

Selektion einer *Apera spica-venti*-Population mit reduzierter Sensitivität gegenüber Iodosulfuron

Selection for reduced iodosulfuron sensitivity in Apera spica-venti

Dagmar Rissel*, Lena Ulber

Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig
*Korrespondierende Autorin, dagmar.rissel@julius-kuehn.de



DOI 10.5073/jka.2018.458.014

Zusammenfassung

Der Gemeine Windhalm (*Apera spica-venti*) ist eine genetisch variable Ungrasart. In Deutschland werden für *A. spica-venti* immer mehr Resistenzfälle besonders gegenüber Herbiziden aus der Gruppe der ALS-Inhibitoren gemeldet. Als Gründe werden sowohl Target-Site (TSR)- als auch Non-Target-Site-Resistenzmechanismen (NTSR) diskutiert. Derzeit gibt es wenige Untersuchungen zur Herbizidresistenzentwicklung und insbesondere zu NTSR-Mechanismen bei *A. spica-venti*. Um diese Resistenzentwicklung besser zu verstehen, wurde aus einer sensitiven Elternpopulation (A 77) mit reduzierten Aufwandmengen des Wirkstoffes Iodosulfuron eine F1-Generation selektiert. Diese Population wurde A 77-1 genannt und einem Dosis-Wirkungs-Experiment unterzogen. Dabei zeigte die Population A 77-1 im Vergleich zur Elternpopulation eine reduzierte Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff Iodosulfuron (RF=2). Außerdem wurden Individuen der A77-1-Population auf eine mögliche TSR untersucht. 53 % der untersuchten Individuen zeigten eine Pro197Asn-Substitution. Einzelpflanzen, die keine TSR trugen, wurden identifiziert, vermehrt und A 77-1-1 genannt. Durch die gleichzeitige Behandlung von A 77-1-1 Pflanzen mit Iodosulfuron und dem Cytochrom P450 (CYP)-Inhibitor Malathion konnte die Herbizidwirkung wieder hergestellt werden. Daher stellen wir fest, dass wir erfolgreich eine Population, die sowohl TSR und NTSR zeigt, selektiert haben. Um CYPs zu identifizieren, die möglicherweise die Reduzierung der Sensitivität gegenüber Iodosulfuron bedingen, wurde eine ACP-PCR durchgeführt. Dabei wurden 6 CYPs identifiziert.

Stichwörter: *Apera spica-venti*, ALS-Inhibitoren, Herbizidresistenz, Iodosulfuron, Nicht-Zielortresistenz, Zielortresistenz

Abstract

Apera spica-venti is a genetically diverse cross-pollinated grass weed species for which increasing numbers of resistance cases towards ALS herbicides are reported in Germany. Target-site and non-target-site mechanisms are discussed to be involved. But to date, studies on resistance evolution - especially on non-target-site mechanisms involved in *A. spica-venti* are rare. To better understand this, a progeny population was selected from a sensitive parental population (A77) using the ALS inhibiting herbicide iodosulfuron at reduced dose rate. This progeny population was designated A77-1 and subjected to a dose-response experiment using iodosulfuron. A77-1 exhibited a decreased sensitivity to iodosulfuron compared to the parental A77 biotype (RI=2). 53% of the studied individuals of A 77-1 exhibited an ALS target-site resistance (Pro197Asn). Individuals lacking target-site resistance were identified and propagated to yield the population A 77-1-1. The co-application of iodosulfuron and the cytochrome P450 (CYP) inhibitor malathion was able to reconstitute iodosulfuron efficacy in A 77-1-1. So, we assume that we successfully selected for target-site resistance and non-target-site resistance simultaneously. ACP-PCR was employed to identify CYPs involved in reduced sensitivity to iodosulfuron. 6 CYPs were identified.

Keywords: *Apera spica-venti*, ALS inhibitors, herbicide resistance, iodosulfuron, non-target-site resistance, target-site resistance

Einleitung

Apera spica-venti oder der Gemeine Windhalm ist ein einjähriges Ungras, das vor allem im Wintergetreideanbau in Zentral-, Nord- und Osteuropa auftritt. In Deutschland ist eine regionale Verbreitung von *A. spica-venti* zu beobachten, da er bevorzugt auf leichten, sandigen bis leicht lehmigen Böden wächst. *A. spica-venti* ist eine windbestäubte Ungrasart mit hoher genetischer Plastizität. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass Populationen in Deutschland Resistenzen gegenüber herbiziden Wirkstoffen aus den Gruppen der Photosystem II-Inhibitoren (HRAC-Gruppe C), der Acetolactat-Synthase-Inhibitoren (ALS, HRAC-Gruppe B) und der Acetyl-Co-A-

Carboxylase-Inhibitoren (ACCase, HRAC-Gruppe A) entwickelt haben (HEAP, 2017). Seit im Jahr 2005 die erste Resistenz gegenüber Wirkstoffen aus der Gruppe der ALS-Inhibitoren bei *A. spica-venti* in Deutschland festgestellt wurde, steigt die Anzahl von Resistenzfällen stetig an. Dabei sind sowohl Target-Site-Resistenzen (TSR) als auch Non-Target-Site-Resistenzmechanismen (NTSR) bekannt. Bei der TSR führt eine einzelne Mutation im codierenden Gen für die Acetolactat-Synthase zu einer Veränderung des Proteins (POWLES und YU, 2010). Diese Veränderung verhindert eine Interaktion von Protein und Herbizid und hemmt so die Herbizidwirkung. Unter dem Begriff der NTSR werden verschiedene Mechanismen zusammengefasst (POWLES und YU, 2010). Es sind folgende Mechanismen bekannt: Eine verringerte Aufnahme des Herbizidwirkstoffs oder eine verringerte Verlagerung im pflanzlichen Gewebe oder eine beschleunigte Ausschleusung in die Zellwände oder die Vakuole. Der bedeutendste Mechanismus der NTSR ist aber ein beschleunigter Abbau des Herbizidwirkstoffs in der Pflanze (POWLES und YU, 2010). Daran sind verschiedene Enzymfamilien beteiligt. Fundamentale Komponenten eines beschleunigten Herbizidabbaus sind Enzyme aus der Familie der Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYPs) (POWLES und YU, 2010). CYP-Enzyme finden sich in allen Reichen der Lebewesen. Sie stellen eine evolutionär alte, sehr diverse Superfamilie dar (SCHULER und WERCK-REICHHART, 2003; HANNEMANN et al., 2007). Bisher sind verschiedene CYPs bekannt, die einen beschleunigten Abbau verschiedener Herbizide vermitteln. Herbizidresistenz, die auf CYPs basiert, tritt besonders häufig bei Ungrasarten auf. Derzeit gibt es wenige Studien, die NTSR bei *A. spica-venti* und die zugrunde liegenden Mechanismen beleuchten.

Um die Resistenzentwicklung bei *A. spica-venti* zu untersuchen, wurde zunächst aus einer sensitiven Elternpopulation mit dem Herbizidwirkstoff Iodosulfuron eine F1-Generation mit reduzierter Iodosulfuron-Sensitivität selektiert. Nachfolgende Untersuchungen sollen zeigen, ob diese reduzierte Sensitivität gegenüber Iodosulfuron auf einen beschleunigten Abbau des Wirkstoffs zurückzuführen ist. Außerdem soll analysiert werden, welche CYPs daran beteiligt sind.

Material und Methoden

Selektion

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen zur Resistenzentwicklung bei *A. spica-venti* dienten Samen einer sensitiven Population (A 77), die auf einer ökologisch bewirtschafteten Fläche gesammelt wurden. Die Fläche wurde seit mindestens 20 Jahren nicht mehr mit einem Herbizid behandelt. Diese Samen wurden in Anzuchtschalen ausgesät. Eine Selektion von Pflanzen mit reduzierter Herbizidsensitivität erfolgte mit dem Herbizid Husar OD (Bayer CropScience, Deutschland), das den Wirkstoff Iodosulfuron (100 g Iodosulfuron-Methyl-Natrium/l) enthält. Dazu wurden die *A. spica-venti* Pflanzen mit der Hälfte der zugelassenen Aufwandmenge (5 g Iodosulfuron/ha) behandelt. 30 überlebende Pflanzen wurden in größere Töpfe umpflanzte, miteinander gekreuzt und bis zur Samenreife weiter kultiviert. Die so entstandenen Samen bilden die F1-Generation (A 77-1). Von 32 Pflanzen dieser Population wurden Blattproben zur TSR-Bestimmung abgenommen.

Dosis-Wirkungskurven

Um zu ermitteln, wie stark die Selektion mit Iodosulfuron die Wirksamkeit dieses Wirkstoffes auf die A 77-1-Pflanzen verringert hat, wurde ein Biotest durchgeführt. Dazu wurden jeweils fünf Pflanzen im Keimblattstadium in einen Topf (7 x 7 x 8 cm) pikiert. Anschließend wurden sie unter kontrollierten Bedingungen (16 h Licht/ 20 °C, 8 h Dunkelheit/ 10 °C) in einem Klimaschrank (Rumed1401, Rubarth Apparate GmbH, Laatzten, Deutschland) kultiviert. Im 3-Blatt-Stadium erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Iodosulfuron-Konzentrationen (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 g/ha) in einer stationären Spritzanlage. Die weitere Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter den bereits beschriebenen Klima-Bedingungen. Nach 21 Tagen wurde die Herbizidwirkung

bonitiert und die pflanzliche Frischmasse bestimmt. Der Versuch wurde mit vier Wiederholungen pro Herbizidkonzentration durchgeführt. Als Referenzpopulation diente die Elternpopulation A 77. Um eine mögliche NTSR zu bestätigen, wurden zunächst A 77-1-Pflanzen, die keine TSR trugen, durch Sequenzierung identifiziert. Diese Pflanzen wurden in zwei Klone geteilt, die miteinander gekreuzt wurden. Die daraus resultierenden Samen bilden die Generation A 77-1-1.

Samen der Generation A 77-1-1 wurden erneut ausgesät und nach einer kurzen Bestockungsphase in vier Klone geteilt. Je ein Klon wurde mit 20 g Iodosulfuron/ha, 20 g Iodosulfuron/ha plus 1000 g Malathion/ha (CYP-Hemmer) oder 1000 g Malathion/ha behandelt. Der vierte Klon diente als Kontrolle. Ein Teil der so behandelten Pflanzen wurde 24 h nach der Behandlung geerntet und zur späteren molekularbiologischen Untersuchung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die übrigen Pflanzen wurden weiter kultiviert. Nach 21 Tagen wurde die Wirkung von Herbizid und Malathion bonitiert.

Zur detaillierteren Analyse, wie eine mögliche NTSR die Sensitivität der A 77-1-Pflanzen gegenüber Iodosulfuron beeinflusst, wurden A 77-1-1-Pflanzen einzeln in Töpfe pikiert. Nach einer Bestockungsphase wurden die Pflanzen in acht Klone mit je zwei Blättern geteilt. Dann wurden die Klone einem Biotest zur Bestimmung der Iodosulfuron-Sensitivität unterzogen. Die Behandlung erfolgte mit folgenden Iodosulfuron-Konzentrationen: 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 g/ha. Anschließend wurden auch diese Pflanzen für 21 Tage weiter kultiviert bevor eine Bonitur und eine Bestimmung der Frischmasse erfolgten.

Analysen der Resistenzmechanismen

Analysen zur TSR in den Codons für Pro197 und Trp574 im ALS-Gen der A 77-1-1-Pflanzen wurden durchgeführt wie von HAMOUZOVA et al. (2014) beschrieben. Zur Identifizierung der genauen Substitution wurden PCR-Produkte sequenziert (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland).

Für die molekularbiologischen Untersuchungen zur NTSR der A 77-1-1-Pflanzen wurde das Pflanzenmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend erfolgte eine RNA-Extraktion mit dem NucleoSpin Plant RNA Kit nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Um CYPs, die an der NTSR bei *A. spica-venti* beteiligt sind, zu identifizieren, wurde eine Annealing-Control-Primer (ACP)-PCR wie von IWAKAMI et al. (2014a) für *Echinochloa phyllopogon* beschrieben mit ausgewählten Primern durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um ein zweistufiges PCR-Verfahren, bei dem die Primer am 3'-Ende aus einer spezifischen Sequenz bestehen, die über eine Polydeoxyinosin-Verbindungsglied mit einem unspezifischen Sequenzanhang am 5'-Ende verbunden ist. Diese zweistufige PCR ermöglicht so ein spezifisches Amplifizieren der gewünschten Gensequenz. In einer anschließenden zweiten PCR mit Primern, die gegen konservierte Bereiche der CYPs gerichtet sind, können CYP-Sequenzen identifiziert werden (Abb. 1).

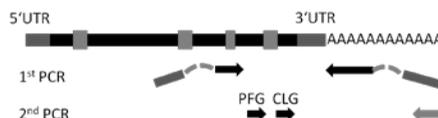


Abb. 1 Darstellung des schematischen Aufbau von CYP-Genen und der Genregionen, die für das Design der ACP-Primer (1. PCR) und der Primer für die spezifische Amplifikation von CYPs (2. PCR) verwendet wurden nach IWAKAMI et al. (2014). Die Pfeile stellen die PCR-Primer dar, die gestrichelten Linien die Polydeoxyinosin-Verbindungsglieder und die grauen Balken die unspezifischen 5'-Sequenzen.

Fig. 1 Presentation of the schematic structure of CYP genes and those regions used for ACP primer design (1st PCR) and the design of primers used for the specific amplification of CYPs (2nd PCR) according to Iwakami et al. (2014). PCR primers are depicted by arrows, the dashed lines show polydeoxyinosine and the grey bars represent the unspecific 5' sequences.

Ergebnisse

Nach der Selektion mit Iodosulfuron zeigt die F1-Generation A 77-1 eine verringerte Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff im Vergleich zur Elterngeneration A 77 (Abb. 2A). Der Resistenzfaktor hat sich verdoppelt (RF = 2). Die Untersuchungen zur TSR zeigten, dass 53 % der untersuchten Pflanzen von A 77-1 eine TSR tragen. Dabei handelt es sich um eine Pro197Gln-Substitution.

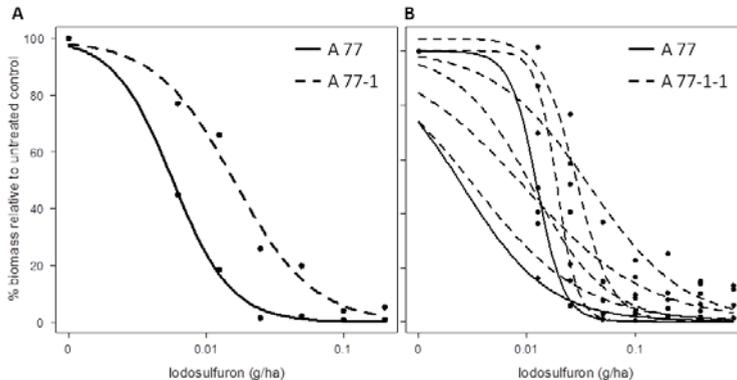


Abb. 2 Dosis-Wirkungsbeziehung für das Herbizid Husar OD mit seinem Wirkstoff Iodosulfuron auf die Spross-Frischmasse der Herbizid-sensitiven Elternpopulation A 77 und der selektierten F1-Generation A 77-1 (A) und auf die Spross-Frischmasse von Einzelpflanzen aus der Elternpopulation A 77 und Population A 77-1-1 (B).

Fig. 2 Dose-response relationship for the herbicidal active Iodosulfuron for the shoot fresh biomass of the herbicide-sensitive parental population A 77 and the selected F1 generation A 77-1 (A) and the shoot fresh biomass of individual plants from the parental population and the population A 77-1-1 (B).

Nicht alle untersuchten Pflanzen aus der F1-Generation A 77-1 zeigten eine TSR. Zusätzlich zeigte die Behandlung von Klonen mit Husar OD und dem CYP-Inhibitor Malathion, dass Malathion eine verringerte Herbizidwirkung bei Pflanzen der Population A 77-1-1 wiederherstellen konnte (Daten nicht dargestellt). Das heißt, in der Population A 77-1-1 spielten hinsichtlich der reduzierten Sensitivität gegenüber Iodosulfuron auch NTSR-Mechanismen eine Rolle. Um den Grad der Sensitivitätsreduktion zu bestimmen, wurde ein Biotest mit Klonen von Einzelpflanzen der Elternpopulation A 77 und der Population A 77-1-1 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Elternpopulation als auch die Population A 77-1-1 in ihrer Sensitivität gegenüber Iodosulfuron schwankten und die Reduzierung der Iodosulfuron-Sensitivität eher gering war (Abb. 2B).

Mit Hilfe der ACP-PCR konnten bisher homologe Sequenzen zu sechs CYPs (Indole-2-Moonoxygenase (CYP71C4), Ent-Isokaurene C2-Hydrolase (CYP71Z6), CYP81A24, CYP81A19, CYP71A1, CYP72A14) identifiziert werden.

Diskussion

Nach der Selektion mit 5 g Iodosulfuron/ha zeigte die F1-Generation eine deutliche Verminderung der Sensitivität gegenüber Iodosulfuron. Diese kann auf TSR und NTSR-Mechanismen zurückgeführt werden. Also wurden hier in einer Population erfolgreich TSR und NTSR selektiert. Für weitere Untersuchungen zur NTSR wurden Einzelpflanzen, bei denen keine TSR vorlag identifiziert. Die Nachkommen dieser Einzelpflanzen zeigten nur eine geringfügig verringerte Sensitivität gegenüber Iodosulfuron im Vergleich zur A 77-1-Population. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass NTSR ein quantitatives, polygenes Merkmal ist (PETIT et al., 2010; BUSI et al., 2011). Eine Kreuzung von Individuen führt zu einer Aufspaltung der NTSR-Allele und so zu einer unterschiedlichen Ausprägung der NTSR in den Nachkommen.

Mit Hilfe der ACP-PCR konnten homologe Sequenzen von sechs CYPs identifiziert werden, die möglicherweise an einer NTSR in *Apera spica-venti* beteiligt sind. Für diese CYPs wurden bereits

Sequenzen in anderen Pflanzenarten identifiziert. CYP71A1 akkumuliert in Avocado während der Reifung und gehört zu den ersten CYPs, die in Pflanzen identifiziert wurden (BOZAK et al., 1990). Die genaue Funktion ist jedoch bis heute nicht vollständig verstanden. Zudem werden für CYP71A1 Veränderungen in der Genexpression im Zusammenhang mit abiotischen Stressoren beschrieben (GONG et al., 2015; OBAID et al., 2016) CYP71C4, CYP71Z6 und CYP72A14 wird eine Rolle in der Produktion von pflanzlichen Sekundärmetaboliten, die an der Antwort auf verschiedene biotische Stressoren beteiligt sind, zugeschrieben (FREY et al., 1997; SOLER et al., 2007; WU et al., 2011). CYP81A24 und CYP81A19 wurden kürzlich in Studien zur Resistenz gegenüber ALS-Inhibitoren in *Echinochloa phyllopogon* identifiziert (IWAKAMI et al., 2014a; IWAKAMI et al., 2014b). Dabei zeigte sich, dass die CYP81A24-Expression 12 h nach der Herbizidbehandlung hoch reguliert ist (IWAKAMI et al. 2014a) während CYP81A19 in *Echinochloa phyllopogon* als Pseudogen beschrieben ist (IWAKAMI et al., 2014b). Dies kann für *A. spica-venti* bisher nicht bestätigt werden, da bisher keine vollständige Gensequenz vorliegt. Bei den bisher identifizierten CYPs zeigt sich also eine Vielfalt an Funktionen in der Pflanze. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um die mögliche Beteiligung dieser CYPs an der NTSR in *A. spica-venti* zu bestätigen und ihre genaue Funktion zu identifizieren.

Literatur

- BOZAK, K.R., H. YU, R. SIREVAG und R.E. CHRISTOFFERSEN, 1990: Sequence Analysis of ripening-related P-450 cDNAs from avocado fruit. *PNAS* **87**, 3904-3908.
- Busi, R., M.M. VILA-AIUB und S.B. POWLES, 2011: Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity* **106**, 817-824.
- FREY, M., P. CHOMET, E. GLAWISCHNIG, C. STETTNER, S. GRÜN, A. WINKLMAIR, W. EISENREICH, A. BACHER, R.B. MEELEY, S.P. BRIGGS, K. SIMCOX und A. GIERL, 1997: Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* **277**, 696-699.
- GONG, L., H. ZHANG, X. GAN, L. ZHANG, Y. CHEN, F. NIE, L. SHI, M. LI, Z. GUO, G. ZHANG und Y. SONG, 2011: Transcriptome profiling of the potatoe (*Solanum tuberosum* L.) plant under drought stress and water stimulus conditions. *PlosOne* **10**, e0128041.
- HAMOUZOVA, K., P. KOSNAROVA, J. SALAVA, J. SOUKOUP. und P. HAMOUZ, 2014: Mechanisms of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Pest Management Science* **70**, 541-548.
- HANNEMANN, F., BICHET A., K.M. EWEN und R. BERNHARDT, 2007: Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta* **1170**, 330-344.
- HEAP, I., 2017: The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. (www.weedscience.org).
- IWAKAMI, S., A. UCHINO, Y. KATAOKA, H. SHIBAIKE, H. WATANABE und T. INAMURA, 2014a: Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Management Science* **70**, 549-558.
- IWAKAMI, S., M. ENDO, H. SAIKA, J.H. OKUNO, N. NAKAMURA, M. YOKOYAMA, H. WATANABE, S. TOKI, A. UCHINO und T. INAMURA, 2014b: Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiology* **165**, 618-629.
- OBAID, A.Y., J.S.M.SABIR, A. ATEF, X. LIU, S. EDRIS, F.M. EL-DOMYATI, M.Z. MUTWAKIL, N.O. GADALLA, N.H. HAJRAH, M.A. AL-KORDY, A. BAHIELDIN und R.K. JANSEN, 2016: Analysis of transcriptional response to heat stress in *Rhazya stricta*. *BMC Plant Biology* **16**, 252.
- PETIT, C., B. DUHIEU, K. BOUCANSAUD und C. DELYE, 2010: Complex genetic control of non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetyl-coenzyme A carboxylase and acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides* Huds.. *Plant Science* **178**, 501-509.
- POWLES, S.B. und Q. YU, 2010: Evolution in action: Plant resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 317-347.
- SCHULER, M.A. und D. WERCK-REICHHART, 2003: Functional genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 629-667.
- SOLER, M., O. SERRA, M. MOLINAS, G. HUGUET, S. FLUCH und M. FIGUERAS, 2007: A genomic approach to suberin biosynthesis and cork differentiation. *Plant Physiology* **144**, 419-433.
- WU, Y., M. L. HILLWIG, Q. WANG und R. J. REUTERS, 2011: Parsing a multifunctional biosynthetic gene cluster from rice: Biochemical characterization of CYP71Z6 & 7. *FEBS Letters* **585**, 3446-3451.