

28. Deutsche Arbeitsbesprechung über Fragen der Unkrautbiologie und -bekämpfung, 27.02. – 01.03.2018 in Braunschweig

Reaktion einer Population von *Lolium multiflorum* var. *westerwoldicum* auf wiederholten Einsatz von Glyphosat

Reaction of a population of Lolium multiflorum var. westerwoldicum to repeated use of glyphosate

Laura Tamms, Laurie Anne Koning*, Friederike de Mol, Bärbel Gerowitt

Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Satower Straße 48,
18051 Rostock

*Korrespondierende Autorin, laurie.koning@uni-rostock.de

DOI 10.5073/jka.2018.458.038



Zusammenfassung

Der Einsatz von Glyphosat hat weltweit zugenommen. Begleitet wurde diese Entwicklung von Sensitivitätsverlusten und Resistenzentwicklungen. Eine herausragende Rolle spielen dabei *Lolium*-Arten. *Lolium multiflorum* var. *westerwoldicum* wurde in einem Freilandversuch in den Jahren 2014, 2015 und 2016 untersucht. In zwei Behandlungsvarianten wurde ein Glyphosat-basiertes Herbizid in zwei Aufwandmengen (50 % und 25 % der zugelassenen Aufwandmenge) eingesetzt, die so gewählt waren, dass Pflanzen die Behandlung überleben sollten. Die Samenbildung der überlebenden Population im Freiland wurde bestimmt. Ein Teil der Samen wurde im jeweils nächsten Jahr wieder im Freiland ausgesät. Für einen anderen Teil der Samen wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt: Nach drei Jahren wurden alle Generationen (Eltern (=F0), F1, F2, F3) in einem Biotest vergleichend untersucht.

Im Feldversuch fand eine erfolgreiche Reproduktion von *L. multiflorum* nach Glyphosateinsatz statt. Die wieder ausgesäten Generationen wiesen geringere Etablierungsraten in den folgenden Jahren auf. Im Biotest deuteten sich abnehmende Sensitivitäten (ED₅₀, ED₉₀) der Folgegenerationen gegenüber Glyphosat an.

Stichwörter: Dosis-Wirkung, Resistenz, Sensitivität, Sensitivitätsverluste

Abstract

The use of glyphosate increased globally, this development is accompanied with losses in sensitivity and upcoming resistance and *Lolium* species have a pronounced role in this development. *Lolium multiflorum* var. *westerwoldicum* was sown in a field experiment in 2014, 2015 and 2016. A glyphosate-based herbicide was applied at two dosages (50%, 25% of the registered dose rate). The two treatments were selected to allow for a certain plant survival. The seed production of the surviving population was assessed in the field. Parts of the seeds were again sown in the field in the following year. Other parts of the seeds were used in a dose-response bioassay: Paternal and filial generations (parents (=F0), F1, F2, F3) were tested in a bioassay after three years.

L. multiflorum successfully reproduced under the treatments of the field experiment. The re-sown seeds of the filial generations established in the field at lower rates. The bioassays indicated a tendency for decreasing glyphosate sensitivities (ED₅₀, ED₉₀) in the filial generations

Keywords: Dose-response, resistance, sensitivity, sensitivity losses

Einleitung

Der Wirkstoff Glyphosat hat einen herausragenden Stellenwert unter den Herbiziden zur Unkrautbekämpfung. Die ausgebrachten Mengen sind in Deutschland ebenso wie global um ein Vielfaches höher als bei jedem anderen herbiziden Wirkstoff (BAYLIS, 2000; GIANESSI, 2013).

In Ackerbausystemen wird durch Herbizide ein kontinuierlicher Selektionsdruck auf die Unkrautpopulationen ausgeübt. Als Antwort auf diese Selektion sind zwei Reaktionsmuster möglich: Die Artengemeinschaft verschiebt sich, so dass die mengenmäßige Bedeutung einzelner Arten zunimmt, und/oder die Sensitivität innerhalb der Population einer Art verschiebt sich.

Auch der Wirkstoff Glyphosat ist weltweit von Sensitivitätsverlusten betroffen (HEAP, 2014). In Deutschland ist Resistenz gegenüber Glyphosat bisher nicht nachgewiesen – weltweit nimmt die Resistenz gegen Glyphosat aber stetig zu (HEAP, 2014).

Eine herausragende Rolle unter den Unkrautarten mit nachgewiesener Glyphosatresistenz spielen *Lolium*-Arten. Die Gattung *Lolium* gehört zur Familie der Süßgräser (Poaceae), sie umfasst mehrjährige und einjährige Gräser, die im Zwischenfruchtbau und in der Grünfüttererzeugung

von Bedeutung sind. Bei der Verwendung als Zwischenfrucht stellt die Wildaussaat ein Risiko dar, denn durch schnellen Samenausfall kann sich *L. multiflorum* in den nachfolgenden Kulturen als Ackerunkraut etablieren (LFL, 2017). *Lolium multiflorum* var. *westerwoldicum* ist eine einjährige Art, die nach der Aussaat im Frühjahr ohne Vernalisation die generative Phase erreicht. Die Blüte beginnt ab Juni (DÖRTER, 1977). *Lolium multiflorum* zählt zu den selbstinkompatiblen, fremdbefruchtenden *Lolium*-Arten (HAYMAN, 1992). Die rasche Jugendentwicklung macht *L. multiflorum* zu einer konkurrenzstarken Pflanze, die in der Regel eine Bekämpfung in der Kultur erforderlich macht.

Wir verwendeten *L. multiflorum*, um die Wirkung von Glyphosatapplikationen auf nachfolgende Generationen über drei Jahre zu prüfen und mögliche Sensitivitätsverluste oder phänotypische Reaktionen festzustellen. Dafür wurde ein zweifach aufgebauter Versuch entwickelt, der aus einem Freilandversuch und Biotests bestand.

Material und Methoden

Freilandversuch

Lolium multiflorum wurde mit subletalen Glyphosataufwandmengen behandelt, so dass einige überlebende Pflanzen Samen bilden konnten. Der Versuch wurde von 2014-2016 im Lehrgarten der Universität Rostock durchgeführt. Saatgutlieferant für *L. multiflorum* war der Züchter „Saatgut Steinach GmbH und Co KG“. Als Herbizid wurde Glyphos SUPREME® mit der Voraufzulassung in Ackerbaukulturen eingesetzt. Die zugelassene volle Aufwandmenge beträgt 1080 g Glyphosat/ha. Der Versuch war als vierfach wiederholte Blockanlage mit den Versuchsvarianten „25 % Aufwandmenge“ und „50 % Aufwandmenge“, jeweils bezogen auf die volle zugelassene Aufwandmenge angelegt. Innerhalb der Blöcke wurden an jährlich zufällig wechselnden Stellen 1,95 m² große Sub-Parzellen angelegt. Auf jeweils 1 m² dieser Sub-Parzellen wurden populationsdynamische Parameter erfasst. Eine unbehandelte Kontrollparzelle pro Block diente als Referenz.

Gesät wurde mit der Hand in einer Dichte von 1000 *L. multiflorum*-Samen/m². Aufgelaufene *Lolium*-Pflanzen wurden vor der Glyphosatbehandlung gezählt. Ab Zeitpunkt der Samenbildung wurden alle zwei bis drei Tage Ähren mit reifen Samen parzellenweise geerntet. Der Erntezeitraum betrug insgesamt 12 Wochen. Die reifen Ähren wurden abgeschnitten und in perforierten Beuteln getrocknet. Anschließend wurden die Samen aus den Ähren entfernt und gezählt. Tabelle 1 zeigt den zeitlichen Ablauf der Feldarbeiten. Die gewonnenen Samen wurden für die Aussaat im Folgejahr genutzt. Dadurch entstanden mehrere Generationen: F0 ist die Elterngeneration, F1, F2, F3 sind die im Feldversuch gewonnenen Folge-Generationen. Alle vier Generationen wurden zum Schluss in einem Gewächshaus-Biotest untersucht (s. Biotests). Bis dahin wurden die Samen kühl und trocken gelagert.

Tab. 1 Erhebungs- und Behandlungstermine im Freilandversuch.

Tab. 1 Dates of assessments and treatments in the field experiment.

Aussaat	Bonitur	Behandlung	Erntebeginn	Ernteperiode
Mitte April bis Anfang Mai	4 Wochen nach Aussaat (1-4 Bestockungs- triebe)	4-6 Wochen nach Aussaat 2 Wochen nach der Bonitur	4 Wochen nach Behandlung	12 Wochen (August bis Oktober)

Biotests

Mit den *L. multiflorum*-Samen aller Generationen (F0-F3) wurde im Frühjahr 2017 mit Glyphos SUPREME® ein Gewächshaus-Biotest durchgeführt. Die Behandlung erfolgte mit acht Herbizid-

Aufwandmengen und einer unbehandelten Kontrolle, es wurden vier Wiederholungen für jede Aufwandmenge kultiviert. Die höchste Aufwandmenge war die zugelassene (100 % \pm 1080 g Glyphosat/ha). Die weiteren Behandlungsstufen entsprachen jeweils der halben Aufwandmenge der vorherigen. Die kleinste Herbizid-Dosis betrug somit 0,78 % der zugelassenen Aufwandmenge (\pm 8,4 g Glyphosat/ha).

Die Keimlinge wurden in Töpfen mit einem Volumen von 125 ml angezogen. Die Erde (50 % lokale landwirtschaftliche Erde, 25 % Blumentopferde, 25 % Kompost) wurde zuvor gedämpft. Es wurden jeweils 28 Samen pro Topf gesät. Die Keimlinge wurden vereinzelt, sodass zur Behandlung vier Wochen nach der Saat jeweils zehn Pflanzen pro Topf vorhanden waren.

Die Töpfe wurden von unten bewässert. Im Gewächshaus wurde ein Tag-Nacht-Zyklus von 14 h zu 10 h und Temperaturen von 20°C zu 16°C simuliert. Die Luftfeuchtigkeit betrug im Durchschnitt 78 %. Die Lichteinstrahlung war Sonnenlicht, bei einer Außenhelligkeit <6 klx wurde zusätzlich künstlich beleuchtet.

Die Keimlinge wurden im 2-3 Blattstadium mit einem Kabinen-Sprüher mit Glyphosat behandelt, der mit einem Druck von 210 kPa und einer Geschwindigkeit von 1 m/s das Herbizid mit 245 l/ha besprühte.

Die Ernte erfolgte zwei Wochen nach der Behandlung der Pflanzen. Dafür wurden alle Pflanzen oberhalb des Bodens abgeschnitten und das Frischgewicht pro Topf gewogen.

Statistische Auswertung

Die Versuche wurden mit der Software R statistisch ausgewertet. Die Pakete „agricolae“ (DE MENDIBURU, 2016) und „drc“ (RITZ and STREIBIG, 2012) wurden für die Feldversuchsauswertungen bzw. für die Biotest-Auswertungen genutzt.

Im Feldversuch wurden die im Feld erfassten Parameter Anzahl aufgelaufener Pflanzen/m² (vor der Glyphosat-Behandlung) und die Anzahl neu gebildeter Samen/m² (nach der Behandlung) ausgewertet. Auflauf und Samenbildung der *L. multiflorum*-Generationen (F0 bis F2), wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) untersucht.

Die Sensitivität der *L. multiflorum*-Generationen (F0 bis F3) wurde anhand von ED₅₀- und ED₉₀-Werten beurteilt. Für die Versuchsfaktoren und Generationen wurden dafür separate 4-parametrische Dosis-Wirkungs-Modelle aufgestellt. Um Varianzhomogenität zu erreichen, wurden die Daten gegebenenfalls Boxcox-transformiert. Das jeweils optimale Modell (log-logistik-Modell, Weibull1- oder Weibull2-Modell) wurde anhand des Akaike-Informationskriteriums (AIC) und des Standardfehlers der Residuen gewählt.

Ergebnisse

Im Feldversuch zeigten sich sowohl im Auflauf der Pflanzen wie auch in der Samenproduktion in der unbehandelten Variante jahresbedingte Unterschiede. In der Elterngeneration vor der Glyphosatbehandlung hatte sich ein mittlerer Pflanzenbestand von 284 Pflanzen pro Quadratmeter entwickelt. Nach der erstmaligen Glyphosatbehandlung im Jahr 2014 wurden mit steigender Glyphosatmenge zunehmend weniger Samen pro Quadratmeter geerntet, bei halber zugelassener Aufwandmenge 35mal weniger als in der Kontrolle (Abb. 1). Im Folgejahr (2015) war die Auflaufrate der F1-Samen umso geringer je höher die Glyphosat-Dosierung in der Elterngeneration war. Im Vergleich zur Kontrolle war die Auflaufrate bei halber Aufwandmenge um 87 % reduziert. Im dritten Versuchsjahr war die Auflaufrate in der Variante „50 % Aufwandmenge“ im Vergleich zu den anderen beiden Varianten geringer. Das Verhältnis zwischen der Anzahl Samen/m² in der Kontrolle und in den behandelten Varianten wurde im Verlauf des Versuchs geringer: Während es 2014 noch bei 3,2 (25 % Aufwandmenge) bzw. 35,0 (50 % Aufwandmenge) lag, sank das Verhältnis 2016 auf 2,7 bzw. 1,6.

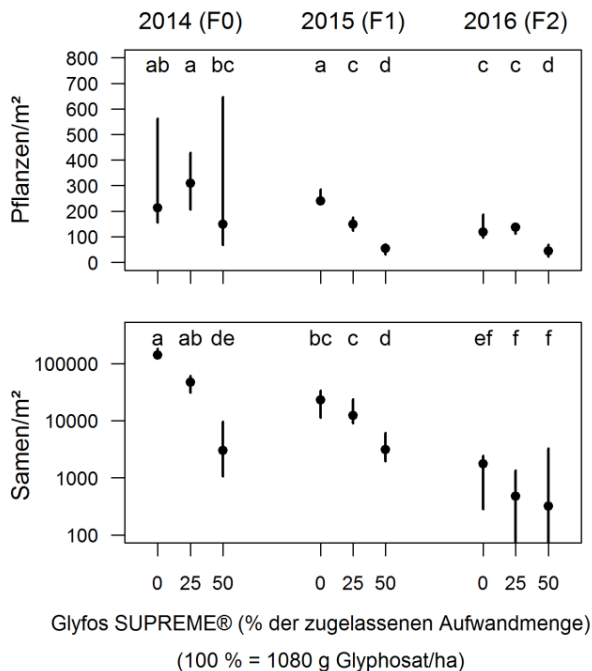


Abb. 1 Im Feld gemessene Pflanzendichte vor der Glyphosat-Behandlung (oben) und gebildete Samen nach Behandlung (unten) aufeinanderfolgender Generationen (F0, F1, F2). Median und Spannweite (n = 4). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test, $\alpha = 0,05$).

Fig. 1 In field plant densities before glyphosate treatment (top) and seeds after treatment (bottom). Median and range (n = 4). Different letters indicate significant differences (Kruskal-Wallis-Test, $\alpha = 0.05$).

Im Biotest reichten im Mittel über die Generationen F0-F3 63 g Glyphosat/ha, d.h. 6 % der zugelassenen Aufwandmenge, um die Frischmasse von Pflanzen, deren Vorfahren nicht mit Glyphosat behandelt worden waren, um 50 % zu reduzieren. Mit 157 g Glyphosat/ha (15 % der zugelassenen Aufwandmenge) wurde die Frischmasse um 90 % gesenkt. In der F1-Generation zeigten die Pflanzen der 25 %-Variante im Vergleich zu den Pflanzen der 0 %-Variante derselben Generation einen höheren ED₅₀-Wert (Tab. 2). Diese Tendenz setzte sich in den folgenden Generationen fort. Bei den ED₉₀-Werten war dieselbe Tendenz erhöhter Werte in den behandelten Varianten ab der zweiten Generation (F2 und F3) vorhanden (Tab. 2). Statistisch konnten die Unterschiede nicht abgesichert werden ($\alpha = 0,05$).

Tab. 2 Effektive Dosis ED₅₀ und ED₉₀ (Standardfehler) in g Glyphosat/ha.

Tab. 2 Effective doses ED₅₀ and ED₉₀ values of treated and untreated progeny (standard error) in g glyphosate/ha.

Kennzahl	Variante	F0	F1	F2	F3
ED ₅₀	unbehandelt	57 (18,5)	69 (26,7)	74 (6,9)	53 (8,9)
	25 % Aufwandmenge		90 (14,0)	123 (22,5)	98 (11,4)
	50 % Aufwandmenge		85 (8,9)	53 (11,9)	65 (11,6)
ED ₉₀	unbehandelt	168 (31,9)	176 (32,6)	141 (20,0)	144 (33,3)
	25 % Aufwandmenge		164 (17,5)	193 (23,0)	170 (39,5)
	50 % Aufwandmenge		128 (9,9)	148 (47,2)	163 (19,3)

Diskussion

Ziel der Feldversuche war es, die Entwicklung der Glyphosat-Sensitivität einer *L. multiflorum* Population nach wiederholten subletalen Behandlungen mit Glyphosat nachzuzeichnen. Die *Lolium*-Pflanzen reagierten im ersten Versuchsjahr sensitiv auf den Glyphosateinsatz mit den reduzierten Aufwandmengen, erkennbar am starken Rückgang der Samenbildung pro Quadratmeter. Jedoch überlebten in allen Glyphosat-behandelten Parzellen nicht nur einige Pflanzen, sondern diese konnten sich sogar erfolgreich reproduzieren: In allen Parzellen wurden mehr Samen gebildet als durch Keimung dem Bodensamenvorrat verloren gingen. Das bedeutet, dass sogar bei Glyphosateinsatz mit halber zugelassener Aufwandmenge die Population wachsen würde, wenn nicht andere Verluste hinzukämen, wie z.B. Samenalterung, Prädation oder andere Managementmaßnahmen. Aus populationsdynamischer Sicht heißt das zunächst einmal, dass es ein Potential zur Selektion gibt.

Eine entscheidende Erkenntnis dieses Versuchs, sichtbar besonders in der F1-Generation, ist die sinkende Auflaufrate von Samen, deren Mutterpflanzen im Vorjahr mit Glyphosat behandelt wurden. Ein indirekter Einfluss des Glyphosats ist möglich: Durch die Behandlung erfahren überlebende Pflanzen eine Schädigung, die sich in einer Entwicklungsverzögerung auswirkt. Reifende Samen von behandelten Pflanzen erfahren also eine deutlich andere Witterungs-Umwelt als unbehandelte. Das kann zu einem höheren Anteil leichter Samen mit geringen Nährstoffreserven oder auch nicht vollständig ausgereifter Samen in der Ähre führen, bei denen die Keimfähigkeit verringert sein kann. Unterschiedliche Witterung bei der Abreife könnte auch unterschiedliche Dormanz induziert haben. Fitness-Verluste wie auch Dormanz können im nächsten Jahr zu verringertem Auflauf führen. Befanden sich die Pflanzen zum Zeitpunkt der Behandlung bereits in einem späteren Bestockungsstadium, so waren Ähren schon angelegt. Spekuliert werden kann deshalb auch, dass es überlebende Ährenanlagen mit geschädigtem Meristem gab, aus dem Samen geringerer Vitalität erwachsen. Für *Lolium perenne* zeigten YANNICARI et al. (2016), dass Glyphosat-Resistenz mit Fitness-Verlusten einherging. Auch wenn bei den hier untersuchten Populationen keine Resistenz vorlag, sollte bei Sensitivitätsverlusten gegenüber Glyphosat die Fitnesskosten für die Pflanzen mit bedacht werden.

Ein Sensitivitätsverlust wird im Biotest anhand des ED₅₀-Wertes in der 25 %-Variante im Vergleich zur Kontrolle bereits nach der ersten Selektion und dann in jeder weiteren Generation sichtbar. Ähnliche Ergebnisse fanden BUSI et al. (2009) für den selektierenden Einfluss von Glyphosat auf *Lolium rigidum*. Überraschenderweise ist für Samen der 50 %-Variante, für die der höhere Selektionsdruck erwartet würde, keine erhöhte Toleranz für Glyphosat zu sehen. Ein Erklärungsansatz liegt in der obligaten Fremdbefruchtung von *L. multiflorum*: Da sehr wenige Pflanzen die halbe Aufwandmenge überlebten, ist eine Befruchtung mit Pollen aus anderen Parzellen wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu gab es in 25 %-Parzellen und erst recht in 0 %-Parzellen genug Pflanzen in unmittelbarer Nachbarschaft, die als Pollenspender dienen konnten. So nahm der ED₅₀-Wert für die Nachkommen unbehandelter Pflanzen bis zur dritten Generation nicht zu. Im Feldversuch ist der über die Selektionszyklen kleiner werdende Unterschied in der Samenproduktion zwischen unbehandelten und behandelten Parzellen ein Ausdruck des Sensitivitätsverlustes. Im Feld ist dieser Effekt jedoch nicht zu trennen von dem gleichsinnig wirkenden Effekt geringerer Auflaufraten von Samen Glyphosat-behandelter Pflanzen. Zudem könnte ein gegenläufig wirkender Effekt höherer Konkurrenz bei unbehandelten Pflanzen vorhanden gewesen sein.

Resistenzentwicklung von Unkrautpopulationen gegenüber Herbiziden beginnt stets mit einem Sensitivitätsverlust. Feldversuch und Biotest haben gezeigt, dass eine Selektion weniger Glyphosat-sensitiver *Lolium multiflorum* Pflanzen mit reduzierten Aufwandmengen im Feld innerhalb einer Generation möglich ist. Ob sich daraus resistente Populationen aufbauen, wird darüber hinaus von jahreszeitlichen Verschiebungen in der Ontogenese und von Fitness-Effekten bestimmt sein.

Dank

Die Daten wurden im Projekt „Best Management Praktiken und Nachhaltige Anwendung von Glyphosatprodukten“ vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und gefördert. Unser Dank gilt zahlreichen helfenden Händen: Ingolf Gliege, Rosa Minderlen, Julia Prüter, Malte Ritter, Jenny Scheel, Fabian Venohr.

Literatur

- BAYLIS, A.D., 2000: Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* **56**, 299–308.
- BUSI, R. und S.B. POWLES, 2009: Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity* **103**, 318–325.
- DE MENDIBURU, F., 2017: agricolae: Statistical procedures for agricultural research. R package version 1.2-8. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- DÖRTER, K., 1977: Süßgräser, Riedgras- und Binsengewächse, Urania-Verlag Leipzig Jena Berlin, Seite 107.
- GIANESSI, L.P., 2013: The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Management Science* **69**, 1099–1105.
- HAYMAN, D.L., 1992: The S-Z incompatibility system. In: Chapman G.P. (Hrsg.): Grass evolution and domestication. Chapter 3: 117–137.
- HEAP, I., 2014: Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Management Science* **70**, 1306–1315.
- LFL - BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2017. Einjähriges Weidelgras – *Lolium multiflorum*, <http://www.lfl.bayern.de/ipz/gruenland/022441/>, Aufgerufen am 01.10.2017.
- RITZ, C., F. BATY, J.C. STREIBIG and D. GERHARD, 2015: Dose-response analysis using R. *PLOS ONE* **10**, e0146021.
- YANNICARI, M., M. VILA-AIUB, C. ISTILART, H. ACCIARESÌ und A.M. CASTRO, 2016: Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is associated with a fitness penalty. *Weed Science* **64**, 71–79.