

26th German Conference on weed Biology and Weed Control, March 11-13, 2014, Braunschweig, Germany

Molekulare Analyse der metabolischen Resistenz in Acker-Fuchsschwanz

Molecular analysis of metabolic resistance in blackgrass

Michael U. Höfer^{1*}, Friedrich Felsenstein², Maria Rosenhauer³ und Jan Petersen³

¹RLP AgroScience GmbH, AlPlanta, Breitenweg 71, 67435 Neustadt a.d. Weinstraße

²Epilagic GmbH, Hohenbachersstraße 19-21, 85354 Freising

³Fachhochschule Bingen, Berlinstraße 109, 55411 Bingen am Rhein Adresse(n)

*Korrespondierender Autor, michael.hoefer@agrosocietne.rlp.de



DOI 10.5073/jka.2014.443.008

Zusammenfassung

Um Kandidatengene für die metabolische Herbizid-Resistenz zu erfassen, wurde mithilfe eines „Transcriptomics“-Ansatz ein quantitativer Vergleich der Genexpression zwischen sensitiven und resistenten Biotypen des Acker-Fuchsschwanz (ALOMY) durchgeführt. Ausgehend von einem metabolisch resistenten Biotyp wurde im ersten Schritt mithilfe eines „paired-end“ RNA-Seq Protokolls ein Referenz-Transkriptom für ALOMY aus unbehandelten und Herbizid-behandelten Pflanzen erstellt. Im zweiten Schritt wurde die Genexpression in verschiedenen metabolisch resistenten ALOMY-Biotypen sowie in einer repräsentativen Auswahl an sensitiven Wildtyp-Biotypen mithilfe einer 3'-spezifischen RNA-Sequenzierung bestimmt und mit dem Referenztranskriptom abgeglichen. Durch Vergleich der Expressionshöhe einzelner Gene in Wildtyp und resistenten ALOMY Biotypen wurden Kandidatengene aus der Gruppe der Glutathion-Transferasen identifiziert. Weitere Analysen werden notwendig sein, um eine enge Korrelation mit der metabolischen Resistenz zu verifizieren.

Stichwörter: ALOMY, Acker-Fuchsschwanz, Glutathion S-Transferase, MACE, metabolische Resistenz, Referenztranskriptom

Abstract

A transcriptomics approach was chosen in order to determine candidate genes for metabolic herbicide resistance in a quantitative comparison of expressed genes in sensitive wild type and resistant blackgrass (*Alopecurus myosuroides* = ALOMY) plants. Firstly a reference transcriptome for blackgrass was established by means of a paired-end RNA-Seq protocol prepared from control and herbicide treated plants from a metabolic resistant biotype. Secondly gene expression was measured in different metabolic resistant ALOMY biotypes and a representative selection of sensitive wild type plants using a 3'-specific RNA sequencing strategy and related to the reference transcriptome. By comparing expression levels for individual genes in wild type and resistant blackgrass biotypes candidate genes from the group of glutathione transferases were identified. Further analyses will be necessary in order to verify a close correlation with the metabolic resistance.

Keywords: ALOMY, blackgrass, MACE, non-target site resistance, reference transcriptome, RNA-Seq

Einleitung

Der Acker-Fuchsschwanz (ALOMY) ist im Wintergetreide eines der wichtigsten Unkräuter in Westeuropa. Seine Anpassung an herbizide Wirkstoffe beruht bei resistenten ALOMY Populationen nicht nur auf „Target-Site“-Mutationen der Herbizid-Bindestellen der gut untersuchten Zielgene Acetolactat-Synthase (ALS) und Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase), sondern zu einem erheblichen Teil auch auf einer breiteren Nicht-Zielort-Resistenz (NTSR). Die daran beteiligten Mechanismen sind vielfältig und beinhalten eine verstärkte Metabolisierung von Herbiziden sowie Kompensationsreaktionen von schädlichen Folgeprodukten wie freien Sauerstoffradikalen (DÉLYE, 2013; YUAN *et al.*, 2007). Die molekularen Ursachen für die metabolischen Resistenzen sind z. Zt. noch weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch vermehrt Hinweise, dass je nach Wirkstoffklasse unterschiedliche enzymatische Systeme - und höchstwahrscheinlich auch Kombinationen davon - beteiligt sein können, wie z. B. Glutathion-Transferasen, Peroxidasen, Cytochrom P450 Monooxygenasen oder Glykosyl-Transferasen; häufig Multi-Genfamilien, aus denen durch wiederholte Herbizidanwendung einzelne mutierte Allele selektiert und angereichert werden können (CUMMINS *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1995; LETOUZE und GAZQUES, 2003; PRESTON, 2004; POWELS und YU, 2010). Genetische Untersuchungen zeigen, dass in

metabolisch resistenten Populationen von Acker-Fuchsschwanz und *Lolium* Resistenzgene dominant oder rezessive vererbt werden und mehrere verschiedene Gene dabei zusammenspielen können (LETOUZÉ und GASQUEZ, 2001; PETIT *et al.*, 2010; BUSI *et al.*, 2013). Außerdem können Resistenzgene konstitutiv oder Herbizid-induziert exprimiert werden (PETIT *et al.*, 2012; DOHOUX und DÉLYE, 2013). Für eine Glutathion-Transferase mit Peroxidase Aktivität wurde gezeigt, dass das zugehörige Gen differentiell auf Transkript- und Proteinebene in dem resistenten Biotyp Peldon im Vergleich zum sensitiven Wildtyp hochreguliert ist (CUMMINS *et al.*, 1999). Es ist daher naheliegend, in resistenten Biotypen mit einer diagnostizierten NTSR mit einem globalen „Screening“-Ansatz nach solchen Genen zu suchen, deren Expressionsverhalten sich vom Wildtyp unterscheidet, um so mögliche Kandidaten aufzuspüren, die für metabolische Resistenz verantwortlich sind.

Die sog. „next generation“-Sequenzieretechnologien („NGS“) wurden in den letzten Jahren soweit verbessert, dass sie sich inzwischen als globales Analyseverfahren gerade für molekularbiologisch weitgehend unbearbeitete Organismen wie ALOMY anbieten (METZKER, 2010). Die Transkriptomik ist dabei nicht auf die Entschlüsselung des oftmals sehr komplexen Erbgutes/Genoms angewiesen, sondern setzt direkt an der Genexpression, d. h. an der Globalanalyse aller erfassbaren Transkripte an (WANG *et al.*, 2009; BRÄUTIGAM und GOWIK, 2010) und ist u. a. wegen ihrer hohen Sensitivität und ihrem breiten dynamischen Bereich zur Erfassung von Transkripten unterschiedlicher Abundanzen herkömmlichen Methoden wie Microarrays weit überlegen. Zum Screening von Herbizidresistenz-assoziierten Genen wurde daher ein genomweiter Transkriptomansatz mit unterschiedlich resistenten und sensitiven ALOMY Biotypen etabliert.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Für das ALOMY Referenz-Transkriptom wurde Gewächshausmaterial von F1-Pflanzen aus einer Kreuzung zweier Einzelpflanzen einer multiresistenten Herkunft (710 A x 710 B) verwendet, für die bekannte Zielortresistenzen über Pyro-Sequenzierung ausgeschlossen wurden (Rosenhauer *et al.* 2013). Der Auswahl der Eltern ging eine Selektion mit 500 g/ha Atlantis WG (Wirkstoffe: Iodosulfuron + Mesosulfuron) + 1,0 l/ha FHS voraus. F1-Pflanzen wurden sieben Wochen nach der Keimung vegetativ vermehrt und fünf resultierende Klone abzüglich einer Kontrollpflanze nach einer weiteren Woche mit 500 g/ha Atlantis WG + 1,0 l/ha FHS behandelt. Blattmaterial der drei behandelten Klone wurden jeweils 4 h, 8 h und 25 h nach Behandlung in Flüssigstickstoff eingefroren, die Ernte des Blattmaterials des unbehandelten Klons (u.) erfolgte zeitgleich mit dem 4h-Wert. Der verbliebene behandelte Klon diente der Verifizierung der Resistenz.

Für die Genexpressionsanalysen wurden sechs resistente Biotypen (710, 601, Elbe, ST44, ST26 und 9509) ausgewählt und parallel unter Gewächshausbedingungen in sandiger Lehmerde mit ca. 2 % organischen Material bei zusätzlicher Beleuchtung von 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ zwischen 07:00 bis 10:00 und 16:00 bis 19:00 angezogen.

Von jeder Herkunft wurden mehrere Pflanzen ausgesät und nach 7 Wochen klonal vermehrt. Zwei Klone jeder Herkunft wurden eine Woche später mit 1,2 l/ha Ralon Super (Biotypen: 9509, ST44, ST26 und 601) bzw. mit 500 g/ha Atlantis WG (Biotypen: Elbe und 710) behandelt und von einem Klon vier Stunden nach der Behandlung Blattmaterial geerntet und in Flüssigstickstoff konserviert. Der verbliebene behandelte Referenz-Klon wurde zur Verifizierung der Resistenz verwendet. Zeitgleich wurden auch Blätter unbehandelter Klone jeder Herkunft geerntet und kryokonserviert.

Repräsentativ für den Wildtyp wurden zeitgleich mit den resistenten Biotypen 30 verschiedene sensitive Biotypen ausgesät, kloniert und zum gleichen Zeitpunkt behandelt bzw. kryokonserviert. Die Behandlung der Hälfte der Klone erfolgte mit 1,2 l/ha Ralon Super, die andere Hälfte diente als unbehandelte Kontrolle. Blattprobenahme und Bonitierung von Referenz-Klonen erfolgten wie für die resistenten Biotypen.

Die Herbizid-Applikationen erfolgten mit einem Spritzautomat (SCHACHTNER) mit den Einstellungen 250 l/ha Wasser, 2,5 km/h, 2,5 bar und einer Düse TEE JET 9502EVS 45 cm über den Pflanzen. Die Bonitierung erfolgte jeweils vier Wochen nach Behandlung der Pflanzen. Es wurden nur Pflanzen für die RNA-Isolation verwendet, deren Resistenz bzw. Sensitivität durch die Bonitierung ihres Klons bestätigt werden konnte.

RNA-Isolation und QC

Gesamtblattmaterial von *A. myosuroides* wurde unter Flüssigstickstoff-Bedingungen mit einer Zelmühle (MM200, Retsch, Haan) bei 30 Hz für 2 min pulverisiert und mit dem RNAeasy Plant Mini-Kit (Qiagen, Hilden) die Gesamt-RNA isoliert. Aliquote dieser RNA wurden zur Eliminierung von kontaminierenden gDNA-Resten mit Baseline-Zero™ DNase (Biozyme Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) nach Herstellerangaben behandelt, über MinElute Cleanup-Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und abschließend photometrisch vermessen (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmigton, USA). Für alle zu sequenzierenden RNA-Proben wurde die RNA-Integrity-Number-Werte mithilfe eines 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) bestimmt.

Normalisierte cDNA, Sequenzierung und Bioinformatik

cDNA aus *A. myosuroides* für den 4 h- und 8 h-Wert wurde nach ihrer Umschreibung aus mRNA mittels oligo-(dT)-Nukleotiden, mithilfe einer Doppelstrang-spezifischen Nuklease (DSN) zur Reduktion häufiger Transkripte nach einem ähnlich zu dem von BOGDANOVA *et al.* (2010) beschriebenen Verfahren normalisiert und vor Adaptor-Ligation mit Ultraschall fragmentiert. Die Gesamt-RNA der unbehandelten Pflanze und aus der 25 h-Probe wurde mithilfe des Ribo-Zero rRNA Removal Kits (Plant Leaf, Epicentre, Biozyme Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) behandelt. Aus den angereicherten mRNAs wurden nach Zink-Fragmentierung (WERY *et al.*, 2013) und direkter Adapter-Ligation RNA-Seq-Bibliotheken hergestellt. Die normalisierten cDNAs und die resultierenden RNA-Seq Bibliotheken wurden von beiden Seiten her (= paired end) mit je 100 bp auf einem Hiseq2000 Gerät sequenziert. Kumulativ standen aus allen vier Bibliotheken nach Duplikatebereinigung und Aussortieren von qualitativ minderwertigen Sequenzen sowie Adaptersequenzen etwa 430 Megabasen an Sequenzinformation zur Verfügung. Die Qualitätsbereinigten Einzelsequenzen wurden mittels Trinity (GRABHERR *et al.*, 2011) und CAP3 (HUANG und MADAN, 1999) *de novo* zu Contigs zusammengefügt. Zur funktionellen Annotation wurden diese mit Hilfe der Datenbanken SwissProt und TrEMBL (Uniprot) mit dem BLASTX Algorithmus (NCBI, Bethesda MD, USA) analysiert. Die Probenvorbereitung und Bioinformatik fanden bei der GenXPro GmbH (Frankfurt am Main) statt.

MACE (Massive Analysis of cDNA Ends)

Massive Analysis of cDNA Ends (MACE) Bibliotheken wurden nach dem von der GenXPro GmbH entwickelten Verfahren hergestellt, wie beschrieben in ZAWADA *et al.* (2013) und mit 1x 100 bp reads auf einer Illumina Hiseq2000 Lane sequenziert. Nach Aussortieren qualitativ minderwertiger Sequenzen sowie dem Aussortieren von Adaptersequenzen mit „TagDust“ (LASSMANN *et al.*, 2009) wurden die einzelnen MACE Sequenzen der verschiedenen Bibliotheken mithilfe des Referenztranskriptoms annotiert, die Häufigkeit der verschiedenen Transkripte ermittelt und auf „reads per million“ normalisiert.

Analysen ausgewählter annotierter Referenz-Contigs und MACE-Contigs erfolgten mit dem Lasergene Core Suite Software-Paket V.10 (DNASTAR Inc. Madison, USA).

Ergebnisse

ALOMY Referenztranskriptom

Als Basis für die Genexpressionanalysen in Acker-Fuchsschwanz wurde zuerst ein Referenz-Transkriptom aus einer F1-Pflanze eines multi-resistenten Biotyps hergestellt. Um den Anteil an heterozygoten Allelen zu reduzieren, wurde dazu ein Kreuzungsschritt vorgeschaltet, was für die Assemblierung der RNASeq-Daten von Vorteil ist (BRÄUTIGAM und GOWIK, 2010). Von dem F1-Individuum wurden vier Klone hergestellt, von denen drei nach 4, 8 und 25 h nach einer

Herbizidbehandlung mit Mesosulfuron beprobt wurden. Dadurch sollte der Anteil an durch die Herbizidwirkung induzierbaren Gene im Referenz-Transkriptom gesteigert werden (PETIT *et al.*, 2012). Die aus den vier Klonen resultierenden RNA-Seq Bibliotheken wurden separat sequenziert und gemeinsam assembliert. Tabelle 1 fasst die Ergebnisse zusammen. Letztlich konnten 51609 contigs einem Protein aus der SwissProt Datenbank zugeordnet werden, wobei mit ca. 77 % die Mehrzahl an 29078 Treffern auf *A. thaliana* und 10923 Treffern auf *O. sativa* entfiel.

Tab. 1 Assemblierung des Referenztranskriptoms.

Tab. 1 Assembly of the reference transcriptome.

Längster Contig	22.033 b
Kürzester Contig	151 b
Mittlere Contig-Länge	803 b
Contigs insgesamt	130.373
Basen insgesamt	104.750.629
Contigs annotiert [SWISSPROT]	51609

Die Abdeckung bekannter Transkripte durch die Contigs wurde anhand publizierter ALOMY Sequenzdaten überprüft und zeigte für ACCase (Abb. 1) sowie für ALS (Acc. AJ437300) und Glutathion-S-Transferasen (Acc. AJ010451, jeweils Daten nicht gezeigt) Vollängentranskripte, die teilweise 5'- und 3'-seitig zusätzliche Sequenzinformationen beinhalten.

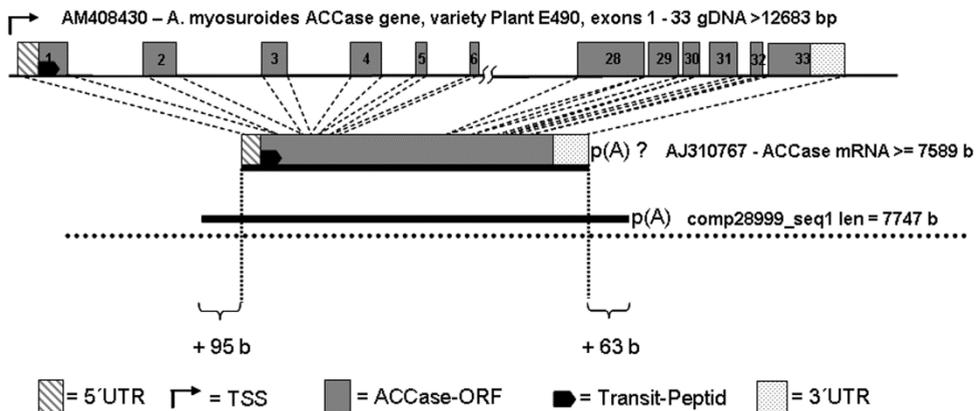


Abb. 1 Vergleich ACCase Gen AM408430 - mRNA AJ310767 - Contig 28999 aus dem ALOMY-Referenztranskriptom.

Fig. 1 Comparison of ACCase gene AM408430 - mRNA AJ310767 - Contig 28999 ALOMY-Reference transcriptome.

Eine Schlagwortsuche im Referenzgenom zeigte für Genfamilien, die im Zusammenhang mit der metabolischen Resistenz stehen, eine entsprechende Diversität an unterschiedlichen Contigs (Tab. 2). Eine direkte Korrelation zu der Anzahl an im ALOMY Genom kodierten Gene besteht allerdings nicht, da u. a. Splice-Varianten in unterschiedliche Contigs assembliert wurden und es sich nicht in allen Fällen um Vollängen-Sequenzen handelt, so dass diese partiellen contigs z. T. auch nicht überlappen.

Tab. 2 Contig-Treffer nach Schlagwortsuche im Referenztranskriptom.

Tab. 2 Contig-hits by keywords in the reference transcriptome.

Kontext	Gen (-Familie/-Superfamilie)	Contig-Treffer
Target-Site Resistenz	Acetyl-CoA-Carboxylase	21
	Acetolactat-Synthase	7
Metabolische Resistenz	ABC-Transporter	303
	Cytochrom P450 Monooxygenasen	347
	Glutathion-S-Transferase	148
	Glutathion Peroxidase	9
	Peroxidase	207
	Glykolsyl-Transferase	216
Diverse	Actin (inkl. „actin-related“)	22 (50)
	Elongation Factor 1-alpha	22
	Chlorophyll a-b binding protein (CAB)	27
	Ribulose biphosphate carboxylase small chain, rbcS	2
	Rezeptor-like Protein Kinase	2855
	Transcriptionsfactor	1066

Um einen Überblick über die Situation für die Genfamilie der Glutathion-S-Transferasen zu erhalten, wurden alle 148 identifizierten Contigs den fünf Klassen zugeordnet und miteinander verglichen. Tabelle 3 zeigt den Vergleich mit der Situation in Reis (*O. sativa*) und *Arabidopsis* nach CUMMINS *et al.* (2011) und DIXON und EDWARDS (2010). Die Anzahl der Contigs verringerte sich dadurch von 148 auf 85.

Tab. 3 Glutation-Transferasen im Referenztranskriptom.

Tab. 3 Glutathione transferases in the reference transcriptome.

Glutathion-Transferase Klassen	<i>A. myosuriodes</i> (Contigs*)	<i>O. sativa</i> (Gene)	<i>A. thaliana</i> (Gene)
GSTF (Phi)	21	16	13
GSTU (Tau)	39	52	28
GSTT (Theta)	18	1	3
GSTZ (Zeta)	6	4	2
GSTL (Lambda)	1	3	1

* nach Clusteranalyse mit SeqManPro-Modul der Lasergene Core Suite
MACE-Expressionsanalyse

Um Kandidatengene für die metabolische Herbizidresistenz zu identifizieren, deren Expression sich deutlich von der im sensitiven Wildtyp unterscheidet, wurde mit einem 3'-spezifischen MACE-RNaseq-Ansatz die globale Genexpression in 6 gut charakterisierten Biotypen mit unterschiedlichen metabolischen Resistenzmustern (ROSENHAUER und PETERSEN, persönliche Mitteilung, unveröffentlicht) gemessen und mit einem repräsentativen Pool sensitiver Biotypen verglichen. Bei MACE wird von jedem Transkript-Molekül lediglich ein Fragment des 3' Endes sequenziert (=MACE-tag). Somit erhöht sich die Abdeckung mit Sequenzen für den 3'-Bereich, was außerdem eine geringere Sequenziertiefe erfordert, um selten exprimierte und kurze Transkripte zu erfassen (KAHL *et al.*, 2012). Für jede Herkunft wurden mehrere Pflanzen kloniert und jeweils ein Klon unbehandelt als auch ein Klon nach Herbizidapplikation analysiert. Nur solche Pflanzen wurden verwendet, deren behandelter Referenzklon in der Bonitur den erwarteten Phänotyp zeigte. Die MACE-Sequenzierung lieferte zwischen 7,2 bis 14,2 Millionen kurze DNA-Sequenzen,

Tab. 4 MACE-Expressionsdaten für 3 putative Glutathion-S-Transferasen.

Tab. 4 MACE-Expression data for 3 putative Glutathione-S-transferases.

[rpm]	601 u	Elbe u	710 u	9509 u	ST44 u	ST26 u	WT u
	15	9	13	6	6	7	30
Contig11971	133,2	71,7	125,8	51,0	20,4	53,0	4,7
Comp39196	118,3	45,0	85,1	24,5	11,0	42,3	3,4
Comp40008	97,1	40,4	73,7	22,8	15,5	29,1	5,8

a: normalisierte MACE reads unbehandelte Biotypen

a: normalised MACE reads of untreated biotypes

[rpm]	601 +	Elbe +	710 +	9509 +	ST44 +	ST26 +	WT +
	15	9	13	6	6	7	30
Contig11971	279,4	204,3	145,9	125,3	200,6	308,4	45,4
Comp39196	207,1	117,6	127,9	70,4	125,0	245,3	31,8
Comp40008	162,8	67,3	102,2	50,8	36,9	92,8	21,6

b: normalisierte MACE reads, Biotypen 4 h nach Herbizid-Applikation

b: normalised MACE reads of biotypes 4 h after herbicide application

	601	Elbe	710	9509	ST44	ST26	WT
Contig11971	2,1	2,8	1,2	2,5	9,8	5,8	9,7
Comp39196	1,8	2,6	1,5	2,9	11,3	5,8	9,5
Comp40008	1,7	1,7	1,4	2,2	2,4	3,2	3,7

c: Expressionsverhältnis [rpm mit] / [rpm ohne] Herbizidbehandlung

c: expression ratio [rpm with] / [rpm without] herbicide treatment

	601 u	Elbe u	710 u	9509 u	ST44 u	ST26 u
Contig11971	28,6	15,4	27,0	10,9	4,4	11,4
Comp39196	35,3	13,4	25,4	7,3	3,3	12,6
Comp40008	16,8	7,0	12,8	3,9	2,7	5,0

d: Expressionsverhältnis [rpm] Resistenter Biotyp / [rpm] Wildtyp; ohne Herbizidbehandlung

d: expression ratio [rpm] resistant biotype / [rpm] wild type; without herbicide treatment

	601 +	Elbe +	710 +	9509 +	ST44 +	ST26 +
Contig11971	6,2	4,5	3,2	2,8	4,4	6,8
Comp39196	6,5	3,7	4,0	2,2	3,9	7,7
Comp40008	7,5	3,1	4,7	2,3	1,7	4,3

e: Expressionsverhältnis [rpm] Resistenter Biotyp / [rpm] Wildtyp nach Herbizidbehandlung

e: expression ratio [rpm] resistant biotype / [rpm] wild type; after herbicide treatment

sog. „reads“, für die 14 Einzelproben (d. h. 6 resistente Biotypen, 1 Wildtyp-Pool, jeweils mit Herbizid behandelt bzw. unbehandelte Kontrolle), die den Contigs des Referenztranskriptoms zugeordnet wurden. Das Filtern auf Contigs mit mehr als 50 „reads“ in mindestens einer der 14

Proben ergab im Gesamtvergleich 31877 unterschiedliche Contigs die nach Normalisierung der „read“-Häufigkeiten je Contig auf „reads“ pro Million (rpm) zur Auswertung weiterverwendet wurden. Aus diesen MACE-Daten konnten 134 Einträge für Glutathion-S-Transferasen (GST) herausgefiltert werden. Tabelle 4 zeigt ein Beispiel für drei verschiedene Contigs, die aufgrund ihrer Sequenz zur Tau-Klasse (Contig11971 und Comp39196) bzw. zur Phi-Klasse (Comp40008) der GSTs zugeordnet werden konnten. Tabelle 4a und Tabelle 4b geben die normalisierten MACE-tag Werte für die unbehandelten (u) bzw. die mit Herbizid behandelten (+) Biotypen wieder. Alle drei GST-Contigs wurden durch die Herbizid-Behandlung induziert (Tab.4c), allerdings zeigten die resistenten Biotypen 601, Elbe, 710 und 9509 im Verhältnis einen deutlich geringen Induktionsgrad als der Wildtyp (WT) und die resistenten Biotypen ST44 und ST26. Im direkten Vergleich der Expressionshöhe wiesen alle verschiedenen resistenten Biotypen (Tab.4d und 4e) eine deutlich höhere Expression als der sensitive Wildtyp auf, wobei die Unterschiede im Herbizid-behandelten Zustand geringer werden. Die größten Unterschiede zum sensitiven Wildtyp wiesen die resistenten Biotypen 601, Elbe und 710 im unbehandelten Zustand auf (Tab. 4d).

Diskussion

Ein *de novo* Transkriptom von Acker-Fuchsschwanz bildet die Grundlage, Gene für die metabolische Herbizidresistenz zu identifizieren. Ähnliche Ansätze wurden (PENG *et al.*, 2010) und werden derzeit verfolgt (GARDIN *et al.*, 2013). Die vorliegende vergleichende Transkriptomanalyse von sechs Herbizid-resistenten Acker-Fuchsschwanz Biotypen hat zur Identifizierung von drei Glutathion-S-Transferasen geführt, deren Expressionshöhe im Vergleich zum sensitiven Wildtyp deutlich erhöht ist. Comp40008 entspricht einer AmGSTF1, von der schon eine differentielle Expression in dem resistenten ALOMY-Biotyp Peldon beschrieben wurde und die aufgrund ihrer Peroxidase-Aktivität zum generellen Schutz vor Herbizid-induziertem oxidativen Stress beiträgt (CUMMINS *et al.*, 1999). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass AmGSTF1 in transgenen *A. thaliana* eine direkte regulatorische Funktion auf den Stoffwechsel ausübt, der in der Akkumulation von schützenden Flavonoiden resultiert (CUMMINS *et al.*, 2013). Es liegt daher nahe, zu vermuten, dass die erhöhte Expression der drei identifizierten GSTs Teil eines Resistenzmechanismus ist, der in den untersuchten resistenten Biotypen vorhanden aber unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Da diese Biotypen unterschiedliche multiple Resistenz- und Kreuzresistenzmuster aufweisen (ROSENHAUER und PETERSEN, pers. Mitteilung), ist zu vermuten, dass weitere Biotyp-spezifische Kombinationen von Resistenzgenen existieren, die in der Summe ihrer Wirkung den Resistenzphänotyp ausmachen. Zur Aufklärung dieser Zusammenhänge werden Validierungen von Kandidatengenen über qPCR durchgeführt sowie in „Bulked Segregant Analysen“ (QUARRIE *et al.*, 1999) MACE Analysen anhand von ausgewählten Pools aus aufspaltenden Populationen untersucht, die aus der Kreuzung von o.g. resistenten Biotypen mit dem sensitiven Wildtyp stammen.

Danksagung

Die beschriebenen Arbeiten wurden im Rahmen eines AiF geförderten ZIM-Projektes mit dem Titel „Neue Werkzeuge für die Diagnose der metabolischen Resistenz in Ackerfuchsschwanz“, Förderkennzeichen: KF 2448406 MD1 durchgeführt.

Literatur

- BOGDANOVA, E.A., I. SHAGINA, E.V. BARSOVA, I. KELMANSON, D.A. SHAGIN und S.A. LUKYANOV, 2010: Normalizing cDNA libraries. *Curr Protoc Mol Biol*. Chapter 5, Unit 5.12.1-27.
- BRÄUTIGAM, A. und U. GOWIK, 2010: What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biol*. **12**(6), 831-841.
- BUSI, R., P. NEVE und S. POWLES, 2013: Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. *Evol. Appl*. **6**(2), 231-242.
- CUMMINS, I., D.J. COLE und R. EDWARDS, 1999: A role for glutathione transferase functioning as glutathione peroxidase in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J*. **18**, 285-292.
- CUMMINS, I., D. N. BRYANT und R. EDWARDS, 2009: Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Biotechnol. J*. **7**(8), 807-820.

- CUMMINS, I., D.P. DIXON, S. FREITAG-POHL, M. SKIPSEY und R. EDWARDS, 2011: Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev.* **(43)2**, 266-80.
- CUMMINS, I., D.J. WORTLEY, F. SABBADIN, Z. HE, C.R. COXON, H.E. STRAKER, J.D. SELLARS, K. KNIGHT, L. EDWARDS, D. HUGHES, S.S. KAUNDUN, S.J. HUTCHINGS, P.G. STEEL und R. EDWARDS, 2013: Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**(15), 5812-5817.
- DÉLYE, C., 2013: Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Manag Sci.* **69**(2), 176-187.
- DIXON, D.P. und R. EDWARDS, 2010: Glutathione transferases. In: *The Arabidopsis Book* 8:e0131. 10.1199/tab.0131.
- DOHOUX, A. und C. DÉLYE, 2013: Reference Genes to Study Herbicide Stress Response in *Lolium* sp.: Up-Regulation of P450 Genes in Plants Resistant to Acetolactate-Synthase Inhibitors. *PLoS One.* 2013, **8**(5), e63576.
- GARDIN, J., R. BEFFA, J. GOUZU, S. CARRÈRE und C. DÉLYE, 2013: A transcriptomics-based approach enables the first identification of candidate genes involved in non-target-site-based resistance to herbicides in a grass weed (*Alopecurus myosuroides*) Global Herbicide Resistance Challenge Conference, Program and Abstracts.
- GRABHERR, M.G., B.J. HAAS, M. YASSOUR, J.Z. LEVIN, D.A. THOMPSON, I. AMIT, X. ADICONIS, L. FAN, R. RAYCHOWDHURY, Q. ZENG, Z. CHEN, E. MAUCELI, N. HACHOEN, A. GNIKKE, N. RHIND, F. DI PALMA, B.W. BIRREN, C. NUSBAUM, K. LINDBLAD-TOH, N. FRIEDMAN und A. REGEV, 2011: Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* **15**, **29**(7), 644-52.
- HUANG, X. und A. MADAN, 1999: CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, **9**, 868-877.
- KAHL, G., C. MOLINA, B. ROTTER, R. JÜNGLING, A. FRANK, N. KREZDORN, K. HOFFMEIER und P. WINTER, 2012: Reduced representation sequencing of plant stress transcriptomes. *J. Plant Biochemi Biotech* (21) 1, Supplement, pp 119-127.
- LASSMANN, T., Y. HAYASHIZAKI und C.O. DAUB, 2009, TagDust - A program to eliminate artifacts from next generation sequencing data. *Bioinformatics.* **1**, **25**(21), 2839-40.
- LETOUZE, A. und J. GASQUEZ, 2001: Inheritance of fenoxaprop-P-ethyl resistance in a blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) population. *Theor. Appl. Genet.* **103**(2), 288-296.
- LETOUZE, A. und J. GASQUEZ (2003): Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) *Agronomie* **23**, 601-608.
- LI, G., S. G. WU, R. X. YU, T. CANG, L.P. CHEN, X.P. ZHAO, L.M. CAI und C. X. WU, 2013: Identification and expression pattern of a glutathione S-transferase in *Echinochloa crus-galli*. *Weed Research* **53**(5), 314-321.
- METZKER, M. L., 2010: Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **11**(1), 31-46.
- PENG, Y., L.L. ABERCROMBIE, J.S. YUAN, C.W. RIGGINS, R.D. SAMMONS, P.J. TRANEL und C.N. STEWART JR., 2010: Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. *Pest Manag. Sci.* **66**(10), 1053-1062.
- PETIT, C., B. DUHIEU, K. BOUCANSAUD und C. DÉLYE, 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**(6), 501-509.
- PETIT, C., F. PERNIN, J.M. HEYDEL und C. DÉLYE, 2012: Validation of a set of reference genes to study response to herbicide stress in grasses. *BMC Res. Notes* **5**, 18.
- QUARRIE, S. A., V. LAZIC-JANCIC, D. KOVACEVIC, A. STEED und S. PEKI, 1999: Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *J. Exp. Bot.* **50**(337), 1299-1306.
- ROSENHAUER, M., B. JASER, F.G. FELSENSTEIN und J. PETERSEN, 2013: Development of target-site resistance (TSR) in *Alopecurus myosuroides* in Germany between 2004 and 2012. *J. Plant Diseases and Protection* **120**, 179-187.
- POWLES, S.B. und Q. YU, 2010: Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 317-47.
- WERY, M., M. DESCRIMES, C. THERMES, D. GAUTHERET und A. MORILLON, 2013: Zinc-mediated RNA fragmentation allows robust transcript reassembly upon whole transcriptome RNA-Seq. *Methods* **63**(1), 25-31.
- YUAN, J.S., P.J. TRANEL und C.N. STEWART JR., 2007: Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.* **12**(1), 6-13.
- ZAWADA, A.M., K.S. ROGACEV, S. MULLER, B. ROTTER, P. WINTER, D. FLISER und G.H. HEINE, 2013: Massive Analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease MACE and miRNA profiling in CKD. *Epigenetics* Nov 1; **9**(1).