

## Einsatz der dCAPS-Technologie zur Differenzierung von Trp574-Leu und Ser653-Asn in Blattproben von Raps und Clearfield®-Raps

*The utilization of the dCAPS technology to discriminate Trp574-Leu and Ser653-Asn in leaf samples of Clearfield® oilseed rape and conventional oilseed rape*

Alexander Proges<sup>1</sup>, Hans-Jörg Jacobsen<sup>1</sup> & Jean Wagner<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik, Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover

<sup>2</sup>Plantalyt GmbH, Vahrenwalder Straße 269 A, D-30179 Hannover

\*Korrespondierender Autor, jean.wagner@plantalyt.com

DOI: 10.5073/jka.2012.434.018

### Zusammenfassung

Bei Clearfield®-Raps (*Brassica napus* L.) handelt es sich um Rapsorten, in denen eine Unkrautbekämpfung mit Herbiziden aus der Gruppe der ALS-Inhibitoren möglich ist. Zwei Allele der ALS (Acetolactat-Synthase), die eine Target-Site Resistance (wirktorspezifische Resistenz, bzw. Toleranz) bewirken, sind in zwei der fünf ALS-Gene des Raps eingekreuzt. Der Clearfield®-Raps differenziert sich vom konventionellen Raps durch die Aminosäure Asparagin an Stelle von Serin im Kodon 653 des ALS I Gens und bewirkt eine erhöhte Toleranz speziell gegen Herbizide aus der Gruppe der Imidazolinone. Das Allel von ALS III differenziert sich durch die Aminosäure Leucin an Stelle von Tryptophan im Kodon 574 und bewirkt eine Toleranz hauptsächlich gegen Imidazolinone, Sulfonylharnstoffe und Triazolopyrimidine (gruppenübergreifende Toleranz). Letzteres ist für eine erschwerte Bekämpfung von Clearfield®-Raps als Ausfallraps mit Sulfonylharnstoffen und Triazolopyrimidinen z.B. in Getreide verantwortlich. In dieser Arbeit wird ein Test vorgestellt, der eine Allel-Diskriminierung mittels der dCAPS-Technologie (derived cleaved amplified polymorphic sequence) ermöglicht. So lässt sich ein Clearfield®-Raps von einem konventionellen Raps an Blättern und anderen Pflanzenteilen mittel Molekulargenetik differenzieren. Durch eine Kombination von PCR und der Behandlung der PCR-Produkte durch spezifische Restriktionsendonukleasen werden die Resistenz-Allele auf dem ALS I (nach Behandlung mit *MnlI*) und ALS III (nach Behandlung mit *NcoI*) mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Für den Nachweis einer Minderwirkung von Sulfonylharnstoffen gegen Ausfallraps reicht oft die Identifizierung von Leu574 aus. Um sicher zu gehen und einen Clearfield®-Raps von natürlich auftretenden Raps-Varianten mit einer Resistenz zu unterscheiden sollte immer auch ein Nachweis von Asn653 durchgeführt werden. Die hier dargestellte Technik setzt keine spezielle Laboreinrichtung voraus und lässt sich mit molekulargenetischen Grundkenntnissen etablieren. So können landwirtschaftliche Einrichtungen flexibel auf einen Nachweisbedarf von Clearfield®-Raps in der Praxis reagieren.

**Stichwörter:** Ausfallraps, Auskreuzung, Clearfield®, dCAPS, Herbizidtoleranz, Imidazolinone, Leu574, Ser, SNPs, Sulfonylharnstoffe, Triazolopyrimidine, Unkrautbekämpfung

### Summary

Clearfield® rape (*Brassica napus* L.) derives from classical breeding methods and makes weed control with ALS-inhibiting herbicides in oilseed rape possible. Two alleles of the ALS (acetolactate synthase), which are responsible for target site resistance (or tolerance, respectively), were crossed into two of the five ALS genes of oilseed rape. The allele of Clearfield® oilseed rape in ALS I is different from other ALS alleles by an exchange of the amino acid serine by asparagine in the codon 653 and is responsible for tolerance to imidazolinones. The allele in ALS III differs by an exchange of tryptophan to leucine in the codon 574 and causes a broad tolerance to imidazolinones, sulfonylureas, and triazolopyrimidines. The latter allele hinders mainly the control of volunteer Clearfield® oilseed rape with sulfonylureas and triazolopyrimidines e.g. in cereals. To decipher the alleles in Clearfield® oilseed rape and conventional oilseed rape a test based on the dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) technology was developed and is presented here. With this test a Clearfield® oilseed rape can be discriminated in leaf samples or other parts of plants from conventional oilseed rape.

A combination of PCR and digestion with restriction endonucleases is used to discriminate the alleles of ALS I (after incubation of PCR-products with *MnlI*) and of ALS III (after incubation of PCR-products with *NcoI*). The identification of Leu574 is in most cases probably sufficient for proving reduced efficacy of sulfonylureas and triazolopyrimidines. To come to a clear identification and to discriminate Clearfield® oilseed rape from natural occurring target-site resistant oilseed rape both alleles should be analysed in samples. The dCAPS technology does not require special lab equipment and can be performed with the basic equipment of every molecular

biological working lab. With the herein presented protocol the agricultural consulting and research facilities can react flexible on the need to prove Clearfield® oilseed rape variations from conventional oilseed rape in practice.

**Keywords:** dCAPS, herbicide tolerance, imidazolinone, outcrossing, single nucleotide polymorphism, sulfonyleureas, triazolopyrimidines, volunteer rape, weed control

## 1. Einleitung

Das Clearfield®-System ist ein von der Firma BASF in Zusammenarbeit mit Züchtungsunternehmen entwickeltes System zur Unkrautbekämpfung in verschiedenen Kulturen. Durch Einführung von Allelen der natürlich auftretenden wirkortspezifischen Herbizidresistenz (Herbicide Target-Site Resistance) bzw. Toleranz (bei Kulturpflanzen) wird mittels konventioneller Züchtung eine Selektivität gegenüber Imidazolinonen und – in unterschiedlicher Ausprägung – weiteren ALS-Inhibitoren, die zu den Sulfonylharnstoffen und Triazolopyrimidinen gehören, ermöglicht (TAN et al., 2005). Im Clearfield®-Raps kann so als Komplementärherbizid das Imazamox (ein Imidazolinon) zur Erweiterung der Bekämpfungsmöglichkeiten eingesetzt werden (PFERDMENGES et al., 2010).

Die Imidazolinone blockieren ähnlich wie die Sulfonylharnstoffe, die Triazolopyrimidine und die Sulfonylaminocarbonyltriazolone das Enzym ALS (Acetolactat-Synthase), das die erste Reaktion des Syntheseweges der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin katalysiert (SINGH und SHANER, 1995). In allen Pflanzen wird mindestens ein ALS-Enzym konstitutiv exprimiert, wobei die Intensität in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanze und der Gewebeart variiert. Der allo-tetraploide Raps (*Brassica napus* L.) besitzt wahrscheinlich die komplexeste Genfamilie mit fünf ALS Genen, von denen zwei Gene, ALS I und ALS III konstitutiv exprimiert werden und für den Stoffwechsel entscheidend sind (OUELLET et al., 1992). Die höchste Aktivität findet sich in meristematischem Gewebe (SCHMITT und SINGH, 1990). Eine Hemmung der ALS-Aktivität führt wenige Tage nach Applikation der Herbizide zu einem Wachstumsstillstand der Pflanzen und zu einer irreversiblen „Entgleisung“ des Stoffwechsels, die über zwei bis drei Wochen zum Tod der Pflanzen führt.

Von den pflanzlichen ALS-Genen sind verschiedene Varianten bekannt, die sich durch Punktmutationen oder so genannten SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) unterscheiden und weniger intensiv oder nahezu gar nicht durch herbizide Wirkstoffe gehemmt werden. Sie spielen weltweit bei der Evolution der Herbizidresistenz eine wichtige Rolle. So werden z.B. in Weidelgräsern (*Lolium* spp. L.), Ackerfuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides* Huds.) und Windhalm (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) Varianten der ALS-Gene gefunden, in denen durch den Austausch einer Base im Kodon von Prolin (Pro197) die Aminosäure Threonin (Thr) kodiert und in die ALS eingebaut wird (DÉLYE und BOUCANSAUD, 2008; DÉLYE et al., 2009; KRYSIAK et al., 2009). Der Austausch führt zu Resistenzen gegen Sulfonylharnstoffe und Triazolopyrimidine, deren Ausprägung neben dem Wirkstoff von der Frequenz der Genotypen in der Population abhängt. Eine Resistenz gegen Imazamox besteht bei einer ALS mit Thr197 wahrscheinlich nicht, was sich aus Untersuchungen verschiedener Unkrautarten wie dem Hederich (*Raphanus raphanistrum* L.) mit gleicher Resistenzursache ableiten lässt (z.B. YU et al., 2003).

Eine andere wichtige Variante, die weltweit am häufigsten in Unkräutern mit einer Target-Site Resistanz gegen ALS-Inhibitoren nachgewiesen wird, ist der Austausch von Tryptophan (Trp574) gegen Leucin. Diese Variante vermittelt eine hohe Ausprägung von Resistenz gegen alle bekannten ALS-Inhibitoren, also auch gegen Imazamox, und ist auch bei den genannten Gräsern verbreitet (DÉLYE und BOUCANSAUD, J., 2008). Bei dieser Target-Site Resistenz findet sich eine Überschneidung zwischen der Evolution von Herbizidresistenz in Unkräutern auf der einen und der Toleranz im Clearfield®-Raps auf der anderen Seite. Im Clearfield®-Raps ist eine Variante der ALS III mit Leu574 eingekreuzt. Diese ALS ist tolerant gegen Imazamox und in unterschiedlicher Intensität gegen Sulfonylharnstoffe und Triazolopyrimidine. Die Verbreitung dieser Target-site Resistenz in Gräsern und die Möglichkeit einer Selektion durch das Imazamox im Fruchtwechsel sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Der Clearfield®-Raps hat neben der Leu574 Variante des ALS III zusätzlich eine Variante des ALS I. Bei dieser Variante wird das Serin (Ser653) gegen Asparagin (Asn) ausgetauscht. Sie vermittelt eine

Toleranz gegen Imidazolinole und – mit geringerer Intensität – gegen die Sulfonylharnstoffe und Triazolopyrimidine. Eine sichere Ausprägung der Toleranz im Clearfield®-Raps erfolgt dann, wenn Leu574 und Asn653 homozygot vorliegen.

Verschiedene Testverfahren zum Nachweis einer Target-Site Resistenz in Unkräutern sind etabliert (siehe Übersichtsartikel CORBETT und TARDIF, 2006). In Analogie zum Nachweis einer Target-site Resistenz in Unkräutern wurden in dieser Arbeit zwei Assays auf der Basis der dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, NEFF et al., 2010) zur Identifizierung der Trp574 und Leu574 Varianten auf dem ALS Gen III auf der Einen und der Ser653 und Asn653 Varianten auf dem ALS Gen I auf der anderen Seite entwickelt. KAUNDUN und WINDASS (2006) nutzen diese Technologie erstmals zum Nachweis von Herbizidresistenz in Unkräutern.

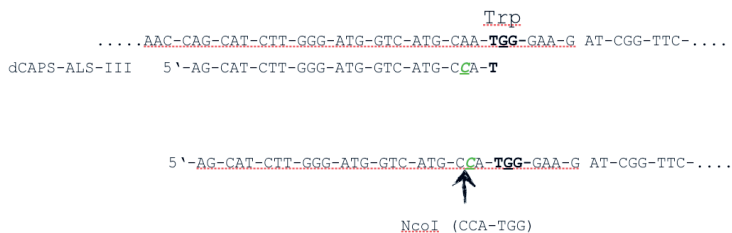
## 2. Material und Methoden

### 2.1 Entwicklung der Assays auf Basis der dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

**Prinzip:** Das Prinzip der dCAPS ist der Einbau einer Falschbase durch einen der beiden PCR-Primer (dCAPS-Primer) in das PCR-Produkt. Das PCR-Produkt selber enthält die genetische Information eines Individuums. Nun ist der dCAPS-Primer, der die Falschbase einbaut, so gelegt, dass er vor dem SNP (Single Nucleotide Polymorphism oder Mutationsstelle, der Punkt, an dem das Kodon verändert wird) liegt. Zusammen mit der Mutationsstelle generiert der Primer durch den Einbau der Fehlbase im PCR-Produkt eine Schnittstelle, die spezifisch für eine Restriktionsendonuklease ist. Ein Schnitt (=Verkürzung) des PCR-Produktes belegt dann, dass das erwartete Allel vorliegt. Verändert eine genetische Abweichung die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease, wird das Fragment nicht geschnitten (Abb. 1 und 2). Im hier vorgestellten Beispiel wird bei Vorliegen der genetischen Information für Trp574 das PCR-Fragment geschnitten (Verkürzung des PCR-Produktes). Liegt eine Leu574-Variante vor (was der genetischen Konstellation im Clearfield®-Raps entspricht), dann unterbleibt der Schnitt durch *NcoI*. Mit diesem System lassen sich nach Gelelektrophorese die verschiedenen Allele nachweisen. Als Ergebnis erhält man eine binäre Information (Schnitt ja/nein), die – zurückgeführt auf das hinterlegte Design – einen Rückschluss auf die genetische Konstellation zulässt.

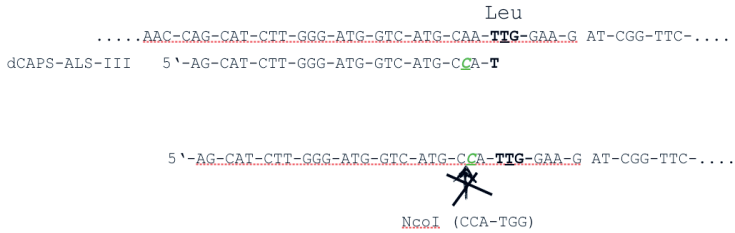
**Genetische Information und Software:** Als Basis für die Assays dienen die genetischen Informationen des ALS I (Z11524.1) und ALS III (Z11526.1). Für die Entwicklung der Assays wurden Vorschläge der Software dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) angenommen.

#### Assay-Design am Beispiel der ALS III:



**Abb. 1** Oben: Kodon der Aminosäure Tryptophan (Trp im konventionellen Raps) im Kontext der genetischen Information in der Pflanze, unterstrichen ist der SNP. Direkt darunter der Primer dCAPS-ALS-III mit der Fehlbase, die durch den Primer in das PCR-Produkt eingebaut wird (kursiv und unterstrichen). Unten: 5'-Ende des PCR-Produktes. Darunter in Klammern die Schnittstelle des Enzyms *NcoI*. Der Pfeil zeigt die Schnittstelle durch *NcoI*. Das PCR Produkt wird nach dem Schnitt um 21 Basen kürzer.

**Fig. 1** Above: Codon of Tryptophan (Trp in oilseed rape) in the context of the genetic information in the plant. The SNP is underlined. Primer dCAPS-ALS-III has one mismatches in its sequence (in italic and bold), which is incorporated into the PCR fragment. Below: The 5'-end of the PCR product. Below in brackets the cutting site of the restriction endonuclease *NcoI*. The arrow shows the position of cutting in the DNA strand. After cutting the PCR product is about 21 base pairs shorter.



**Abb. 2** Erklärung wie in Abbildung 1. Unterschied: Das Kodon, das für Leucin (Leu, Clearfield®-Raps) kodiert, zerstört durch den Ersatz von G durch T die Erkennungssequenz CCA-TGG des Enzyms *NcoI*. Das PCR-Produkt wird nicht geschnitten und behält seine ursprüngliche Länge.

**Fig. 2** Use Explanation like in Figure 1. The difference: The Codon of Leucine (Leu in Clearfield® rape) in destroying through the exchange of G by T the recognition site of the endorestriction enzyme *NcoI* (CCA-TGG). The fragment is not cut and retains its length.

## 2.2 DNA-Extraktion aus Blattmaterial

Aus Blattproben von Clearfield®-Raps und konventionellem Raps wurden DNA-Rohextrakte hergestellt. Dafür wurden ca. 0,5 cm<sup>2</sup> (ca. 5-10 mg) frisches Blattmaterial entnommen und in einem 2 ml Polypropylen Reaktionsgefäß zusammen mit 400 µl Extraktionspuffer (100 mM Tris, 1 M KCl, 10 mM EDTA, pH 7,6) und einer Edelstahlkugel von 5 mm Durchmesser in einer Kugelmühle (Retsch MM400) für zwei Minuten bei 30 Hz aufgeschlossen. Das so entstandene Homogenat wurde anschließend mit einer Laborzentrifuge (Heraeus Biofuge pico) bei 16060 g für zwei Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden 25 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Frischextrakte wurden im Verhältnis 1:65 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert. Bei guter Qualität des Extraktes wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet. In der Routine ist eine Aufreinigung der DNA mittels verschiedener konventioneller Kits empfehlenswert.

## 2.3 PCR zur Amplifikation der ALS-Gene I und III

ALS I und III von *Brassica napus* zeigen eine große Homologie (> 97 %). Für eine ausreichende Diskriminierung beider ALS-Gene und ihrer Allele wurden zwei PCR-Schritte durchgeführt. Die Primer FwdALS-I und RevALS-I (Tab. 1) wurden eingesetzt, um ein Fragment der ALS I zu amplifizieren, das die Information für Trp574 und Ser/Asn653 enthält. Für die Amplifikation von Fragmenten der ALS III mit der Information Trp/Leu574 und Ser653 wurden die Primer FwdALS-III und RevALS-III eingesetzt (Tab. 1). In beiden Fällen wurde ein Fragment von 610 bp amplifiziert. Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Die Konzentration der Primer betrug 0,4 µM (jeweils), die dNTPs wurden mit einer Konzentration von 0,4 mM (jeweils) und die DNA Polymerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit) wurde mit 0,04 U/µl in 5 µl Puffer mit 2,5 mM MgCl angesetzt. Als DANN-Template wurden 5 µl des verdünnten Rohextraktes eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit folgendem Programm gefahren: Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten, 40 Zyklen (Denaturierung: 94 °C, 30 Sekunden, Annealing: 55 °C, 30 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 60 Sekunden). Als abschließender Schritt erfolgte eine Elongation bei 72 °C für 10 Minuten. Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

**Tab. 1** Primer für die Amplifikation von Fragmenten der Gene ALS I und ALS III.

**Tab. 1** Primers used to amplify fragments of the genes ALS I and ALS III.

Name	Sequenz (5'-3')	Zielgen	Fragmentlänge	Annealingtemp.
FwdALS-I	cctcgagctatgggtttt	ALS I	610 bp	55 °C
RevALS-I	agcgagtacgtctggaaca			
FwdALS-III	gactcggagctatgggtttc	ALS III	610 bp	55 °C
RevALS-III	agcgagtaagtctggaaca			

## 2.4 Identifikation der Allele Trp574 und Leu574 des Gens ALS III

Die PCR-Produkte der PCR wie unter 2.2 beschrieben wurden als Template für die PCR mit den dCAPS-Primern verwendet, um einen unspezifischen Verlauf der Reaktionen und damit die Produktion von Nebenprodukten durch die dCAPS-Primer zu minimieren. Für den Nachweis Ser653 vs. Asn653 im ALS I wurde die Primerkombination For-ALS-I-nested und dCAPS-ALS-I verwendet (Tab. 2). Die PCR wurde wie unter 2.2 beschrieben angesetzt. Als DNA-Template wurde 0,1 µl PCR Produkt (FwdALS-I/RevALS-I) verwendet. Für den Nachweis Trp574 vs. Leu574 im ALS III wurde die Primerkombination dCAPS-ALS-III und RevALS-III verwendet (Tab. 2). Als DNA-Template wurde 0,1 µl PCR Produkt (FwdALS-III/RevALS-III) verwendet. Die Produkte wurden bis zum Restriktionsverdau bei 4 °C gelagert. Für den Restriktionsverdau der PCR-Produkte wurden Fast Digest® Kits von Fermentas eingesetzt. Die Mengenverhältnisse der Reagenzien und PCR-Fragmente entsprachen den Angaben des Herstellers. Die Inkubationszeiten wurden jedoch bis auf 90 min heraufgesetzt, um ein möglichst vollständiges Schneiden zu erreichen. Im Anschluss an die Inkubation mit Restriktionsendonukleasen wurde vom Ansatz ein Aliquot von 10 µl auf ein 3 %iges (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 8 V/cm durchgeführt. Den Gelen wurde ein Farbstoff zugegeben (10 µl einer 0,01 % Serva-G-Stain) und die DNA bei ca. 300 nm detektiert.

**Tab. 2** Primer, dCAPS-Primer und Restriktionsendonukleasen. Die Fehlbase, die durch den dCAPS-Primer eingebaut wird und eine Schnittstelle mit dem SNP bildet, ist hervorgehoben (Erklärung im Text). Eine Interpretation der Fragmente ist in der letzten Spalte angegeben.

**Tab. 2** *Primers, dCAPS primers and restriction endonucleases. Mismatching bases which are incorporated via the dCAPS-primer are creating a restriction site and are bold and underlined. An interpretation of fragments is given in the last column.*

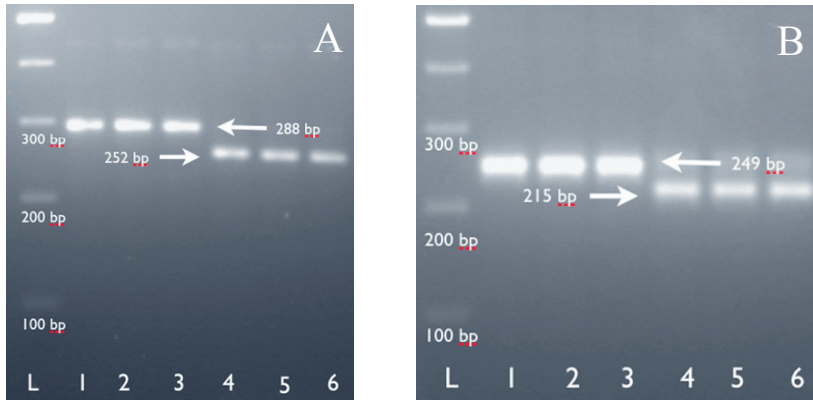
Name	Sequenz (5'-3')	Länge, Annealingtemp.	Endonucleas en (Erk.-Seq.)	Marker
For-ALS-I-nested	CATCTTGGGATGGTCATGCA	288 bp, 55 °C	MnII (CCTC(N)7 <sup>^</sup> )	252 bp, sensitiv, Ser653
dCAPS-ALS-I	TGTTATTACATCTTTGAAAGTCCAC <b><u>CT</u></b>			288 bp, resistent, Asn653
dCAPS-ALS-III	AACAACCAGCATCTTGGGATGGTCATG <b><u>CC</u></b> AT	249 bp, 55 °C	NcoI (CCATGG)	215 bp, sensitiv, Trp574
RevALS-III	TTCTTGGTGCGGACAGATG			249 bp, resistent, Leu574

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Diskriminierung der Allele der ALS mittels dCAPS

Die Amplifikate der Voramplifikation von ALS I und ALS III wurden sequenziert, um sicher zu gehen, dass die PCR-Fragmente die entsprechende Information enthalten. ALS I und ALS III konnten mit der unter 2.2 dargestellten PCR diskriminierend amplifiziert werden. Mit diesen Fragmenten als Template wurden mit den dCAPS-Primern Fragmente generiert, die nach einer Behandlung mit Restriktionsendonukleasen eine Differenzierung der ALS-Varianten möglich machten. In Abbildung 3 sind Fragmente von je drei Blättern Clearfield®-Raps und drei Blättern konventionellem Raps, die nach PCR und Behandlung mit Restriktionsendonukleasen in 3 %igen Agarose-Gel aufgetrennt wurden, abgebildet. Eine Differenzierung von konventionellem Raps und Clearfield®-Raps ist hier leicht möglich. In allen drei Proben liegen die genetischen Informationen homozygot vor, was eine wichtige Voraussetzung für eine ausreichende Selektivität von Clearfield®-Raps ist. Das Nachweisverfahren kann genutzt werden, um zu klären, ob die Ursache einer Minderwirkung bei der Bekämpfung von

Raps in anderen Kulturen auf einen Clearfield®-Raps zurückzuführen ist. Auch bei Verdacht, dass ein Clearfield®-Raps in konventionellen Raps eingekreuzt wurde, ist ein Nachweis möglich. Für den eindeutigen Nachweis einer Variante des Clearfield®-Raps sollte allerdings auch immer der Nachweis von Asn653 auf dem ALS Gen I nachgewiesen werden, da eine natürlich auftretende Mutation selten ist und immer nur ein Gen betrifft. Im Falle einer Auskreuzung lassen sich beide Allele der ALS heterozygot nachweisen.



**Abb. 3** A) Nachweis von Ser653/Asn653, B) Nachweis von Trp574/Leu574. Die Fragmente des Clearfield®-Raps (Spur 1-3) werden nicht geschnitten und behalten ihre Größe (288 bp bzw. 249 bp), während die Fragmente des konventionellen Raps (Spur 4-6) geschnitten werden und das Vorliegen von Ser653 (252 bp) und Trp574 (215 bp) belegen. L = Molekularer Größenmarker.

**Fig. 3** A) Proof of Ser653/Asn653, B) Proof of Trp574/Leu574. The fragments that derive from Clearfield® oilseed rape (lane 1-3) are uncut (they retain their size of 288 bp and 249 bp, respectively), while the fragments of oilseed rape (lane 4-6) are cut and proof the presence of Ser653 (252 bp) and Trp574 (215 bp). L = Molecular weight marker.

Der Vorteil dieses Testverfahrens ist der geringe apparative Aufwand und die leichte Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Eine molekulargenetische Basisausstattung im Labor zur Durchführung einer PCR und zum Nachweis der DNA-Fragmente ist ausreichend und macht den hier erarbeiteten Test vielseitig einsetzbar.

## Literatur

- CORBETT, C.-A. UND F.J. TARDIF, 2006: DETECTION OF RESISTANCE TO ACETOLACTATE SYNTHASE INHIBITORS IN WEEDS WITH EMPHASIS ON DNA-BASED TECHNIQUES: A REVIEW. *PEST MANAGEMENT SCIENCE* **62**, 584-597.
- DÉLYE, C. UND K. BOUCANSAUD, 2008: A MOLECULAR ASSAY FOR THE PROACTIVE DETECTION OF TARGET SITE-BASED RESISTANCE TO HERBICIDES INHIBITING ACETOLACTATE SYNTHASE IN *ALOPECURUS MYOSUROIDES*. *WEED RESEARCH* **48**, 97-101.
- DÉLYE, C., K. BOUCANSAUD, F. PERNIN UND V. LE CORRE, 2009: A VARIATION IN THE GENE ENCODING ACETOLACTATE-SYNTHASE IN *LOLIUM* SPECIES AND PROACTIVE DETECTION OF MUTANT, HERBICIDE-RESISTANT ALLELES. *WEED RESEARCH* **49**, 326-336.
- DÉLYE, C., F. PERNIN UND S. MICHEL, 2011: „UNIVERSAL“ PCR ASSAYS DETECTING MUTATIONS IN ACETYL-COENZYME A CARBOXYLASE OR ACETOLACTATE SYNTHASE THAT ENDOW HERBICIDE RESISTANCE IN GRASS WEEDS. *WEED RESEARCH* **51**, 353-362.
- KRYSIAK, M., S.W. GAWROŃSKI, K. ADAMCZEWSKI UND R. KIERZEK, 2011: ALS GENE MUTATIONS IN *APERA SPICA-VENTI* CONFER BROAD-RANGE RESISTANCE TO HERBICIDES. *JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH* **51**, 261-267.
- NEFF, M.M., J.D. NEFF, J. CHORY UND A.E. PEPPER, 1998: dCAPS, A SIMPLE TECHNIQUE FOR GENETIC ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS: EXPERIMENTAL APPLICATIONS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* GENETICS. *THE PLANT JOURNAL* **14**, 387-192.
- PFERDMENGES, F., S. CHENEVIER, H. VANTIEGHEM, A. SCHÖNHAMMER, M. PFENNING UND R. KEHLER, 2010: CLEARFIELD®-PRODUKTIONSSYSTEM: DAS ZUSAMMENSPIEL VON ZÜCHTUNG UND PFLANZENSCHUTZ. *JULIUS-KÜHN-ARCHIV* **428**, 484.
- RUTLEDGE R., T. OUELLET, J. HATTORI UND B. MIKI, 1991: MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENETIC ORIGIN OF THE BRASSICA NAPUS ACETOHYDROXYACID SYNTHASE MULTIGENE FAMILY. *MOLECULAR AND GENERAL GENETICS* **229**, 31-40.

- SCHMITT, G.K. UND B.K. SINGH, 1990: TISSUE DISTRIBUTION OF ACETOHYDROXYACID SYNTHASE ACTIVITY AT VARIOUS DEVELOPMENTAL STAGES OF LIMA BEAN. PESTICIDE SCIENCE **30**, 418-419.
- TAN, S., R.R. EVANS, M.L. DAHMER, B.K. SINGH UND D.L. SHANER, 2005: IMIDAZOLINONE-TOLERANT CROPS: HISTORY, CURRENT STATUS AND FUTURE. PEST MANAGEMENT SCIENCE **61**, 246-257.
- YU, Q., X. Q. ZHANG, A. HASHEM, M.J. WALSH UND S.B. POWLES, 2003: IMIDAZOLINONE-TOLERANT CROPS: HISTORY, CURRENT STATUS AND FUTURE. PEST MANAGEMENT SCIENCE **61**, 246-257.