

Resistenzentwicklungen von *Apera spica-venti* (L.) P. Beauv. (Gemeiner Windhalm) in Niedersachsen 2013 – zunehmend auch gegen Pinoxaden

Development of resistance of Apera spica-venti (L.) P. Beauv. (Loose silky-bent) in Lower Saxony in 2013 - also increasingly against Pinoxaden

Dirk Michael Wolber

Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Pflanzenschutzamt, Wunstorfer Landstr. 9, 30453 Hannover
dirk.wolber@lwk-niedersachsen.de



DOI 10.5073/jka.2014.443.035

Zusammenfassung

Weltweit haben Herbizidresistenzen massiv zugenommen, besonders Nord- und Südamerika und Australien sind betroffen. Zunehmend brechen aber auch Wirkstoffgruppen zur Unkrautbekämpfung in Europa weg. Besonders die ACCase-Hemmer (Gruppe A), und Photosynthesehemmer (Gruppe C) und neuerdings auch die Wirkstoffgruppe der ALS-Hemmer (Gruppe B) zeigen ein erhöhtes Resistenzrisiko. Auf fast allen Ackerbaustandorten in Niedersachsen ist Windhalm (*Apera spica-venti*) gegen mindestens eine Wirkstoffgruppe resistent. Eine Resistenz gegen ALS-Hemmer zeigt Windhalm in Niedersachsen bereits seit 2005, vorrangig im Großraum Osnabrück-Hannover-Braunschweig. Seit 2012 wird in Niedersachsen erstmals auch eine TSR-Resistenz gegen Pinoxaden gefunden. Eine effektive Bekämpfung wird bei gleichzeitiger Resistenz gegen ALS- und ACCase-Hemmer sehr schwierig.

Stichwörter: Resistenzmanagement, Ungrasbekämpfung, Windhalm

Abstract

Herbicide resistance has increased dramatically all over the world. Especially North America, South America and Australia are affected. In the last few years also in Europe different active ingredient groups become more and more ineffectively. The risk of resistance is very high for the ACC-ase inhibitors (Group A), the photosynthese- inhibitors (Group C) and by now also for the ALS - inhibitors (Group B). In almost every agricultural region of Lower Saxony the loose silky-bent grass (*Apera spica-venti*) shows resistance to at least one mode of action. Since 2005 especially in the lower saxonian region between Osnabrück, Hannover and Braunschweig resistance in loose silky-bent grass against the ALS- inhibitors occurs. 2012 target site resistance against Pinoxaden was found for the first time. In the last few years also in Europe different active ingredient groups became more and more ineffectively.

Keywords: Grass weed control, herbicide resistance management, loose silky-bent grass

Einleitung

Das Auftreten von herbizidresistenten Unkräutern ist die Folge eines Selektionsprozesses durch einen häufigen Einsatz von Herbiziden mit demselben Wirkmechanismus bzw. dem gleichen Wirkstoff, meist in reduzierten Aufwandmengen. Dabei werden Biotypen mit einer natürlichen Widerstandsfähigkeit in ihrer Entwicklung begünstigt. Der Anteil resistenter Biotypen in der Population nimmt laufend zu und es entstehen zunehmend Bekämpfungsprobleme. Das bekannteste Beispiel hierzu ist die früher gebräuchliche Behandlung mit Isoproturon (IPU), zumeist in Mischungen mit Diflufenican oder Pendimethalin. IPU hat seine Wirkung aufgrund überregionaler IPU-Resistenz bei Windhalm in Niedersachsen seit Anfang der Jahrtausendwende fast nahezu vollständig eingebüßt. Gründe hierfür sind der fehlende Wirkstoffwechsel und die meist reduzierten Aufwandmengen.

Seit der Jahrtausendwende werden ALS-Hemmer (Gruppe B nach HRAC) sehr breit und intensiv zur Windhalmbekämpfung genutzt, leider werden zunehmend Windhalmpopulationen mit einer Resistenz gegen ALS-Hemmer gefunden (AUGUSTIN, 2010; GEHRING *et al.*, 2010, 2012; SCHRÖDER *et al.*, 2012; WAGNER und WOLBER, 2012). Auch gegen Axial 50 mit dem Wirkstoff Pinoxaden aus der Wirkstoffgruppe der ACCase-Hemmer (Gruppe A nach HRAC) zeigen erste Windhalmpopulationen eine multiple Resistenz (AUGUSTIN, 2010). Eine Target-Site Resistenz konnte aber bisher

ausgeschlossen werden (KRATO und PETERSEN, 2010). Der nachfolgende Beitrag wird die aktuelle Entwicklung zur Herbizidresistenz von Windhalm anhand von Ergebnissen aus Niedersachsen erläutern.

Material und Methoden

Biotest

Bei dem untersuchten Samenmaterial handelt es sich um Verdachtsproben, die aus allen Teilen Niedersachsens stammen. *Apera spica-venti* (APESV) wird auf den leichteren Standorten im Binnenland gesammelt. Zum Nachweis einer vorliegenden Herbizidresistenz wurde ein Biotest im Gewächshaus an intakten Pflanzen unter definierten Temperatur- und Lichtbedingungen durchgeführt.

Tab. 1 Im Resistenztest verwendete Herbizide.

Tab. 1 *Herbicides used in the resistance test.*

Mittel	Wirkstoff	Aufwand/ha	Applikations-Termin (BBCH)
Cadou SC	Flufenacet	0,25 l/ha	00
Cadou SC	Flufenacet	0,5 l/ha	00
Boxer	Prosulfocarb	2,0 l/ha	00
Boxer	Prosulfocarb	4,0 l/ha	00
Sumimax	Flumioxazin	60 g/ha	00
Sumimax	Flumioxazin	120 g/ha	00
Axial 50	Pinoxaden	0,9 l/ha	11-12
Axial 50	Pinoxaden	1,8 l/ha	11-12
Focus Ultra + Dash E.C.	Cycloxydim	1,25 l/ha + 1,25 l/ha	11-12
Focus Ultra + Dash E.C.	Cycloxydim	2,5 l/ha + 2,5 l/ha	11-12
Select 240 EC + Para Sommer	Clethodim	1,0 l/ha + 2,0 l/ha	11-12
Select 240 EC + Para Sommer	Clethodim	2,0 l/ha + 4,0 l/ha	11-12
Husar OD + Mero	Iodosulfuron	0,1 l/ha + 1,0 l/ha	11-12
Husar OD + Mero	Iodosulfuron	0,2 l/ha + 2,0 l/ha	11-12
Broadway +Broadway Netzmittel	Pyroxsulam Florasulam	130 g/ha + 0,6 l/ha	11-12
Broadway +Broadway Netzmittel	Pyroxsulam Florasulam	260 g/ha + 1,2 l/ha	11-12

Die ausgedroschenen und gesiebten Samenproben lagern trocken in Papiertüten, bis sie vor der Aussaat zur Brechung der Dormanz 5 Tage bei -18 °C in der Tiefkühltruhe verbringen. Im Anschluss daran erfolgt unmittelbar die Aussaat der Samenproben in Biotesttöpfe (Jiffy-Rundtöpfe 8 x 8 cm geschlitzt) in 4 Wiederholungen je Versuchsvariante. Die Töpfe (Jiffy-Pots) stehen in Pflanzschalen (40 x 60 cm) deren Boden eine Plastikfolie bedeckt auf der ein Bewässerungsfliß passgenau ausgelegt ist. Bei der Aussaaterde handelt es sich um Standardboden (lehmgiger Sand pH 6,5, Humusgehalt 1,8 %, ca. 300 g incl. Topf, sterilisiert ca. 60 % WK max.). Das zu testende Samenmaterial wird portioniert, in die mit Erde gefüllten Töpfe gestreut und jeweils mit einer 1 cm dicken Schicht fein gesiebter Erde des PSA-Standardbodens bedeckt. Für das weitere Wachstum im Gewächshaus werden die folgenden Parameter eingestellt: Tagphase: 20 °C, 16 h Beleuchtung mit 8000 LUX (180 Watt/m²), Nachtphase: 16 °C, 8 h Dunkelheit. Die Bewässerung geschieht durch bedarfsgerechtes Gießen von unten (Anstau). Der Feuchtigkeitszustand der Töpfe wird täglich kontrolliert.

Die Applikation erfolgt in einer Schachtner Applikationskabine (Wasseraufwandmenge 200 l/ha, ES 90-02, 1,89 bar, Spritzhöhe 40 cm) für die Bodenherbizide im BBCH 0-7 (je nach Herbizid) und die der Blattherbizide im BBCH 11-12. Nach der Herbizidapplikation (21 und 28 Tage) wird gemäß EPPO-Richtlinie PP1/93(3) der Wirkungsgrad bonitiert. Für die Bewertung des Wirkungsgrades werden folgende Grenzwerte zugrunde gelegt: 0-50 % resistente Proben, 50-79,9 % moderat resistente Proben.

Im Biotest sollten möglichst verschiedene Wirkungsmechanismen der Herbizide geprüft werden. Daher richtete sich die Auswahl der Herbizide nach ihrem Wirkungsmechanismus. Behandelt wurde dann mit handelsüblichen Gräserherbiziden in einfacher und doppelter Aufwandmenge.

PCR-Test

Das resistente Pflanzenmaterial des Windhalms (Proben 133, 134, 135, 136, 137 aus dem Biotest in 2012) wurde nach der Behandlung mit Axial 50 geerntet. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde die DNA der Pflanzen mit einem kommerziell erhältlichen Kit zur DNA Extraktion aufbereitet. Die DNA-Extrakte wurden als Template in einer PCR eingesetzt um die entsprechenden Abschnitte für sieben polymorphe Positionen des ACCase-Gens, nämlich Ile/Leu1781, Trp/Cys1999, Trp/Cys2027, Ile/Val/Asn2041, Asp/Gly2078, Cys/Arg2088 und Gly/Ala2096 zu amplifizieren. In Abbildung 1 und Abbildung 2 sind beispielhaft Positionen für die Allele Ile1781 und Leu1781 dargestellt.

sensitive Pflanze (Ile1781)	
... AAC - A TA - CAT ...	DNA-Sequenz
... Asn - Ile - His ...	Aminosäure
... 1780 - 1781 - 1782...	Position im Protein ACCase
resistente Pflanze (Leu1781)	
... AAC - C TA - CAT ...	DNA-Sequenz
... Asn - Leu - His ...	Aminosäure
... 1780 - 1781 - 1782...	Position im Protein ACCase

Abb. 1 DNA-Sequenz des ACCase der sensitiven und resistenten Pflanzen an der korrespondierenden Stelle 1781 im Protein und abgeleitete Aminosäuren. Erläuterungen: Asn = Asparagin, Ile = Isoleucin, Leu = Leucin, His = Histidin, erste Zeile: DNA-Sequenz, zweite Zeile: Aminosäuresequenz im Protein, dritte Zeile: Nummer der Aminosäureposition im Protein.

Fig. 1 DNA sequence of ACCase of sensitive and resistant plants at the corresponding site of 1781 in the protein and derived amino acids. Explanation: Asn = asparagine, Ile = isoleucine, Leu = leucine, His = histidine, first row: DNA sequence, second line: Amino acid sequence of the protein, third line : number of amino acid position in the protein.

sensitive Pflanze (Ile2041)		
... GGA - ATT - CTG ...	DNA-Sequenz	
... Gly - Ile - Leu ...	Aminosäure	
... 2040 - 2041 - 2042...	Position im Protein ACCase	
resistente Pflanze (Asn2041)		
... GGA - AAT - CTG ...	DNA-Sequenz	
... Gly - Asn - Leu ...	Aminosäure	
... 2040 - 2041 - 2042...	Position im Protein ACCase	

Abb. 2 DNA-Sequenz der ACCase der sensitiven und resistenten Pflanzen an der korrespondierenden Stelle 2041 im Protein und abgeleitete Aminosäuren. Erläuterungen: Asn = Asparagin, Ile = Isoleucin, Leu = Leucin, His = Histidin, erste Zeile: DNA-Sequenz, zweite Zeile: Aminosäuresequenz des Proteins, dritte Zeile: Nummer der Aminosäurenposition im Protein.

Fig. 2 DNA sequence of ACCase of sensitive and resistant plants at the corresponding site of 2041 in the protein and derived amino acids. Explanation: Asn = asparagine, Ile = Isoleucine, Leu = Leucine, His = Histidine. First line: DNA sequence, second line: Amino acid sequence of protein, third line: numbering of amino acids.

Aus 5 Proben (133, 134, 135, 136, 137) für die im Biotest 2012 bereits eine Resistenz gegen Axial 50 bestätigt wurde, sind je 8 Pflanzen auf das Vorkommen der oben aufgeführten 7 SNPs analysiert worden. In der Tabelle 1 sind beispielhaft die Primer und die PCR-Bedingungen für das Allel Ile/Leu1781 aufgeführt. Für die Amplifikation der PCR-Fragmente, die die genetischen Informationen des Allels Ile/Leu1781 enthalten, wurden die Primer Fwd-Pyr-ACCase1781 und Rev-Pyr-ACCase1781 eingesetzt. Das erwartete Fragment betrug 182 bp. Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl mit einem kommerziellen Master-Mix Kit durchgeführt. Die Konzentration der Primer betrug 0,4 µM (jeweils) und als PCR-Template wurden 3 µl der DNA-Extrakte eingesetzt.

Tab. 2 Primer zur Amplifikation des ACCase-Abschnittes, der die Sequenz für Ile/Leu 1781 und Ile/Asn 2041 enthält.

Tab. 2 Primers for amplification of the ACCase portion that contains the sequence Ile / Leu 1781 and Ile/Asn 2041.

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temp	Länge des PCR-Fragments
Fwd-Pyr-ACCase1781	gcacacaagatgcagctagatagt	53 °C	182 bp
Rev-Pyr-ACCase1781	Tccgattccaacagttcgt		
Fwd-Pyr-ACCase2041	Cccgtgctgggcagttt	55 °C	203 bp
Rev-Pyr-ACCase2041	Aaggcaggctgattgtatgtccta		

Tab. 3 Primer zur Sequenzierung (Pyrosequencing) und Pipettierschema der Nukleotide (Sequence to analyze) im Pyrosequencing-Verfahren.

Tab. 3 Primers for sequencing (pyrosequencing) and pipetting of nucleotides (sequence to analyze) in the pyrosequencing method.

Sequenzier-Primer	Sequenz (5'-3')	Sequence to Analyze
Seq-ACCase1781	Atggactaggtgtggagaac	<u>ht</u> acatggaagtgtctgctattgccag
Seq-ACCase2041	Gcaaagagatcttttgaagga	<u>rw</u> tctgaggctgggt

Erläuterungen: h= Nukleotid in der Sequenz kann A, C oder T sein

Die Reaktion wurde in einem laborüblichen Thermocycler mit dem folgendem Temperatur-Profil gefahren: Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten, danach 40 Zyklen (Denaturierung: 94 °C, 20 s, Annealing: je nach Primer-Kombination (siehe Tab. 2), 20 s und Elongation bei 72 °C für 20 s). Die PCR-Produkte wurden auf einem Pyrosequencer (PSQ 96MA) analysiert. Für die Sequenzierung

wurde der Primer Seq-ACCCase1781 (Tab. 3) verwendet. Die Analyse der Proben am Pyrosequencer erfolgte nach Anleitung des Geräteherstellers (Biotage).

Ergebnisse

In Niedersachsen werden ALS-Hemmer (Gruppe B nach HRAC) sehr breit und intensiv gegen Windhalm und andere Ungräser eingesetzt. Mittlerweile ist eine sichere Wirkung dieser Wirkstoffgruppe auf zahlreichen Standorten nur noch bedingt möglich (Tab. 4). Verdachtsproben für Windhalm werden im niedersächsischen Pflanzenschutzamt seit 2006 mittels Biotest zur Resistenzneigung gegen Husar OD (Iodosulfuron) untersucht.

Von insgesamt 291 Proben im Zeitraum 2006 bis 2012 wurden 74 Resistenzen nachgewiesen, davon 13 Target-Site-Resistenzen. Eine Verdopplung der Aufwandmenge führte insgesamt nur zu leichten Wirkungsverbesserungen. Broadway (Pyroxulam + Florasulam) wurde seit 2009 im Monitoring aufgenommen und war bis Frühjahr 2011 überregional noch ausreichend wirkungssicher zu bewerten. Die aktuellen Ergebnisse der Resistenzuntersuchungen zeigen aber, dass von 190 Verdachtsproben zunehmende Resistenzen (25 Proben, davon 6 Target-Site Resistenzen) nachgewiesen werden können.

Tab. 4 Resistenztest von *Apera spica-venti* (L.) P. Beauv. (Gemeiner Windhalm) in Niedersachsen 2012.

Tab. 4 Resistance test of *Apera spica-venti* (L.) P. Beauv. (Loose silky-bent) in Lower Saxony 2012.

Mittel	Anzahl der untersuchten Verdachtsproben	Auftreten von Resistenzen	Auftreten von TSR-Resistenzen
Cadou SC	131	0	0
Boxer	131	0	0
Sumimax	62	0	0
Axial 50	128	15	2
Focus Ultra + Dash E.C.	62	0	0
Select 240 EC + Para Sommer	94	0	0
Husar OD + Mero	291	74	13
Broadway +Broadway Netzmittel	190	25	6

Axial 50 mit dem Wirkstoff Pinoxaden gehört als alleiniger Vertreter der Wirkstoffgruppe DEN, einer Untergruppe der ACCase-Hemmer, an. In Niedersachsen wurden die ersten Resistenzentwicklungen von Windhalm gegen Axial 50 auf einzelnen Standorten in 2010 festgestellt. Bis 2012 wurden insgesamt 15 metabolische Resistenzen im Biotest nachgewiesen. Seit 2012 wird neben der vorhandenen metabolischen Resistenz in 4 Proben eine Target-Site Resistenz mittels PCR Testung festgestellt. Gegenüber Cadou SC, Boxer, Sumimax, Focus Ultra und Select 240 EC wurden in Niedersachsen bisher noch keine Resistenzen in Windhalm gefunden.

In den Tabellen 5 und 6 sind das Vorkommen der Allele 1781 (A) und 2041 (B) für die insgesamt 40 Blattproben aufgelistet.

Die Target-Site Resistenz mit einem Leu1781 Allel kommt mit einer Frequenz von 0,18 vor und schlüsselt sich in heterozygote und homozygote Pflanzen mit einer Frequenz von 0,1 bzw. 0,08 auf. Die Target-Site Resistenz mit einem Asn2041 Allel ist die dominierende Target-Site Resistenz in der Population mit einer Frequenz von 0,38 und schlüsselt sich in heterozygote und homozygote Pflanzen mit einer Frequenz von 0,28 bzw. 0,10 auf.

Tab. 5 Vorkommen von Ile/Leu 1781.

Tab. 5 Occurrence of Ile / Leu 1781.

Biotyp	Summe analysierter Pflanzen nach Behandlung			
	Genotyp 1781 A/A (sensitiv)	Genotyp 1781 A/T (heterozygot resistent)	Genotyp 1781 T/T (homozygot resistent)	
133	8	8	0	0
134	8	4	2	2
135	8	8	0	0
136	8	8	0	0
137	8	5	2	1
Summe	40	33	4	3
Frequenz		0,83	0,10	0,08

Tab. 6 Vorkommen von Ile/Asn 2041.

Tab. 6 Occurrence von Ile/Asn 2041.

Biotyp	Summe analysierter Pflanzen nach Behandlung			
	Genotyp 2041 T/T (sensitiv)	Genotyp 2041 A/T (heterozygot resistent)	Genotyp 2041 A/A (homozygot resistent)	
133	8	4	1	3
134	8	2	6	0
135	8	8	0	0
136	8	5	2	1
137	8	6	2	0
Summe	40	25	11	4
Frequenz		0,63	0,28	0,10

Diskussion

Die Herbizidresistenz der Windhalmpopulationen entwickelt sich in Niedersachsen zu einem ernsthaften Problem. Neben der bekannten Herbizidresistenz gegen IPU und CTU fällt für eine wirksame Bekämpfung von Windhalm die Wirkstoffgruppe der ALS-Hemmer auch zunehmend aus. Aus Gründen der Resistenzvermeidung ist ein wiederholter Einsatz eines Sulfonylharnstoffs in der Fruchtfolge nicht zu empfehlen. Das Ausweichen auf das Herbizid Axial 50 stellt ebenfalls keine nachhaltige Strategie dar, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen.

Ein gewünschter Wirkstoffwechsel, als zentrales Element des Herbizidresistenzmanagements, ist mangels Wirkstoffauswahl nur noch bedingt möglich (GEHRING *et al.*, 2012). Ein effektives Resistenzmanagement ist nur dort möglich, wo auch die Wirkung der Herbizide eine nahezu vollständige Bekämpfung der Schadgräser bzw. Unkräuter ermöglicht. Auf Resistenzstandorten ist eine sichere Bekämpfung von Windhalm nur noch mit Wirkstoffen zum Einsatz im Herbst zu empfehlen, wie z. B. Flufenacet (HRAC-Gruppe K3), Flurtamone (HRAC-Gruppe F1), Flumioxazin

(HRAC-Gruppe E) und Prosulfocarb (HRAC-Gruppe N). Grundsätzlich lässt sich die Entwicklung einer Herbizidresistenz nicht mehr durch ein sachgerechtes Wirkstoffmanagement alleine begrenzen, die verstärkte Integration von unterstützenden ackerbaulichen Maßnahmen zur Vermeidung von Herbizidresistenzen ist dringend erforderlich.

Literatur

- AUGUSTIN, B., 2010: Windhalm-Herkunft aus Rheinland-Pfalz mit multipler Herbizidresistenz. *Julius-Kühn-Archiv* **428**, 271-272.
- GEHRING, K., S. THYSSEN und T. FESTNER, 2010: Herbizidresistenz bei *Apera spica-venti* L. in Bayern. *Julius-Kühn-Archiv* **428**, 270-271.
- GEHRING, K., S. THYSSEN und T. FESTNER, 2012: Herbizidresistenz bei *Apera spica-venti* L. in Bayern. *Julius-Kühn-Archiv* **434**, 133-137.
- KRATO, C. und J. PETERSEN, 2010: Situation der Herbizidresistenz bei Ungräsern in Deutschland. *Julius-Kühn-Archiv* **428**, 273.
- SCHRÖDER, G., E. MEINLSCHMIDT, R. BALGHEIM, E. BERGMANN und K. GÖSSNER, 2012: Effektive Kontrolle von Windhalm (*Apera spica-venti* (L.) P.B.) in Wintergetreide durch Nutzung von Herbizidbehandlungen mit hohen Wirkungsgraden – Ergebnisse der Ringversuche der Bundesländer Brandenburg, Hessen, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen von 2001-2011. *Julius-Kühn-Archiv* **434**, 301-312.
- WAGNER, J. und D. WOLBER, 2012: Ergebnisse zum Vorkommen von Herbizidresistenz gegen ALS-Inhibitoren und den mittels Pyrosequencing identifizierten Resistenz-Allelen in *Alopecurus myosuroides* Huds. (Ackerfuchsschwanz) und *Apera spica-venti* (L.) Beauv. (Gemeiner Windhalm) in Praxisflächen Niedersachsen. *Julius-Kühn-Archiv* **438**, 319.