند سیگموئیدی کاهش یافت که سرعت و شدت آن در جمعیت‌های مختلف مقاوم به علف‌کش با توجه به درجات متفاوت مقاومت متفاوت بود، به‌طوری‌که شروع کاهش در روند سیگموئیدی در جمعیت‌هایی با درجه مقاومت پایین زودتر و در غلظت‌های پایین‌تر اتفاق افتاد (شکل ۱). بنابراین، طبق نتایج آزمایش‌های زیست سنجی می‌توان نتیجه گرفت که اکثر جمعیت‌های جمع‌آوری شده از شهرستان سرپل ذهاب با توجه به سابقه بالای مصرف علف‌کش تری‌بنورون‌متیل، مقاومت در سطح بالایی حادث شده است و در شهرستان گیلان‌غرب نیز در چند سال آینده احتمال مقاومت بالا به تری‌بنورون‌متیل می‌رود.

تعیین درجه‌بندی مقاومت و رتبه‌بندی جمعیت‌های خردل وحشی به علف‌کش تری بنورون متیل

از سیستم رتبه‌بندی بکی و تاردیف (Beckie and Tardif, 2012) به‌منظور رتبه‌بندی جمعیت‌های مقاوم استفاده شد. طبق سیستم رتبه‌بندی بکی و تاردیف (Beckie and Tardif, 2012) جمعیت‌ها در سه گروه قرار گرفتند، به طوری که ۵۷/۸۹ درصد از جمعیت‌ها (Z_9, Z_{10} , Z_{11}, Z_{12}, Z_{14}, Z_{15}, Z_{16}, Z_{17}, Z_{19}, Z_{20} و GI_3) دارای مقاومت خیلی زیاد (VH) و ۳۱/۵۷ درصد از جمعیت‌ها (Z_3, Z_4 , Z_8, Z_{13}, Z_{18} و GI_2) دارای مقاومت بالا (H) و ۱۰/۵ درصد از جمعیت‌ها (GI_5 و GI_6) دارای مقاومت کم به علف‌کش تری-بنورون‌متیل بودند (جدول ۵).

تعیین مکانیزم مقاومت به علف‌کش‌ها

نتایج حاصل از توالی یابی DNA نشان داد که جهش در موقعیت‌های ۱۱۳، ۱۱۷، ۱۲۲ و ۱۲۳ ژن ALS (تطبیق داده شده با گیاه ارابیدوبسیس) صورت گرفته است (شکل ۲). به دلیل گزارش موقعیت ۱۲۲ توسط سایر محققین (Yu and Powles, 2014; Heap, 2016) این موقعیت از ژن به‌عنوان جهش مؤثر تشخیص داده شد.

جهش در موقعیت آلانین ۱۲۲ و جایگزینی اسید آمینه پرولین سبب بروز مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل شده است (شکل ۲). جایگزینی آلانین ۱۲۲ توسط اسیدهای آمینه ترئونین،

تایروزین و والین در گونه‌های مختلف علف‌های هرز نیز توسط محققین به اثبات رسیده است، به طوری‌که در اثر جایگزینی اسیدهای آمینه مختلف به‌جای آلانین ۱۲۲ سبب بروز عکس‌العمل‌های متفاوتی از ژن ALS به بازدارنده‌های استولاکتات سینتاز شده است، به‌طوری‌که جایگزینی تایروزین در موقعیت آلانین ۱۲۲ سبب مقاومت به بازدارنده‌های ایمیدازولینون‌ها، سولفونیل‌اوره‌ها و تریازولوپیریمیدین‌ها شده است و پاسخ آن به علف‌کش‌های پیریمیدینیل تیوبنزوات‌ها و سولفونیل‌آمینوکربونیل تریازولینون‌ها تعیین نشده است (Tranel *et al.*, 2016).

جایگزینی والین به جای آلانین ۱۲۲ سبب بروز مقاومت به علف‌کش‌های ایمیدازولینون‌ها و حساسیت نسبت به بازدارنده‌های تریازولو پیریمیدین‌ها و پیریمیدینیل تیوبنزوات‌ها شده است و پاسخ بازدارنده‌های سولفونیل اوره‌ها و سولفونیل آمینوکربونیل تریازولینون‌ها تعیین نشده است (Tranel *et al.*, 2016).

نتیجه‌گیری کلی

غلظت تفکیک‌کننده در شرایط گلخانه برای علف‌کش تری بنورون متیل ۱۰/۴g a.i ha^{-1} بود. همچنین، GR_{50} علف‌های‌هرز مقاوم در مقایسه با علف‌های‌هرز حساس افزایش یافته است که بیانگر وجود مقاومت در این استان است، به‌طوری‌که برای کنترل جمعیت مقاوم Z_{15}، این مقدار به ۱۳۰۹ گرم ماده مؤثر در هکتار افزایش یافته است. در رتبه‌بندی جمعیت‌ها بر اساس روش بکی و تاردیف علف‌های‌هرز در سه گروه با مقاومت خیلی زیاد، مقاومت بالا و مقاومت کم قرار گرفتند. همچنین، در بررسی مکانیزم مقاومت علف‌کش تری‌بنورون‌متیل با استفاده از کلون ژن خردل وحشی و توالی یابی DNA ژن ALS مشخص شد که جهش از نـوع جهش مبتنی بر محل هدف می‌باشد که اسید امینه پرولین در موقعیت ۱۲۲ جایگزین اسیدامینه آلانین شده است. بنابراین، درک مکانیزم و ژنتیک مقاومت به علف‌کش‌ها می‌تواند به افزایش کارآیی شیوه‌های مدیریتی علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش‌ها منجر شود. همچنین این اطلاعات در تعیین اینکه کـدام علف‌کش‌ها در ترکیب یا تناوب با سایر علف‌کش‌ها به‌منظور جلوگیری از مقاومت مبتنی بر محل هدف یا مبتنی بر متابولیسم مورد استفاده قرار گیرد، بسیار حایز اهمیت است. علاوه بر موارد فوق، این اطلاعات می‌تواند موقعی که علف‌کش جدید در برنامه‌های تلفیقی مدیریت علف‌های هرز مورد استفاده قرار می‌گیرد به‌عنوان یک روش اساسی، شانس مقاومت انتخابی بیوتیپ‌ها را به میزان قابل توجهی کاهش دهد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای توالی ژن ALS

Table 1- Primers utilized to sequence the acetolactase synthase gene

آغازگر Primers	توالی Sequence 3'- 5'
$ALS1_{for.}$	AAACCGTCTTCGCTTACCCAGGAG
$ALS1_{rev.}$	TTAGCCCTGCTAGCAAAAGCCTCG
pJET1.2F	CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC
pJET1.2R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

جدول ۲- مقادیر ED_{90} برآورد شده از تابع گامپرتز سه پارامتره برای وزن خشک جمعیت حساس (S) نسبت به کاربرد علف‌کش تری بنورون متیل به منظور تعیین دز تفکیک کننده

Table 2- Amounts of GR_{90} estimated from the dry weight of the sensitive-populations three Gampertz function parameters for the use of tribenuron-methyl to determine the discriminating dose

علف کش Herbicide	**نحوه تاثیر** Mechanism of action	**فرمولاسیون** Formulation	**دز توصیه شده** Recommended dose (g/ha^{-1})	**دز تفکیک** GR_{90} (g ai ha^{-1}) Discriminanting dose	**آزمون عدم برازش** Lack of fit test
تری بنورون متیل (گرانستار) Tribenuron-methyl(Granestar)	بازدارنده ALS ALS inhibitor	DF75%	15	10.4 (±1.4)	0.4^{ns}

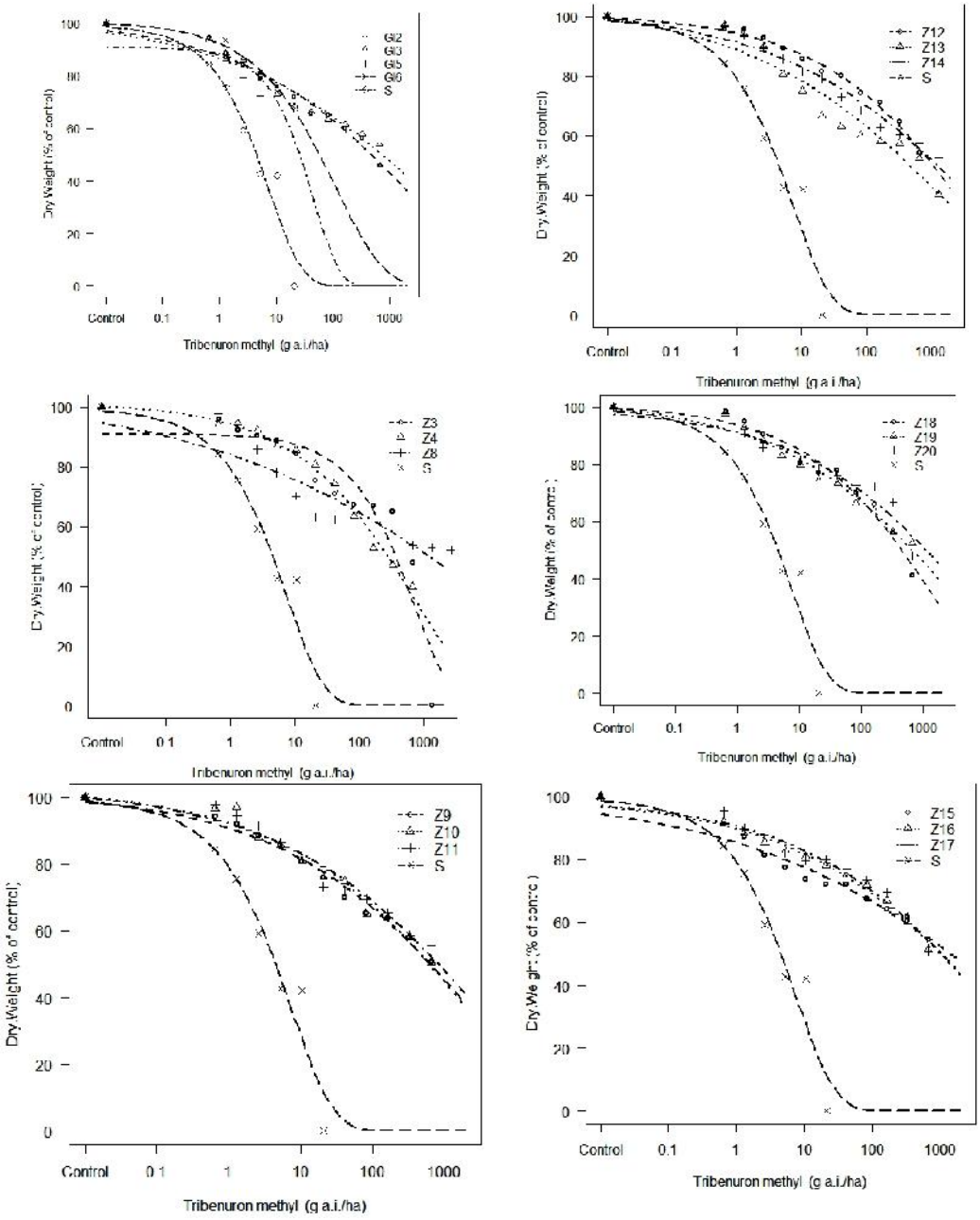
جدول ۳- نتایج آزمایش غربال‌گری جمعیت‌های مشکوک به مقاومت خردل وحشی با دز تفکیک کننده (GR_{90}) علف‌کش تری‌بنورون متیل (پارامترها به صورت درصد از شاهد محاسبه گردیده اند).

Table 3- Results of screening test wild mustard suspected populations resistance of wild mustard with discriminantig dose (GR_{90}) of tribenuron-methyl (Parameters were calculated as a percentage of control)

جمعیت خردل وحشی Wild mustard population	**درصد زنده مانی** (٪شاهد) Survival plant (% of control)	**ماده خشک** (٪شاهد) Dry matter (% of control)	**وزن تر** (٪شاهد) Fresh matter (% of control)	**جمعیت خردل وحشی** Wild mustard population	**درصد زنده مانی** (٪شاهد) Survival plant (% of control)	**ماده خشک** (٪شاهد) Dry matter (% of control)	**وزن تر** (٪شاهد) Fresh matter (% of control)
GI1	0.0	100	100	Z1	25	76.0	75.6
GI2	100	24.0	28.6	Z2	25	76.6	81.2
GI3	100	26.9	20.9	Z3	100	15.5	31.2
GI4	0.0	100	100	Z4	100	14.5	25.3
GI5	75	36.1	40.4	Z5	25	75.8	62.7
GI6	75	26.0	30.2	Z6	50	48.6	58.7
GA1	50	67.5	66.7	Z7	50	68.0	59.8
GA2	50	68.6	73.0	Z8	100	29.8	24.1
GA3	50	62.5	68.0	Z9	100	19.1	17.0
GA4	50	65.4	67.1	Z10	100	19.1	17.0
GA5	50	57.9	66.7	Z11	100	17.3	13.0
GA6	50	60.1	59.6	Z12	100	14.0	15.8
K1	0.0	100	100	Z13	100	25.0	29.7
K2	0.0	100	100	Z14	100	18.5	32.0
K3	0.0	100	100	Z15	100	26.2	11.6
K4	0.0	100	100	Z16	100	18.9	9.2
K5	0.0	100	100	Z17	100	20.4	11.8
K6	0.0	100	100	Z18	100	19.5	15.6
S	0.0	100	100	Z19	100	20.2	13.8
				Z20	100	18.5	11.0

بخش‌های هاشور خورده بیانگر جمعیت‌های حساس و مکان‌های هاشور نخورده بیانگر جمعیت‌های مقاوم خردل وحشی می باشد.

Shaded areas are represent sensitive populations and not hatching places represent are the resistant populations of wild mustard.



شکل ۱- روند پاسخ وزن خشک تک بوته جمعیت‌های مقاوم وحساس به دزهای مختلف علف‌کش تری بنورون متیل در آزمایش‌های زیست سنجی در گلدان

Figure 1- The response of the dry weight of resistant and susceptible populations to different concentrations of tribenuron-methyl in the bioassay tests in plot

جدول ۴- پارامترهای به دست آمده از برازش توابع سه و چهار پارامتره گامپرتز به مقادیر وزن خشک جمعیت‌های مقاوم و حساس به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل چهارهفته پس از سم‌پاشی

Table 4- Parameter estimates of Gompertz equation three and four parameters functions fitted to shoot dry weight of susceptible and resistant of wild mustard population to tribenuron-methyl herbicide four weeks after spraying

جمعیت Population	شیب منحنی Curve slope	حد بالا Upper limit	حد پایین Lower limit	GR_{50} (g ai ha^{-1})	آزمون عدم برازش Lack of fit test
Z3	0.42 (±0.07)	1.37 (±0.05)	–	469.91 (±98.23)	0.05^{ns}
Z4	0.57 (±0.16)	1.35 (±0.05)	0.47 (±0.15)	67.36 (±33.60)	0.99^{ns}
Z8	0.58 (±0.09)	1.42 (±0.04)	–	342.91 (±54.73)	0.97^{ns}
Z9	0.28 (±0.04)	1.41 (±0.05)	–	584.49 (±195.08)	0.99^{ns}
Z10	0.29 (±0.04)	1.42 (±0.05)	–	549.93 (±169.32)	0.93^{ns}
Z11	0.27 (±0.05)	1.58 (±0.07)	–	711.02 (±292.11)	0.94^{ns}
Z12	0.34 (±0.08)	1.54 (±0.06)	–	1048.13 (±409.53)	0.99^{ns}
Z13	0.24 (±0.03)	1.56 (±0.07)	–	367.91 (±142.12)	0.56^{ns}
Z14	0.24 (±0.03)	1.53 (±0.05)	–	1090.1 (±361.64)	0.97^{ns}
Z15	0.19 (±0.02)	1.63 (±0.04)	–	1309.2 (±513.54)	0.74^{ns}
Z16	0.28 (±0.07)	1.53 (±۰0.07)	–	1037.54 (±461.84)	0.99^{ns}
Z17	0.28 (±0.06)	1.61 (±0.07)	–	1073.26 (±425.4)	0.94^{ns}
Z18	0.37 (±0.06)	1.52 (±0.05)	–	437.36 (±97.32)	0.85^{ns}
Z19	0.27 (±0.03)	1.56 (±0.05)	–	583.05 (±167.53)	0.83^{ns}
Z20	0.28 (±0.05)	1.52 (±0.05)	–	1117.08 (±383.85)	0.37^{ns}
GI2	0.25 (±0.03)	1.57 (±0.05)	–	429.08(±123.44)	0.84^{ns}
GI3	0.22 (±0.05)	1.29 (±0.08)	–	625.04 (±460.36)	0.98^{ns}
GI5	0.40 (±0.07)	1.3 (±0.05)	–	40.5 (±10.52)	0.9^{ns}
GI6	0.59 (±0.19)	1.17 (±0.03)	–	41.39 (±21.81)	0.91^{ns}
S	0.55(±0.09)	1.04 (±0.04)	–	5.04 (±0.99)	0.17^{ns}

GR_{50} value is the tribenuron-methyl concentration that reduced dry weight by 50%
ns: not significant
Values in parenthesis are standard error.

جدول ۵- مقایسه جمعیت‌های خردل وحشی مقاوم به علف کش تری بنورون متیل با استفاده از روش بکی و تاردیف

Table 5- Comparison of resistance wild mustard populations to herbicides of tribenuron-methyl based on R rating system Beckie & Tardif

جمعیت population	بکی و تاردیف Beckie & Tardif	درجه مقاومت RF	جمعیت population	بکی و تاردیف Beckie & Tardif	درجه مقاومت RF
Z16	VH	205.8**	Z3	H	**93.2
Z17	VH	212.9**	Z4	H	13.3*
Z18	H	86.8**	Z8	H	68.0^{ns}
Z19	VH	115.6**	Z9	VH	115.9**
Z20	VH	221.6*	Z10	VH	109.1**
GI2	H	85.1^{ns}	Z11	VH	141.0**
GI3	VH	124.0**	Z12	VH	207.9**
GI5	L	8.0^{ns}	Z13	H	72.9**
GI6	L	8.2^{ns}	Z14	VH	216.2*
S		-	Z15	VH	253.7*

S؛ جمعیت حساسR ؛ مقاوم L ؛ مقاومت کم H؛ مقاومت بالا VH؛ مقاومت خیلی بالا وRF بیانگر درجه مقاومت جمعیت‌های مقاوم می‌باشد. ** معنی داری در سطح ۱درصد،* معنی داری در سطح ۵ درصد و ns بیانگر عدم معنی داری

S =susceptible population; R= Resistance L= Low resistance; H= High resistance; VH= Very high resistance and RF indicate resistance degree of resistant populations. ** Significant at 1%,* Significant at 5% and ns is not significant.

```
                 ....|....| ....|....|
                         120        130
Arabidopsis  GVETVFAYPG GASMEIHQAL
S            --ETVFAYPG GASMEIHQAL
Z10          --ETVFAYPG GPCMEIHQAL
Z14          --ETVFAYPG GPCMEIHQAL
Z17          --ETVFAYPG GASMEIHQAL
Z15          --ITVFTYPG GPCMEIHQAL
Z8           --ETVFAYPG GASMEIHQAL
Z4           --ETVFAYPG GPCMEIHQAL
Z3           --ETVFAYPG GASMEIHQAL
Z13          --ETVFAYPG GPCMEIHQAL
Cons           :*********::*******
```

شکل ۲– هم‌ردیفی توالی قطعه‌ای از DNA زن ALS تعدادی از جمعیت‌های مقاوم (Z_{10}, Z_{14}, Z_{17}, Z_{15}, Z_8, Z_4, Z_3 و Z_{13})، حساس (S) و گیاه آرابیدوبسیس (با شماره دست‌یابی AY042819)

Figure 2– Aalignment of partial DNA sequence of acetolactate synthase (ALS) gene from a number of resistant (ZR_3, ZR_4, ZR_8, ZR_{10}, ZR_{14}, ZR_{15}, Z_{17} and ZR_{13}), susceptible (S) populations and Arabidopsis (GenBank accession number. AY042819)

متن با تصویر زمینه خاکستری بیانگر اختلاف گیاهان مقاوم و آرابیدوبسیس می‌باشد.

Text with Grey background indicates difference between the resistant and Arabidopsis ALS gene.

References منابع مورد استفاده

- Beckie, H.J., I.M. Heap, R.J. Smeda, and L.M. Hall. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology*. 14: 428-445.
- Beckie, H.J., and F.J. Tardif. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*. 35: 15-28.
- Beffa, R., A. Figge, L. Lorentz, M. Hess, B. Laber, and J.P. Ruiz-Santaella. 2012. Weed resistance diagnostic technologies to detect herbicide resistance in cerealgrowing areas. A review. 25th German Conference on Weed Biology and Weed Control. March 13-15, Braunschweig, Germany.
- Burgos, N.R., P.J. Tranel, J.C. Streibig, V.M. Davis, D. Shaner, J.K. Norsworthy, and C. Ritz. 2013. Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Science*. 61: 4-20.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- Han, H., Q. Yu, E. Purba, M. Li, M. Walsh, and S. Powles. 2012. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. *Pest Managment Science*. 68: 1164–1170.
- Heap, I. 2016. The international survey of herbicide-resistant weeds. [Online]. Available:http://www.weedscience.org. Accessed: [25 March 2016].
- Gherekhloo, J. 2008. Tracing resistant *Phalaris minor* populations and studying their resistance mechanisms to aryloxyphenoxy propionate herbicides in Fars and Golestan wheat fields. Ph.D Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. 160 pp.
- Moss, S.R., S.A. Perryman, and L.V. Tatnell. 2007. Managing herbicide-resistant blackgrass (*Alopecurus myosuroides*): theory and practice. *Weed Technology*. 21: 300–309.
- Saari, L.L., J.C. Cotterman, and D.C. Thill. 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.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning New York: Cold spring harbor laboratory press (Vol. 2, pp. 9-14).
- Switzer, C.M. 1957. The existence of 2,4-D–resistant strains of wild carrot. *Weed Control*. 11: 315–318.
- Thomas, A.G. 1985. Weed survey system used in Saskatchevan for cereal and oilseed crops. *Weed Science*. 33: 34-43.
- Tranel, P.J., T.R. Wright, and I.M. Heap. 2016. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. [Online]. Available:http://www.weedscience.org. Accessed: [25 March 2016].

- Veisi, M., M. Minbashi, and P. Sabeti. 2012. Weed community structure, species diversity and weed mapping in irrigated wheat fields of Kermanshah province. *Iranian Journal of Weed Research*. 4: 77-96. (In Persian).
- Veisi, M., H. Rahimian Mashhadi, H. Alizadeh, M. Minbashi Moeini, and M. Oveisi. 2014. Weed flora change in irrigated wheat fields of Kermanshah after a decade. *Iranian Journal of Weed Research*. 10: 1-20. (In Persian).
- Yu, Q., H. Han, M. Li, M. Walsh, and S. Powles. 2012. Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing ALS gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. *Weed Research*. 52: 178–186.
- Yu, Q., and S.B. Powles. 2014. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science*. 70: 1340-1350.
- Zand, E., M.A. Baghestani, P. Shimi, N. Nezamabadi, M.R. Mousavi, and S.K. Mousavi. 2012. Chemical weed control quideline for major of Iran. Jahade Daneshgahi Mashhad. 176 pp. (In Persian).

Investigating Resistance of Wild Mustard (*Sinapis arvensis* L.) Populations to Tribenuron-Methyl Herbicide

Mehdi Afshari[1], Ali Ghanbari[2]*, Mehdi Rastgoo[2], Javid Gherekhloo[3], and Goodarz Ahmadvand[4]

Received: February 2016, Revised: 14 June 2016, Accepted: 24 April 2017

Abstract

Tribenuron-methyl is commonly used for post emergence control of broad leaf weeds in wheat fields. In order to survey suspicious resistant weeds in wheat fields to this herbicide thirty-eight fields of Kermanshah province were investigated during 2012- 2013. Seeds of suspected resistance of wild mustard were gathered and tested in a randomized complete blocks design experiment with three replications. First, for early detection of herbicide resistance, the suspected population was screened using discriminating dose of tribenuron-methyl. Determining of the resistance degree was conducted by whole plant bioassay tests using dose-response curves. The resistance mechanisms were assayed by molecular methods, especially using the ALS gene cloning by PJET1.2/blunt Vector. For susceptible populations, the concentration required for complete control was 10.4 g ai ha^{-1} tribenuron-methyl. Also, in screening tests 50% of populations as resistant populations were identified. According to the Beckie and Tardif, it was found that 57.8% of these population did have a very high degree of resistance, 31.5% with high resistance and 10/5% with low resistance degree. GR_{50} of the resistant weeds was also increased as compared to sensitive weed, which indicates resistance in this province, Thus to control the resistant populations Z_{15}, this amount increased to 1309 g ai ha^{-1}.The results of DNA sequencing showed that mutation by replacing proline amino acid at position Ala122 causes resistance based on target-site mutation.

Key words: ALS gene, DNA sequencing, Dose-response, Mutation, PJET1.2/blunt Vector.

1- Ph.D. Student of Weed Science of Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Associate Professor of Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3- Associate Professor of University of Gorgan, Gorgan, Iran.
4- Associate Professor of Bu Ali Sina University of Hamedan, Hamedan, Iran.
**** Corresponding Author:*** *ghambari@um.ac.ir*