

Untersuchungen zur Selektion metabolischer Resistenz bei *Alopecurus myosuroides* Huds. durch Pinoxaden und Pyroxsulam in Dosis-Wirkungsversuchen im Gewächshaus – Analyse der F1-Generation

Studies on the Selection of Metabolic Resistance in Alopecurus myosuroides Huds. to Pinoxaden and Pyroxsulam in Dose-Response Experiments in the greenhouse - Analysis of the F1 Generation

Jean Wagner*, Manuela Mücke

PlantaLyt GmbH, Hannover

jean.wagner@plantaLyt.de

DOI: 10.5073/20220124-062351

Zusammenfassung

Die Bekämpfung von Ackerfuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides* Huds.) stellt vor dem Hintergrund der zunehmenden Resistenzen eine Herausforderung dar. Strategien zur Resistenzvermeidung beinhalten das Alternieren der Wirkstoffe oder ihre Anwendung in Mischungen bzw. in Sequenz. Unabhängig der gewählten Strategie stellt sich immer die Frage welche Resistenzmechanismen durch welche Anwendung positiv, gar nicht oder negativ selektiert werden. Der Blick in dieser Arbeit wird auf die metabolische Resistenz (NTSR) gelegt. Ihre Evolution erfolgt in kleinen quantifizierbaren Schritten und die Ausprägung von Kreuzresistenzen gegen weitere Wirkstoffe bleibt schwer vorhersagbar. Mit den im Getreide zur Bekämpfung von Ackerfuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides* Huds.) eingesetzten Wirkstoffen Pinoxaden (HRAC 1) und Pyroxsulam (HRAC 2) wurde die Evolution von Resistenz bzw. Kreuzresistenz in Gewächshausversuchen für die 1. Generation experimentell simuliert. Dazu wurde eine Anzucht aus der ursprünglichen Feld-Population in drei Teilpopulationen unterteilt. Diese Teilpopulationen wurden mit jeweils 10 % der Feldaufwandmenge der Einzelwirkstoffe Pinoxaden und Pyroxsulam oder der Mischung dieser Wirkstoffe behandelt. Die Überlebenden dieser Behandlung wurden dann getrennt als Teilpopulation weiter vermehrt (F1). Die Empfindlichkeit der drei F1-Populationen und der Elterngeneration (P) gegenüber Pinoxaden, Pyroxsulam und der Mischung wurde in insgesamt 12 Dosis-Wirkungsversuchen verglichen. Die mit Pinoxaden selektierte F1-Population zeigte als einzige Teilpopulation eine signifikante Verschiebung der Unempfindlichkeit gegen Pinoxaden im Vergleich zu der P-Generation mit einem Faktor von 6. Nach Selektion in nur einer Generation konnte eine spezifisch gegen Pinoxaden metabolische Resistenz selektiert werden, die sich mit der Feldaufwandmenge nicht mehr ausreichend bekämpfen ließ.

Stichwörter: Ackerfuchsschwanz, *Alopecurus myosuroides* Huds., Herbizidmischung, metabolische Resistenz, NTSR, Pinoxaden, Pyroxsulam

Summary

The control of blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) is a challenge against the background of increasing resistance. Strategies for avoiding resistance include the alternation of the active ingredients or their application in mixtures or in sequence. Regardless of the strategy chosen, the question always arises which resistance mechanisms are selected by which application and in which direction (positive, not at all or negative). This work focuses on metabolic resistance (NTSR). Their evolution takes place in small, quantifiable steps and the development of cross-resistance to other active ingredients remains difficult to predict. With the active ingredients pinoxaden (HRAC 1) and pyroxsulam (HRAC 2) used in cereals to control blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.), the evolution of resistance and cross-resistance was experimentally simulated in greenhouse experiments. For this purpose, a blackgrass population was propagated from the original field population. This population was divided into three subpopulations,

which were treated with 10% of the field application rate of the individual active ingredients pinoxaden and pyroxsulam and a mixture of them. The survivors of these treatments were propagated separately as subpopulations (F1). The herbicide sensitivity of the three F1 populations and the parental generation (P) was analyzed in 12 dose-response experiments. The F1 that was selected with Pinoxaden was the only subpopulation that showed a significant shift in sensitivity to Pinoxaden compared to the P generation with a factor of 6; but no significant shift was found in sensitivity to pyroxsulam or to the mixture of pinoxaden and pyroxsulam. After selection in just one generation, it was possible to select a specific metabolic resistance to pinoxaden, which could no longer be adequately controlled with the field application rate.

Keywords: *Alopecurus myosuroides* Huds., blackgrass, herbicide mixtures, metabolic resistance, NTSR, pinoxaden, pyroxsulam

Einleitung

Der Ackerfuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides* Huds.) gehört zu den am schwersten bekämpfbaren Ungräsern im Ackerbau Mitteleuropas. Er ist stark an Winterungen angepasst und lässt sich mit immer weniger Herbiziden ausreichend bekämpfen. Strategien zur Resistenzvermeidung bzw. zur Zurückdrängung von resistenten Pflanzen berücksichtigen daher auch die nicht chemischen direkten Methoden und indirekten Maßnahmen zur Entlastung der Herbizide. Die formenreichen Resistenzmechanismen werden in zwei Gruppen unterteilt, TSR (**T**arget-**S**ite **R**esistance oder Wirkortresistenz) und NTSR (**N**on-**T**arget-**S**ite **R**esistance oder wirkortunabhängige Resistenz).

Strategien zur Resistenzvermeidung beinhalten das Alternieren der Wirkstoffe im Fruchtwechsel oder die Anwendung in Mischungen bzw. in Sequenz. Die Frage, welche Resistenzmechanismen durch welche Strategie positiv selektiert, gar nicht selektiert oder sogar negativ selektiert werden (z.B. durch eine synergistische Wirkung) sollte bei der Wahl der Strategie immer Beachtung finden.

Die metabolische Resistenz nutzt die in den Pflanzen existierende Abbauewege der Entgiftung eines Wirkstoffs und steigert die Effizienz des Abbaus. Diese (oft durch mehrere Gene) komplex gesteuerte Resistenz kommt in der Regel erst über einige Generationen zum Tragen (NEVE & POWLES, 2005). Im Allgemeinen sind die Mechanismen metabolisch resistenter Pflanzen komplex vernetzt und es arbeiten je nach Resistenz die gleichen oder ähnliche Gene verschiedentlich miteinander (FRANCO-ORTEGA et al., 2021). Es gibt also keine metabolische General-Resistenz, sondern man wird es immer mit Teilmechanismen zu tun haben, die mehr oder weniger spezifisch für einen Wirkstoff sind. Ob und wie stark eine vorhandene Resistenz sich dabei auch als Kreuzresistenz gegen andere Wirkstoffe ausprägen kann ist schwer vorhersagen.

Anhand der im Getreide eingesetzten Wirkstoffe Pinoxaden (HRAC 1) und Pyroxsulam (HRAC 2) wurde in Gewächshausversuchen die Evolution einer Resistenz gegen Pinoxaden, Pyroxsulam und einer Mischung aus beiden Wirkstoffen bei Ackerfuchsschwanz zumindest in ihren Anfängen simuliert. Dazu wurden zunächst von einer Ausgangspopulation 3 Teilpopulationen angezogen und mit einer Dosierung von 10% der Feldaufwandmenge eine Überlebensrate provoziert, um ausreichend Pflanzen zu generieren, die eine F1 aufbauen konnten. In allen Pflanzen wurde vor Vermehrung die TSR als möglicher Mechanismus durch genetische Analyse ausgeschlossen. So konnte indirekt über Phänologie und TSR-Ausschluss das Vorhandensein von NTSR in Einzelpflanzen als Ursache der Unempfindlichkeit belegt werden.

Die vorliegende Studie soll die folgenden Hypothesen beantworten:

- 1) Lässt sich durch Selektion mit Pinoxaden innerhalb einer Generation die Empfindlichkeit in der F1-Population signifikant verschieben? Wenn ja, hat die Verschiebung der Empfindlichkeit eine Auswirkung auf die Empfindlichkeit gegen Pyroxsulam solo und in Mischung mit Pinoxaden?

- 2) Lässt sich durch Selektion mit Pyroxsulam innerhalb einer Generation die Empfindlichkeit in der F1-Population signifikant verschieben? Wenn ja, hat die Verschiebung der Empfindlichkeit eine Auswirkung auf die Empfindlichkeit gegen Pinoxaden solo und in Mischung mit Pyroxsulam?
- 3) Lässt sich durch Selektion mit einer Mischung beider Wirkstoffe innerhalb einer Generation die Empfindlichkeit in der F1-Population gegen eine Mischung signifikant verschieben? Wenn ja, hat die Verschiebung der Empfindlichkeit eine Auswirkung auf die Empfindlichkeit gegen die Solo-Anwendung beider Wirkstoffe?

Material und Methoden

Ausgangspopulation (P)

Als Ausgangspopulation wurde ein in 2014 gesammelter Ackerfuchsschwanz-Biotyp eines Schrages aus dem Harz gewählt (Herzberg am Harz OT Scharzfeld= P), von dem keine Resistenz bekannt war. Die Sammlung der Probe erfolgte im Rahmen eines Monitorings.

Selektion der F1

Von dem Biotyp P wurde eine Population von ca. 3000 Pflanzen angezogen und in drei Gruppen zu ca. 1000 eingeteilt. Jede Gruppe wurde im BBCH 12 mit den jeweiligen herbiziden Wirkstoffen Pinoxaden, Pyroxsulam oder einer Mischung der beiden behandelt. Aus den drei Teil-Populationen wurden die optisch vitalsten Pflanzen 28 Tage nach Behandlung herausgenommen und in getrennten Gewächshäusern zur Blüte und Samenreife gebracht. Die Samen-Sammlungen der drei Teil-Populationen wurden nach der jeweiligen Aktivsubstanz bezeichnet, mit der selektiert wurde. (Tab. 1)

Tabelle 1 Übersicht Selektion von Teil-Populationen (F1) aus der Ausgangspopulation P.

Table 1 Overview: selection of sub-populations (F1) from the starting population P.

Ausgangspopulation (P)	Behandlung	Anzahl selektierter vitaler Pflanzen	Bezeichnung der Samensammlung nach Vermehrung
OT Scharzfeld	6 g/ha Pinoxaden	40	Pino-F1
OT Scharzfeld	2 g/ha Pyroxsulam	26	Pyro-F1
OT Scharzfeld	mit 6 g/ha Pinoxaden + 2 g/ha Pyroxsulam	31	Pino+Pyro-F1

Ausschluss von TSR in P und F1

Der Ausschluss einer TSR (**T**arget-**S**ite **R**esistance oder Wirkortresistenz) in Pflanzen durch genetische Analyse kann als Beleg für eine NTSR in phänotypisch resistenten Pflanzen dienen. Die Vorgehensweise ist heuristisch. Die SNPs einer TSR sind bekannt und ihre An- bzw. Abwesenheit ist an Einzelpflanzen nachweisbar. Vergleichbare genetische Marker zur Bestätigung oder zum Ausschluss einer NTSR in Einzelpflanzen sind nicht verfügbar.

Von jeder Pflanze wurden zum Zeitpunkt der Vermehrung ca. 2 cm lange Blattstücke von vitalen Blättern abgeschnitten und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurde die DNA der Pflanzen extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden als Matrize in einer PCR eingesetzt, um Abschnitte des ACCase- und ALS-Gen zu amplifizieren, die folgende SNPs kodieren:

ACCase: Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Arg2078, Cys2088, Gly2096,

ALS: Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Asn653.

Die Fragmente wurden mittels Sanger-Sequenzierung kommerziell sequenziert. Die SNP-Analyse wurde mit Hilfe der Software Mutation Surveyor® durchgeführt.

Dosis-Wirkungsversuche

Mittels Dosis-Wirkungs-Experimenten kann auf Populationsebene untersucht werden, ob nach Selektion eine Verschiebung der Empfindlichkeit in der F1-Generation gegen einen der Wirkstoffe oder der Mischung im Vergleich zur ursprünglichen Elterngeneration stattgefunden hat. Insgesamt wurden dafür 12 Dosis-Wirkungs-Experimente angelegt und als Parameter die Sprossfrischmasse 18 Tage nach Behandlung erhoben. Für die Modellierung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden in den Experimenten 5 Dosierungen eingesetzt. Von jeder Population (P, Pino-F1, Pyro-F1 und Pino+Pyro-F1) wurden Pflanzen in Pflanzschalen (50 x 32 cm) in Dichten von etwa 300 Pflanzen/m² (49 Pflanzen in 7 Reihen x 7 Pflanzen) angezogen (Tab. 2). Für ein Dosis-Wirkungs-Experiment wurden 5 Schalen/Biotyp angesetzt und für 12 Dosis-Wirkungs-Experimente wurden insgesamt 60 Schalen mit je bis zu 49 Pflanzen pikiert (insgesamt knapp 3000 Pflanzen). Aufgrund des hohen Aufwands bei zeitgleicher Durchführung aller Dosis-Wirkungs-Experimente konnten keine Wiederholungen der Schalen angelegt werden.

Tabelle 2 Übersicht Dosierungen der Dosis-Wirkungs-Experimente

Table 2 Overview: Used doses in dose-response experiments

Testpopulationen	Aktivsubstanz	Dosierungen aufsteigend (g/ha)
P, Pino-F1, Pyro-F1, Pino+Pyro-F1	Pinoxaden	0/0,002/0,0045/0,0225/0,045
P, Pino-F1, Pyro-F1, Pino+Pyro-F1	Pyroxsulam	0/0,000935/0,00187/0,00935/0,0187
P, Pino-F1, Pyro-F1, Pino+Pyro-F1	Pinoxaden + Pyroxsulam	0/0,00369/0,00738/0,0369/0,0738

Eine Ernte und Einwaage der Spross-Frischmasse von einzelnen Pflanzen erfolgte am 18. Und 19. Tag nach Behandlung. Dazu wurden die Pflanzen möglichst gleichmäßig über der Oberfläche abgeschnitten und direkt eingewogen.

Statistische Analyse

Für die Modellierung des Parameters Frischmasse in Dosis-Wirkungskurven wurde das Paket drc (RITZ et al., 2015) mit der Software R nach KNEZEVIC et al. (2007) verwendet.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 12 Dosis-Wirkungs-Versuche durchgeführt. Alle 4 Populationen (P, Pino-F1, Pyro-F1 und Pino+Pyro-F1) wurden mit den Dosierungen (Tab. 2) von Pinoxaden, Pyroxsulam und der Mischung beider Wirkstoffe behandelt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Abbildung 1 zeigt die modellierten Kurven und die jeweiligen Mittelwerte (Symbole in der jeweiligen Abbildung) aus bis zu 49 Pflanzen pro Mittelwert. Eine signifikante Verschiebung der Empfindlichkeit ließ sich für Pino-F1 bei der Anwendung von Pinoxaden ableiten (RF= 6). Bei der Population Pyro-F1 zeigt sich eine Verschiebung der Empfindlichkeit bei der niedrigsten Aufwandmenge mit Pyroxsulam um den Faktor 2. Diese Verschiebung ließ sich aber im Dosis-Wirkungs-Modell nicht statistisch absichern. Die Tendenzen der Effekte sind in Tabelle 3 angeführt (Spalte 4).

Tabelle 3 Dargestellt sind die mit den entsprechenden Wirkstoffen geprüften Teil-Populationen, ihre modellierten ED₅₀-Werte nach KNEZEVIC et al. (2007) und der resultierende RF-Wert bezogen auf die Ausgangspopulation P. Signifikante Abweichungen wurde nur in einem Fall festgestellt (Pino-F1 gegen Pinoxaden). RF-Werte (Resistenz-Faktoren) ergeben sich aus dem Verhältnis der ED₅₀-Werte zweier Dosis-Wirkungs-Experimente

Table 3 The sub-populations tested with the corresponding active substances are shown. The modeled ED₅₀ values according to KNEZEVIC et al. (2007) and the resulting RF value related to the parental population P are shown. Significant differences was only found in one case (Pino-F1 versus Pinoxaden). RF values (resistance factors) result from the ratio of the ED₅₀ values of two dose-response experiments

Wirkstoff(e)	Biotypen	ED ₅₀	Tendenz Unempfindlichkeit	RF-Wert	Signifikanz
Pinoxaden	P	0,0065		1	n.s.
Pinoxaden	Pino-F1	0,041	steigend	6	P= 0,03
Pinoxaden	Pyro-F1	0,01	steigend	1,5	n.s.
Pinoxaden	Pino+Pyro-F1	0,006	gleich bleibend	1	n.s.
Pyroxsulam	P	0,0004		1	n.s.
Pyroxsulam	Pino-F1	0,00015	gleich bleibend bis sinkend	0,37	n.s.
Pyroxsulam	Pyro-F1	0,00075	steigend	2	n.s.
Pyroxsulam	Pino+Pyro-F1	0,0002	gleich bleibend	1	n.s.
Pinoxaden + Pyroxsulam	P	0,0015		1	n.s.
Pinoxaden + Pyroxsulam	Pino-F1	0,003	steigend	1,9	n.s.
Pinoxaden + Pyroxsulam	Pyro-F1	0,0035	steigend	2,3	n.s.
Pinoxaden + Pyroxsulam	Pino+Pyro-F1	0,001	gleich bleibend bis sinkend	0,7	n.s.

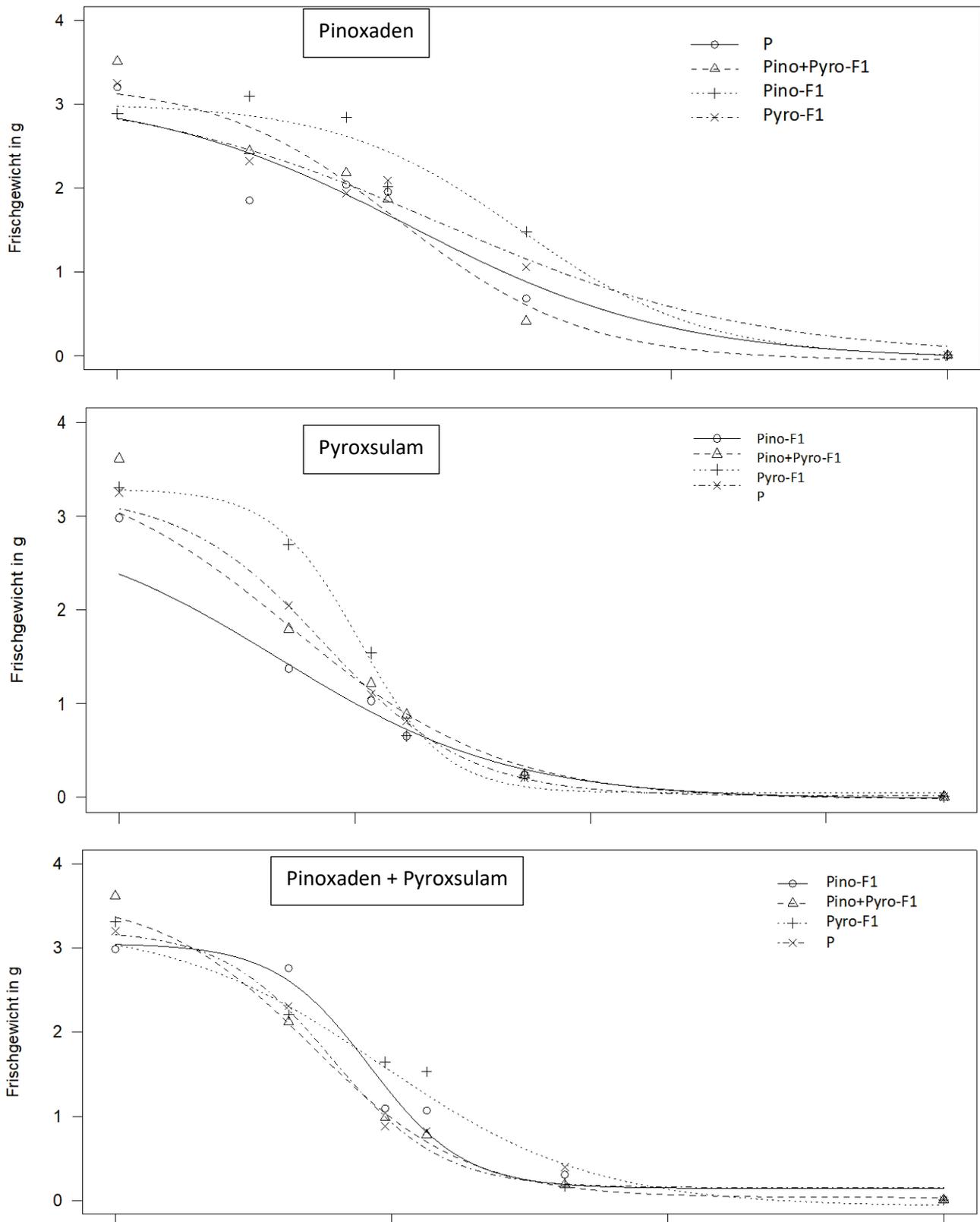


Abbildung 1 Modellierung der Dosis-Wirkungsbeziehungen der 4 Teilpopulationen für Pinoxaden, Pyroxsulam und die Mischung. Die Symbole entsprechen den Mittelwerten aus bis zu 49 Einzelpflanzen.

Figure 1 Modelling of dose-response relationships of the 4 subpopulations for pinoxaden, pyroxsulam and the mixture of both active ingredients. The symbols are corresponding to the mean values from up to 49 individual plants.

Diskussion

Die Anzucht von Ackerfuchsschwanz und die Selektion von Überlebenden aus niedrig dosierten Behandlung stellt zwar eine artifiziell beschleunigte, aber sinnvolle Nachstellung der Selektion von metabolischer Herbizidresistenz im Feld dar. Es wird allgemein angenommen, dass sich Pflanzen im Feld die metabolische Resistenz in kleinen Schritten über Generationen aneignen (NEVE & POWLES, 2005). Das wird – in Abhängigkeit des betrachteten Wirkstoffes – mal schneller gegen (über wenige) und mal langsamer über mehrere Generationen ablaufen. Langfristig dürfte es vermutlich aber alle Wirkstoffe betreffen.

Nach Behandlung der Ausgangspopulation mit Pinoxaden konnte in diesem Experiment innerhalb einer Generation eine signifikante Verschiebung der Empfindlichkeit selektiert werden. Im Vergleich zur Ausgangspopulation P ist die Pino-F1-Population um den Faktor 6 weniger empfindlich (RF= 6). Gleichzeitig zeigten die Population Pyro-F1 und die Population Pino + Pyro-F1 zwar keine signifikante Verschiebung, aber die Empfindlichkeit nach Selektion mit Pinoxaden gegenüber Pyroxsulam nahm im Trend ab (Tab. 3, Spalte 4, Tendenzen einer Steigerung der Unempfindlichkeit). Bestätigt sich der Trend in Fortführung des Experiments in der kommenden Generation, dann ist eine Kreuzresistenz als Ursache wahrscheinlich. Die Ausprägung ist schwächer und es stellt sich dann die Frage, ob es sich um einen gemeinsamen Teilmechanismus oder ob es sich um eine Induzierung des Metabolismus handelt. Beides wäre kontraproduktiv im Sinne einer Förderung von metabolischer Resistenz im Feld und kann wahrscheinlich nur sinnvoll unterbrochen werden durch geeignete Mittelwahl im Fruchtwechsel (z.B. Clethodim-haltige Produkte, die streng gegen metabolische Resistenzen selektieren). Es stellt sich dann auch die Frage ob umgekehrt durch eine Selektion mit Pyroxsulam (Pyro-F1) eine Verschiebung der Empfindlichkeit gegen Pinoxaden eine logische Konsequenz ist. Im Versuch zeigte sich dieser Trend nicht. Die Empfindlichkeit gegen Pinoxaden veränderte sich hier nicht für Pyro-F1. Im Trend war aber die Verschiebung bei Pyro-F1 bei Anwendung von Pyroxsulam zu sehen, aber nicht signifikant. Weiterhin zu prüfen ist Feststellung, dass eine Selektion nach Behandlung mit der Mischung beider Wirkstoffe (Pino+Pyro-F1) und auch die Population Pino-F1 und Pyro-F1 keine Senkung der Empfindlichkeit nach Anwendung beider Wirkstoffe in Mischung zeigte. Dies spricht entweder dafür, dass die Wirkstoffe Pinoxaden und Pyroxsulam keine gemeinsamen Abbauewege haben oder aber in Kombination eine synergistische Wirkung haben können. Auch das muss sich erst über eine weitere Generation der Selektion bestätigen lassen.

Mit den Ergebnissen lassen sich die eingangs aufgestellten Hypothesen teilweise beantworten:

1: eine Selektion mit Pinoxaden kann in einer Generation zu einer signifikanten Erhöhung der Unempfindlichkeit führen. Die Verschiebung der Empfindlichkeit kann eine schwache Auswirkung auf die Empfindlichkeit gegen Pyroxsulam solo haben, jedoch (in diesem Versuch) offensichtlich nicht auf die Mischung mit Pinoxaden?

2: Die Selektion mit Pyroxsulam führte in einer Generation zu einer leichten (aber nicht signifikanten) Erhöhung der Unempfindlichkeit gegen Pyroxsulam. Eine Änderung gegenüber Pinoxaden und der Mischung beider Wirkstoffe konnte nicht beobachtet werden.

3: Die Selektion mit der Mischung beider Wirkstoffe führte in einer Generation zu einer leichten (aber nicht signifikanten) Erhöhung der Unempfindlichkeit gegen Pyroxsulam und Pinoxaden solo, aber nicht in Mischung. Unter Vorbehalt lässt sich ableiten: Eine Mischung beider Wirkstoffe selektiert weniger intensiv die Unempfindlichkeit gegen Pinoxaden als die Solo-Anwendung Pinoxaden. Es besteht bei Solo und Mischanwendung von Pyroxsulam aber die Möglichkeit der Selektion der Unempfindlichkeit gegen Pyroxsulam, woraus sich bei weitere Bestätigung ableiten lässt nach Anwendung einer Mischung eher nicht zum Soloprodukt zurück zu kehren

Insgesamt war aber die Selektion einer metabolischen Resistenz gegen Pinoxaden deutlich schneller sichtbar als die Selektion gegen Pyroxsulam. Die Gefahr der Selektion von metabolischer Resistenz gegen

30. Deutsche Arbeitsbesprechung über Fragen der Unkrautbiologie und -bekämpfung, 22. – 24. Februar 2022 online

Pinoxaden kann für die gewählte Population als hoch eingeschätzt werden. Ob sich die Beobachtung generalisieren lässt muss sich in weiteren Versuchen zeigen.

Literatur

FRANCO-ORTEGA, S., A. GOLDBERG-CAVALLERI, A. WALKER, M. BRAZIER-HICKS, N. ONKOKESUNG, R. EDWARDS, 2021: Non-target Site Herbicide Resistance Is Conferred by Two Distinct Mechanisms in Black-Grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Metabolism and Chemodiversity*, 10.3389/fpls.2021.636652.

KNEZEVIC, S.Z., J.C. STREIBIG, C. RITZ, 2007: Utilizing R Software Package for Dose-Response Studies: The Concept and Data Analysis. *Weed Technology* **21**(3), 840–848.

NEVE, P., S. POWLES, 2005: Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theor Appl Genet* **110**, 1154–1166.

RITZ, C., F. BATY, J.C. STREIBIG, D. GERHARDS, 2015: Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, **10**(12).