

2.17 HEIKE THIEL¹, CHRISTIAN KLUTH², MARK VARRELMANN¹

¹Institut für Zuckerrübenforschung (IfZ), Holtenser Landstr. 77, D - 37079 Göttingen

²Applied Biostatistics & Consulting, Arndtstr. 7, D - 37075 Göttingen

Original language: German

A NEW METHOD FOR RAPID DETECTION OF THE METAMITRON TARGET SITE D1 SER264GLY MUTATION IN *CHENOPODIUM ALBUM*

ABSTRACT

Fat-hen, *Chenopodium album* L. represents one of the most important weeds in sugar beet as it is very competitive and has the ability to set seeds until and beyond canopy closure. Metamitron is a member of the triazinones inhibitors of the photosystem II (PS II) and represents the most important active herbicide compound to control fat-hen in sugar beet as alternative substances are limited. It is known that resistance to PS II inhibitors triazines (atrazine) and triazinones (metamitron, metribuzin) in *C. album* is caused by the Serine 264 to Glycine (Ser264Gly) mutation in the D1 protein. This mutation has been detected in *C. album* collections from Belgium with unsatisfactory metamitron control measures. A rapid and reliable method for mutation detection in the target gene *psbA* is required to screen suspicious *C. album* samples. As greenhouse bioassay need sufficient repetitions plus several different compound concentrations, they are elaborate and time consuming. Methods were developed which speed up the D1 Ser264Gly mutation detection and allow for the first time to perform extensive surveys. A restriction length polymorphism (RFLP) was developed which can be used directly on partial *psbA* sequences allowing to discriminate the target site resistance. Thus a fast and simple differentiation of susceptible and resistant populations is possible by evaluation of the restriction patterns. The nucleic acid extraction for the assay was extended to seed tissue which facilitates sampling and storage and enables the straightforward analysis of samples. Furthermore a paper-based nucleic extraction matrix permits nucleic acid sampling without further storage directly from *C. album* leaf tissue in the field. In order to allow the mutation detection even in mixed seed samples, an additional nested PCR RFLP was developed. The suitability of the fast and reliable assay for exhaustive surveys to confirm or disprove metamitron resistance in case of unsatisfactory control is discussed.

UNE NOUVELLE MÉTHODE POUR UNE DÉTECTION RAPIDE DE LA MUTATION DU SITE CIBLE METAMITRONE SER264GLY DANS LA PROTEÏNE D1 CHEZ *CHENOPODIUM ALBUM*

RÉSUMÉ

Le chénopode blanc (*Chenopodium album*) représente l'une des mauvaises herbes de mire dans la culture de la betterave à sucre en Europe. *C. album* est très compétitive et possède la faculté d'établir des semences avant et après la fermeture des lignes. La métamitrone fait parti du groupe des inhibiteurs triazinone du photosystème II (PS II). A défaut d'alternatives, la métamitrone représente la plus importante substance active pour contrôler *C. album*. Il est

connu que la résistance aux inhibiteurs PS II triazine (atrazine) et triazinone (métamitron, métribuzine) chez *C. album*, est causée par la mutation Sérine 264 Glycine (Ser264Gly) dans la protéine D1. Cette mutation a été détectée dans des biotypes belges de *C. album* avec un contrôle insuffisant de métamitron. C'est pour cela qu'une méthode rapide et fiable pour détecter la mutation dans le gène cible *psbA* est indispensable pour pouvoir analyser des échantillons suspects de *C. album*. Cependant, des expérimentations sous serre avec un nombre suffisant de répétitions et des concentrations différentes de substance active sont très onéreuses en temps et en argent. Des méthodes de preuve pour accélérer la détection des mutations D1 Ser264Gly, permettant une ample surveillance, ont été développées. Par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) appliqué directement sur des séquences partielles de *psbA* PCR, une différenciation entre des génotypes sensibles ou résistants a pu être directement établie. La méthode d'extraction d'acides nucléiques a été étendue sur les tissus de semences ce qui facilite énormément le prélèvement d'échantillons. De plus, une matrice d'extraction sur papier a été établie, pour échantillonner le tissu foliaire de *C. album* directement dans le champ. Pour permettre de déceler une mutation même dans les échantillons de semences mixtes des populations, une analyse « nested PCR RFLP » supplémentaire a été développée. Les possibilités d'application de cette méthode rapide et fiable pour une surveillance ample et représentative afin de confirmer ou réfuter la résistance à la métamitron sont en discussion.

ENTWICKLUNG EINER NACHWEISMETHODE ZUR ERMITTLUNG DER SER264GLY MUTATION IM D1 PROTEIN BEI *CHENOPODIUM ALBUM*

KURZFASSUNG

Der Weisse Gänsefuß (*Chenopodium album* L.) stellt eines der Leitunkräuter im Zuckerrübenanbau in Europa dar. *C. album* ist sehr konkurrenzfähig und besitzt die Fähigkeit zur vollständigen Samenbildung vor und nach Reihenschluss. Metamitron gehört zur Gruppe der Triazinone Photosystem II (PS II) Inhibitoren und repräsentiert den bedeutendsten Wirkstoff zur *C. album* Kontrolle, da alternative Wirkstoffe fehlen. Es ist bekannt, dass die Resistenz gegenüber PS II Inhibitoren Triazine (Atrazin) und Triazinone (Metamitron, Metribuzin) in *C. album* durch die Serin 264 Glycin (Ser264Gly) Mutation im D1 Protein verursacht wird. Diese Mutation wurde in belgischen *C. album* Biotypen mit unzureichender Kontrolle nachgewiesen. Daher ist eine schnelle und verlässliche Nachweismethode der Mutation im Zielgen *psbA* erforderlich, um verdächtige *C. album* Proben untersuchen zu können. Gewächshausuntersuchungen mit ausreichender Wiederholungszahl und verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen sind jedoch sehr aufwändig. Daher wurden Methoden zum schnellen D1 Ser264Gly Mutationsnachweis entwickelt, die ein Monitoring erlauben. Mittels Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP) von *psbA* PCR Produkten konnte eine direkte Differenzierung von anfälligen und resistenten Genotypen gezeigt werden. Die Methode zur Nukleinsäureextraktion wurde auf Samengewebe erweitert, welches die Probennahme erheblich vereinfacht. Des Weiteren wurde eine Papier-basierte Extraktionsmatrix für die Beprobung von *C. album* Blattgewebe direkt im Feld etabliert. Um einen Mutationsnachweis auch in Samenmischproben von Populationen zu ermöglichen, wurde eine zusätzliche „nested PCR RFLP“ Analyse entwickelt. Die mögliche Anwendbarkeit des schnellen und zuverlässigen Nachweisverfahrens für ein umfassendes und repräsentatives Monitoring wird diskutiert.