

شایستگی نسبی بیوتیپ های دم‌روباهی کشیده (*Alopecurus myosuroides*) حساس و مقاوم به علف‌کش های بازدارنده آنزیم استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز: جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در شرایط تنش شوری و خشکی

زهرا غزالی^۱، اسحاق کشتکار^{۲*}، مجید آقالیخانی^۲، پیر کودسک^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، رشته شناسایی و مبارزه با علف‌های هرز، گروه زراعت، دانشگاه تربیت مدرس ۳ و ۲- به ترتیب استادیار و استاد گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۴- استاد گروه آگرواکولوژی، دانشکده علوم و تکنولوژی، دانشگاه آرهوس، دانمارک

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۱)

چکیده

به منظور آزمون فرضیه بیشتر بودن هزینه شایستگی مقاومت به علف‌کش‌ها در شرایط تنش، دو بیوتیپ حساس و مقاوم به علف‌کش‌های بازدارنده آنزیم استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز، با پس‌زمینه ژنتیکی همگن، از بین یک جمعیت دم‌روباهی کشیده (*A. myosuroides*) با ساز و کار مقاومت به غیر محل هدف، ایزوله شدند. ایزوله‌سازی بیوتیپ‌ها در گروه آگرواکولوژی دانشگاه آرهوس دانمارک و ارزیابی شایستگی، در گروه زراعت دانشگاه تربیت مدرس تهران در سال ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ انجام شدند. بیشینه جوانه‌زنی تجمعی (G_{max}) و زمان رسیدن به ۵۰ درصد بیشینه جوانه‌زنی (G_{50}) برای بیوتیپ‌های حساس و مقاوم به علف‌کش، تحت شرایط تنش (خشکی ۰/۸ - مگاپاسکال، شوری ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر) و عدم تنش محاسبه شد. همچنین، رشد گیاهچه پیش از رویش، برای هر دو بیوتیپ در شرایط بدون تنش اندازه‌گیری شد. در شرایط عدم تنش، اختلاف معنی‌داری بین دو جمعیت از نظر حداکثر جوانه‌زنی وجود نداشت اما در شرایط تنش شوری و خشکی، حداکثر جوانه‌زنی بیوتیپ مقاوم، به ترتیب ۲۸ و ۴۹ درصد کمتر از بیوتیپ حساس بود. همچنین در تمام شرایط (تنش شوری، خشکی و عدم تنش)، بیوتیپ مقاوم به علف‌کش نسبت به بیوتیپ حساس دیرتر (بین هفت تا ۱۶ ساعت) جوانه زد یعنی زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی در آن بالاتر بود. ارزیابی رشد گیاهچه پیش از سبز شدن نشان داد که هر دو بیوتیپ از نظر طول ساقه‌چه و ریشه‌چه مشابه بودند. نتایج این پژوهش به روشنی نشان داد که علف‌هرز دم‌روباهی کشیده مقاوم به علف‌کش در مقایسه با بیوتیپ حساس، در صورت وقوع تنش خشکی و شوری، هزینه بیشتری را از نظر پارامترهای جوانه‌زنی پرداخت خواهد کرد.

کلمات کلیدی: طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، مقاومت به علف‌کش، هزینه‌ی شایستگی

Relative Fitness of Acetyl-CoA Carboxylase susceptible and resistant *Alopecurus myosuroides* biotypes: germinability and seedling pre-emergence growth under salinity and drought stress conditions

Zahra Ghazali¹, Eshagh Keshtkar^{1*}, Majid AghaAlikhani¹, Per Kudsk⁴

1. Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran 2. Department of Agroecology, Aarhus University, Denmark.

(Received: May 16, 2019- Accepted: September 2, 2019)

ABSTRACT

Fitness costs of herbicide resistance may be more evident and increase under stress environmental conditions. To test this hypothesis, a herbicide-resistant (R) and a herbicide-susceptible (S) phenotype with controlled and homogenized genetic background were isolated within a non-target-site resistant (NTSR) black-grass population. Accumulated maximum germination (G_{max}) and time to reach the G_{max} (G_{50}) of biotypes were examined under non-stress and abiotic-stress conditions (salinity at 16 dSm⁻¹, drought at -0.8 Mpa). In addition, seedling pre-emergence biotypes growths were evaluated under non-stress condition. There was no difference in G_{max} between the R and S biotypes, whereas the G_{max} of R phenotype was 28% and 49% lower than that of the S phenotype under salinity- and drought-stress conditions, respectively. The R phenotype germinated around seven to 16 hours later than the S phenotype under all non-stress and abiotic-stress conditions, i.e. the R phenotype had higher G_{50} than the other phenotype. The experiments of seedling pre-emergence growth showed that the R and S biotypes had similar root and shoot length under non-stress condition. The results clearly showed that the germinability fitness costs of NTSR black-grass increase when the plants are grown under salinity and drought stress conditions.

Keywords: Fitness cost, herbicide resistance, root length, shoot length

* Corresponding author E-mail: keshtkar@modares.ac.ir

مقدمه

(2019). نه تنها مقاومت دم روباهی کشیده به برخی علف‌کش‌های رایج در گندم، کنترل این علف‌هرز در این محصول استراتژیک را محدود کرده است، بلکه بروز مقاومت عرضی و چندگانه به گروه‌های علف‌کشی مختلف، گزینه‌های کنترل شیمیایی این علف‌هرز در محصولات تناوبی را نیز با چالش جدی روبرو کرده است به طوری که مقاومت علف‌هرز دم-روباهی کشیده به هفت گروه از علف‌کش‌ها شامل گروه A(1), B(2), C1(5), C2(7), K1(7), K3(15) و N(8) گزارش شده است و هر دو نوع سازوکار مقاومت یعنی مقاومت به محل هدف و غیر محل هدف در بین جمعیت‌های آن تایید شده است (Heap, 2015, Keshtkar et al., 2019). بنابراین تمرکز روی زیست‌شناسی و مقایسه توده‌های مقاوم و حساس این علف‌هرز در غیاب کاربرد علف‌کش‌ها، می‌تواند در یافتن نقاط ضعف و قوت آن، جهت بکارگیری در برنامه‌های مدیریتی موثر باشد. با توجه به مقاومت این علف‌هرز به طیف وسیعی از گروه‌های علف‌کش و برخورداری از ژنومی ساده، دم‌روباهی کشیده، گیاهی مناسب برای مطالعه مقاومت به علف‌کش‌ها و هزینه شایستگی محسوب می‌شود.

بر اساس پیش‌بینی تئوری‌های تکامل و اکولوژی انتظار می‌رود که برخی از گونه‌های گیاهی مقاوم به علف‌کش در مقایسه با گونه‌های وحشی (حساس به علف‌کش) در غیاب فشار انتخابی علف‌کش، شایستگی کمتری (منفی) داشته باشند (Keshtkar et al., 2009, Vila-Aiub et al., 2019, al.). به عبارت دیگر، به ازای کسب توانایی مقاومت به علف‌کش‌ها، برخی از توانایی‌های این گیاهان مانند تولید بذر فراوان و زیست‌توده زیاد، مقاومت در برابر گیاه‌خواری^۱ (خورده‌شدن)، مقاومت به خشکی و در مقایسه با قبل

علف‌های هرز، مهم‌ترین تنش زیستی برای تولید محصولات زراعی محسوب می‌شوند به طوری که پتانسیل کاهش عملکرد گیاهان توسط آن‌ها به ۳۴٪ درصد می‌رسد که با مجموع خسارت حشرات (۱۸٪) و بیماری‌های گیاهی (۱۶٪) برابری می‌کند (Oerke, 2006). علف‌کش‌ها، مؤثرترین و اقتصادی‌ترین راه برای مهار علف‌های هرز می‌باشند و سهم غیر قابل انکاری در مدیریت علف‌های هرز دارند. با این حال، مصرف پی‌درپی آن‌ها، فقط کمتر از یک دهه پس از کشف اولین علف‌کش‌ها، منجر به بروز پدیده مقاومت به علف‌کش‌ها در دهه پنجاه میلادی شد (Heap, 2019). پدیده مقاومت به علف‌کش‌ها، یک تهدید جدی برای نظام‌های پیشرفته کشاورزی دنیا محسوب می‌شود (Norsworthy et al., 2012) و تا کنون بیش از ۴۹۰ مورد علف‌هرز مقاوم به علف‌کش در دنیا گزارش شده است (Heap, 2019).

علف‌هرز دم‌روباهی کشیده (*Alopecurus myosuroides* Huds.) که یکی از علف‌های هرز مهم در غرب و شمال‌غربی اروپا می‌باشد، در ایران نیز به عنوان یکی از علف‌های هرز رایج مزارع گندم آبی و دیم در استان‌های شمال غربی مانند آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل شناخته می‌شود (Narimani et al., 2012, Soheili, 2013). این علف‌هرز در بیش از ۳۷ کشور دنیا رشد می‌کند (Holm et al., 1997) و توان کاهش عملکرد گندم تا ۴۵٪ را دارد (Vizantinopoulos and Katranis, 1998). بر اساس گزارش‌ها، دم‌روباهی کشیده، مهم‌ترین علف‌هرز مقاوم به علف‌کش در اروپاست (Lutman et al., 2013) و اکنون در فهرست ۱۵ گونه علف‌هرز مقاوم به علف-کش با بیشترین فراوانی در دنیا قرار دارد (Heap, 2019).

^۱ Herbivory

مدیریتی کارا و پیش‌بینی روند تکامل مقاومت به علف‌کش و فراوانی نسبی علف‌های هرز مقاوم در جمعیت می‌باشد (Cousens and Fournier-Level, 2018, Vila-Aiub et al., 2011). بدین منظور، سال‌هاست که ارزیابی و کمی‌سازی میزان هزینه شایستگی جمعیت‌های علف‌های هرز مقاوم به علف-کش مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال، متأسفانه نه تنها در ایران بلکه در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده در سراسر جهان، پیش‌نیازها و راهکارهای علمی پیشنهاد شده برای ارزیابی هزینه شایستگی گونه‌های مقاوم به علف‌کش، کمتر مد نظر قرار گرفته است (Keshtkar et al., 2019). بنابراین، طراحی بسیاری از پژوهش‌های صورت گرفته، نامطلوب بوده است و سرانجام منجر به تفسیر نامناسب نتایج شده است (Keshtkar et al., 2019, Neve, 2007). رایج‌ترین کاستی در اجرای آزمایش‌های ارزیابی هزینه‌های شایستگی علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش، عدم همگن‌سازی و کنترل پس‌زمینه ژنتیکی گیاهان حساس و مقاوم به علف‌کش می‌باشد (Keshtkar et al., 2019, Vila-Aiub et al., 2015). به طوری که متأسفانه در اغلب پژوهش‌های انجام شده (در بیش از ۷۵ درصد مطالعات)، پس‌زمینه ژنتیکی گیاهان مورد مطالعه کنترل نشده است (Vila-Aiub et al., 2009). در این پروژه برای نخستین بار در کشور، به کنترل پس‌زمینه ژنتیکی که یک نکته اساسی در مطالعه ارزیابی شایستگی است توجه شده است و امید است که نتایج آن، راهگشای انجام تحقیقات دقیق‌تر در زمینه بررسی هزینه شایستگی گیاهان مقاوم به (زنوبیوتیک‌ها) بیگانه‌زیست‌ها در کشور باشد.

هدف از پژوهش حاضر، آزمودن فرضیه ای است که احتمال مشاهده و بروز هزینه شایستگی مقاومت به علف‌کش در شرایط تنش را بیشتر از شرایط معمولی می‌داند. برای این منظور، شایستگی نسبی بیوتیپ‌های

از اکتساب مقاومت به علف‌کش‌ها، کاهش خواهند یافت. به این پدیده، هزینه شایستگی^۱ یا هزینه مقاومت به علف‌کش^۲ گفته می‌شود. اگر هزینه شایستگی ژن یا ژن‌های مقاومت زیاد باشد، آن‌گاه در غیاب عامل گزینش (علف‌کش)، داشتن ژن یا ژن‌های مقاومت در مقایسه با آلل‌های نوع وحشی، یک نقص محسوب خواهد شد. بر اساس این تئوری تکامل، در شرایط عدم مصرف علف‌کش، انتخاب برگشتی صورت خواهد گرفت و در واقع گونه‌های حساس به علف‌کش، از نظر فراوانی و تعداد در مزرعه غالب خواهند شد (Keshtkar et al., 2019). این موضوع، به‌ویژه در بسیاری از علف‌های هرز مقاوم به علف-کش‌های خانواده تریازین (بازدارند فتوسنتز II) به اثبات رسیده است (Keshtkar et al., 2019).

شایان ذکر است پژوهشگران در برخی موارد خاص، شایستگی برابر (ختی) و حتی شایستگی مثبت نیز برای برخی صفات اندازه‌گیری شده در برخی علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش را گزارش کرده‌اند. به همین دلیل گفته می‌شود که هزینه شایستگی مقاومت به علف‌کش، قابل تعمیم به همه شرایط نیست و بستگی به نوع جهش صورت گرفته در ژن مقاومت، شرایط محیطی (Lehnhoff et al., 2013) و نیز غالبیت جهش و گونه گیاهی دارد. با این حال، یک فرضیه عمومی و کلی بیان می‌کند که وقوع تنش‌های محیطی، هزینه شایستگی در علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش را افزایش می‌دهد (Vila-Aiub et al., 2009).

هدف از بررسی و مطالعه تفاوت شایستگی علف‌های هرز مقاوم و حساس به علف‌کش، طراحی راهبردهای

^۱ Fitness cost

^۲ Herbicide resistance cost

طور خلاصه در مرحله پنجه زنی (دو تا سه پنجه‌ای)، گیاهچه‌ها به همراه ریشه از خاک خارج شدند. سپس از هر گیاهچه، یک پنجه (کلون) جدا شد، به طوری که هر دو گیاهچه کلون و گیاه مادری دارای ریشه بودند. ریشه و پنجه کلون‌ها به طول دو سانتی‌متر با قیچی کوتاه شدند. پس از کاشت گیاهان پایه مادری و کلون‌های مربوطه در گلدان‌های جداگانه، شماره گذاری شدند. پس از رشد دوباره و رسیدن کلون‌ها به مرحله سه تا چهار برگگی، با استفاده از دز توصیه شده علف‌کش فنوکساپروپ-پی اتیل (۶۹ گرم ماده موثره بر هکتار) سم‌پاشی شدند. چهار هفته بعد از سم‌پاشی، کلون‌ها به سه دسته حساس (گیاهچه مرده)، نیمه مقاوم (گیاهچه زنده اما بدون رشد مجدد) و مقاوم (گیاهچه زنده و رشد فراوان) تقسیم بندی شدند (شکل ۱). سپس گیاهان مادری نیز بر اساس شماره کلون مربوطه، به سه دسته تقسیم شدند. گیاهان مادری نیمه مقاوم حذف شدند و گیاهان حساس و مقاوم به علف‌کش، به منظور تولید بذر و بهاره سازی، به گلخانه‌ای با دمای پایین منتقل شدند. دو بیوتیپ جداسازی شده (گیاهان حساس و مقاوم به علف‌کش) هر کدام به صورت جداگانه در گلخانه، تحت شرایط یکسان در آذرماه نگهداری شدند. قبل از گلدهی و به منظور جلوگیری از انتقال و تبادل گرده بین بیوتیپ‌ها، هر بیوتیپ توسط پوشش پلی‌اتیلن ضد انتقال گرده محصور شد و تا زمان رسیدن بذرها (F1) تا خرداد ماه سال ۲۰۱۲ در گلخانه نگهداری شدند. در سال بعد (۲۰۱۳)، هر دو بیوتیپ به منظور تولید بذر F2 به صورت جداگانه در شرایط ذکر شده رشد یافتند. از بذرای تولید شده در سال ۲۰۱۳، برای انجام آزمایش‌ها در تحقیق حاضر استفاده شد. خواب اولیه بذرها توسط تیمار گرمایی (به مدت شش هفته در دمای 35 ± 2 درجه سانتیگراد) شکسته (Keshtkar et al., 2017) شد و بذرها تا زمان انجام آزمایش، در

حساس و مقاوم به علف‌کش با پس زمینه ژنتیکی یکسان از نظر ویژگی‌های جوانه‌زنی در شرایط معمولی و تنش‌های شبیه سازی شده خشکی و شوری و همچنین رشد گیاهچه پیش از رویش مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

الف. مواد گیاهی

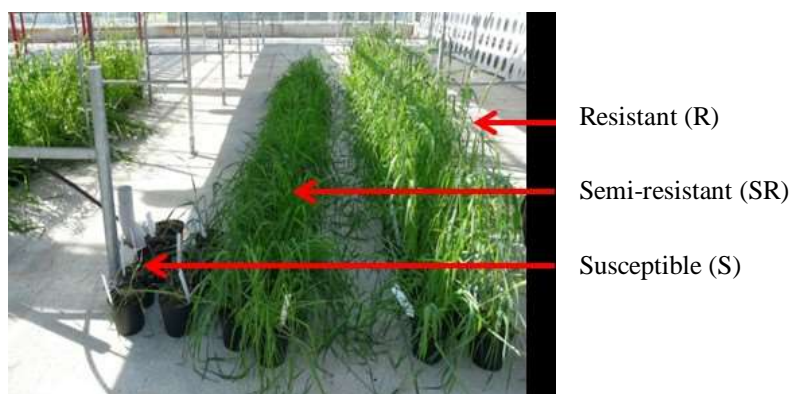
یک جمعیت دم‌روباهی‌کشیده (جمعیت ID914 از کشور دانمارک) مقاوم به علف‌کش فنوکساپروپ-پی اتیل (بازدارنده استیل‌کوآنزیم-آکربوکسیلاز^۱ با سازوکار سازوکار مقاومت از نوع غیرمحل هدف^۲ برای این پژوهش انتخاب شد. این جمعیت در سال ۲۰۱۱ از جزیره لولند واقع در جنوب دانمارک جمع‌آوری شد (Keshtkar et al., 2015). این جمعیت نه تنها به علف‌کش فنوکساپروپ-پی اتیل بلکه به چند علف‌کش دیگر از جمله پندیمتالین، پروسولفوکارب و فلوپیرسولفورون متیل سدیم مقاوم بود (Keshtkar et al., 2015).

در سال ۲۰۱۱، حدود ۴۰۰ بذر از جمعیت گفته شده در گلخانه گروه اگرواکولوژی دانشگاه آرهوس دانمارک در جعبه‌های پلاستیکی کاشته شد. سپس به منظور یکسان سازی و کنترل پس‌زمینه ژنتیکی مواد آزمایشی، ایزوله‌سازی و انتخاب بیوتیپ‌های حساس و مقاوم، از طریق راهکار تک جمعیت و به وسیله کلون کردن گیاهچه انجام شد (Vila-Aiub et al., 2005). این روش، یکی از روش‌های مناسب و پیشنهاد شده برای یکسان سازی و کنترل پس‌زمینه ژنتیکی گیاهان است که منجر به تصادفی شدن پس-زمینه ژنتیکی می‌شود (Keshtkar et al., 2019). به

^۱ Acetyl-CoA carboxylase; ACCase

^۲ Non-Target Site Resistance; NTSR

دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



شکل ۱- سه گروه گیاه حساس، نیمه مقاوم و مقاوم به علف‌کش های بازدارنده آنزیم‌استیل‌کوانزیم‌اکربوکسیلاز که از بین یک جمعیت دم‌روباهی کشیده با ساز و کار مقاومت به غیر محل هدف ایزوله‌سازی شد.

Fig 1. Three classes of herbicide-susceptible (S), semi-resistant (SR) and -resistant (R) biotypes were isolated within a non-target site herbicide resistant black-grass population

شب) قرار گرفتند. بذرها طی زمان‌های متوالی بازمینی شدند و تعداد بذرهایی که ریشه‌چه آن‌ها به دو میلی-متر رسیده بود، شمارش شدند و از پتری‌دیش‌ها حذف شدند. شمارش بذرها تا زمانی که به مدت سه روز متوالی جوانه‌زنی صورت نگرفت ادامه یافت.

آزمایش تنش شوری بر اساس روش مدرس‌ثانوی و همکاران (Modarres-Sanavy et al., 2014) با استفاده از سدیم کلراید در دو غلظت صفر و ۲۰ دس‌زیمنس بر متر (ds m⁻¹) با چهار تکرار انجام شد. تمام مراحل آزمایش تنش شوری مشابه آزمایش تنش خشکی بود. آزمایش تنش خشکی دوبار و آزمایش تنش شوری سه بار تکرار شد.

ج. رشد گیاهچه پیش از رویش

آزمایش ارزیابی رشد گیاهچه پیش از رویش، براساس روش دلی و همکاران (Delye et al., 2013) انجام شد. برای این منظور، تعداد ۲۰۰ عدد بذر از هر یک از بیوتیپ‌های حساس و مقاوم دم‌روباهی کشیده انتخاب شدند. سپس طبق روش و شرایط گفته شده در آزمایش‌های تنش شوری و خشکی، در هر پتری

ب. اثر تنش شوری و خشکی شبیه‌سازی شده بر جوانه‌زنی

به منظور بررسی تاثیر تیمار تنش خشکی و شوری بر جوانه‌زنی بذر بیوتیپ‌های حساس و مقاوم به علف‌کش، دو آزمایش جداگانه در آزمایشگاه گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس اجرا شد. آزمایش تنش خشکی در دو پتانسیل صفر و ۰/۸- مگاپاسکال (Mpa) و با چهار تکرار برای هر بیوتیپ، با استفاده از PEG₆₀₀₀ و بر اساس روش میشل و کافمن (Michel and Kaufmann, 1973) انجام شد. قبل از آزمایش، بذرها با هیپوکلریت سدیم پنج درصد، به مدت دو دقیقه ضدعفونی شدند و سپس چندین بار با آب مقطر آبشویی شدند. از این میان، تعداد ۵۰ بذر، انتخاب شدند و درون پتری‌دیش‌هایی به قطر هشت سانتی‌متر که کف آن‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک پوشانده شده بود، قرار داده شدند. سپس به هر پتری، هفت میلی‌لیتر از محلول‌های مربوطه اضافه شد. پتری‌ها به ژرمیناتوری با دوره نوری ۱۴ / ۱۰ ساعت (روشنایی/تاریکی) انتقال یافتند و تحت رژیم دمایی ۱۷ / ۱۰ درجه سانتیگراد (روز/

به ۵۰ درصد بیشینه جوانه‌زنی و b شیب خط در ناحیه G_{50} است.

در مرحله دوم، پارامترهای بدست آمده در مرحله اول شامل بیشینه جوانه‌زنی، ساعت تا رسیدن به ۵۰ درصد بیشینه جوانه‌زنی و شیب خط، با استفاده از مدل متا-آنالیز با اثرات تصادفی پیشنهاد شده توسط ینسن و همکاران (Jensen et al., 2017) تجزیه شدند. در این مدل، تعداد آزمایش‌ها به عنوان اثر تصادفی و بیوتیپ و تنش، به عنوان اثر ثابت در نظر گرفته می‌شود. در نهایت، مقایسات دوگانه متناسب برای ارزیابی دو بیوتیپ حساس و مقاوم به علف‌کش از نظر پارامترهای مربوطه انجام شد.

برازش مدل سه پارامتره لگ لجستیک و رسم شکل‌ها با استفاده از بسته نرم افزاری *drc* (Ritz et al., 2015a) انجام شد. برای برازش مدل متا-آنالیز، از بسته نرم افزاری *metafor* (Viechtbauer, 2010) استفاده شد و مقایسات دوگانه، با استفاده از بسته نرم افزاری *multcomp* (Hothorn et al., 2008) در محیط R (R Core Team, 2013) صورت گرفت. مقایسه بیوتیپ‌های حساس و مقاوم به علف‌کش از نظر داده-های طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، با آزمون *t-test* و در سطح احتمال پنج درصد توسط نرم افزار R (R Core Team, 2013) انجام شد. به دلیل اختلاف واریانس بین آزمایش‌های (آزمایش شماره یک و دو) رشد گیاهچه پیش از سبز شدن، داده‌های هر آزمایش جداگانه تجزیه شد.

نتایج و بحث

الف. اثر تنش شوری و خشکی شبیه‌سازی شده بر جوانه‌زنی

الف-۱) بیشینه جوانه‌زنی تجمعی (G_{max})

در همه آزمایش‌ها و در شرایط بدون تنش، بیشینه جوانه‌زنی تجمعی (G_{max}) هر دو بیوتیپ حساس و

دیش ۵۰ عدد بذر کاشته شد و به هر پتری دیش، هفت میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از جوانه زدن بذرها، پنج گیاهچه هم اندازه و هم شکل با طول ساقه‌چه حدود پنج میلی‌متر انتخاب شدند و در عمق دو سانتی‌متری گلدان‌هایی به قطر ۱۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر، حاوی ماسه کاشته شدند. برای هر بیوتیپ، هشت گلدان (تکرار) یعنی ۴۰ گیاهچه در نظر گرفته شد. بلافاصله بعد از کاشت و به منظور جلوگیری از جذب نور و فتوستیز بوسیله گیاهچه‌ها، سطح گلدان‌ها با استوانه کاغذی (قطر ۱۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر) پوشانده شدند. به منظور اطمینان بیشتر از عدم ورود نور، سطح استوانه نیز با ورقه‌های فویل آلومینیوم پوشانده شدند. آبیاری هر چند روز یکبار و با رعایت عدم دریافت نور توسط گیاه انجام شد. بعد از ۱۵ روز، استوانه کاغذی شکافته شد و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمایش نیز دوبار تکرار شد.

د. تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به دشواری تفسیر نتایج تجزیه رگرسیون غیرخطی با اثرات مختلط (Ritz et al., 2015b)، تجزیه آماری داده‌های جوانه‌زنی به روش جدید دو مرحله‌ای پیشنهاد شده توسط ینسن و همکاران (Jensen et al., 2017) انجام شد. در مرحله اول و به منظور به دست آوردن پارامترهای جوانه‌زنی مانند بیشینه جوانه‌زنی و زمان مورد نیاز تا رسیدن به ۵۰ درصد بیشینه جوانه‌زنی، یک مدل لگ لجستیک سه پارامتره (معادله ۱) با راهکار زمان-وقوع (Ritz et al., 2013)، به داده‌های جوانه‌زنی برازش داده شد.

$$G(t) = \frac{G_{max}}{1 + \exp[b(\log(t) - \log(G_{50}))]} = \frac{G_{max}}{1 + \left(\frac{t}{G_{50}}\right)^b} \quad \text{معادله ۱}$$

در این معادله: $G(t)$ ، جوانه‌زنی تجمعی در زمان t ؛ G_{max} ، بیشینه جوانه‌زنی تجمعی؛ t ، زمان (برحسب ساعت)؛ G_{50} ، مدت زمان بر حسب ساعت تا رسیدن

مقاوم به علف‌کش، بیشتر از ۹۴ درصد بود و تفاوت آماری معنی‌داری بین دو بیوتیپ وجود نداشت (جدول ۱ و ۲، شکل ۲ و ۳). بیشینه جوانه‌زنی تجمعی بیوتیپ مقاوم در شرایط تنش شوری و خشکی، به ترتیب ۲۸ و ۴۹ درصد کمتر از بیوتیپ حساس بود (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- پارامترهای جوانه‌زنی بیوتیپ‌های حساس (S) و مقاوم به علف‌کش (R) ایزوله شده از بین یک جمعیت دم‌روباهی کشیده با سازوکار مقاومت به غیر محل هدف تحت تیمار تنش شوری ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر مربع و عدم تنش. پارامترها با برازش مدل سه پارامتره لگ لجستیک و با استفاده از راهکار زمان-وقوع، به صورت جداگانه برای هر سه آزمایش محاسبه شدند و سپس به وسیله مدل متا-آتالیز با اثرات تصادفی تجزیه شدند.

Table 1. Germination parameters of herbicide-resistant (R) and herbicide-susceptible (S) biotypes isolated within a non-target site herbicide resistant blackgrass population under salinity stress (16 dS m⁻¹) and no-stress conditions. The parameters were estimated by fitting a three parameter log-logistic model adopting to an event-time approach for the three experiments separately, then the estimated parameters were subjected to a meta-analytic random effects model.

Salinity (dS m ⁻¹)	G _{max} (%) ^a		G ₅₀ (hours) ^b		slope	
	R	S	R	S	R	S
0	94 (1.0)	ns	77 (6.9)	*	-5.1 (1.25)	**
16	52 (1.9)	***	139 (7.3)	***	-5.6 (1.26)	ns

^aThe accumulative germination = d parameter × 100.

^bTime to reach 50% of the maximum of accumulative germination.

*, **, *** Significant at 0.05, 0.01 and 0.001 level, respectively.

^{ns} Non-significant.

جدول ۲- پارامترهای جوانه‌زنی بیوتیپ‌های حساس (S) و مقاوم به علف‌کش (R) ایزوله شده از بین یک جمعیت دم‌روباهی کشیده با سازوکار مقاومت به غیر محل هدف تحت تیمار تنش خشکی منفی ۰/۸ مگاپاسکال و عدم تنش. پارامترها با برازش مدل سه پارامتره لگ لجستیک و با استفاده از راهکار زمان-وقوع بصورت جداگانه برای هر دو آزمایش محاسبه و سپس بوسیله مدل متا-آتالیز با اثرات تصادفی تجزیه شد.

Table 2. Germination parameters of herbicide-resistant (R) and herbicide-susceptible (S) biotypes isolated within a non-target site herbicide resistant blackgrass population under drought stress (-0.8 Mpa) and no-stress conditions. The parameters were estimated by fitting a three parameter log-logistic model adopting to an event-time approach for the two experiments separately, then the estimated parameters were subjected to a meta-analytic random effects model.

Drought (-Mpa)	G _{max} (%) ^a		G ₅₀ (hours) ^b		slope	
	R	S	R	S	R	S
0	96 (2.9)	ns	86 (6.5)	***	-5.5 (1.54)	ns
- 0.8	23 (3.6)	***	135 (7.7)	***	-4.4 (1.59)	ns

^aThe accumulative germination = d parameter × 100.

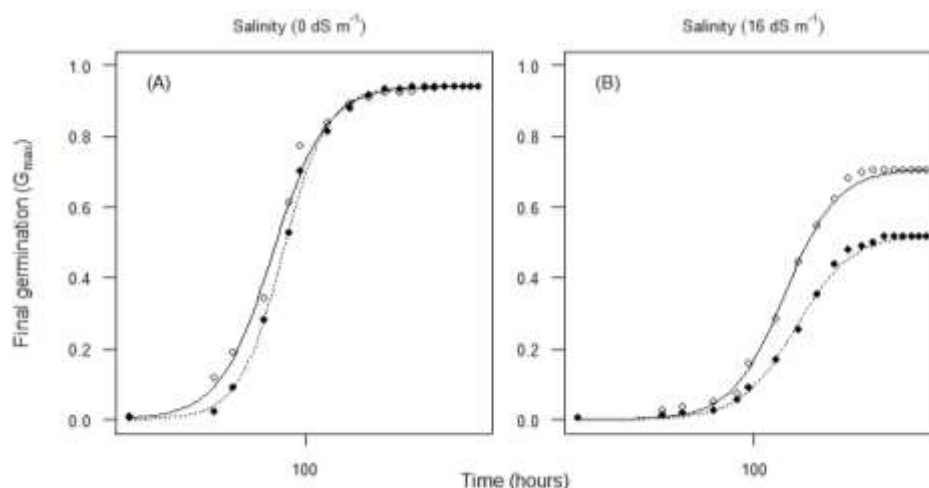
^bTime to reach 50% of the maximum accumulative germination.

*** Significant at 0.001 level.

^{ns} Non-significant.

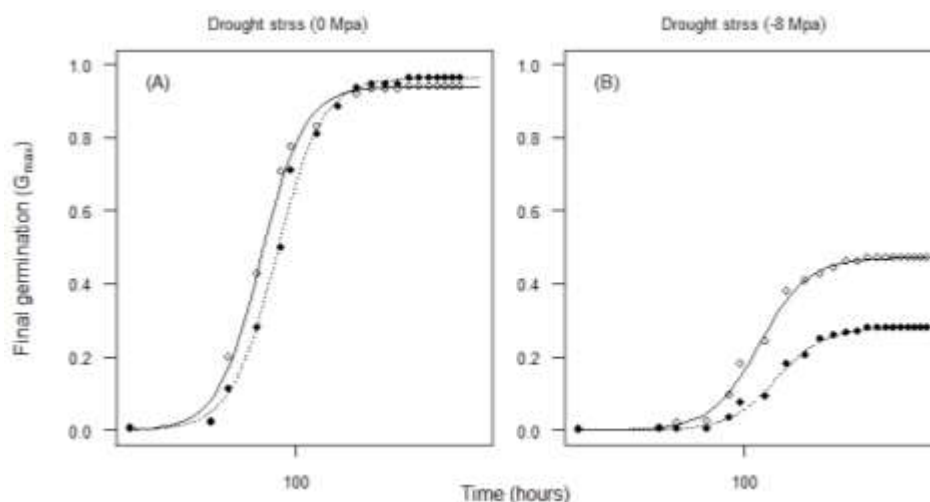
۱۶ دسی‌زیمنس بر متر مربع و خشکی ۰/۸- مگاپاسکال، به ترتیب ۴۲ و ۷۶ درصد نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد.

علاوه بر این، G_{max} بیوتیپ حساس به علف‌کش در شرایط تنش شوری و خشکی نسبت به شرایط معمول، به ترتیب ۲۵ و ۵۲ درصد کاهش داشت در حالی که G_{max} بیوتیپ مقاوم به علف‌کش در شوری



شکل ۲- الگوی جوانه‌زنی بیوتیپ‌های حساس (S, ○) و مقاوم (R, ●) ایزوله شده از بین یک جمعیت دم‌روباهی کشیده با سازوکار مقاومت به غیر محل هدف تحت تیمار عدم تنش (A) و تنش شوری ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر مربع (B). هر منحنی نماینده داده‌های سه آزمایش جداگانه است. پارامترها بدست آمده در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

Fig 2. Germination pattern of herbicide-resistant (R, ●) and herbicide-susceptible (S, ○) biotypes isolated within a non-target site herbicide resistant blackgrass population under non-stress (A) and salinity stress (16 dS m^{-1} , B) conditions. The curves represent the data of the three experiments conducted separately. The estimated parameters were presented in Table 1.



شکل ۳- الگوی جوانه‌زنی بیوتیپ‌های حساس (S, ○) و مقاوم (R, ●) ایزوله شده از بین یک جمعیت دم‌روباهی کشیده با سازوکار مقاومت به غیر محل هدف تحت تیمار عدم تنش (A) و تنش خشکی منفی ۰/۸ مگاپاسکال (B). هر منحنی نماینده داده‌های دو آزمایش جداگانه است. پارامترها بدست آمده در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

Fig 3. Germination pattern of herbicide-resistant (R, ●) and herbicide-susceptible (S, ○) biotypes isolated within a non-target site herbicide resistant blackgrass population under non-stress (A) and drought stress (-0.8 Mpa , B) conditions. The curves represent the data of the two experiments conducted separately. The estimated parameters were presented in Table 2.

خشکی، اغلب مشابه است (Uddin *et al.*, 2016) و منجر به کاهش جذب آب توسط گیاه می‌شود.

بالتر بودن G_{max} بیوتیپ حساس نسبت به بیوتیپ مقاوم در شرایط تنش‌های شوری و خشکی، به نوعی

کاهش بیشینه جوانه‌زنی تجمعی بذرها در شرایط تنش می‌تواند مربوط به کاهش پتانسیل آب، به دلیل وجود NaCl و PEG موجود در پتری‌دیش‌ها در مقایسه با شاهد باشد چرا که پاسخ گیاهان به تنش شوری و

و رویش بسیاری از گیاهان مطالعه شده است (Ebrahimi and Eslami, 2012, Florentine *et al.*,) اما تاثیر این عوامل بر گیاهان حساس و مقاوم به علفکش با پس‌زمینه ژنتیکی یکسان به ندرت بررسی شده است. همچنین مطالعات نشان داده است که با همگن سازی پس‌زمینه ژنتیکی گیاهان حساس و مقاوم به علفکش در شرایط مختلف محیطی و رقابت، احتمال تشخیص هزینه‌های شایستگی مقاومت به علفکش‌ها بیشتر می‌شود (Vila-Aiub *et al.*, 2009). با این حال، نتایج اندک مطالعات انجام شده در این زمینه، به خوبی تبیین نشده‌اند چراکه گفته می‌شود که ژن‌های مختلف، آلل‌های متفاوت، موقعیت و غالبیت جهش و حتی جهش‌های مختلف روی یک ژن خاص که منجر به مقاومت به علفکش‌ها می‌شوند می‌توانند هزینه‌های متفاوتی (مثبت، منفی و خنثی) را به گیاه مقاوم تحمیل کنند (Keshtkar *et al.*, 2017, Vila-Aiub *et al.*, 2009).

به تازگی وو و همکاران (Wu *et al.*, 2016)، پارامترهای جوانه‌زنی (G_{50} و G_{max}) دو بیوتیپ دم-روباهی ژاپنی (*Alopecurus japonicus*) حساس و مقاوم به علفکش فنوکساپروپ با پس‌زمینه ژنتیکی یکسان را در شرایط تنش (شوری و خشکی) و بدون تنش بررسی کرده‌اند. هرچند در این آزمایش، تفاوتی از نظر G_{max} بین بیوتیپ‌های دم‌روباهی ژاپنی مشاهده نشد اما در توافق با نتایج پژوهش حاضر، مقدار G_{50} در بیوتیپ مقاوم به فنوکساپروپ در تنش شوری، ۲۵۰ میلی‌مولار و در تنش خشکی، ۰/۴ - مگاپاسکال بیشتر (تاخیر در جوانه‌زنی) از بیوتیپ حساس به فنوکساپروپ بود. البته دو و همکاران (Du *et al.*, 2017) نتایج متناقضی در جمعیت‌های نوعی گراس (*Beckmannia syzigachne*) با سه جهش مختلف در ژن ACCase مشاهده کردند که تفاوت‌ها در میزان هزینه شایستگی به نوع جهش مربوط بود.

فرضیه افزایش هزینه شایستگی به علفکش‌ها در شرایط تنش‌های محیطی را به طور واضح اثبات می‌کند.

الف- ۲) زمان تا رسیدن به ۵۰ درصد بیشینه جوانه-زنی (G_{50}):

در شرایط بدون تنش و در هر دو آزمایش، تفاوت آماری معنی‌داری از نظر زمان سپری شده تا رسیدن به ۵۰ درصد بیشینه جوانه‌زنی یا G_{50} بین بیوتیپ‌ها وجود داشت به طوری که بیوتیپ مقاوم نسبت به بیوتیپ حساس، در آزمایش اول (جدول ۱) و آزمایش دوم (جدول ۲) به ترتیب حدود سه تا ۱۰ ساعت دیرتر جوانه زد.

همچنین پارامتر G_{50} برای هر دو بیوتیپ در شرایط تنش (هر دو تنش شوری و خشکی) نسبت به شرایط عدم تنش افزایش داشت. همانطور که در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است، سرعت جوانه‌زنی در شرایط تنش نسبت به شرایط عدم تنش، دو برابر کاهش یافته است و یا بعبارتی G_{50} دو برابر شده است.

همچنین تفاوت آماری معنی‌داری از نظر G_{50} بین دو بیوتیپ حساس و مقاوم به علفکش در شرایط تنش شوری و خشکی مشاهده شد (جدول ۱ و ۲). بیوتیپ مقاوم به علفکش در شرایط تنش خشکی (جدول ۱) و تنش شوری (جدول ۲) نسبت به بیوتیپ حساس، به ترتیب حدود ۱۳ و ۱۶ ساعت دیرتر جوانه زد درحالی‌که میزان تاخیر در جوانه‌زنی بیوتیپ مقاوم نسبت به بیوتیپ حساس در شرایط بدون تنش، حدود هفت ساعت بود. این افزایش تاخیر در جوانه‌زنی بیوتیپ مقاوم به علفکش نسبت به بیوتیپ حساس در شرایط تنش (هر دو تنش شوری و خشکی)، دلیل دیگری برای اثبات فرضیه مذکور است.

هرچند تاثیر تنش‌های شوری و خشکی بر جوانه‌زنی

تفاوت توان رشد گیاهچه بیوتیپ‌های حساس و مقاوم در درون خاک و در مرحله بین جوانه‌زنی و خروج از خاک است (Delye et al., 2013). در واقع در این آزمایش، توان گیاهچه‌ها برای تولید ریشه‌چه و ساقچه، با استفاده از ترکیبات ذخیره‌ای بذر و بر اساس منبع کربن سنجیده می‌شود. هرچند طول ساقه-چه و ریشه‌چه بیوتیپ حساس به علف‌کش، اندکی بلندتر از بیوتیپ مقاوم به علف‌کش بود اما این تفاوت از نظر آماری در هیچ یک از دو آزمایش معنی‌دار نبود (شکل ۴ و ۵).

دیلی و همکاران (Delye et al., 2013) با بررسی طول ساقه‌چه و ریشه‌چه سه بیوتیپ حساس با سه بیوتیپ مقاوم به علف‌کش‌های بازدرنده ACCase (بیوتیپ‌های مقاوم به ترتیب حامل جهش‌های Leu-1781، Gly-2078 و Asn-2041 بودند) نشان دادند که تفاوتی بین بذرهای تازه برداشت شده بیوتیپ‌های حساس و مقاوم به علف‌کش، از نظر طول ساقه‌چه وجود ندارد اما از نظر طول ریشه‌چه، نتایج متفاوتی گزارش شد به طوری که بیوتیپ‌های هتروزیگوت حامل جهش‌های Gly-2078 و Asn-2041، ریشه‌چه بلندتری نسبت به بیوتیپ‌های حساس هموزیگوت داشتند. نتایج آن‌ها (Delye et al., 2013) همچنین نشان داد که بااستثنای بیوتیپ حامل جهش Leu-1781 که طول ریشه‌چه بلندتری نسبت به بیوتیپ حساس داشت، هیچ تفاوت آماری از نظر صفات فوق بین بیوتیپ‌های حساس و مقاوم، در بذرهایی که به مدت یکسال در خاک دفن بودند مشاهده نشد. آنان این تفاوت‌ها را به نوع جهش در ژن ACCase و شرایط محیطی نسبت دادند. بر اساس چنین نتایجی است که پژوهشگران، بررسی شایستگی را برای هر مورد مقاومت توصیه می‌کنند. البته توصیه می‌شود که آزمایش رشد گیاهچه قبل از رویش، در شرایط تنش‌های مختلف به‌ویژه تنش‌های شوری و خشکی

تاخیر در سرعت جوانه‌زنی یا به عبارتی زمان رسیدن به ۵۰ درصد بیشینه جوانه‌زنی ممکن است توان رقابتی علف‌های هرز را تحت تاثیر قرار دهد و سرانجام موفقیت علف‌های هرز برای استقرار در مزرعه را تحت تاثیر قرار دهد. در شرایط تنش شوری، علف‌های هرزی که می‌توانند شوری خاک را تحمل کنند، قادر به استقرار و اشغال سطح وسیع‌تری از منطقه خواهند بود (Javaid and Tanveer, 2014)؛ بنابراین انتظار می‌رود که بیوتیپ مقاوم به علف‌کش، در شرایط تنش خشکی و شوری مورد مطالعه (شوری ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر و خشکی ۰/۸- مگاپاسکال) نسبت به بیوتیپ حساس از نظر پارامترهای جوانه‌زنی برتری داشته باشد. البته دیگر پارامترهای شایستگی مانند تولید بذر، زیست توده و ... باید در شرایط اشاره شده، مورد ارزیابی قرار گیرند تا بتوان با اطمینان بیشتری فراوانی جمعیت‌های حساس و مقاوم به علف‌کش را تعیین کرد. گفتنی است که برخی از پژوهشگران برای ارزیابی هزینه شایستگی، فقط پارامتر میزان تولید بذر را لازم می‌دانند (Cousens and Fournier-Level, 2018) اما برخی دیگر از پژوهشگران، میزان شایستگی را مجموعه‌ای از ویژگی‌های گیاه شامل جوانه‌زنی، خواب بذر، فنولوژی، سرعت رشد، اندازه بذر، میزان تولید بذر و ... می‌دانند (Keshtkar et al., 2019) که از این بین، جوانه‌زنی به عنوان یک عامل مهم، فقط در تعداد اندکی از پژوهش‌ها بررسی شده است (Vila-Aiub et al., 2009).

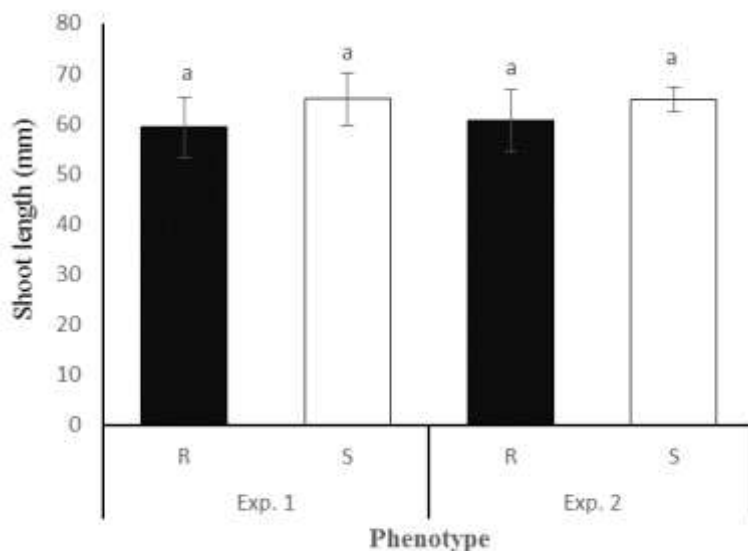
مقادیر محاسبه شده شیب خط (Slope) که در واقع شیب منحنی را در اطراف G_{50} نشان می‌دهد، در جدول ۱ و ۲ ارائه شده است.

ب. رشد گیاهچه قبل از رویش

هدف آزمایش رشد گیاهچه قبل از رویش، تعیین

برهم‌کنش و رابطه بین کسب مقاومت به علف‌کش در گیاه و میزان ترکیبات ذخیره‌ای بذر، به‌ویژه کربن را با تنش‌ها، به‌خوبی نشان دهند.

نیز بررسی شود چرا که این دو تنش، به عنوان مهم‌ترین تنش‌های محیطی، معمولاً منجر به پاسخ‌های منفی در گیاهان از نظر رشد و جوانه‌زنی می‌شوند (Lee et al., 2010, Uddin et al., 2016) و می‌توانند



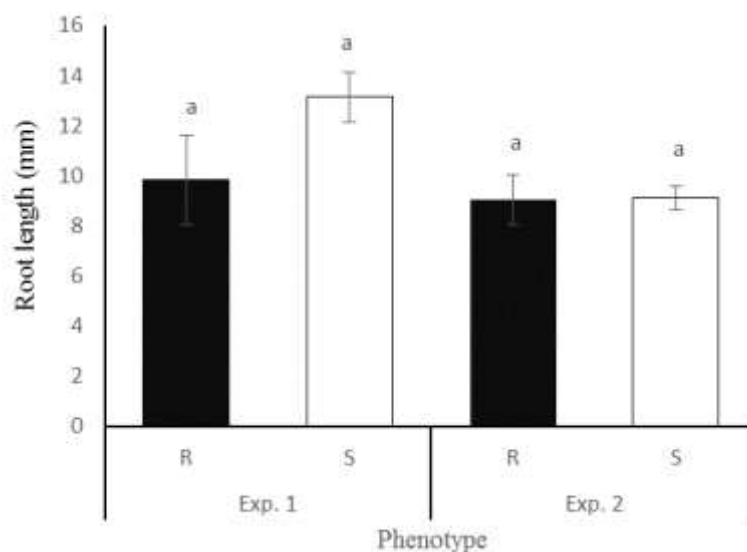
شکل ۴- طول ساقچه بیوتیپ‌های حساس (S) و مقاوم به علف‌کش (R) ایزوله شده از بین یک جمعیت دم‌روباهی کشیده با سازوکار مقاومت به محل غیر هدف. حروف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بین میانگین بیوتیپ‌ها است.

Fig 4. Shoot length of herbicide-resistant (R) and herbicide-susceptible (S) biotypes isolated within a non-target site herbicide resistant black-grass population. Columns with the same letters are not significantly different at 5% of probability level.

علف‌کش‌ها به‌ویژه از نظر G_{max} بسیار مشهود بود به‌طوری‌که می‌توان گفت بیوتیپ مقاوم به علف‌کش با کسب قابلیت تحمل به علف‌کش‌ها، توانایی خود در برابر تحمل تنش شوری و خشکی را از نظر پارامترهای جوانه‌زنی از دست داده است. این یافته‌ها، فرضیه "افزایش احتمال مشاهده و بروز هزینه شایستگی علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش در شرایط تنش‌های محیطی" را تایید می‌کند. همچنین از نظر پارامترهای رشد گیاهچه قبل از رویش، تفاوتی بین بیوتیپ‌ها از نظر طول ساقچه و ریشه‌چه وجود نداشت که نشان‌دهنده یکسان بودن ذخیره کربنی بذرها در دو بیوتیپ می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش به روشنی نشان داد که در شرایط تنش شوری (۱۶ دسی‌زیمنس بر متر مربع) و خشکی (۰/۸- مگاپاسکال)، پارامترهای جوانه‌زنی شامل بیشینه جوانه‌زنی تجمعی (G_{max}) و زمان تا رسیدن به ۵۰ درصد بیشینه جوانه‌زنی تجمعی (G_{50}) در هر دو بیوتیپ حساس و مقاوم به علف‌کش، به طور معنی‌داری نسبت به شرایط عدم تنش، به ترتیب کاهش و افزایش پیدا کرد. علاوه بر این در شرایط تنش، برتری بیوتیپ حساس به علف‌کش از نظر پارامترهای G_{50} و G_{max} بر بیوتیپ مقاوم، معنی‌دار بود. بنابراین در شرایط تنش، هزینه ایجاد مقاومت به



شکل ۵- طول ریشه‌چه بیوتیپ‌های حساس (S) و مقاوم به علف‌کش (R) ایزوله شده از بین یک جمعیت دمرواباهی کشیده با سازوکار مقاومت به محل غیر هدف. حروف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بین میانگین بیوتیپ‌ها است.

Fig 5. Root length of herbicide-resistant (R) and herbicide-susceptible (S) Biotypes isolated within a non-target site herbicide resistant black-grass population. Columns with the same letters are not significantly different at 5% of probability level.

منابع

- Cousens, R.D., Fournier-Level, A. 2018. Herbicide resistance costs: What are we actually measuring and why? *Pest Manag. Sci.* 74:1539-1546.
- Delye, C., Menchari, Y., Michel, S., Cadet, E. and Le Corre, V. 2013. A new insight into arable weed adaptive evolution: mutations endowing herbicide resistance also affect germination dynamics and seedling emergence. *Ann. Bot.* 111:681-691.
- Du, L., Bai, S., Li, Q., Qu, M., Yuan, G., Guo, W. and Wang, J. 2017. Effect of herbicide resistance endowing three ACCase mutations on seed germination and viability in American slough grass (*Beckmannia syzigachne* Steud. Fernald). *Chil. J. Agric. Res.* 77:142-149.
- Ebrahimi, E. and Eslami, S.V. 2012. Effect of environmental factors on seed germination and seedling emergence of invasive *Ceratocarpus arenarius*. *Weed Res* 52:50-59.
- Florentine, S., Weller, S., King, A., Florentine, A., Dowling, K., Westbrooke, M. and Chauhan, B.S. 2018. Seed germination response of a noxious agricultural weed *Echium plantagineum* to temperature, light, pH, drought stress, salinity, heat and smoke. *Crop and Pasture Sci.* 69:326-333.
- Heap, I. 2019. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. 2018;11:1. Available: www.weedscience.org [Online]. Available: www.weedscience.org [Accessed January 2018].
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J.V. and Herberger, J.P. 1997. *World Weeds: Natural Histories and Distribution*, New York, USA, John Wiley and Sons
- Hothorn, T., Bretz, F. and Westfall, P. 2008. Simultaneous Inference in general parametric models. *Biom. J.* 50:346-363.
- Javaid, M.M., Tanveer, A., 2014. Germination ecology of *Emex spinosa* and *Emex australis*, invasive weeds of winter crops. *Weed Res.*, 54, 565-575.
- Jensen, S.M., Andreassen, C., Streibig, J.C., Keshtkar, E. and Ritz, C. 2017. A note on the analysis of germination data from complex experimental designs. *Seed Sci. Res.* 27:321-327.
- Keshtkar, E., Abdolshahi, R., Sasanfar, H., Zand, E., Beffa, R., Dayan, F.E. and Kudsk, P. 2019. Assessing fitness costs from a herbicide resistance management perspective: A review and insight. *Weed Sci.* 67:137-148.

- Keshtkar, E., Mathiassen, S.K. and Kudsk, P. 2017. No vegetative and fecundity fitness cost associated with Acetyl-Coenzyme A Carboxylase non-target-site resistance in a black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) population. *Front. Plant Sci.* 8.
- Keshtkar, E., Mathiassen, S.K., Moss, S.R. and Kudsk, P. 2015. Resistance profile of herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides* (black-grass) populations in Denmark. *Crop Prot.* 69:83-89.
- Lee, Y.P., Baek, K.H., Lee, H.S., Kwak, S.S., Bang, J.W. and Kwon, S.Y., 2010. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *J. Exp. Bot.* 61:2499-2506.
- Lehnhoff, E.A., Keith, B.K., Dyer, W.E. and Menalled, F.D. 2013. Impact of biotic and abiotic stresses on the competitive ability of multiple herbicide resistant wild oat (*Avena fatua*). *PLoS One* 8: e64478.
- Lutman, P.J.W., Moss, S.R., Cook, S. and Welham, S.J. 2013. A review of the effects of crop agronomy on the management of *Alopecurus myosuroides*. *Weed Res.* 53:299-313.
- Michel, B.E. and Kaufmann, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 51:914-916.
- Modarres-Sanavy, S.A.M., Panahi, M., Khatamian Oskoe, A.S. and Ghanati, F. 2014. Laboratory methods and modern techniques in crop sciences. Zanjan Jahad Daneshgahi Press
- Narimani, V., Minbashi, M. and Pouri, Z., 2012. Evaluation of abundance and preparation of dominant weeds distribution map in irrigated and rain fed wheat fields of East Azerbaijan province, Iran. *J. Crop Ecophysiol.* 6:233-303.
- Neve, P. 2007. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. *Weed Res.* 47: 365-369.
- Norsworthy, J.K., Ward, S.M., Shaw, D.R., Llewellyn, R.S., Nichols, R.L., Webster, T.M., Bradley, K.W., Frisvold, G., Powles, S.B., Burgos, N.R., Witt, W.W. and Barrett, M. 2012. Reducing the risks of herbicide resistance: Best management practices and recommendations. *Weed Sci.* 60:31-62.
- Oerke, E.C., 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144:31-43.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. and Gerhard, D. 2015a. Dose-response analysis using R. *PLoS One* 10: e0146021.
- Ritz, C., Kniss, A.R. and Streibig, J.C. 2015b. Research methods in weed science: Statistics. *Weed Sci.* 63:166-187.
- Ritz, C., Pipper, C.B. and Streibig, J.C. 2013. Analysis of germination data from agricultural experiments. *Eur. J. Agron.* 45:1-6.
- Soheili, B. 2013. Studying geographical distribution map of weeds of irrigated wheat fields of Ardabil province (In Persian). *J. Crop Ecophysiol.* 7:159-181.
- Uddin MN, Hossain MA, Burritt DJ (2016) Salinity and drought stress: similarities and differences in oxidative responses and cellular redox regulation. Pages 784 in Ahmad P, ed. *Water stress and crop plants: A Sustainable Approach: Wiley-Blackwell*
- Viechtbauer, W. 2010. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J Stat. Softw.* 36:1-48.
- Vila-Aiub, M.M., Gundel, P.E. and Preston, C. 2015. Experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes. *Weed Sci.* 63:203-216.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P. and Powles, S.B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytol.* 184:751-767.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P. and Roux, F. 2011. A unified approach to the estimation and interpretation of resistance costs in plants. *J. Hered.* 107:386-394.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P., Steadman, K.J. and Powles, S.B. 2005. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *J. Appl. Ecol.* 42:288-298.
- Vizantinopoulos, S. and Katranis, N. 1998. Management of blackgrass (*Alopecurus myosuroides*) in winter wheat in Greece. *Weed Technol.* 12:484-490.
- Wu, X., Zhang, T., Pan, L., Wang, L., Xu, H. and Dong, L. 2016. Germination requirements differ between fenoxaprop-p-ethyl resistant and susceptible japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) biotypes. *Weed Sci.* 64:653-663.