

29. Deutsche Arbeitsbesprechung über Fragen der Unkrautbiologie und -bekämpfung, 3. – 5. März 2020 in Braunschweig

Sektion 9: Resistenzanalyse

Session 9: Resistance analysis

Methoden zur Untersuchung der Allelfrequenzen und-Verteilung im Acetolactat-Synthase (ALS)-Gen bei Target-Site-Resistenzen in *Echinochloa crus-galli*

Methods for investigating allele frequencies and distribution in the acetolactate-synthase (ALS) gene in target-site-resistant *Echinochloa crus-galli*

Fabian Runge^{1*}, Sven Keil¹, Anja Löbmann², Jan Petersen², Frank Brändle¹

¹IDENTXX GmbH, Maybachstr. 50, 70469 Stuttgart

²Technische Hochschule Bingen, Berlinstr. 109, 55411 Bingen

*Korrespondierender Autor, Fabian.Runge@identxx.com

DOI 10.5073/jka.2020.464.072



Zusammenfassung

Hühnerhirse (*Echinochloa crus-galli*) gewinnt als Ungras im Maisanbau zunehmend an Bedeutung. Einseitiger Einsatz von ALS-Inhibitoren erzeugt einen Selektionsdruck, der zu vermehrtem Auftreten von Resistenzen führt. Häufig handelt es sich um Target-Site-Resistenzen (TSR) mit Punktmutationen an den Positionen Ala-122, Pro-197 oder Trp-574 des ALS-Gens. Dieses liegt in der hexaploiden Hühnerhirse in drei homologen Varianten vor. Gängige PCR-Verfahren ermöglichen nur eine gemeinsame Analyse aller Genvarianten, wodurch ein großer Teil des Informationsgehalts verloren geht. Für eine fundierte Aussage müssen die Genvarianten getrennt analysiert werden. Ein methodischer Ansatz war die allel-spezifische PCR. Hierfür wurden DNA-Polymorphismen zwischen den drei ALS-Genvarianten genutzt, um diese separat bei Position 574 hochspezifisch zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die schwierige Struktur und geringe Polymorphismen verhinderten den Einsatz der allel-spezifischen PCR an den Positionen 122 und 197. Hier wurden die drei Genvarianten gemeinsam amplifiziert und anschließend in einem mehrstufigen Ansatz mit Restriktionsenzymen spezifisch verdaut. Nach Separation, Aufreinigung und Reamplifikation der Fragmente wurden die einzelnen Genvarianten durch Pyrosequenzierung analysiert. So konnten an Position Ala-122 in allen ALS-Homologen heterozygote Mutationen nachgewiesen werden, bei Pro-197 und Trp-574 dagegen heterozygote bzw. homozygote Mutationen nur bei ALS3. Durch die Etablierung dieser Methoden können nun Resistenzmuster in Populationen von *Echinochloa crus-galli* detaillierter untersucht und wichtige Daten zu deren Ausbreitungsdynamik gewonnen werden.

Stichwörter: Acetolactat-Synthase, allelspezifische PCR, hexaploid, Hühnerhirse, Restriktionsverdau, Target-Site-Resistenz

Abstract

Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) is an important weed in maize. Rising selection pressure due to intensive use of ALS-inhibitors leads to an increase of resistances, of which target site resistances at positions Ala-122, Pro-197 and Trp-574 of ALS gene are a common result. Three homologous variants of this gene are present within the hexaploid barnyardgrass. Standard PCR cannot differentiate between variants, giving a rough overview of mutations, but not the exact location. For well-founded evaluation, the variants must be analyzed separately. One way to do so is allele-specific PCR. Using DNA polymorphisms differing the variants from each other, specific amplification was performed at position 574. Insufficient polymorphisms at positions 122 and 197 called for another approach. A large fragment including all three variants was created and subsequently digested repeatedly to get specific segments for each variant. Segments were separated, cleaned, re-amplified and finally analyzed by pyrosequencing. Thus, it was possible to find heterozygous mutations at position Ala-122 for all ALS homologues. For Pro-197 and Trp-574 mutations (heterozygous as well as homozygous) were found only in variant ALS3. By establishment of the described methods resistance patterns within populations of *Echinochloa crus-galli* can be reviewed more closely, giving better insight to dynamics of spreading.

Keywords: Acetolactate-synthase, allele-specific PCR, barnyardgrass, hexaploid, restriction enzyme, target-site resistance

Einleitung

In den letzten 15 Jahren hat der Maisanbau in Deutschland stark zugenommen. Das bedeutendste Ungras im Maisanbau ist die Gemeine Hühnerhirse (*Echinochloa crus-galli*), eine überwiegend selbst-bestäubende Sommerannuelle, die gut an organische Böden angepasst ist. Dies und ihr C4-Stoffwechsel tragen dazu bei, dass sie als erfolgreicher Konkurrent zu den problematischsten Ungräsern im Maisanbau gehört. Hauptsächlich wird die Hühnerhirse mit ALS-Hemmern bekämpft. Die Acetolactat-Synthase (ALS) ist das erste Enzym im Syntheseweg bei der Bildung der verzweigten essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin (DUGGLEBY et al., 2008). Wird dieser Syntheseweg blockiert, stirbt die Pflanze. Seit den frühen 1980iger Jahren werden ALS-Hemmer aufgrund ihres breiten Wirkspektrums intensiv genutzt. Diese scheinen jedoch auch am anfälligsten für Resistenzselektion zu sein. Dies hat weltweit zur Evolution vieler resistenter Unkrautpopulationen geführt. Inzwischen haben sich ALS-Hemmer-resistente Biotypen in 162 Unkrautarten entwickelt (HEAP, 2019). In vielen Fällen ist die Resistenz Zielort-basiert (Target-Site-Resistenz, TSR), beruhend auf einer Aminosäuresubstitution in einer konservierten Region des ALS-Hemmer Ziel-Enzyms. Diese Substitution ist die Folge einer Punktmutation im ALS-Gen. In den letzten drei Jahrzehnten wurden 29 Resistenz verursachende Aminosäuresubstitutionen an acht Positionen des ALS-Gens in 64 Unkrautarten nachgewiesen (TRANEL et al., 2019). Bei der Hühnerhirse wurden seit dem Jahr 2000 Resistenzen gegenüber ALS-Hemmern in einigen europäischen Ländern registriert. 2012 wurde der erste Fall einer ALS-Hemmer-toleranten Hühnerhirse in Deutschland gemeldet (HEAP, 2019). Mutationen die Target-Site-Resistenzen bei *E. crus-galli* vermitteln, konnten an den Aminosäurepositionen (als Referenz der Nummerierung gilt die Acetolactat-Synthase von *Arabidopsis thaliana*) Ala-122 und Trp-574 (RIAR et al., 2013) sowie Position Pro-197 (DÉLYE et al., 2015a) identifiziert werden. Resistenzen gegen verschiedene ALS-Hemmer können mit der Position der Mutation bei TSR variieren (YU und POWLES, 2014). Aber auch die Art der Mutation und der Zygotie-Level der Mutation wirkt sich unterschiedlich auf die Resistenz aus (MATZENBACHER et al., 2014).

Die genetische Basis der Resistenz einer Spezies gegenüber einem Herbizid zu verstehen, ist essentiell für die Entwicklung diagnostischer Marker, für das Verständnis der Konsequenzen der Mutation auf die Fitness der resistenten Pflanzen und generell für das Verständnis, wie Herbizidresistenz-Evolution funktioniert. (MARTIN et al., 2019)

Um ein angepasstes Unkraut-Management betreiben zu können, ist es somit unabdingbar zu wissen, welche Art der Resistenz vorliegt und wie die Dynamik der Resistenzausbreitung ist. Hierzu sind Monitoring-Programme nützlich, die größere Stichprobenmengen routinemäßig erfassen. Bei diploiden Spezies ist dies relativ einfach mit klassischen molekulargenetischen Methoden zu bewerkstelligen. Polyploide Spezies hingegen können verschiedene Genkopien und/oder verschiedene Allele eines Gens beherbergen, die verschiedene Nukleotidsequenzen besitzen. Daher sind vergleichbare Analysen komplexer und kostenintensiver. Es wird geschätzt, dass 30 % - 70 % der Pflanzenarten polyploiden Ursprungs sind (MASTERTSON, 1994; YU et al., 2013). Aber erst im letzten Jahrzehnt hat Target-Site-Resistenz im ALS-Gen in polyploiden Arten an Beachtung gewonnen (SCARABEL et al., 2010; YU et al., 2013; IWAKAMI et al., 2015; DÉLYE et al., 2016). *Echinochloa crus-galli* ist ein hexaploider Organismus, der aus einer Hybridisierung der tetraploiden *Echinochloa oryzicola* mit einem unbekanntem diploiden *Echinochloa*-Vorfahren hervorgegangen ist (GUO et al., 2017). Allopolyploidie hat dazu geführt, dass die Hühnerhirse nun drei Genome besitzt, mit insgesamt 6 Allelen, was 2014 mittels Next Generation Sequencing (NGS) bestätigt werden konnte (DÉLYE et al., 2015a).

Ist die Kenntnis der exakten Sequenz eines individuellen Gens oder Allels von Interesse, dann ist es notwendig, die Genvarianten getrennt voneinander zu betrachten. Dies erreicht man im einfachsten Fall mit Allel-spezifischer PCR. In Fällen wo dies nicht möglich ist, wie im vorliegenden Fall bei Teilen des ALS-Gens der Hühnerhirse, müssen komplexere Methoden angewandt werden. Neben NGS können die individuellen Genvarianten auch durch Klonierung separiert und

anschließend sequenziert werden (DÉLYE et al., 2015b). Beide Methoden sind aber bei großen Probenumfängen nur schwer durchführbar und kaum erschwinglich.

Ziel dieser Studie war es daher, eine zeit- und kosteneffiziente Methode zu entwickeln, mit der im Hochdurchsatz auch für breit angelegte Studien eine Analyse von Gen-Einzelvarianten realisierbar ist.

Material und Methoden

Herkunft der untersuchten Pflanzen

2016 bis 2018 wurden im Gewächshaus der TH Bingen Spritzmittelversuche an *Echinochloa crus-galli* Biotypen aus Deutschland und Österreich mit ALS-Hemmern durchgeführt. Bei zehn Biotypen überlebten einige Individuen die Behandlung. Von diesen wurde jeweils ein Blatt entnommen, luftgetrocknet, und zur molekulargenetischen Analyse in die Labore der IDENTXX GmbH gesandt.

DNA-Extraktion, PCR und TSR-Analyse

Pro Blattprobe wurden 0,5 cm² Blattmaterial in je ein Probenröhrchen (Collection microtubes; Qiagen, Hilden) mit zwei Stahlkugeln (Umarex; 4,5 mm) überführt. Anschließend wurden die Proben in einer Schüttelmühle (TissueLysor II; Qiagen, Hilden) homogenisiert. Die DNA-Extraktion erfolgte im KingFisher™ Flex Extraktionsroboter (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) unter Verwendung des Chemagic Plant 400 Kits (Perkin Elmer, Rodgau) nach Herstellerangaben (modifiziert von IDENTXX).

Für eine erste Analyse des ALS-Gens (alle Genvarianten gemeinsam) an den Positionen Ala-122, Pro-197 und Trp-574 wurden die Zielregionen durch Endpunkt-PCR vervielfältigt. Die Amplifikation der Ziel-Produkte erfolgte mittels eines Taq-Polymerase-Kits (MangoTaq; Bioline, Luckenwalde) und spezifischen Primern (von IDENTXX entwickelt, Primersequenzen nicht öffentlich zugänglich) in einem Flex Cycler (Analytic Jena, Jena). Die erfolgreiche Amplifikation wurde per Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel mittels entsprechender Fotodokumentation überprüft.

Die PCR-Produkte wurden auf SNPs (single nucleotide polymorphism) an den Zielpositionen mittels Pyrosequenzierung untersucht. Hierzu wurden ein PyroMark Q24 Sequenziergerät, entsprechende PyroMark Q24 gold Reagenzien (Qiagen, Hilden), sowie spezifische Sequenzierprimer (von IDENTXX entwickelt, Primersequenzen nicht öffentlich zugänglich) verwendet. Zur Auswertung der Sequenzierergebnisse wurde die PyroMark Q24-Software (v. 2.0.7) verwendet.

Im weiteren Verlauf wurden Proben, bei denen mindestens eine Mutation über alle Genvarianten hinweg nachgewiesen wurde, für eine individuelle Analyse der einzelnen Genvarianten an der polymorphen Position herangezogen. Als Referenzen für die einzelnen Genvarianten dienten die GenBank-Einträge LC006058.1 (ALS1), LC006059.1 (ALS2) und LC006061.1 (ALS3) aus IWAKAMI et al. (2015).

Allel-spezifische PCR und Sanger-Sequenzierung

Aufgrund zahlreicher DNA-Polymorphismen zwischen den drei ALS-Genvarianten in der umgebenden Nukleotidsequenz der Position Trp-574 wurde hier ein Ansatz der Allel-spezifischen PCR gewählt. Je Genvariante wurde ein spezifisches Primerpaar entwickelt. Die reverse-Primer zu den einzelnen Genvarianten wurden so konstruiert, dass die endständige 3'-Base des jeweiligen Primers nur komplementär zu je einer Genvariante war. Zu den anderen beiden Varianten hatte der Primer ein Mismatch. Die Amplifikation der Ziel-Produkte erfolgte mit der SNP Pol DNA-Polymerase (Genaxxon, Ulm), die bei einer Fehlpaarung am 3'-Ende des Primers nicht amplifiziert. Somit wird je Ansatz nur eine einzige Genvariante vervielfältigt (Abb. 1).

Die erfolgreiche Amplifikation wurde durch Gelelektrophorese überprüft und die PCR-Produkte anschließend von einem kommerziellen Sequenzier-Dienstleister (SeqLab, Göttingen) mittels der Sanger-Dideoxy-Methode sequenziert. Die Analyse der Sequenzierergebnisse erfolgte mittels Geneious-Software (v. 9.1.8). Dabei konnten individuell vorhandene (diagnostische) Basen in den

Nukleotidsequenzen der einzelnen Genvarianten als Kontrolle für die hochspezifische Amplifikation verwendet werden.

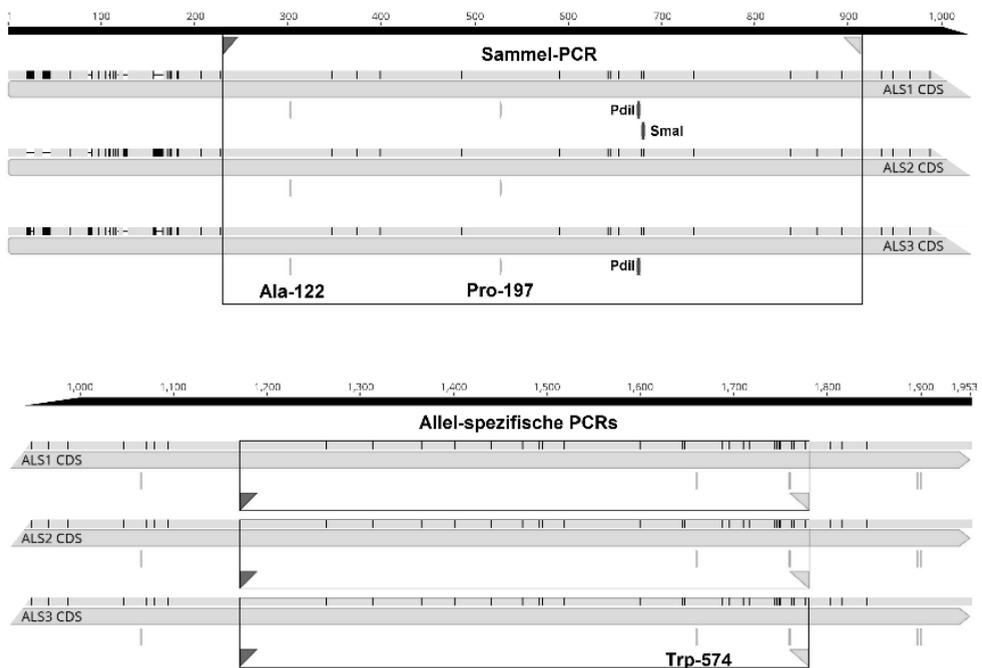


Abb. 1 Schematische Darstellung der drei Genvarianten des ALS-Gens von *E. crus-galli* aus Genious (v. 9.1.8). Hervorgehoben sind die TSR vermittelnden Positionen Ala-122, Pro-197 und Trp-574, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *PdiI* und *SmaI*, sowie die Genabschnitte, die entweder in einer Sammel-PCR (oben) oder in Allel-spezifischen PCRs (unten) amplifiziert wurden.

Fig. 1 Graphical scheme of the three ALS-gene variants of *E. crus-galli* obtained from Genious (v. 9.1.8). The TSR-mediating positions Ala-122, Pro-197 and Trp-574, the restriction enzyme sites *PdiI* and *SmaI*, and the gene segments amplified either in the pooled PCR (top) or in allele-specific PCRs (bottom) are highlighted.

PCR der 122/197-Genregion, stufenweiser Restriktionsverdau, Reamplifikation und TSR-Analyse

Aufgrund fehlender Polymorphismen in der Genregion um die Positionen Ala-122 und Pro-197 und einer allgemeinen Schwierigkeit der Amplifikation des ALS-Gens in diesem Bereich, die vermutlich durch den hohen GC-Gehalt und damit verbundenen Sekundärstrukturen am 5'-Ende des Gens bedingt ist, war ein Allel-spezifischer PCR-Ansatz hier nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde zuerst ein größeres, alle drei Genvarianten umfassendes, Fragment amplifiziert, in dessen Mittelsequenz sich zwei Restriktionsschnittstellen befinden. Eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *SmaI* findet sich in der ALS1-Variante, eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *PdiI* in der ALS1- und ALS3-Variante (Abb. 1). Somit ergeben sich nach einem Verdau für jede Genvariante Fragmente unterschiedlicher Größe.

Die Amplifikation des Gesamtfragmentes erfolgte mit dem RedTaq-Mastermix (Genaxxon, Ulm). Anschließend wurde das Amplikon mit dem *SmaI*-FastDigest-Restriktionsenzym (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben für PCR-Produkte verdaut. Um den vollständigen Verdau der ALS1-Genvariante zu gewährleisten wurde die Inkubationszeit auf 15 min erhöht. Nach der Inkubation wurde das Enzym durch 5 min bei 65°C inaktiviert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz durch Gelelektrophorese auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die beiden Fragmente ALS1 und ALS2/3 wurden aus dem Gel geschnitten und separat in Probenröhrchen (Collection microtubes; Qiagen, Hilden) überführt. Nach Zugabe von 200µl Lyse-Puffer des GeneJET

Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und 20 min Inkubation bei 50°C wurde die DNA im KingFisher™ Flex Extraktionsroboter unter Verwendung des Chemagic Plant 400 Kits extrahiert. Die ALS2/3-Fragmente wurden mit dem *PdiI*-Restriktionsenzym (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) erneut nach Herstellerangaben verdaut. Dabei wurde jedoch auf die Zugabe von Nuklease-freiem Wasser verzichtet und stattdessen das Volumen des PCR-Ansatzes (hier der DNA-Lösung) entsprechend erhöht. Die Inkubationszeit betrug 16 Stunden. Am Ende wurde das Enzym für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Wiederum wurde der gesamte Ansatz über ein Agarosegel aufgetrennt, die spezifischen Fragmente für ALS2 und ALS3 aus dem Gel geschnitten und die DNA wie oben beschrieben aus dem Gel extrahiert.

Die separierten DNA-Lösungen der einzelnen Genvarianten wurden anschließend einer Reamplifikation mit den spezifischen Primern der Voranalyse unterzogen und die Positionen Ala-122 bzw. Pro-197 mittels Pyrosequenzierung analysiert.

Ergebnisse

Variantenübergreifende Voruntersuchung auf vorhandene SNPs

Die initiale Untersuchung der gesammelten ALS-Varianten in der Pyrosequenzierung zeigte in allen untersuchten Biotypen Mutationen an jeweils einer der drei bekannten resistenzvermittelnden Positionen (Tab. 1). Jedoch waren in keiner Probe zwei oder drei Positionen gleichzeitig mutiert.

Tab. 1 Anteil und Verteilung mutierter Resistenz vermittelnder Positionen in Allelen des ALS-Gens bei *Echinochloa crus-galli*. WT – Wildtypisch.

Tab. 1 Proportion and distribution of mutant resistance-mediating positions in alleles of the ALS gene in *Echinochloa crus-galli*. WT – wild type.

Unspezifisches Analyseergebnis über alle 3 Genvarianten		Näher aufgeschlüsselt durch	Variantenspezifisches Analyseergebnis		
			ALS1	ALS2	ALS3
Position Trp-574 TGG	Mutationsrate 33 % (Trp zu Leu)	Allel-spezifische PCR und Sanger-Sequenzierung	100 % homozygot WT TGG (Trp)	100 % homozygot WT TGG (Trp)	100 % homozygot mutiert TTG (Trp zu Leu)
Position Pro-197 CCC	Mutationsrate 12-18 % (Pro zu Thr)	Restriktionsverdau und Pyrosequenzierung	100 % homozygot WT CCC (Pro)	100 % homozygot WT CCC (Pro)	100 % heterozygot mutiert ACC (Pro zu Thr)
Position Ala-122 GCC	Mutationsrate 50 % (Ala zu Asn & Ala zu Asp)	Restriktionsverdau und Pyrosequenzierung	100 % heterozygot mutiert GAC (Ala zu Asn)	100 % heterozygot mutiert AAC (Ala zu Asp)	100 % heterozygot mutiert GAC (Ala zu Asn)

Die Pyrosequenzierungen der Position Trp-574 zeigten im Falle einer Mutation (Trp zu Leu) einen Anteil von 33 % mutierten Allelen (WT zu mutiert 2:1). An der Position Pro-197 ergaben sich in der Mutationsindikation stets Werte von 12-18 % für den Mutantenanteil (Pro zu Thr). Die Position Ala-122 zeigte in der initialen Pyrosequenzierung bei auftretenden Mutationen einen Mutationsanteil von ca. 50 %.

Allel-spezifische PCR der Position Trp-574

Die Nukleotidsequenzen der Sanger-Sequenzierung aus dem Allel-spezifischen PCR-Ansatz zeigten durch die diagnostischen Basen eine eindeutige Zuordnung zu den verschiedenen Genvarianten. An der Position Trp-574 wiesen die ALS1- und ALS2-Varianten aller Proben das wildtypische Basentriplett TGG auf. Im Gegensatz dazu zeigten alle Proben in der ALS3-Variante das Basentriplett

TTG in homozygoter Ausprägung, welches zu einer Substitution in der Aminosäuresequenz von Tryptophan zu Leucin führt (Abb. 2).

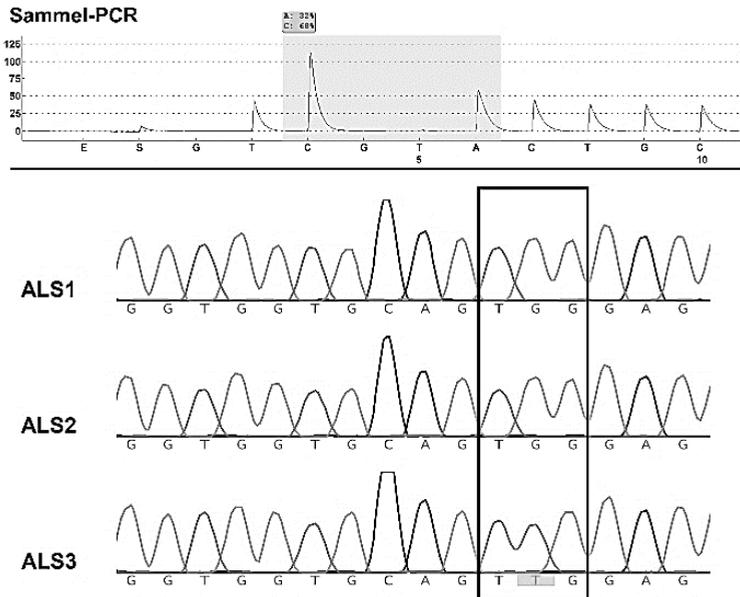


Abb. 2 In der Voruntersuchung mittels Pyrosequenzierung ermittelte Mutation an Position 574 von TGG (Trp) zu TTG (Leu) im Verhältnis 2:1 (revers-komplementär: CCA zu CAA) zeigten nach Allel-spezifischer PCR in der Sanger-Sequenzierung den TGG-Wildtyp in ALS1 und ALS2 und die TTG-Mutante in ALS3, jeweils homozygot.

Fig. 2 Mutations of TGG (Trp) to TTG (Leu) at position 574 in a 2:1-ratio (pyrosequencing was performed reverse-complementary: CCA to CAA) determined by pyrosequencing in the preliminary analyses revealed the wild-type TGG in ALS1 and ALS2 following allele-specific PCR in Sanger-sequencing and the TTG mutant in ALS3, each homozygous.

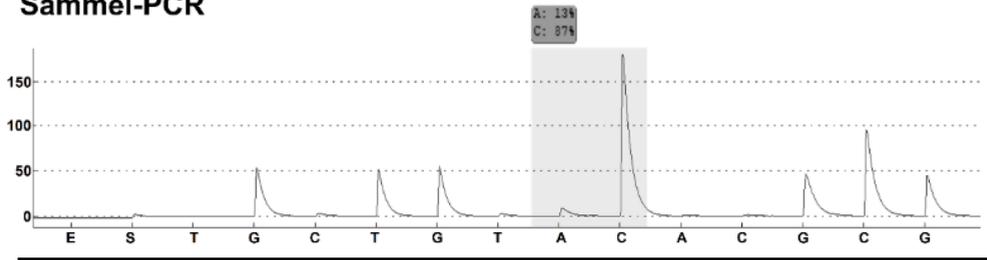
Restriktionsverdau, Reamplifikation und Pyrosequenzierung der Positionen Ala-122 und Pro-197

Durch PCR mit einem nahe der Position Ala-122 bindenden forward-Primer und einem in der hochkonservierten und leicht zugänglichen ALS-Gen-Mittelregion bindenden reverse-Primer konnten Allel-übergreifende Amplifikate der 122-197-Region erzielt werden. Nach Verdau mit dem *Sma*I Fast Digest-Restriktionsenzym wurden die entstandenen Fragmente im Agarosegel der Größe entsprechend aufgetrennt. Dabei konnten die Fragmente der ungeschnittenen ALS2/3-Varianten (660bp) und der geschnittenen ALS1-Variante (420bp-Zielsequenz und 240bp-Rest) getrennt und nachgewiesen werden. Anschließend wurden die Fragmente aus dem Gel extrahiert und die ALS2/3-Gesamtvarianten mit dem *Pdi*I-Restriktionsenzym verdaut. Nach diesem zweiten Verdau konnten auch die Fragmente für die ungeschnittene ALS2-Variante (660bp) und die geschnittene ALS3-Variante (420bp-Zielsequenz und 240bp-Rest) im Agarosegel getrennt werden. Die folgende Reamplifikation der drei aus dem Gel extrahierten Einzelvarianten ergab Amplifikate in den erwarteten Größen. Die Pyrosequenzierung der einzelnen Genvarianten ergab für die Position Pro-197, dass die Varianten ALS1 und ALS2 wildtypisch (CCC – Prolin) waren. Die Variante ALS3 wies jedoch eine Mutation des Basentriplets von CCC zu ACC in heterozygoter Ausprägung auf, was in einem Allel zu einer Substitution in der Aminosäuresequenz von Prolin zu Threonin führt (Abb. 3).

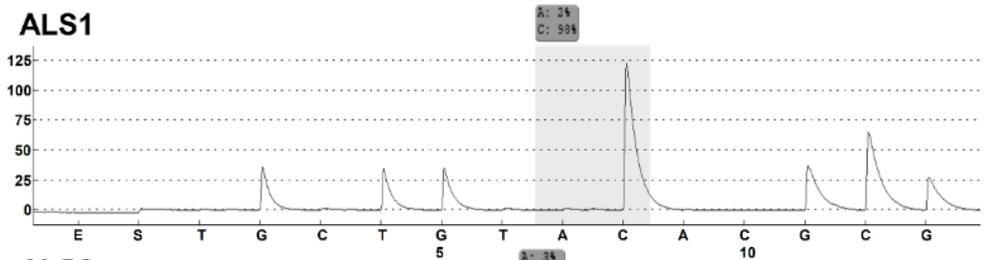
Für Position Ala-122 wiesen die Pyrosequenzierungen in allen drei Genvarianten heterozygot auftretende Mutationen nach. In ALS1 und ALS 3 vom wildtypischen GCC zu GAC, was einer Aminosäureänderung von Alanin zu Asparagin entspricht. Im Gegensatz hierzu war in ALS2 eine

Änderung zu Aspartam nachweisbar (GCC zu AAC; Pyrogramme aufgrund ihrer hohen Komplexität nicht gezeigt).

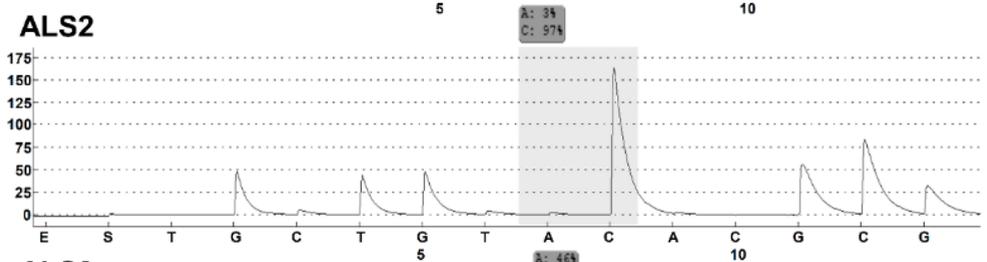
Sammel-PCR



ALS1



ALS2



ALS3

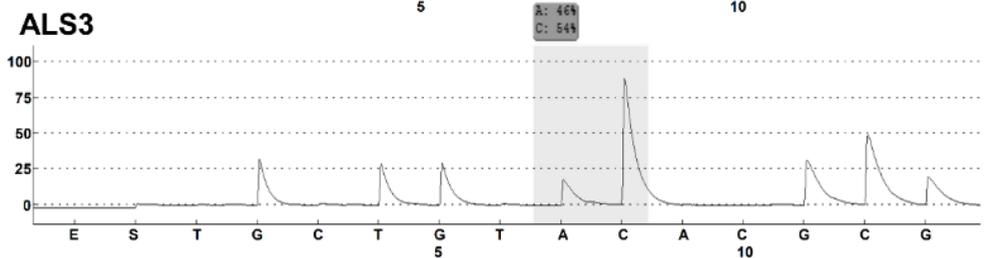


Abb. 3 Die in der Voruntersuchung mittels Pyrosequenzierung ermittelte Mutation an Position 197 von CCC (Pro) zu ACC (Thr) im Verhältnis 5:1 zeigte nach Sammel-PCR, Restriktionsverdau und Reamplifikation in der Genvarianten-spezifischen Pyrosequenzierung den CCC-Wildtyp in ALS1 und ALS2 (homozygot) und ein mutiertes Allel hin zu ACC (Thr) in ALS3, also in heterozygoter Ausprägung.

Fig. 3 The mutation of CCC (Pro) to ACC (Thr) at position 197 in the ratio 5:1 determined in the preliminary investigation by means of pyrosequencing showed the CCC wild type in ALS1 and ALS2 (homozygous) and after collective PCR, restriction digestion and reamplification in gene-variant-specific pyrosequencing a mutated allele to ACC (Thr) in ALS3, i.e. heterozygous expression.

Diskussion

Bei polyploiden Arten wie der Hühnerhirse können mehrere Genvarianten vorliegen und auch exprimiert werden. Sämtliche exprimierten Varianten können Resistenz vermitteln, wobei die Stärke der Resistenz vom Anteil der mutierten Allele abhängig sein kann (Yu et al., 2013). Bei Hexaploidie stoßen die gängigen Nachweismethoden an ihre Grenzen. Wie auch von DÉLYE et al. (2015) diskutiert, ergibt erst eine getrennte Analyse der Varianten ein exaktes Bild über Anzahl und Verteilung der Mutationen.

Die Allel-spezifische PCR erwies sich für die Position 574 als geeignet, da dieser Bereich strukturell leicht zugänglich ist, und genügend Polymorphismen vorhanden sind, die einerseits die Allel-spezifische PCR ermöglichen und andererseits diagnostische Basen für eine Unterscheidung der Genvarianten umfassen. Die Produkte der Allel-spezifischen PCR lassen sich direkt Sequenzieren, was eine schnelle und kostengünstige Analyse ermöglicht.

Im Gegensatz dazu erschwert die schwierige Struktur am 5'-Ende des ALS-Gens, das die Positionen 122 und 197 umfasst, die Amplifikation größerer Fragmente (vgl. auch PANOZZO et al., 2013, DÉLYE et al., 2015a). Kleine Fragmente für die Pyrosequenzierung lassen sich leichter amplifizieren, jedoch fehlt es dann an Polymorphismen, die eine Allel-spezifische PCR ermöglichen. Eine andere Möglichkeit, die ALS-Varianten hier separat zu analysieren wäre die Klonierung. Jedoch müsste auch hierfür zuerst ein Amplikon von entsprechender Länge gewonnen werden, das diagnostische Basen enthält. Die anschließende Klonierung wäre noch immer verhältnismäßig teuer, zumal nicht nur die Klonierung einen relativ hohen Kostenfaktor darstellt, sondern zur sicheren Auswertung auch eine entsprechende Anzahl an Kolonien sequenziert werden müsste. Außerdem ist für die Klonierung zusätzliches Equipment und bei größeren Probenumfängen ausreichend Platz erforderlich.

Beim entwickelten Restriktionsverdau erwies es sich von Vorteil, dass mit einfacher Laborausrüstung gearbeitet werden kann. Es genügen Geräte für DNA-Extraktion und PCR. Es konnte zudem mit kostengünstigen Standard-Restriktionsenzymen gearbeitet werden. Allerdings trugen ALS1 und ALS3 beide die *Pdil*-Erkennungssequenz an der gleichen Position im Amplikon. Deshalb konnte kein einstufiger Restriktionsverdau durchgeführt werden, bei dem die Genvarianten aufgrund der entstandenen Fragmentgrößen unterschieden werden können. Stattdessen musste ein zweistufiger Ansatz gewählt werden, bei dem zuerst die Variante ALS1 und anschließend die Variante ALS3 gewonnen wurde.

Für *Echinochloa crus-galli* ist bekannt, dass auch metabolische Resistenz dazu beiträgt, die Art zu einem schädlichen herbizidresistenten Ungras zu machen (NORSWORTHY et al., 2014). In den vergangenen Jahren wurde aber die große Bedeutung der Target-Site-Resistenz deutlich. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass an der TSR maßgeblich ALS-Variante 3 beteiligt ist. Unterschiede in der Resistenzausprägung lassen sich nicht nur der mutierten Herbizidbindestelle zuordnen (Yu und POWLES, 2014), sondern lassen sich auch im Anteil der mutierten Allele vermuten (Yu et al., 2013). Bei anderen polyploiden Arten besteht generell die Möglichkeit, dass manche Genkopien Pseudogene oder „silenced genes“ sind (DÉLYE et al., 2016), daher sollte vor der erstmaligen Analyse verschiedener Genvarianten mittels PCR und Enzym-Assay überprüft werden, ob diese auch alle exprimiert werden.

Bei der Hühnerhirse können mit der vorgestellten Methodik Verteilungsmuster innerhalb von Individuen vollständig aufgezeigt werden. Diese Verteilungsmuster können die Populationsdynamik abbilden und zu einem besseren Verständnis der fortschreitenden Resistenzentwicklung beitragen. *Echinochloa crus-galli* hat gegen die meisten Herbizide, die zur Kontrolle dieses Ungrases eingesetzt werden, multiple Resistenzen entwickelt (HEAP, 2014). Es bleibt zu erwarten, da Hühnerhirse kein ausschließlicher Selbstbestäuber ist, dass durch Kreuzung unterschiedlich resistenter Individuen mehr multiresistente Individuen entstehen, die ALS-Hemmern eine ganze Reihe Allele mit unterschiedlicher Resistenzausprägung entgegensetzen haben.

Literatur

- DÉLYE, C., R. CAUSSE, V. GAUTIER, C. PONCET, S. MICHEL, 2015a: Using nextgeneration sequencing to detect mutations endowing resistance to pesticides: application to acetolactate-synthase (ALS)-based resistance in barnyardgrass, a polyploid grass weed. *Pest Manag Sci* **71**, 675–685.
- DÉLYE, C., A. DUHOUX, F. PERNIN, C.W. RIGGINS, P.J. TRANEL, 2015b: Molecular Mechanisms of Herbicide Resistance. *Weed Science Special Issue 2015*, 91–115.
- DÉLYE, C., R. CAUSSE, S. MICHEL, 2016: Genetic basis, evolutionary origin and spread of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Pest Manag Sci* **72**, 89-102.
- DUGGLEBY, R.G., J.A. MCCOURT, L.W. GUDDAT, 2008: Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol Biochem* **46**, 309–324.
- GUO, L., J. QIU, C. YE, G. JIN, L. MAO, H. ZHANG, X. YANG, Q. PENG, Y. WANG, L. JIA, 2017: *Echinochloa crus-galli* genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed. *Nat Commun* **8**, 1–10.
- HEAP, I., 2014: Herbicide resistant weeds. In: *Integrated Pest Management*. PIMENTEL, D., R. PESHIN (Eds.), Netherlands, Springer, 281-301.
- HEAP, I., 2019: The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Available at: <http://www.weedscience.org> (accessed October 9, 2019).
- IWAKAMI, S., M. HASHIMOTO, K.-I. MATSUSHIMA, H. WATANABE, K. HAMAMURA, A. UCHINO, 2015: Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. *Pest Biochem Physiol* **119**, 1-8.
- MARTIN, S.L., J.S. PARENT, M. LAFOREST, E. PAGE, J.M. KREINER, T. JAMES, 2019: Population Genomic Approaches for Weed Science. *Plants* **8** (9), E354.
- MASTERSON, J., 1994: Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**, 421–424.
- MATZENBACHER F.O., E.D. BORTOLY, A. KALSING, A. MEROTTO JR., 2014: Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. *J Agric Science* **153** (6), 1-15.
- NORSWORTHY, J.K., M.J. WILSON, R.C. SCOTT, E.E. GBUR, 2014: Herbicidal activity on acetolactate synthase-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas, USA. *Weed Biol Manag* **14**, 50–58.
- PANOZZO, S., L. SCARABEL, P.J. TRANEL, M. SATTIN, 2013: Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pestic Biochem Physiol* **105**, 93–101.
- RIAR, D.S., J.K. NORSWORTHY, V. SRIVASTAVA, V. NANDULA, J.A. BOND, R.C. SCOTT, 2013. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *J Agric Food Chem* **61**, 278–289.
- SCARABEL, L., A. LOCASCIO, A. FURINI, M. SATTIN, S. VAROTTO, 2010: Characterisation of ALS genes in the polyploid species *Schoenoplectus mucronatus* and implications for resistance management. *Pest Manag Sci* **66**, 337–344.
- TRANEL, P.J., T.R. WRIGHT, I.M. HEAP, 2019: Mutations in Herbicide-Resistant Weeds to ALS Inhibitors. Available at: <http://www.weedscience.com> (accessed October 9, 2019).
- YU, Q., M.S. AHMAD-HAMDANI, H.P. HAN, M.J. CHRISTOFFERS, S.B. POWLES, 2013: Herbicide resistance-endowing ACCase gene mutations hexaploid wild oat (*Avena fatua*): insights into resistance evolution in a hexaploid species. *Heredity* **110**, 220–231.
- YU, Q., S.B. POWLES, 2014: Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Manag Sci* **70**, 1340–1350.