

## Resistenzausprägung von hetero- und homozygot resistenten Genotypen eines Acker-Fuchsschwanz-Biotypen mit Target-Site Resistenz (Haplotyp Leu1781) in Dosis-Wirkungsversuchen mit Clethodim und Cycloxydim

*Degree of resistance of hetero- and homozygous resistant genotypes of a target-site resistant blackgrass biotype (haplotype Leu1781) in dose-response experiments with clethodim and cycloxydim*

Jean Wagner<sup>1\*</sup> und Regina G. Belz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Plantalyt GmbH, Vahrenwalder Str. 269A, 30179 Hannover

<sup>2</sup>Universität Hohenheim, Agroecology Unit (380b), 70593 Stuttgart

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



DOI 10.5073/jka.2014.443.012

### Zusammenfassung

Anhand von Dosis-Wirkungsversuchen und molekularbiologischen Analysen wurde die Reaktion der Gesamtpopulation eines Biotyps von Acker-Fuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides*) mit Target-Site Resistenz gegen ACCase-Inhibitoren (Ile1781-Leu) auf die Wirkstoffe Clethodim und Cycloxydim mit der Reaktion der homozygoten (reinerbigen) und der heterozygoten (mischerbigen) Teilpopulation verglichen. Um die beobachtete Reaktion in die einer homo- und heterozygoten Teilpopulation aufzuschlüsseln, wurden individuelle Pflanzen bezüglich des Haplotyps Leu1781 mittels SNP-Analytik (Pyrosequencing) differenziert. Für die Gesamtpopulation ergaben sich signifikant unterschiedliche Resistenzfaktoren (RF) von 8 für Clethodim und 153 für Cycloxydim. Nach Korrelation der Phäno- und Genotypen ergab sich für die heterozygote Teilpopulation ein RF von 6 für Clethodim und 118 für Cycloxydim und für die homozygote Teilpopulation ein RF von 10 für Clethodim und 136 für Cycloxydim. Obwohl sich die RF der homo- und heterozygoten Teilpopulationen nicht signifikant unterschieden, zeigten die geringeren RF der heterozygoten Teilpopulationen den deutlichen Trend einer verringerten Resistenzausprägung. Lässt sich dieser Trend in weiteren Versuchen bestätigen, so kann angenommen werden, dass die Selektion von Resistenz in einer Feld-Population neben dem eingesetzten Wirkstoff auch von der Frequenz der Genotypen abhängig ist. Die beobachteten Unterschiede zwischen der Reaktion von Acker-Fuchsschwanz mit dem Haplotyp Leu1781 auf die Wirkstoffe Clethodim und Cycloxydim verdeutlichen zudem die Bedeutung der stets individuell zu betrachtenden Konstellation von Resistenzmechanismus, Genotyp und Wirkstoff für die Selektion und Ausbreitung von Resistenz.

**Stichwörter:** *Alopecurus myosuroides*, Dosis-Wirkungsversuche, Pyrosequenzierung, Target-Site Resistenz

### Abstract

In dose-response experiments and by molecular analyses the reaction of a black grass biotype (*Alopecurus myosuroides*) with target site resistance to ACCase inhibitors (Ile1781-Leu) was examined for the response to clethodim and cycloxydim and compared to the responses of the homozygous and heterozygous sub-populations. To decipher the population into the homo- and heterozygous sub-populations, individual plants of the resistant biotype were analyzed for the haplotype Leu1781 by means of SNP analytics (pyrosequencing). For the entire population, significant different resistance factors (RF) of 8 and 153 resulted for clethodim and cycloxydim, respectively. For the heterozygous sub-population a RF of 6 was estimated for clethodim and 118 for cycloxydim. For the homozygous sub-population a RF of 10 for clethodim and 136 for cycloxydim was estimated. The RF between the homo- and heterozygous sub-populations for each herbicide were, however, not significantly different. Despite this, a tendency of the heterozygous sub-population being less resistant was indicated. Therefore, it is hypothesized that the selection of resistance depends not only on the herbicide used, but on the frequency of the genotypes in a field population. Furthermore, the significant different reaction of black grass with the haplotype 1781 to both tested herbicides reflects the meaning of the individual constellation of active ingredient, resistance mechanisms and genotype for selection and spread of resistance.

**Keywords:** *Alopecurus myosuroides*, dose-response, pyrosequencing, target-site resistance

### Einleitung

Herbizidresistente Unkrautpopulationen sind eine Folge der chemischen Unkrautbekämpfung. Die Identifizierung von Resistenzmechanismen und Kenntnisse über die Ausprägung der Resistenz

in Abhängigkeit des eingesetzten Wirkstoffes, der Unkrautart und der Genotypenfrequenz in einer Gesamtpopulation sind elementare Grundlagen eines rationalen Resistenzmanagements (DELYE *et al.*, 2007). Eine wichtige Kenngröße zur Charakterisierung der Resistenzausprägung ist der Resistenzfaktor (RF), d.h. die Reaktion in Relation zu einem sensitiven Standard. Meist wird der RF als Quotient der ED<sub>50</sub>-Werte der resistenten Population und einer sensitiven Referenzpopulation angegeben. ED<sub>50</sub>-Werte kennzeichnen den Punkt einer Dosis-Wirkungsbeziehung, an dem 50 % einer Wirkung erzielt wird. Der Quotient ergibt eine dimensionslose Zahl, die ein Maß für die Herbizidsensitivität einer Population darstellt und spezifisch für jede Kombination von Herbizid, Unkrautart und Resistenzmechanismus ist. Je höher der RF einer Population, umso stärker die Resistenzausprägung und damit die Wahrscheinlichkeit, dass bei vorschriftsmäßiger Applikation unter Praxisbedingungen keine ausreichende Kontrolle möglich ist. Die Ermittlung der für die Bestimmung von RF-Werten notwendigen ED<sub>50</sub>-Werte erfolgt als Summe der Reaktionen von Einzelpflanzen einer Population. Im Falle eines monogenetischen Resistenzmechanismus ergibt sich bei der Bestimmung des ED<sub>50</sub>-Wertes einer Population das Problem, dass das Verhältnis der Frequenzen von sensitiven und hetero- bzw. homozygot resistenten Pflanzen in der Population einen Einfluss auf die Höhe des ED<sub>50</sub>-Wertes und letztendlich auf den RF haben könnte. Die ED<sub>50</sub>-Werte und damit auch die RF-Werte von resistenten Populationen dürften deshalb bei gleichem Resistenzmechanismus bei einer gegebenen Unkrautart von Feld zu Feld stark schwanken und mit anzunehmender Sicherheit selbst an einer Stelle eines Ackers von Jahr zu Jahr variieren.

Der Acker-Fuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides* Huds.) hat einen diploiden Chromosomensatz. Eine Target-Site Resistenz (TSR) beruht auf einem Allel bzw. einem Haplotyp und kommt beim Acker-Fuchsschwanz hetero- und homozygot vor. Eine beim Acker-Fuchsschwanz weit verbreitete Target-Site Resistenz gegen ACCase-Inhibitoren ist der Haplotyp Leu1781 (DELYE, 2005). In sensitiven Pflanzen kodiert das Basen-Triplet ATA an der korrespondierenden Position 1781 im ACCase-Gen für die Aminosäure Isoleucin (Ile). Wird die erste Base des Triplets verändert (Abb. 1) resultiert das Triplet CTA oder TTA welches für die Aminosäure Leucin (Leu) kodiert. Die Konsequenz dieser punktuellen Veränderung ist eine verminderte Empfindlichkeit der ACCase gegenüber einer Inhibierung durch entsprechende herbizide Wirkstoffe. Dies wurde in verschiedenen Arbeiten durch Messung der ACCase-Aktivität von Target-Site resistenten Biotypen in Gegenwart verschiedener Wirkstoffe gezeigt (DELYE, 2005). Der Nachweis einer Target-Site Resistenz in Einzelpflanzen erfolgt über eine molekulargenetische Analyse. Mittels PCR werden dabei zunächst Fragmente der ACCase amplifiziert, um anschließend beispielweise durch verschiedene Techniken der SNP-Analytik (Single Nucleotide Polymorphism) die Target-Site Resistenz nachzuweisen und so letztendlich auch einen hetero- oder homozygoten Genotyp zu bestimmen (KAUNDUN und WINDASS, 2006; WAGNER *et al.*, 2008). Die Problematik der Aufspaltung einer resistenten Gesamtpopulation mit dem Haplotyp 1781 in sensitive, heterozygote und homozygote Genotypen ist für *Lolium* spp. bekannt (Yu *et al.*, 2007). Die Konsequenzen von Frequenzunterschieden in den drei Genotypen in Acker-Fuchsschwanz-Populationen für die Herbizidwirksamkeit und die Resistenzbewertung unter Praxisbedingungen sind nicht näher untersucht. Gleiches gilt für die Quantifizierung möglicher Unterschiede in der Sensitivität von hetero- und homozygoten Genotypen anhand von Dosis-Wirkungsversuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Reaktion einer Acker-Fuchsschwanz-Population mit Vorkommen einer Leu1781 Target-Site Resistenz gegenüber zwei ACCase-Wirkstoffen hinsichtlich folgender Versuchsfragen analysiert:

- a) Lassen sich unter Gewächshausbedingungen signifikante Unterschiede in der Ausprägung des Resistenzmechanismus bei der Anwendung von Clethodim und Cycloxydim quantifizieren und wie hoch sind die resultierenden RF?
- b) Wie wirkt sich eine heterozygote Resistenz im Vergleich zu einer homozygoten Resistenz aus und lassen sich signifikante Unterschiede zwischen homo- und heterozygot resistenten Pflanzen nachweisen?

Bei dem verwendeten resistenten Biotyp konnte in Voruntersuchungen das Vorkommen des Haplotyps Leu1781 bestätigt werden und das Vorkommen weitere Haplotypen (Trp/Cys1999, Trp/Cys2027, Ile/Asn2041, Asp/Gly2078, Cys/Arg2088, und Gly/Ala2096) weitgehend ausgeschlossen werden. Die Wahl der ACCase-Wirkstoffe fiel auf Clethodim und Cycloxydim, weil bei diesen derzeit eine metabolische Resistenz in *A. myosuroides* ausgeschlossen wird. Für die metabolische Resistenz bei *A. myosuroides* wird angenommen, dass diese bei den DIMs (ACCase Inhibitoren der Wirkstoffklasse der Cyclohexandione) nicht oder nur in geringem Umfang vorkommt (Moss *et al.*, 2003; KAUNDUN *et al.*, 2013). Für die vorliegende Arbeit wurde damit hypothetisch ausgeschlossen, dass sich andere Resistenzmechanismen als die TSR durch das Leu1781 in dem Biotyp ausprägen können. In Gewächshausversuchen wurden für beide Wirkstoffe Dosis-Wirkungsversuche durchgeführt und die behandelten Einzelpflanzen anschließend molekulargenetisch analysiert und in sensitiv, heterozygot oder homozygot klassifiziert. Anhand der für die Gesamtpopulation bzw. für die einzelnen Genotypen berechneten RF-Werte wurden die Unterschiede in der Resistenzausprägung bewertet.

## Material und Methoden

### Etablierung von Pflanzenbeständen im Gewächshaus und Herbizidapplikation.

Samen eines Biotyps von *A. myosuroides* mit TSR (BPL12\_510; Leu1781) und eines Referenz-Biotyps (Ref\_sens; Fa. Herbiseed, Twyford, England) wurden in Töpfe (Ø=10 cm) mit Lehmboden ausgesät und nach dem Auflaufen mit einer Pflanzendichte von 1 Pflanze/Topf in neue Töpfe pikiert. Bei Erreichen des BBCH 13 bis 15 wurden die Pflanzen mit den entsprechenden Aufwandmengen in 200 l/ha Spritzvolumen behandelt. Für den Wirkstoff Clethodim wurde das formulierte Produkt Select 240 EC (241,9 g a.i./l Clethodim) verwendet und für Cycloxydim das Produkt Focus Ultra (100 g a.i./l Cycloxydim). Von beiden Herbiziden wurden acht bzw. neun Dosierungen angesetzt. Die Aufwandmengen betragen 0,06 - 8,0 l/ha für Select 240 EC und 0,16 - 160 l/ha für Focus Ultra und wurden in einem Spritzstand ausgebracht. 21 Tage nach Behandlung wurden das Frischgewicht der Pflanzensprosse bestimmt.

### Entnahme von Pflanzenproben, DNA-Extraktion und PCR.

Position in der Primärsequenz des Enzyms ACCase			
... 1780 - 1781 - 1782...			
sensitive Pflanze			
... AAC -	<u>A</u> TA -	CAT ...	DNA-Sequenz
... Asn -	<u>I</u> le -	His ...	Aminosäure
resistente Pflanze			
... AAC -	<u>C</u> TA -	CAT ...	DNA-Sequenz
... Asn -	<u>L</u> eu -	His ...	Aminosäure

**Abb. 1** DNA-Sequenz in sensitiven und resistenten Pflanzen an der korrespondierenden Stelle 1781 im Protein und abgeleitete Aminosäuren. Asn=Asparagin, Ile=Isoleucin, Leu=Leucin, His=Histidin.

**Fig. 1** DNA-sequence in sensitive and resistant plants at the corresponding position 1781 of the protein and coded amino acids. Asn=asparagine, Ile=isoleucine, Leu=leucine, His=histidine.

Nach Bestimmung der Frischgewichte wurden pro Einzelpflanze ca. 2 cm lange Blattstücke von vitalen Blättern abgeschnitten und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Trocknung wurde die DNA der Pflanzen mit einem kommerziell erhältlichen Kit zur DNA Aufreinigung (DNeasy Plant Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden als Template in einer PCR eingesetzt um die entsprechenden Abschnitte des ACCase-Gens, die für das Ile/leu1781 kodieren (Abb. 1), zu amplifizieren.

Für die Amplifikation wurden die Primer Fwd-Pyr-ACCCase1781 und Rev-Pyr-ACCCase1781 eingesetzt (Tab. 1). Als Ausgangsbasis für das Primerdesign diente die genetische Information für die ACCCase von *A. myosuroides* in der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) mit der Bezeichnung AJ310767. Das zu erwartende Fragment betrug 182 bp. Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl mit einem kommerziellen Master-Mix Kit (Taq PCR Master Mix Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Konzentration der Primer betrug jeweils 0,4 µM und als PCR-Template wurden 3 µl der DNA-Extrakte eingesetzt.

**Tab. 1** Primer zur Amplifikation des ACCCase-Abschnittes, der die Sequenz für Ile/Leu 1781 enthält.

**Tab. 1** *Primer for the amplification of the ACCCase section containing the sequence for Ile/Leu 1781.*

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temp.	Länge des PCR-Fragments
Fwd-Pyr-ACCCase1781	gcacacaagatgcagctagatagt	53 °C	182 bp
Rev-Pyr-ACCCase1781	tccgattccaacagttcgt		

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler® gradient, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit folgendem Temperaturprofil gefahren: Denaturierung bei 94 °C für 5 min, danach 40 Zyklen (Denaturierung: 94 °C, 20 s; Annealing: 54 °C, 20 s; Elongation: 72 °C, 20 s). Die PCR-Produkte wurden mittels Pyrosequencing (RONAGHI und ELAHI, 2002) auf einem Pyrosequencer (PSQ 96MA, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) analysiert. Für die Sequenzierung wurde der Primer Seq-ACCCase1781 (Tab. 2) verwendet.

**Tab. 2** Primer zur Sequenzierung und Pipettierschema der Nukleotide (Sequence to Analyze) im Pyrosequencing-Verfahren.

**Tab. 2** *Primer for sequencing and pipetting scheme of the nucleotides (Sequence to Analyze) in the pyrosequencing procedure.*

Sequenzier-Primer	Sequenz (5'-3')	Sequence to Analyze
Seq-ACCCase1781	atggactaggtgtggagaac	htacatggaagtgctgctattgccag <sup>1</sup>

<sup>1</sup>h=Nukleotid in der Sequenz; kann A, C oder T sein

Statistische Analyse. Die Berechnung der Dosis-Wirkungskurven für den Parameter Frischgewicht erfolgte unter Verwendung des nichtlinearen Regressionsmodells von STREIBIG (1988) mittels IBM® SPSS® Statistics 20. Für jeden Wirkstoff wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung der Gesamtpopulation modelliert und nach molekulargenetischer Auftrennung der Population in hetero- und homozygote Einzelpflanzen auch für die misch- und reinerbigen Teilpopulationen. Mittels *F*-Test ( $\alpha=0.05$ ) wurde die Signifikanz unterschiedlicher Kurvenverläufe geprüft. Resistenzfaktoren für die resistenten Populationen (R) wurden anhand der ermittelten ED<sub>50</sub>-Werte als Quotient ED<sub>50</sub> (R)/ED<sub>50</sub> (Ref\_sens) berechnet.

## Ergebnisse und Diskussion

### Resistenzfaktoren für Clethodim und Cycloxydim.

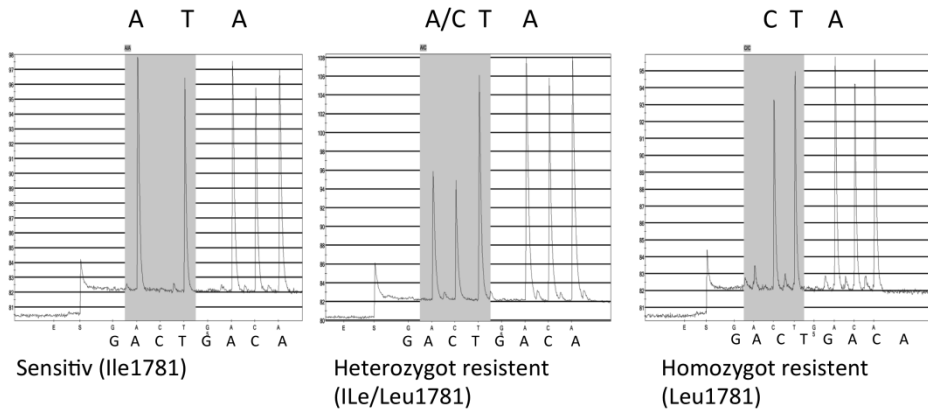
Die Dosis-Wirkungsbeziehungen (Abb. 3) ergaben für die sensitive Population einen ED<sub>50</sub> von 0,029 l/ha für Select 240 EC (Clethodim) und 0,161 l/ha für Focus Ultra (Cycloxydim). Für die resistente Population BPL12\_510 ergab sich ein ED<sub>50</sub> von 0,234 l/ha für Select 240 EC und 24,29 l/ha für Focus Ultra. Der Resistenzfaktor (RF) lag somit für Focus Ultra bei 153 und für Select 240 EC bei 8. Die ED<sub>50</sub> der gesamten Population unterschieden sich für die beiden Wirkstoffe statistisch signifikant voneinander. Beide Produkte übten somit einen unterschiedlich hohen Selektionsdruck auf Pflanzen mit dem Haplotyp Leu1781 aus. Die unterschiedlichen Resistenzfaktoren für beide Wirkstoffe lassen in Ableitung daraus die Hypothese zu, dass das Vorkommen der TSR Ile/Leu1781 in einer Population die Empfindlichkeit der Pflanzen für

formulierte Produkte bzw. einzelne Wirkstoffe unterschiedlich stark beeinflusst. Focus Ultra sollte aufgrund der stärkeren Resistenzausprägung stärker auf Leu1781 selektieren als Select 240 EC. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für jede individuelle Kombination von Wirkstoff und Resistenzmechanismus im Ackerfuchsschwanz eine unterschiedlich stark ausgeprägt Resistenz angenommen werden kann. In der Praxis wird häufig nach der Erfahrung des Autors von einer "totalen Resistenz" bei einer wirkortspezifischen Resistenz und einer partiellen Resistenz bei einer metabolischen Resistenz gesprochen. Das hier aufgeführte Beispiel für Ackerfuchsschwanz, dem Haplotyp Leu1781 und den Herbiziden Select 240 EC und Focus Ultra macht deutlich, dass eine pauschale Zuordnung von Teilwirkungen (Ausreizung der Wirkungsreserven bei niedrigen RF) zu einer metabolischen Resistenz als Mechanismus nicht gemacht werden kann. In dieser Arbeit wurde mit Herbiziden gearbeitet, deren Wirkstoffe (DIMs) die Beteiligung anderer Mechanismen als die durch das Leu1781 verursachte TSR weitgehend ausschließen. Somit lässt sich die beobachtete extrem unterschiedliche Reaktion gegenüber Focus Ultra und Select 240 EC auf nur einen Resistenzmechanismus zurückführen. Eine TSR kann sich jedoch in diploiden Unkräutern wie dem Acker-Fuchsschwanz homo- und heterozygot ausprägen. Die zweite Fragestellung in diesem Beitrag lautete daher wie sich der Genotyp einer resistenten Acker-Fuchsschwanzpflanze auf die Resistenzausprägung auswirkt. Dazu wurden die phänotypische und genotypische Reaktion miteinander korreliert und die jeweiligen Dosis-Wirkungskurven berechnet.

#### Differenzierung homo- und heterozygot resistenter Genotypen

Mittels Pyrosequencing wurden die Allele identifiziert und die behandelten Einzelpflanzen genotypisiert. Die PCR-Produkte jeder einzelnen Pflanze enthalten i.d.R. immer die Information über die Abschnitte des ACCase-Gens beider Chromosomen eines diploiden Satzes. Somit gibt es bezogen auf die beiden Haplotypen Ile1781 (sensitiv) und Leu1781 (TSR) immer drei Genotypen des Acker-Fuchsschwanz: homozygot sensitiv, heterozygot resistent und homozygot resistent. Heterozygot resistent bedeutet, dass in der Pflanze sowohl das resistente wie auch das sensitive Allel der ACCase (der allgemein: des Target-Gens) zugleich vorkommen. Sie tragen beide Erbkomponenten zu je 50 %. Aufgrund dessen könnte eine Resistenz in heterozygoten Pflanzen abgeschwächer auftreten als in homozygoten Pflanzen, was zu einem niedrigeren Resistenzfaktor als bei homozygoten Pflanzen führen würde. Zur Klärung dieser Hypothese wurden die überlebenden Pflanzen aus verschiedenen Dosierungen mittels Pyrosequencing auf ihren Genotyp hin analysiert und im Anschluss in eine hetero- und homozygote Teilpopulation gruppiert. In Abbildung 2 sind die Pyrogramme für sensitive, heterozygot resistente und homozygot resistente Pflanzen dargestellt. Die PCR-Produkte enthalten immer Informationen beider Allele. Die gelb hervorgehobenen Bereiche in Abbildung 2 markieren den Bereich der Sequenz, der variieren kann. Die Anschluss-Sequenz ACA ist für alle Proben gleich und dient als Qualitätskontrolle einer erfolgreichen Sequenzierung. Die Sequenz kann für sensitiv (ATA) und homozygot resistent (CTA) abgelesen werden. Bei einer heterozygoten Pflanze finden sich die Nukleotide A und C zu je 50 % vertreten (Abb. 2).

In der Select 240EC (Clethodim)-Behandlung wurden insgesamt 52 Pflanzen molekulargenetisch analysiert (Tab. 3, links). Zusätzlich wurden 15 Pflanzen aus verschiedenen Dosierungen (0,03 - 0,25 l/ha) der sensitiven Referenz analysiert. Sie zeigten alle den sensitiven Genotyp ATA. Die resistenten Pflanzen des Biotyps BPL12\_510 zeigten unterschiedliche Anteile (Frequenzen) der beiden Genotypen A/CTA (heterozygote) und CTA (homozygote) mit einer Frequenz von 0,23 für den heterozygoten Genotyp und 0,77 für den homozygoten.



**Abb. 2** Pyrogramme von sensitiven, mischerbigen (heterozygoten) und homozygot resistenten Pflanzen des Acker-Fuchsschwanz an der Position 1781 der ACCase.

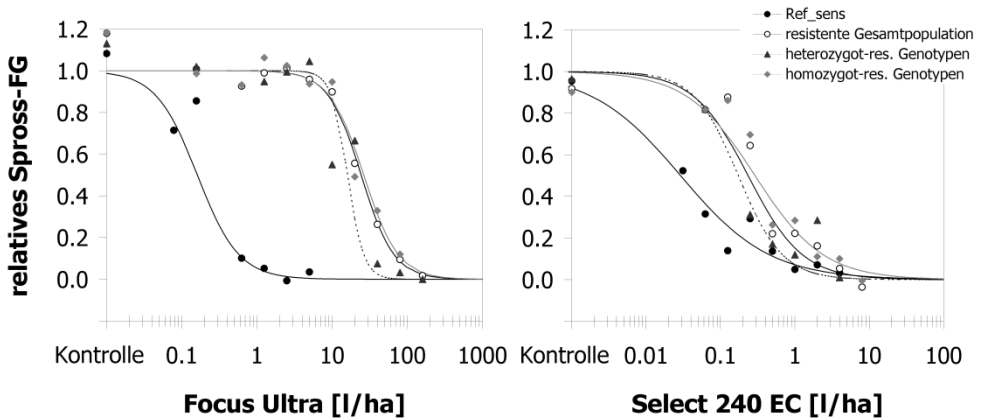
**Fig. 2** Pyrogram of sensitive, heterocytot, and homocytot resistant plants of blackgrass at position 1781 on the ACCase.

**Tab. 3** Summe der Analysen des Genotyps der Pflanzen aus den entsprechenden Dosierungen nach Select 240EC (Clethodim)-Behandlung (links) und nach Focus Ultra (Cycloxydim)-Behandlung (rechts).

**Tab. 3** Summary of the analyses of resistant plants from the respective doses after treatment with Select 240EC (clethodim) (left) and Focus Ultra (cycloxydim) (right).

Select240EC Clethodim (l/ha)	Summe analysierter Pflanzen	Genotyp A/A (sensitive)	Genotyp A/C (hetero- zygot; resistent)	Genotyp C/C (homo- zygot; resistent)	Focus ULTRA Cycloxy- dim (l/ha)	Summe analy- sierter Pflanzen	Genotyp A/A (sensitive)	Genotyp A/C (heterozygot; resistent)	Genotyp C/C (homozygot; resistent)
0,060	7	0	2	5	0,160	5	0	3	2
0,125	7	0	0	7	0,600	5	0	0	5
0,250	7	0	1	6	1,250	5	2	2	1
0,5	7	0	2	5	2,5	9	1	3	5
1,0	7	0	2	5	10,0	9	0	2	7
2,0	7	0	3	4	20,0	7	0	3	4
4,0	7	0	2	5	40,0	7	0	2	5
8,0	3	0	0	3	80,0	3	0	0	3
-					160,0	4	1	3	0
Summe	52	0	12	40	Summe	54	4	18	32
Frequenz		0	0,23	0,77	Fre- quenz		0,07	0,33	0,59

Aus der Focus Ultra (Cycloxydim)-Behandlung wurden 54 Pflanzen analysiert (Tab. 3, rechts). Zusätzlich wurden auch hier 12 Pflanzen aus verschiedenen Dosierungen der sensitiven Referenz analysiert, welche alle den sensitiven Genotyp ATA aufwiesen. Die resistenten Pflanzen zeigten unterschiedliche Anteile der zwei Genotypen mit einer Frequenz von 0,33 für A/CTA (heterozygot) und 0,59 für CTA (homozygot). Darüber hinaus zeigten vier überlebende Pflanzen nach Focus Ultra (Cycloxydim)-Behandlung das sensitive Allel A/A (Frequenz = 0,07). Das Vorkommen sensitiver Allele könnte dadurch bedingt gewesen sein, dass die Pflanzen zwar letal geschädigt waren, aber noch nicht vollständig abgestorben waren. Eine andere Interpretation wäre, dass ein anderer Haplotyp vorlag, der jedoch aufgrund der im Vorfeld durchgeführten Stichprobenanalyse nicht detektiert wurde.



**Abb. 3** Dosis-Wirkungsbeziehungen eines Clethodim (Select 240EC)- bzw. Cycloxydim (Focus Ultra)-haltigen Herbizids auf die Gesamtpopulation eines sensitiven (Ref\_sens) und eines resistenten Biotyps von *Alopecurus myosuroides* sowie der homo- bzw. heterozygot-resistenten Teilpopulationen.

**Fig. 3** Dose-response relationship for a clethodim (Select 240EC) and cycloxydim (Focus Ultra) containing herbicide on the overall population of a sensitive (Ref\_sens) and a resistant biotype of *Alopecurus myosuroides* as well as the homo- and heterozygous-resistant sub-populations.

Für die Dosis-Wirkungsbeziehung der heterozygoten Teilpopulation (Ile/Leu1781) und Select 240EC (Clethodim, Abb. 3) wurde ein ED<sub>50</sub> von 0,17 l/ha ermittelt. Im Verhältnis zur sensitiven Referenzpopulation ergab sich somit ein signifikanter RF von 6, der damit unter dem RF der Gesamtpopulation lag. Der ED<sub>50</sub> der homozygoten Teilpopulation betrug 0,29 l/ha und der resultierende RF 10, der damit über dem RF der Gesamtpopulation und der heterozygoten Teilpopulation lag. Die ED<sub>50</sub>-Werte der hetero- und homozygoten Teilpopulationen waren jedoch nicht signifikant verschieden voneinander.

Für Focus Ultra (Cycloxydim, Abb. 3) konnte für die heterozygote Teilpopulation eine Dosis-Wirkungsbeziehung mit einem ED<sub>50</sub> von 21,98 l/ha ermittelt werden. Der resultierende RF betrug 137 und war damit ebenfalls geringer als der RF der Gesamtpopulation. Der ED<sub>50</sub> der homozygoten Teilpopulation betrug 26,32 l/ha und der resultierende RF 164, der somit höher war als der RF der Gesamtpopulation und der heterozygoten Teilpopulation. Die ED<sub>50</sub>-Werte von hetero- und homozygoter Population waren jedoch auch für Cycloxydim nicht signifikant verschieden voneinander, jedoch jeweils signifikant höher als der Wert der sensitiven Referenzpopulation.

Obwohl jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen homo- und heterozygot resistenten Genotypen beobachtet wurden, zeigte sich bei beiden Wirkstoffen der gleiche Trend, dass heterozygote Pflanzen eine schwächere Resistenzausprägung zeigten als homozygote Pflanzen. Dies könnte durch das in den heterozygot-resistenten Pflanzen immer noch vorhandene sensitive Allel der ACCase zustande kommen. Die Gesamtpopulation als Mischpopulation hetero- und homozygoter Genotypen lag bei beiden Wirkstoffen in der Resistenzausprägung zwischen den Teilpopulationen.

Lässt sich der in dieser Studie beobachtete Trend in weiterführenden Untersuchungen bestätigen, so könnte eine Quantifizierung der Herbizidresistenz in Abhängigkeit von der Ausprägung der Haplotypen zu einer detaillierteren Kenntnis der Populationsstruktur und des Resistenzniveaus führen. Eine Aufschlüsselung und Beschreibung der Allelausprägung in Unkrautbiotypen könnte zu präziseren Resistenzfaktoren für einzelne Unkrautarten führen und zu einem besseren Verständnis der Resistenzdynamik innerhalb einer Unkrautpopulation. Weiterführende Untersuchungen zur Dynamik der Etablierung homozygot- bzw. heterozygot-resistenter

Einzelpflanzen könnten somit für die Resistenzentwicklung von Interesse sein. Weiterhin könnte eine Klassifizierung von Wirkstoffen und Resistenzmechanismen nach Höhe ihres Selektionsdrucks Chancen für einen optimierteren Wirkstoffwechsel ergeben.

### Danksagung

R.G. Belz wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (DFG), Projekt BE 4189/ 1-1).

### Literatur

- DELYE, C., 2005: Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Sci.* **53**, 728-746.
- DELYE, C., Y. MENCHARI, J-P. GUILLEMIN, A. MATEJICEK, S. MICHEL, C. CAMILLERIA und B. CHAUVEL, 2007: Status of black grass (*Alopecurus myosuroides*) resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in France. *Weed Res.* **47**, 95-105.
- KAUNDUN, S. S. und J. D. WINDASS, 2006: Derived cleaved amplified polymorphic sequence, a simple method to detect a key point mutation conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. *Weed Res.* **46**, 34-39.
- KAUNDUN, S. S., S-J. HUTCHINGS, R.P. DALE und E. MCINDOE, 2013: Role of a novel I1781T mutation and other mechanisms in conferring resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides in a black-grass population. *PLoS One.* **8(7)**, doi:10.1371/journal.pone.0069568.
- MOSS, S. R., K. M. COCKER, A. C. BROWN, L. HALL und L. M. FIELD, 2003: Characterisation of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pest Manag. Sci.* **59**, 190-201.
- STREIBIG, J. C., 1988: Herbicide bioassay. *Weed Res.* **28**, 479-484.
- RONAGHI, M. und E. ELAHI, 2002: Discovery of single nucleotide polymorphisms and mutations by Pyrosequencing. *Comp. Funct. Genomics*, **3**, 51-56.
- WAGNER, J., B. LABER B, H. MENNE und HJ. KRAEHMER, 2008: Rapid analysis of target-site resistance in blackgrass using pyrosequencing® technology. *Proceedings 5<sup>th</sup> International Weed Science Congress, 23-27 June 2008, Vancouver, Canada.*
- YU Q, A. COLLAVO, M.Q. ZHENG, M. OWEN und S.B. POWLES, 2007: Diversity of acetyl-coenzyme mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. *Plant Physiol.* **145**, 547-558.