

# Genomeditierung und Herbizid-resistente Kulturpflanzen

Literaturrecherche

Erstellt im Auftrag des Bundesamts für Umwelt (BAFU), Bern

Benno Vogel

Berlin/Winterthur – Januar 2019

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aufbau des Berichts .....	1
<b>2. Herbizide und Wirkstoffgruppen</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Resistenzmechanismen und ihre genetische Basis</b> .....	<b>3</b>
3.1 Resistenzmechanismen.....	3
3.1.1 Target Site-Mechanismen .....	4
3.1.2 Non-Target Site-Mechanismen .....	4
3.2 Genetische Basis .....	5
3.3 Epigenetische Basis.....	6
<b>4. Genomeditierung und Herbizid-resistente Pflanzen</b> .....	<b>7</b>
4.1 Mögliche DNA-Veränderungen und Herbizidresistenz .....	7
4.1.1 Punktmutationen.....	7
4.1.2 Indels.....	7
4.1.3 Insertion .....	8
4.1.4 Inversionen, Translokationen und große Deletionen.....	8
4.1.5 Multiplexing .....	8
4.1.6 Genetische Veränderungen in cis- und trans-regulatorischen Elementen.....	9
4.1.7 Extrachromosomale zirkuläre DNA .....	9
4.1.8 Veränderungen im Chloroplastengenom .....	10
4.1.9 Epiallele .....	10
4.1.10 Gene Drives .....	10
4.2 Kreuz- und Mehrfachresistenzen .....	10
4.2.1 Kreuzresistenz .....	11
4.2.2 Mehrfachresistenz .....	11
4.3 Resistenzmechanismen.....	11
4.4 Wirkstoffgruppen-spezifische Resistenzen .....	12
4.4.1 ACC-Hemmer .....	12
4.4.2 ALS-Hemmer.....	13
4.4.3 EPSPS-Hemmer.....	13
4.4.4 GS-Hemmer .....	14
4.4.5 HPPD-Hemmer.....	14
4.4.6 Mikrotubuli-Hemmer.....	15
4.4.7 PDS-Hemmer .....	15
4.4.8 PPO-Hemmer.....	16
4.4.9 PSI-Hemmer.....	16
4.4.10 PSII-Hemmer .....	16
4.4.11 Synthetische Auxine.....	17
4.4.12 Zellulosesynthese-Hemmer.....	17
4.5 Genomeditierte HR-Kulturpflanzen .....	18
<b>5. Anhang</b> .....	<b>20</b>
5.1 HRAC-Gruppe A: ACC-Hemmer .....	20
5.2 HRAC-Gruppe B: ALS-Hemmer.....	22

5.3 HRAC-Gruppen C1, C2 und C3: PSII-Hemmer .....	25
5.4 HRAC-Gruppe D: PSI-Hemmer .....	27
5.5 HRAC-Gruppe E: PPO-Hemmer .....	28
5.6 HRAC-Gruppe F1: PDS-Hemmer .....	30
5.7 HRAC-Gruppe F2: HPPD-Hemmer.....	32
5.8 HRAC-Gruppe F3: Bleichmittel mit unbekanntem Angriffspunkt.....	34
5.9 HRAC-Gruppe F4: DOXPS-Hemmer .....	34
5.10 HRAC-Gruppe G: EPSPS-Hemmer .....	34
5.11 HRAC-Gruppe H: GS-Hemmer.....	37
5.12 HRAC-Gruppe I: DHPS-Hemmer.....	39
5.13 HRAC-Gruppe K1: Mikrotubuli-Hemmer.....	39
5.14 HRAC-Gruppe K2: Mikrotubuliorganisations-Hemmer .....	41
5.15 HRAC-Gruppe K3: VLCFA-Synthese-Hemmer .....	41
5.16 HRAC-Gruppe L: Zellulosesynthese-Hemmer .....	42
5.17 HRAC-Gruppe M: Entkoppler .....	43
5.18 HRAC-Gruppe N: Hemmer der Lipidsynthese .....	43
5.19 HRAC-Gruppe O: Synthetische Auxine .....	43
5.20 HRAC Gruppe P: Auxintransport-Hemmer.....	46
5.21 HRAC-Gruppe Z: Unbekannter Wirkmechanismus.....	46
<b>Literatur .....</b>	<b>47</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HRAC-Wirkstoffgruppen, Anzahl chemische Familien und Wirkstoffe und Beispiele .....	3
Tabelle 2: Mechanismen von Wirkort- und Nicht-Wirkortresistenz .....	4
Tabelle 3: Aminosäurensubstitutionen in Zielproteinen herbizider Wirkstoffe, die mit einer Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden. ....	6
Tabelle 4: Arbeiten zur Herstellung von HR-Kulturpflanzen mittels gezielter Mutagenese.....	18
Tabelle 5: Aminosäurensubstitutionen in der ACC, die mit einer Resistenz gegen ACC-Hemmer in Verbindung gebracht werden. ....	20
Tabelle 6: Vorhaben zur Züchtung von Pflanzen mit Resistenz gegen ACC-Hemmer. ....	21
Tabelle 7: Aminosäurensubstitutionen in der ALS, die mit einer Resistenz gegen ALS-Hemmer in Verbindung gebracht werden. ....	23
Tabelle 8: Vorhaben zur Herstellung von ALS-Hemmer-resistenten Pflanzen mittels gezielter oder ungezielter Mutagenese .....	24
Tabelle 9: Aminosäurensubstitutionen im D1-Protein, die mit einer Resistenz gegen PSII-Hemmer in Verbindung gebracht werden. ....	26
Tabelle 10: Vorhaben zur Züchtung von Kulturpflanzen mit Resistenz gegen PSII-Hemmer. ....	27
Tabelle 11: Änderungen in der Aminosäuresequenz der PPO, die mit einer Resistenz gegen PPO-Hemmer in Verbindung gebracht werden. ....	29
Tabelle 12: Aminosäuren-Substitutionen in der PDS, die mit einer Resistenz gegen PDS-hemmende Herbizide in Verbindung gebracht werden.....	31
Tabelle 13: Beispiele von Aminosäurensubstitutionen in der EPSPS, die mit einer Resistenz gegen Glyphosat in Verbindung gebracht werden.....	35
Tabelle 14: Vorhaben zur Herstellung Glyphosat-resistenter Pflanzen mit Mutationen im epsps-Gen.....	36
Tabelle 15: Aminosäurensubstitutionen in der GS von Kulturpflanzen, die mit einer Glufosinat-Resistenz in Verbindung gebracht werden. ....	38
Tabelle 16: Aminosäurensubstitutionen im $\alpha$ -Tubulin, die mit einer Resistenz gegen Dinitroanilin-Herbizide in Verbindung gebracht werden. ....	40
Tabelle 17: Vorhaben zur Herstellung von Kulturpflanzen mit Resistenz gegen synthetische Auxine .....	45

# 1. Einleitung

Seit vor 35 Jahren mit dem Triton-Raps erstmals eine Herbizid-resistente (HR-) Sorte auf den Markt kam, sind weltweit bei mehr als achtzehn Kulturarten HR-Sorten lanciert worden. Eine breite Anwendung finden diese Anbausysteme seit 1996, als mit der Glyphosat-resistenten Soja die ersten HR-Sorten auf die Felder kamen, die resistent gegen ein Totalherbizid sind. Die aktuellen agrarökonomischen und -politischen Rahmenbedingungen machen die Entwicklung von HR-Systemen weiterhin attraktiv und Saatgutfirmen haben entsprechende Produkte in der Pipeline.

Während die Nutzung von HR-Sorten der Landwirtschaft Vorteile bringen kann, kann sie für Natur und Umwelt negative Folgen haben. Aus Sicht des Natur- und Umweltschutzes sind HR-Sorten kritisch zu beurteilen, weil 1) ihre Nutzung mit der Anwendung von Herbiziden einhergeht und die Pflanzengifte unerwünschte Auswirkungen auf die biologische Vielfalt haben können, 2) weil HR-Kulturpflanzen sich verbreiten und zum Unkraut werden könnten, und 3) weil HR-Pflanzen ihre Resistenzgene gegebenenfalls an kreuzbare Wildarten weitergeben können.

In der Schweiz können gegenwärtig allein HR-Sorten aus herkömmlicher Züchtung kommerziell genutzt werden. HR-Sorten aus gentechnischer Züchtung hingegen dürfen wegen des geltenden GVO-Moratoriums nicht für den Anbau zugelassen werden.

Derzeit erhältlich in der Schweiz sind eine Tribenuron-resistente Sonnenblume sowie Zuckerrüben mit Resistenz gegen Foramsulfuron und Thiencarbazon. Da in der EU anerkanntes Saatgut in die Schweiz eingeführt und hier vertrieben werden darf und aufgrund der bestehenden Herbizidzulassungen dürften auch folgende HR-Systeme hierzulande verkehrsfähig sein: Mais mit Cycloxydim-Resistenz sowie Raps und Sonnenblume mit Imazomax-Resistenz.

Bis vor kurzem standen für die Entwicklung von HR-Sorten herkömmliche Züchtungsverfahren sowie gentechnische Methoden zur Verfügung. Neu können heute auch Verfahren der Genomeditierung dafür eingesetzt werden. Diese Verfahren gelten insbesondere deshalb als interessant für die Firmen, weil sie die Herstellung von transgenfreien HR-Sorten vereinfachen und beschleunigen könnten.

Für das Bundesamt für Umwelt ist es wichtig, frühzeitig über die Entwicklung transgenfreier HR-Sorten mittels Genomeditierung informiert zu sein. Diese Informationen sind im Rahmen einer Literaturrecherche gesammelt und im vorliegenden Bericht aufgearbeitet worden. Der Bericht beschreibt, welche Mechanismen bei Pflanzen zu einer Herbizidresistenz führen können und was über die genetischen Veränderungen, die diesen Mechanismen zu Grunde liegen, bekannt ist. Zudem diskutiert der Bericht, welche dieser genetischen Veränderungen nutzbar sein könnten, um mittels Verfahren der Genomeditierung transgenfreie HR-Sorten zu entwickeln.

## 1.1 Aufbau des Berichts

Kapitel 2 stellt kurz das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Herbizid-Klassifizierungssystem vor. Kapitel 3 beschreibt die HR-Mechanismen sowie die Typen von genetischen Veränderungen, die zu einer Herbizidresistenz führen können. Zudem fasst Kapitel 3 die genetischen Veränderungen zusammen, die in der wissenschaftlichen Literatur sowie in Patentschriften mit einer Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden. Kapitel 4 beleuchtet schliesslich

unterschiedliche Aspekte, die bei der Herstellung von HR-Sorten mit Verfahren der Genomeditierung eine Rolle spielen. Dabei wird insbesondere diskutiert bei welchen Gruppen herbizider Wirkstoffe es möglich sein könnte, mit Genomeditierung transgenfreie HR-Sorten herzustellen.

Am Ende des Berichts findet sich ein Anhang. Er fasst die Rechercheresultate zusammen und bildet die Basis für die Kapitel 3 und 4. Da die wichtigen Informationen in Kapitel 3 und 4 vorliegen, ist das Lesen des Anhangs nicht zwingend notwendig.

Der Anhang beschreibt für die behandelten Wirkstoffgruppen jeweils kurz folgende Aspekte: den Mechanismus der Wirkstoffe, die Mechanismen der Resistenzen, die genetische Basis für die Resistenzmechanismen, die Vorhaben zur Züchtung resistenter Sorten und die Anwendbarkeit von Verfahren der Genomeditierung für die Züchtung solcher Sorten.

## 2. Herbizide und Wirkstoffgruppen

Weltweit gibt es mehr als 300 herbizide Wirkstoffe. Sie lassen sich nach verschiedenen Kriterien klassieren – etwa nach ihrem Wirkmechanismus, dem Zeitpunkt ihrer Anwendung, der Art ihrer Anwendung oder ihrer Selektivität. Das für die vorliegende Arbeit entscheidende Kriterium ist der Wirkmechanismus beziehungsweise der molekulare Wirkort (das Zielprotein) der Wirkstoffe. Von den drei Klassifizierungssystemen, die sich hierzu finden lassen, wurde dasjenige des *Herbicide Resistance Action Committee* (HRAC) gewählt (Menne & Köcher 2012). Dieses Komitee ist eine Interessengemeinschaft der Industrie. Es unterteilt die Wirkstoffe nach Art des Mechanismus in insgesamt 23 Wirkstoffgruppen, die mit Buchstaben gekennzeichnet sind. Die Wirkstoffe der einzelnen Gruppen werden im HRAC-System zudem noch – aufgrund ihrer Struktur – unterschiedlichen chemischen Familien zugeordnet. Tabelle 1 zeigt, welche 23 HRAC-Wirkstoffgruppen es gibt und wie gross jeweils die Anzahl der chemischen Familien und Wirkstoffe ist. Zudem führt die Tabelle für jede Gruppe Beispiele von Wirkstoffen auf. Detailliertere Darstellungen des HRAC-Systems finden sich auf Wikipedia<sup>1</sup> oder beim Komitee selbst<sup>2</sup>.

In der vorliegenden Arbeit werden die drei HRAC-Gruppe C1, C2 und C3 als eine Gruppe behandelt. Diese Vereinfachung erfolgte, weil die Wirkstoffe der drei Gruppen das gleiche Protein hemmen und sich allein in der Stelle unterscheiden, an der sie an dieses Protein binden.

Die Entwicklung neuer Herbizide ist seit längerem ein Gebiet, das arm an Innovationen ist. Zwar kommen immer wieder neue Wirkstoffe auf den Markt, aber die Entwicklung eines neuartigen Wirkmechanismus ist seit längerem nicht mehr gelungen (Westwood et 2018). Fachleute gehen davon aus, dass erst nach 2025 mit der Lancierung eines Wirkstoffes mit neuem Wirkmechanismus gerechnet werden kann (Kraehmer et al. 2014, Tschuy & Wirth 2015).

---

1 [https://de.wikipedia.org/wiki/Herbicide\\_Resistance\\_Action\\_Committee](https://de.wikipedia.org/wiki/Herbicide_Resistance_Action_Committee)

2 <https://hracglobal.com/tools/world-of-herbicides-map>

**Tabelle 1**  
**HRAC-Wirkstoffgruppen, Anzahl chemische Familien und Wirkstoffe und Beispiele**

HRAC-Nr	Wirkstoffgruppe	Anzahl		Wirkstoffe (Beispiele)
		Familien	Wirkstoffe	
A	ACC-Hemmer	3	21	Cycloxydim, Sethoxydim
B	ALS-Hemmer	5	57	Imazamox
C1	PSII-Hemmer	6	28	Atrazin, Metamitron
C2	PSII-Hemmer	3	24	Dimefuron, Liniron
C3	PSII-Hemmer	3	6	Bentazon, Bromoxynil
D	PSI-Hemmer	1	2	Diquat, Paraquat
E	PPO-Hemmer	8	31	Butafenacil
F1	PDS-Hemmer	1	7	Fluridon, Norflurazon
F2	HPPD-Hemmer	4	13	Isoxaflutol, Mesotrion
F3	Bleichmittel mit unbekanntem Wirkort	2	2	Aclonifen, Amitrol
F4	DOXPS-Hemmer	1	1	Clomazon
G	EPSPS-Hemmer	1	2	Gluphosat, Sulfosat
H	GS-Hemmer	1	2	Bialaphos, Glufosinat
I	DHP-Hemmer	1	1	Asulam
K1	Mikrotubuli-Hemmer	5	16	Butralin, Thiazopyr
K2	Mikrotubuliorganisations-Hemmer	1	3	Barban, Carbetamid
K3	VLCFA-Synthese-Hemmer	5	26	Butachlor, Flufenacet
L	Zellulosesynthese-Hemmer	4	6	Dichlobenil, Isoxaben
M	Entkoppler	1	3	Dinoseb, Dinoterb
N	Lipidsynthese-Hemmer	4	20	Bensulid
O	Synthetische Auxine	5	25	2,4-D, Dicamba
P	Auxintransport-Hemmer	2	2	Diflufenzopyr, Naptalam
Z	Unbekannter Wirkort	3	20	Dazomet, Metam

**ACC:** Acetyl-CoA-Carboxylase; **ALS:** Acetolactate-Synthase; **DHP:** Dihydropteroat-Synthase; **DOXPS:** Desoxyxylulosephosphatsynthase; **EPSPS:** 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase; **GS:** Glutaminsynthetase; **HPPD:** 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase; **PDS:** Phytoen-Desaturase; **PPO:** Protoporphyrinogen-Oxidase; **PSI:** Photosystem I; **PSII:** Photosystem II; **VLCFA:** very long chain fatty acids

### 3. Resistenzmechanismen und ihre genetische Basis

#### 3.1 Resistenzmechanismen

Herbizidresistenzen lassen sich – nach dem molekularen Ort, an dem sie fungieren – in zwei Arten unterteilen: Wirkortresistenzen (*target site resistance*, TSR) und Nicht-Wirkortresistenzen (*non-target site resistance*, NTSR) (Délye 2013, Délye et al. 2015). Bei beiden Arten sind mehrere Mechanismen bekannt, die zur Ausprägung der Resistenz führen können (Tabelle 2). Den Resistenzarten entsprechend werden sie in TS- und NTS-Mechanismen unterteilt. Die Herbizidresistenz einer einzelnen Pflanze kann entweder auf TS-, NTS- oder einer Kombination der Mechanismen beruhen.

**Tabelle 2**  
**Mechanismen von Wirkort- und Nicht-Wirkortresistenz**

<b>Resistenzart</b>	<b>Resistenzmechanismen</b>
Wirkortresistenz ( <i>target site resistance; TSR</i> )	Bildung eines unempfindlichen Zielproteins Vervielfachung des Gens des Zielproteins Überexpression des Gens des Zielproteins
Nicht-Wirkortresistenz ( <i>non-target site resistance; NTSR</i> )	Abbau des Wirkstoffes in ungiftige Metaboliten Verringerte Aufnahme des Wirkstoffes Sequestrierung/Separierung des Wirkstoffes Schneller Gewebstod/schnelle Entlaubung Kompensation giftiger Nebenprodukte

### **3.1.1 Target Site-Mechanismen**

TS-Mechanismen sind die Resistenzmechanismen, die am Wirkort der Herbizide fungieren. Sie basieren auf Änderungen im Zielprotein der herbiziden Wirkstoffe und können qualitativer und/oder quantitativer Natur sein. Es sind drei TS-Mechanismen bekannt. Der wichtigste ist qualitativer Natur und beruht darauf, dass Pflanzen eine neue Version des Zielproteins bilden, die unempfindlich gegen den herbiziden Wirkstoff ist und gleichzeitig funktionsfähig bleibt. Die beiden anderen TS-Mechanismen sind quantitativer Natur und fassen darauf, dass die Pflanzen die Produktion des Zielproteins – durch Vervielfachung oder Überexpression des korrespondierenden Gens – erhöhen und dadurch den herbiziden Wirkstoff „verdünnen“.

### **3.1.2 Non-Target Site-Mechanismen**

NTS-Mechanismen umfassen diejenigen Resistenzmechanismen, die nicht am Wirkort der Herbizide fungieren. Sie führen in der Regel dazu, dass die Menge der Herbizide, die das Zielprotein erreicht, stark verringert wird. Der wichtigste NTS-Mechanismus besteht darin, dass Pflanzen die herbiziden Wirkstoffe in ungiftige Moleküle umwandeln. Diese Entgiftung, die auch metabolische Resistenz genannt wird, ist in den meisten Fällen das Resultat eines Prozesses, an dem mehrere Proteine und auch Mikro-RNAs beteiligt sind (Délye 2013). Zu den Proteinen, die involviert sein können, gehören Cytochrome P450, Glutathion-S-Transferasen, Glycosyltransferasen, ABC Transporter, Esterasen, Hydrolasen und Transkriptionsfaktoren (Délye 2013). Neben der Entgiftung besitzen Pflanzen weitere NTS-Mechanismen (Délye 2013, Délye et al. 2015): Sie können die Menge der Wirkstoffe, die absorbiert werden, senken, oder die absorbierten Gifte von den Zielproteinen separieren – zum Beispiel durch Sequestrierung in Vakuolen. Zudem existieren NTS-Mechanismen, mit denen Pflanzen nicht die Menge der Herbizide verringern, sondern die Menge giftiger Produkte der Herbizide. PSI-Hemmer zum Beispiel führen zu Bildung giftiger Sauerstoffspezies und Pflanzen können sich davor schützen, indem sie Antioxidantien bilden.

Auch wenn NTS-Resistenzen auf einem einzelnen Gen beruhen können, sind sie in der Regel eine polygenetische Eigenschaft, die sowohl qualitativer und als auch quantitativer Natur ist und an deren Ausprägung cis- und trans-regulatorische sowie epigenetische Elemente beteiligt sein können (Powles & Yu 2010, Délye 2013, Délye et al. 2015, Ghanizadeh & Harrington 2017, Markus et al. 2018).

### 3.2 Genetische Basis

Die genetischen Veränderungen im Erbgut von Pflanzen, die zur Entwicklung von Herbizidresistenz führen oder beitragen können, lassen sich in zwei Typen unterteilen (Délye et al. 2015). Der eine Typ hat Folgen qualitativer Natur und umfasst Veränderungen in Protein-codierenden Sequenzen. Diese Veränderungen bewirken eine Modifikation in der dreidimensionalen Struktur eines Proteins, die zur Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber einem Herbizid führt. Ein Beispiel sind Punktmutationen in Genen, die für Zielproteine der herbiziden Wirkstoffe codieren: Sie können Aminosäuresubstitutionen evozieren, die die Herbizid-Bindungsstelle eines Zielproteins derart verändern, dass die Affinität für den herbiziden Wirkstoff sinkt und eine TS-Resistenz resultiert. Ein weiteres Beispiel: Aminosäuresubstitutionen an der aktiven Stelle eines metabolischen Enzyms können den Abbau eines Herbizids verbessern (NTS-Resistenz).

Der zweite Typ von genetischen Veränderungen, die mit Herbizidresistenz verbunden sind, hat Folgen quantitativer Natur und umfasst Veränderungen in cis- und trans-regulatorischen Elementen sowie Kopienzahlvariationen (Délye et al. 2015). Die Herbizidresistenz kommt hier durch Modifikationen in der Expression einzelner oder mehrerer Gene zu Stande. Ein Beispiel sind Mutationen in der Promotorsequenz von Genen, die für Zielproteine der herbiziden Wirkstoffe codieren: Sie können zu einer Überproduktion des Zielproteins führen, dadurch die Hemmwirkung der Herbizide kompensieren und somit eine TS-Resistenz auslösen. Ein weiteres Beispiel: Mutationen in der Promotorsequenz von Genen, die für Transkriptionsfaktoren codieren, können eine Überproduktion metabolischer Enzyme verursachen und dadurch die Basis für eine NTS-Resistenz bilden.

Die genetischen Veränderungen, die mit einer Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der wissenschaftlichen Literatur sowie in Patentschriften ermittelt worden sind, sind – abgesehen von zwei Ausnahmen – ausschliesslich vom qualitativen Typ. Die beiden Ausnahmen sind: Eine zwölf Basenpaar lange Insertion im Promotor eines *epsps*-Gens, die mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat in Verbindung gebracht steht (Zhang et al. 2018a), und Indels im vorangestellten offenen Leseraster (uORF) des Enzyms LsGGP2, die mit einer Paraquat-Resistenz korrelieren (Zhang et al. 2018b). Die ermittelten qualitativen genetischen Veränderungen betreffen – wiederum abgesehen von zwei Ausnahmen – ausschliesslich Gene, die für Zielproteine der Herbizide codieren. Die beiden Ausnahmen sind: Aminosäuresubstitutionen in den Entgiftungsenzymen Glutathion-S-Transferase und UDP-Glycosyltransferase gelten als mögliche Ursache für eine Resistenz gegen ACC-Hemmer (Pan et al. 2016a). Die genetischen Veränderungen in den Zielproteingenen sind – abgesehen von einer Ausnahme – alles Punktmutationen, die im Zielprotein an einer oder zwei Stellen zum Austausch einer Aminosäure führen. Die Ausnahme ist: Eine Deletion der Aminosäure Glycin an der Position 210 der Protoporphyrinogen-Oxidase kann eine Resistenz gegen PPO-Hemmer verleihen

(Patzold et al. 2006, Gressel & Levy 2006). Die Aminosäuresubstitutionen in Zielproteinen, die mit einer Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden, sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

**Tabelle 3**  
Aminosäuresubstitutionen in Zielproteinen herbizider Wirkstoffe, die mit einer Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden.

Wirkstoffgruppe	Zielprotein	Aminosäuresubstitutionen
ACC-Hemmer	ACC	Ile-1781-Leu/Val/Arg/Thr, Trp-1999-Cys/Leu/Ser, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn/Val, Asp-2078-Gly, Cys-2088-Arg, Gly-2096-Ala/Ser
ALS-Hemmer	ALS	Ala-122-Thr/Val/Tyr/Ser/Asn, Pro-197-Thr/His/Arg/Leu/Gln/Ala/Ile/Ser/Asn, Ala-205-Val/Phe, Asp-376-Glu, Arg-377-His, Trp-574-Leu/Gly/Met/Arg, Ser-653-Thr/Asn/Ile, Gly-654-Glu/Asp
EPSPS-Hemmer	EPSPS	Gly-101-Ala, Gly-101-Ala + Gly-144-Asn, Thr-102-Ile/Ser, Thr-102-Ile + Pro-106-Ser/Met/Ala, Pro-106-Ala/Leu/Ser/Thr
GS-Hemmer	GS	x-207-Gly, Gly-245-Ser/Cys/Arg, His-249-Tyr, Arg-295-Lys, Glu-297-Ala, Arg-332-Lys
HPPD-Hemmer	HPPD	Pro-215-Leu, Gly-336-Glu/Ile/Trp
Mikrotubuli-Hemmer	$\alpha$ -Tubulin	Leu-125-Met, Leu-136-Phe, Val-202-Phe, Thr-239-Ile, Arg-243-Met/Lys, Met-268-Thr
PDS-Hemmer	PDS	Arg-304-Ser/Cys/His, Glu-425-Asp, Leu-498-Val
PPO-Hemmer	PPO	Arg-98-Leu/Gly/Met, Ser-305-Leu + Tyr-426-Met
PSII-Hemmer	D1	Leu-218-Val, Val-219-Ile, Ala-251-Val, Phe-255-Ile, Ser-264-Gly/Thr, Asn-266-Thr, Phe-274-Val
Synthetische Auxine	IAA16	Gly-Asp
ZS-Hemmer	CESA	Ser-377-Phe, Arg-806-Lys, Thr-942-Ile, Gly-988-Asp/Ser, Gly-1009-Asp

**Quellen:** siehe Referenzen im Anhang. **Abkürzungen:** ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase; ALS: Acetolactate-Synthase; CESA: Cellulose Synthase A; EPSPS: 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase; GS: Glutaminsynthetase; HPPD: 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase; PDS: Phytoen-Desaturase; PPO: Protoporphyrinogen-Oxidase; PSII: Photosystem II; ZS: Zellulosesynthese.

### 3.3 Epigenetische Basis

Das Ermitteln von Epiallelen, die zur Ausprägung einer Herbizidresistenz führen oder beitragen können, war nicht Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Nichtsdestotrotz sei hier kurz erwähnt, dass Resistenzmechanismen neben einer genetischen auch eine epigenetische Basis haben können (Markus et al. 2018). So kann beispielsweise eine erhöhte Methylierung derjenigen Region des *epsps*-Gens, die die Translationsinitiationsstelle umspannt, mit einer Glyphosat-Resistenz in Verbindung gebracht werden (Margaritopoulou et al. 2018).

## 4. Genomeditierung und Herbizid-resistente Pflanzen

### 4.1 Mögliche DNA-Veränderungen und Herbizidresistenz

#### 4.1.1 Punktmutationen

Wie die Züchtung mit chemischer Mutagenese zeigt, lassen sich durch die Erzeugung zufälliger Punktmutationen HR-Sorten herstellen; derzeit sind Sorten mit Resistenzen gegen ACC-, ALS- und PSII-Hemmer auf dem Markt erhältlich. Mit den Werkzeugen der Genomeditierung ist es nun möglich geworden, Punktmutationen an vorbestimmten Orten im Erbgut zu erzeugen (Baltes et al. 2017). Die Herstellung kann dabei so erfolgen, dass Pflanzen ohne artfremde Gene entstehen können. Damit eröffnet sich in der Züchtung die Möglichkeit, Punktmutationen, die mit Herbizidresistenz in Verbindung stehen, gezielt zu kreieren und für die Herstellung transgenfreier HR-Sorten zu nutzen. Die derzeit dafür in Frage kommenden Mutationen befinden sich fast ausnahmslos in Genen, die für Zielproteine von Herbiziden codieren. Die Wirkstoffgruppen, bei denen Resistenzmutationen bekannt sind, sind ACC-, ALS-, HPPD-, EPSPS-, GS-, PDS-, PPO-, PSII-, ZS- und Mikrotubuli-Hemmer sowie synthetische Auxine (siehe Abschnitt 3.2 und Anhang). Bei ACC-, ALS- und EPSPS-Hemmern finden sich in der Literatur Arbeiten, in denen die Herstellung von HR-Kulturpflanzen mittels gezielt erzeugter Punktmutationen beschrieben ist (Abschnitt 4.5). Bei den ALS-Hemmern sind zwei Produkte bereits marktreif: der *SU*-Raps von Cibus, der in Nordamerika kommerziell erhältlich ist (Cibus 2018a/b), und der *Clearfield*-Raps CLB-1 von BASF, der in Kanada für den Anbau bewilligt ist (CFIA 2014). Wie die Aussichten für die Herstellung von punktmutierten HR-Pflanzen bei den einzelnen Wirkstoffgruppen sind, wird im Abschnitt 4.4 näher beschrieben.

#### 4.1.2 Indels

Genomeditierungsverfahren machen es möglich, an vorbestimmten Stellen des Erbgut Indels zu erzeugen (Baltes et al. 2017). Die Herstellung kann dabei so erfolgen, dass Pflanzen ohne artfremde Gene entstehen. Gegenwärtig sind keine Indels bekannt, die bei Kulturarten zu einer kommerziell verwertbaren Herbizidresistenz führen. Die HR-Sorten, die auf dem Markt sind, beruhen entweder auf Punktmutationen oder auf Insertionen. Da Indels in Protein-codierenden Regionen in der Regel zu *Loss-of-function*-Mutationen führen, bieten sich die Gene, die für die Zielproteine der Herbizide codieren, nicht als Angriffsziel an; Knockouts dieses Gene würden die gleiche Wirkung hervorrufen wie die Herbizide.

Auch wenn die Erzeugung von Indels gegenwärtig bei der Herstellung von HR-Sorten kaum eine Rolle spielen dürfte, ist ein zukünftiger Beitrag nicht auszuschliessen. Da Herbizidresistenz auch eine quantitative Eigenschaft sein kann, könnten cis- und trans-regulatorische Elemente Kandidaten für Indels werden (siehe Abschnitt 4.1.6). Fälle, in denen Indels in Promotoren oder vorangestellten offenen Leserastern (uORFs) mit Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden, sind kürzlich beschrieben worden (Zhang et al. 2018a/b). Denkbar ist auch, dass Gene für Transportproteine von Herbiziden identifiziert werden, deren Ausschalten zu einem NTSR-Mechanismus führt (Li et al. 2013).

#### **4.1.3 Insertion**

Mit den Verfahren der Genomeditierung ist es bei Pflanzen möglich geworden, Herbizidresistenzgene an einem vorbestimmten Ort ins Erbgut zu inserieren. Im Vergleich zur herkömmlichen Gentechnik bietet die gezielte Insertion im Wesentlichen zwei Vorteile: Zum einen können bei der Transformation „safe harbors“ gewählt werden. Das sind Orte im Erbgut, bei denen eine zuverlässige Expression der inserierten Gene zu erwarten ist (Baltes et al. 2017). Zum anderen erleichtert die Genomeditierung das Stapeln von Herbizidresistenzgenen, was die Herstellung von mehrfachresistenten Sorten beschleunigen könnte. Die gezielte Insertion von Herbizidresistenzgenen dürfte vor allem für Konzerne interessant sein, die bei „cash crops“ transgene HR-Sorten entwickeln. Bei Soja, Mais und Baumwolle finden sich in der Literatur denn auch entsprechende Arbeiten (Shukla et al. 2009, Ainley et al. 2013, D'Halluin et al. 2013, Bonawitz et al. 2018, Verkest et al. 2018).

Neben der Herstellung transgener HR-Pflanzen könnten gezielte Insertionen auch bei der Entwicklung cis- und intragener HR-Pflanzen zum Einsatz kommen. So zum Beispiel in Fällen, in denen neben gezielten Punktmutationen zusätzlich eine Überproduktion des veränderten Proteins notwendig ist, um ein kommerziell verwertbares Resistenzniveau zu erreichen. Eine Überproduktion könnte dabei auf zwei Wegen erreichbar sein: Indem mehrere Kopien des mutierten Gens inseriert werden (cisgene Variante) oder indem vor das mutierte Gen ein starker, nativer Promotor eingesetzt wird (intragene Variante).

#### **4.1.4 Inversionen, Translokationen und große Deletionen**

Mit den Werkzeugen der Genomeditierung wird es erstmals möglich, gezielt Translokationen, Inversionen und/oder große Deletionen zu erzeugen und dadurch das Erbgut nach Plan umzugestalten (Puchta 2017, Scheben et al. 2017, Kumlehn et al. 2018). Die Umgestaltung soll dabei machbar sein, ohne dass artfremde Gene im Erbgut der Pflanzen zurückbleiben (Kumlehn et al. 2018). Für die Neuerzeugung einer Herbizidresistenz ist die Technik kaum geeignet. Ihr Einsatz könnte jedoch nützlich sein, wenn es darum geht, in Wildpflanzen bestehende Herbizidresistenzen in Kulturpflanzen einzukreuzen. Da es nämlich möglich wird, Gene aneinander zu koppeln oder unerwünschte Genkopplungen aufzuheben, dürfte sich der natürliche Genpool einer Pflanze einfacher und schneller nutzen lassen (Puchta 2017, Kumlehn et al. 2018).

#### **4.1.5 Multiplexing**

Mit den Genomeditierungsverfahren, insbesondere mit den CRIPSR-Werkzeugen, ist es möglich, das Erbgut gleichzeitig an zwei oder mehr Orten gezielt zu verändern. Dieses Multiplexing gelingt vor allem beim Erzeugen von Indels, ist beispielsweise aber auch mit Baseneditierungsverfahren möglich (Shimatani et al. 2017/2018). Bei der Herstellung einer Herbizidresistenz kann das Multiplexing in verschiedenen Fällen hilfreich sein: wenn für die Resistenz zwei oder mehr Veränderungen in einem Gen notwendig sind; wenn ein Resistenzallel rezessiv vererbt wird; wenn mehrere Isoformen eines Gens zu verändern sind; und wenn – bei polyploiden Pflanzen – mehrere homeologe Gene zu verändern sind. Des Weiteren könnte es möglich sein, in einem Schritt eine mehrfachresistente Pflanze zu erzeugen, indem gleichzeitig die Zielproteingene verschiedener Wirkstoffgruppen verändert werden (siehe Abschnitt 4.2).

#### **4.1.6 Genetische Veränderungen in cis- und trans-regulatorischen Elementen**

Der regulatorische Teil des Erbguts von Pflanzen gilt als vielversprechendes Ziel, wenn es darum geht, mittels Genomeditierung neue Sorten zu erzeugen (Wolters & Puchta 2018). Dies könnte auch für die Erzeugung von HR-Sorten gelten – und zwar in den Fällen, in denen die Ausprägung der Herbizidresistenz eine quantitative Komponente hat. Einer der möglichen Fälle findet sich beispielsweise bei der Herstellung von Glyphosat-resistenten Pflanzen: Durch die Erzeugung bestimmter Mutationen im *epsps*-Gen lässt sich zwar die Unempfindlichkeit gegenüber Glyphosat steigern, aber eine kommerziell verwertbare Resistenz wird unter Umständen erst dann erzielt, wenn die mutierte EPSPS zusätzlich überproduziert wird (Hummell et al. 2018, Ortega et al. 2018, Sammons et al. 2018; siehe Abschnitt 4.4.3).

Voraussetzung für die Nutzung des regulatorischen Teils des Erbguts ist, dass Veränderungen in cis- oder trans-regulatorischen Elementen bekannt sind, die mit einer Herbizidresistenz in Verbindung stehen. Bisher ist dies kaum der Fall. Im Laufe der vorliegenden Arbeit sind nur zwei derartige Veränderungen ermittelt worden (siehe Abschnitt 3.2): Indels im uORF des Enzyms LsGGP2, die mit einer Paraquat-Resistenz korrelieren (Zhang et al. 2018b), und eine kurze Insertion im Promotor eines *epsps*-Gens, die mit einer Glyphosat-Resistenz in Verbindung gebracht wird (Zhang et al. 2018a).

Falls die Verfahren der Genomeditierung dazu benutzt werden, um in cis- oder trans-regulatorischen Elementen gezielt Indels und Punktmutationen zu erzeugen, können dabei transgenfreie Pflanzen resultieren. Zhang & Voytas (2018) zum Beispiel gehen davon aus, dass gezielte Mutationen in uORFs den Einsatz starker, artfremder Promotoren ersetzen könnte, wenn es darum geht, ein natives Gen überzuexprimieren.

Neben der Erzeugung von Indels und Punktmutationen bietet die Genomeditierung noch eine weitere Möglichkeit, um den regulatorischen Teil des Erbguts zu nutzen: den gezielten Austausch von Promotoren (Shi et al. 2017). Bei der Herstellung Glyphosat-resistenter Pflanzen beispielsweise könnte es damit möglich werden, den Promotor eines mutierten *epsps*-Gens gezielt durch einen stärkeren zu ersetzen und damit die notwendige Überproduktion der Glyphosat-unempfindlichen EPSPS zu erzielen. Falls dabei ein nativer Promotor zum Einsatz käme, entstünde keine transgene sondern eine intragene Pflanze.

#### **4.1.7 Extrachromosomale zirkuläre DNA**

Bei Humanzellen ist kürzlich eine neue Variante der CRISPR-Technik entwickelt worden, mit der sich innerhalb von Zellen aus vorbestimmten Genloci extrachromosomale zirkuläre DNA-Moleküle (ecDNA) bilden lassen (Møller et al. 2018). Falls diese CRISPR-C genannte Technik auch bei Pflanzenzellen funktioniert, könnte sie in Zukunft eine neue Möglichkeit bieten, Herbizidresistenz zu erzeugen. Das Konzept dazu: Eine Überproduktion der Zielenzyme von Herbiziden herbeiführen, indem die entsprechenden Gene auf ecDNAs vervielfacht werden. In der Natur wird dieses Konzept bereits umgesetzt. Bei einer Glyphosat-resistenten Wildart finden sich mehrere Kopien des *epsps*-Gens auf ecDNAs (Koo et al. 2018).

#### **4.1.8 Veränderungen im Chloroplastengenom**

In den weitaus meisten Fällen liegen die Gene, die für die Erzeugung von Herbizidresistenz zu verändern sind, im Kerngenom. Dass es auch Ausnahmen geben kann, zeigt das *psbA*-Gen. Es enthält die Anleitung für D1, dem Zielprotein der PSII-Hemmer, und befindet sich im Erbgut der Chloroplasten. Ob sich das Chloroplastengenom mit den gängigen Genomeditierungsverfahren gezielt verändern lässt, ist derzeit unklar. In der Literatur finden sich keine entsprechenden Arbeiten (Fichtner et al. 2014, Piatek et al. 2018). Da in Chloroplasten die homologe Rekombination vorherrscht, könnte eine gezielte Veränderung jedoch auch mit anderen Methoden gelingen. Avila et al. (2016) beschreiben ein Verfahren, mit dem es möglich sein soll, in Chloroplasten gezielt Punktmutationen einzufügen, ohne dass weitere Spuren des Eingriffs zurückbleiben.

#### **4.1.9 Epiallele**

Durch Weiterentwicklungen der Werkzeuge der Genomeditierung dürfte es in Zukunft möglich werden, das Epigenom von Kulturpflanzen gezielt zu verändern (Puchta 2016, Springer & Schmitz 2017, Khan et al. 2018). Bei der Modellpflanze *Arabidopsis* ist bereits gezeigt worden, dass die gezielte Erzeugung von Epiallelen technisch gelingen kann (Gallego-Bartolomé et al. 2018). Da epigenetische Mechanismen an der Ausprägung von Herbizidresistenz beteiligt sein können (Markus et al. 2018, Margaritopoulou et al. 2018), ist es nicht auszuschließen, dass in Zukunft bei der Erzeugung von HR-Sorten auch Verfahren der Epigenomeditierung eine Rolle spielen. Neben der Entwicklung der entsprechenden Techniken müssten auch Epiallele identifiziert werden, die Resistenz verleihen und stabil vererbt werden (siehe auch Abschnitt 3.3).

#### **4.1.10 Gene Drives**

Genomeditierungsverfahren, insbesondere die CRISPR-basierten Werkzeuge, rücken Anwendungen von Gene Drive erstmals in den Bereich des technisch Möglichen. Bei der Herstellung von HR-Sorten dürften Gene Drives kaum eine Rolle spielen. Erwähnenswert ist jedoch, dass darüber diskutiert wird, resistente Wildpflanzen mittels Gene Drives wieder empfindlich auf Herbizide zu machen (Esvelt et al. 2014, Neve 2018, Marshall & Akbari 2018), was die Nutzbarkeit von HR-Systemen verlängern könnte. Laut Westwood et al. (2018) sind Gene Drives eines der möglichen Mittel, um dem Szenario zu begegnen, wonach Herbizide und HR-Sorten um das Jahr 2050 wegen der steigenden Anzahl resistenter Wildpflanzen nutzlos werden.

### **4.2 Kreuz- und Mehrfachresistenzen**

Kulturpflanzen können gleichzeitig gegen Wirkstoffe aus unterschiedlichen chemischen Familien resistent sein. Dabei kann entweder eine Kreuz- oder eine Mehrfachresistenz vorliegen. Von Kreuzresistenz ist die Rede, wenn ein einzelner Resistenzmechanismus zur Unempfindlichkeit gegen Wirkstoffen unterschiedlicher Familien führt. In der Regel gehören die Wirkstoffe dabei derselben Wirkstoffgruppe an. Eine Mehrfachresistenz hingegen basiert auf zwei oder mehr Resistenzmechanismen und bewirkt, dass Kulturpflanzen gleichzeitig gegen Herbizide unterschiedlicher Wirkstoffgruppen resistent sind.

#### **4.2.1 Kreuzresistenz**

Wie bei herkömmlicher Mutagenese und Gentechnik können auch bei der Genomeditierung HR-Sorten entstehen, die eine Kreuzresistenz aufweisen. Ein Beispiel ist der SU-Raps der Firma Cibus. Er ist resistent gegen ALS-Hemmer aus den beiden chemischen Familien der Imidazolone und Sulfonylharnstoffe (CFIA 2013).

#### **4.2.2 Mehrfachresistenz**

Mit Genomeditierungsverfahren lassen sich auf unterschiedliche Weise Pflanzen mit mehrfacher Herbizidresistenz herstellen. So ist es beispielsweise möglich, in bereits kommerzialisierten HR-Sorten eine zusätzliche Resistenz zu erzeugen – etwa indem ein neues Resistenzgen inseriert oder ein natives Gen gezielt mutiert wird. Mehrfachresistenz lässt sich auch erschaffen, indem zwei oder mehr Resistenzgene gleichzeitig gezielt inseriert werden. Dieses Stapeln von Resistenzgenen könnte vor allem für Firmen interessant sein, die bei „cash crops“ transgene HR-Sorten entwickeln (siehe auch Abschnitt 4.1.3).

Auch ein transgenfreie Herstellungsweise von Mehrfachresistenz ist möglich: Indem zwei oder mehr Gene, die für Zielproteine unterschiedlicher Herbizide codieren, gleichzeitig oder nacheinander gezielt mutiert werden, können mehrfachresistente Pflanzen entstehen, die frei von Transgenen sind. Die argentinische Firma Bioheuris zum Beispiel hat eine transgenfreie Soja in Entwicklung, die Resistenzmechanismen gegen Herbizide aus drei unterschiedlichen Wirkstoffgruppen besitzen soll. Welche Wirkstoffgruppen dies sind und wie genau die dreifachresistente Soja hergestellt wurde, geht aus den gesichteten Unterlagen nicht hervor. Laut Medienberichten soll die Soja, die von den zuständigen argentinischen Behörden als Nicht-GVO eingestuft wurde, im Jahr 2022 auf den Markt kommen (XX).

### **4.3 Resistenzmechanismen**

Mit den Verfahren der Genomeditierung lassen sich sowohl TS- wie auch NTS-Resistenzmechanismen erzeugen. Voraussetzung ist, dass entsprechende Genomsequenzen bekannt sind. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten genetischen Veränderungen, die mit Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden und als Kandidaten für die Entwicklung transgenfreier HR-Pflanzen in Frage kommen, betreffen – abgesehen von drei Ausnahmen – ausschliesslich TS-Mechanismen. Die drei Ausnahmen sind: Aminosäuresubstitutionen in den Entgiftungsenzymen Glutathion-S-Transferase und UDP-Glycosyltransferase gelten als mögliche Ursache für eine Resistenz gegen ACC-Hemmer (Pan et al. 2016a) und Indels im uORF des Enzyms LsGGP2, die zu einer gesteigerten Produktion von Ascorbinsäure führen, stehen mit einer Resistenz gegen den PSI-Hemmer Paraquat in Verbindung (Zhang et al. 2018b). Ob diese genetischen Veränderungen für die Erzeugung Herbizid-resistenter Kulturpflanzen genutzt werden könnten, bleibt offen. Da NTS-Mechanismen derzeit intensiv erforscht werden, ist davon auszugehen, dass in Zukunft mehr genetische Veränderungen bekannt werden, die für die Genomeditierung nutzbar sein könnten. Als mögliche Kandidaten gehandelt werden beispielsweise Änderungen in Genen, die für Cytochrom P450 Monooxygenasen codieren (Gao & Jiang 2018), und Änderungen in der Promotorsequenz der microRNA mir397 (Mangrauthia et al. 2017).

Die ermittelten genetischen Veränderungen, die TS-Mechanismen betreffen, sind – abgesehen von einer Ausnahme – vom qualitativen Typ. Die Ausnahme ist eine zwölf Basenpaar lange Insertion im Promotor eines *epsps*-Gens, die mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat in Verbindung gebracht wird (Zhang et al. 2018a). Die restlichen Veränderungen finden sich alle in Genen für Zielproteine von Herbiziden und bewirken, dass die Zielproteine unempfindlich gegenüber den entsprechenden Pflanzengiften werden (siehe Abschnitt 3.2). Wie in Tabelle 3 dargestellt, sind bei elf Wirkstoffgruppen solche qualitativen Veränderungen ermittelt worden. Ob sie genutzt werden können, um HR-Sorten zu erzeugen, wird im folgenden Abschnitt näher diskutiert. In Fällen, in denen die qualitativen Veränderungen zu einer Funktionseinbusse im Zielprotein führen, könnte es notwendig sein, zusätzlich einen quantitativen TS-Mechanismus zu erzeugen, der zu einer Überproduktion des Zielproteins führt.

#### **4.4 Wirkstoffgruppen-spezifische Resistenzen**

Bei zwölf Wirkstoffgruppen sind im Laufe der vorliegenden Arbeit Mutationen ermittelt worden, die in der Literatur oder in Patentschriften mit einer jeweiligen Herbizidresistenz in Verbindung gebracht werden. Bei zehn dieser Gruppen betreffen diese Mutationen nur Gene, die für das jeweilige Zielprotein der Wirkstoffe codieren. Sie könnten also entsprechend für die Erzeugung eines TS-Mechanismus nutzbar sein. Bei der Gruppe der PSI-Hemmer vermitteln die identifizierten Mutationen einen NTS-Mechanismus. Die ACC-Hemmer sind die einzige Wirkstoffgruppe, bei der sowohl TS- wie auch NTSR-Mutationen ermittelt worden sind. Im Folgenden werden die zwölf Gruppen kurz einzeln behandelt.

##### **4.4.1 ACC-Hemmer**

ACC-Hemmer wirken giftig auf Pflanzen, weil sie die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC oder ACCase) blockieren und damit ein Enzym hemmen, das für die Synthese von Fettsäuren unerlässlich ist. Da Mutationen im *acc*-Gen bekannt sind, die zu einer TS-Resistenz führen können (Tabelle 3 und Abschnitt 5.1 im Anhang), sind ACC-codierende Gene potenzielle Ziele, um mit Verfahren der Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen herzustellen (Endo & Toki 2013, Gao & Jiang 2018). In der Literatur findet sich gegenwärtig eine entsprechende Arbeit. Li et al. (2018a) haben bei Reis eine Resistenz gegen ACC-Hemmer erzeugt, indem sie mit CRISPR eine Mutation ins *acc*-Gen einführten, die aus einem Raygras bekannt ist.

Da die Nutzung von TSR-Mutationen in herkömmlichen Züchtungsprogrammen bei Reis (BASF 2018), Mais (Vanèetoviæ et al. 2014), Weizen (Hopkins 2017) und Kolbenhirse (Darmency et al. 2017) zur Kommerzialisierung von HR-Sorten geführt hat, ist anzunehmen, dass sich auch via Genomeditierung Resistenzen erzeugen lassen, die kommerziell verwertbar sind.

Neben den TSR-Mutationen sind auch zwei NTSR-Mutationen bekannt, die mit einer Resistenz gegen ACC-Hemmer in Verbindung stehen: Aminosäuresubstitutionen in den beiden Enzymen Glutathion-S-Transferase und UDP-Glycosyltransferase sollen eine Entgiftung ermöglichen (Pan et al. 2016a). Ob diese NTSR-Mutationen Kandidaten für die Herstellung transgenfreier HR-Sorten nutzbar sind, bleibt jedoch offen.

Zu nennen ist schliesslich noch die miRNA mir397. Da bekannt ist, dass ihre Überproduktion die Empfindlichkeit gegenüber dem ACC-Hemmer Fenoxaprop-P-ethyl senken kann, gehen Man-

grauthia et al. (2017) davon aus, dass regulatorische Sequenzen von mir397 gute Kandidaten sind, um mittel Genomeditierung Herbizidresistenz zu erzeugen.

#### **4.4.2 ALS-Hemmer**

ALS-Hemmer wirken giftig auf Pflanzen, weil sie die Acetolactate-Synthase (ALS) blockieren und dadurch die Bildung der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin unterbinden. Da Mutationen im *als*-Gen bekannt sind, die zu einer TS-Resistenz führen können (Tabelle 3 und Abschnitt 5.2 im Anhang), sind ALS-codierende Gene potenzielle Ziele, um mit Verfahren der Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen herzustellen (Endo & Toki 2013, Gao & Jiang 2018). Bei Raps sind entsprechende Sorten bereits bis zur Marktreife entwickelt worden: Der SU-Raps von Cibus, der in Nordamerika kommerziell erhältlich ist (Cibus 2018a/b), und der Clearfield-Raps CLB-1 von BASF, der in Kanada für den Anbau bewilligt ist (CFIA 2014). Bei anderen Kulturarten finden sich entsprechende Arbeiten in der Literatur: bei Mais (Svitashev et al. 2015/2016), Reis (Endo et al. 2007, Sun et al. 2016, Butt et al. 2017, Shimatani et al. 2017/2018, Li et al. 2018c), Soja (Li et al. 2015), Weizen (Ran et al. 2018), Kartoffel (Butler et al. 2016) und Wassermelone (Tian et al. 2018). Ob in diesen Arbeiten jeweils ein Resistenzniveau erreicht wurde, das ausreichend für eine kommerzielle Verwertung ist, wurde hier nicht untersucht. Dass sich mit der Erzeugung von TSR-Mutationen kommerziell verwertbare Resistenzen gegen ALS-Hemmer erzielen lassen, zeigen nicht nur die editierten Rapsorten von BASF und Cibus sondern auch die erfolgreiche Nutzung von TSR-Mutationen in herkömmlichen Züchtungsprogrammen: Bei Raps, Reis, Mais, Gerste, Linsen, Weizen, Sorghum, Hartweizen, Sareptasenf, Sonnenblume und Zuckerrübe sind Sorten mit Resistenz gegen ALS-Hemmer lanciert worden.

#### **4.4.3 EPSPS-Hemmer**

Der EPSPS-Hemmer Glyphosat wirkt giftig auf Pflanzen, weil er die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) blockiert und dadurch die Bildung von aromatischen Aminosäuren unterbindet. Da Mutationen im *epsps*-Gen bekannt sind, die mit einer TS-Resistenz in Verbindung stehen (siehe Tabelle 3 und Abschnitt 5.10 im Anhang), sind *epsps*-Gene potenzielle Ziele, um mit Verfahren der Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen herzustellen (Abdallah et al. 2015, Huang et al. 2016, Gao & Jiang 2018, Aramrak et al. 2018, Dong et al. 2019). In der Literatur finden sich gegenwärtig entsprechende Arbeiten bei Flachs (Sauer et al. 2016), Maniok (Hummel et al. 2018) und Reis (Wang et al. 2015, Li et al. 2016a). Als vielversprechend gilt derzeit, Pflanzen mit den Doppelmutationen TIPS oder TIPA auszustatten, von denen bekannt ist, dass sie eine hohe Resistenz bringen. TIPS führt in der EPSPS zu den beiden Aminosäuresubstitutionen Thr-102-Ile und Pro-106-Ser und TIPA resultiert in Thr-102-Ile und Pro-106-Ala (Sauer et al. 2016, Li et al. 2016a, Hummel et al. 2018). Ob die damit erzielbare Glyphosat-Resistenz auch kommerziell verwertbar ist, ohne weitere Veränderungen zu erzeugen, ist jedoch fraglich. Die bekannten Resistenzmutationen sind meist mit Funktionseinbussen der EPSPS verbunden und die bisherigen Erfahrungen mit TIPS und TIPA deuten darauf hin, dass zusätzlich zu den Punktmutationen auch eine Überproduktion der mutierten EPSPS notwendig sein dürfte, um eine robuste Glyphosat-Resistenz zu erzeugen (Ortega et al. 2018, Hummel et al. 2018, Sammons et al. 2018, Dong et al. 2019). Für die Notwendigkeit einer Überproduktion spricht

auch das Beispiel des GA21-Mais. Dieser transgene Mais, den Monsanto Ende der 1990er auf den Markt brachte, bildet eine Mais-eigene EPSPS mit TIPS. Die Robustheit seiner Glyphosat-Resistenz kommt jedoch nur dadurch zu Stande, dass Monsanto das korrespondierende *epsps*-Gen gemeinsam mit einem starken Promotor sowie in dreifacher Kopie ins Erbgut inserierte.

Kürzlich wurde bei einer Wildart eine 12-Basenpaar lange Insertion im Promotor eines *epsps*-Gens entdeckt, die eine Überexpression auslöst und deshalb mit einer Glyphosat-Resistenz in Verbindung steht (Zhang et al. 2018a). Ob dies ein Vorbild sein kann, um bei Kulturpflanzen eine Überproduktion Glyphosat-unempfindlicher EPSPS zu erzielen, bleibt unklar.

Corteva Agriscience testet derzeit EPSPS-Varianten auf ihre Funktionalität, die zusätzlich zu TIPS oder TIPA weitere, künstlich erzeugte Mutationen aufweisen (Dong et al. 2018/2019). Falls sich geeignete Mutationen finden lassen, könnten sie mittels Genomeditierung gezielt im Erbgut von Pflanzen erzeugt werden.

#### **4.4.4 GS-Hemmer**

Die beiden GS-Hemmer Glufosinat und Bialaphos wirken giftig auf Pflanzen, weil sie die Glutaminsynthetase (GS) hemmen – ein Enzym, das Ammonium auf Glutamat überträgt und dadurch Glutamin bildet. Durch die Hemmung reichert sich in den Blättern Ammonium an, Glutamin und andere Aminosäuren hingegen fehlen. Als Folge bilden sich Chlorosen und die Pflanzen sterben ab. Da Mutationen in *gs*-Genen bekannt sind, die mit einer TSR-Resistenz gegen Glufosinat in Verbindung stehen (siehe Tabelle 3 und Abschnitt 5.11 im Anhang), gelten *gs*-Gene als mögliches Ziel, um mittels Verfahren der Genomeditierung transgenfreie Glufosinat-resistente Pflanzen zu erzeugen (James et al. 2018a/b, Gao & Jiang 2018). Offen ist dabei jedoch, ob die Erzeugung einer TSR-Mutation im *gs*-Gen genügt, um eine kommerziell verwertbare Resistenz zu erreichen. Laut James et al. (2018a/b) ist vielmehr davon auszugehen, dass eine robuste Resistenz nur dann erzielt werden kann, wenn zusätzlich eine Überproduktion der Glufosinat-unempfindlichen GS erfolgt. In der Literatur finden sich derzeit keine Arbeiten zur Herstellung transgenfreier Glufosinat-resistenter Pflanzen mittels Genomeditierung.

#### **4.4.5 HPPD-Hemmer**

HPPD-Hemmer sind giftig für sensitive Pflanzen, weil sie die Aktivität der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) blockieren und dadurch dazu führen, dass die Pflanzen weder Plastoquinon noch Carotinoide bilden können. Da mehrere Patentschriften Mutationen in *hppd*-Genen beschreiben, die mit einer TSR-Resistenz in Verbindung stehen (Boudec et al. 2001, Busch et al. 2011, Hawkes et al. 2012, Pasternak et al. 2017, Gao & Jiang 2018), könnten *hppd*-Gene ein mögliches Ziel sein, um via Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen zu erzeugen. Entsprechende Arbeiten finden sich in der Literatur bisher jedoch nicht (Abschnitt 5.7 im Anhang).

Ob die gezielte Erzeugung von TSR-Mutationen in *hppd*-Genen ausreicht, um eine kommerziell verwertbare Resistenz zu erzielen, bleibt unklar. Da TSR-Mutationen die katalytische Aktivität der HPPD schmälern dürften und Mutagenese-Studien darauf hindeuten, dass einzelne Mutationen noch keine ausreichende Resistenz verleihen (Kaundun et al. 2017), ist anzunehmen, dass zusätzlich eine Überproduktion der unempfindlichen HPPD notwendig sein könnte. Für diese Annahme spricht auch das Beispiel der SYHT0H2-Soja von Syngenta, die unter anderem resistent gegen

den HPPD-Hemmer Mesotrion ist. Um diese Resistenz zu erzeugen, musste nicht nur das Gen für eine unempfindliche HPPD aus Hafer übertragen werden, sondern auch mehrere regulatorische Elemente, die für eine Überexpression des transferierten *hppd*-Gens sorgen.

#### **4.4.6 Mikrotubuli-Hemmer**

Mikrotubuli-Hemmer wirken giftig auf Pflanzen, weil sie an deren Tubulin binden, dadurch die Polymersierung der Mikrotubuli unterbrechen und so schliesslich die Teilung und Dehnung der Zellen stoppen. Mikrotubuli sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgebaut sind. Im  $\alpha$ -Tubulin sind acht Positionen bekannt, an denen Aminosäuresubstitutionen dazu führen können, dass die Empfindlichkeit gegenüber einzelnen Mikrotubuli-Hemmern sinkt (Tabelle 3 und Abschnitt 5.13 im Anhang). Da TSR-Mutationen bekannt sind, sind die Gene für  $\alpha$ -Tubulin Kandidaten für die Herstellung transgenfreier HR-Pflanzen mittels Genomeditierung (Endo & Toki 2013). Dass die Resistenz – anders als bei den TS-Mechanismen bei den anderen Wirkstoffgruppen – rezessiv vererbt ist (Powles & Yu 2010), sollte kein Hindernis sein, da sich mit Verfahren der Genomeditierung Homozygotie herstellen lässt. Ob sich in Kulturpflanzen durch das gezielte Mutieren des  $\alpha$ -Tubulins eine Resistenz erzeugen lässt, die kommerziell verwertbar ist, kann hier nicht abschliessend beantwortet werden. In der Literatur finden sich gegenwärtig keine entsprechenden Arbeiten. Gegen eine Verwertbarkeit spricht, dass TSR-Mutationen im  $\alpha$ -Tubulingen die Funktion des Tubulins einschränken und Finesseinbussen auslösen können (Darmency et al. 2011/2017, Chu et al. 2018). Bei Kolbenhirse führte das Einkreuzen eines mutierten  $\alpha$ -Tubulins aus einer Wildart zwar zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Mikrotubuli-Hemmern aus der Familie der Dinitroaniline, aber die Erhöhung war zu niedrig, um Unkräuter ausreichend bekämpfen zu können, weshalb eine Kommerzialisierung ausblieb (Darmency et al. 2017).

#### **4.4.7 PDS-Hemmer**

PDS-Hemmer wirken giftig auf Pflanzen, weil sie an die Phytoen-Desaturase (PDS) binden und dadurch die Biosynthese von Carotenoiden blockieren. Da Mutationen im *pds*-Gen bekannt sind, die mit einer TS-Resistenz in Verbindung stehen (Tabelle 3 und Abschnitt 5.6 im Anhang), gelten *pds*-Gene als mögliche Ziele, um via Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen zu erzeugen (Brausemann et al. 2017, Gao & Jiang 2018). In der Literatur finden sich gegenwärtig jedoch keine entsprechenden Arbeiten.

Brausemann et al. (2017) nennen insbesondere die Bindungsstelle des PDS-Hemmers Norflurazon als möglichen Ort, an dem gezielte Punktmutationen zu einer Herbizidresistenz führen könnten. Diese Bindungsstelle liegt an der Position Arg-304 der PDS und bei der Grundnessel ist bekannt, dass Substitutionen des Arginins zu Serin, Cystein oder Histidin zu einer Resistenz führen können (Michel et al. 2004, Benoit & Les 2013). Zudem überleben Arabidopsis-Pflanzen, die eine PDS-Version mit Arg-304 Mutationen bilden, eine Behandlung mit Norflurazon (Arias et al. 2006). Unklar ist jedoch, wie sich Mutationen an der Position Arg-304 auf die Aktivität der PDS auswirken (Koschmieder et al. 2017, Brausemann et al. 2017). Falls die Mutationen die Aktivität schwächen, könnte dies einer kommerziellen Verwertung der Herbizidresistenz entgegenstehen.

#### **4.4.8 PPO-Hemmer**

PPO-Hemmer wirken giftig auf Pflanzen, weil sie die Aktivität der Protoporphyrinogen-Oxidase (PPO) blockieren und dadurch eine Akkumulation des photoaktiven Protoporphyrinogen IX verursachen (Green & Owen 2011). Da Mutationen in *ppo*-Genen bekannt sind, die mit einer TS-Resistenz in Verbindung stehen (Tabelle 3 und Abschnitt 5.5 im Anhang), gelten PPO-codierende Gene als potenzielle Ziele, um bei Kulturpflanzen mit Genomeditierung transgenfreie HR-Sorten zu erzeugen (Endo & Toki 2013, Gao & Jiang 2018). Entsprechende Züchtungsvorhaben finden sich in der Literatur jedoch nicht. Bei *Arabidopsis* hingegen beschreiben zwei Publikationen, wie die gezielte Erzeugung zweier Punktmutationen im *ppo*-Gen zu einer Resistenz gegen den PPO-Hemmer Butafenacil führt (de Pater et al. 2013/2018). Die Resistenz diente dabei als Selektionssystem, um die Machbarkeit neuer Verfahren der Genomeditierung prüfen zu können.

Pflanzen besitzen in der Regel zwei Isoformen der PPO, wobei die eine in den Mitochondrien und die andere in den Chloroplasten wirkt. Um eine Resistenz zu erzeugen, dürfte es notwendig sein, beide Isoformen gezielt zu verändern. Da die TSR-Mutationen dazu tendieren, die Funktion der PPO zu schwächen (Li et al. 2003), ist es denkbar, dass zusätzlich zur Erzeugung der Mutationen eine Überproduktion der mutierten PPO notwendig sein könnte, um ein kommerziell verwertbares Resistenzniveau zu erreichen.

#### **4.4.9 PSI-Hemmer**

Die beiden PSI-Hemmer Paraquat und Diquat wirken giftig auf Pflanzen, weil sie im Photosystem I (PSI) als Elektronenfänger fungieren und dadurch einen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies auslösen, was zum Tod der Pflanzenzellen führt. Da PSI-Hemmer kein Zielprotein haben, können nur NTSR-Mutationen Kandidaten sein, um mittels Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen zu erzeugen. Ein möglicher Kandidat ist der vorangestellte offene Leseraster (uORF) des Enzyms LsGGP2. Bei Kopfsalat wurde kürzlich mit CRISPR gezeigt, dass Indels in diesem uORF die Produktion von Ascorbinsäure ankurbeln und dadurch die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und Paraquat senken können (Zhang et al. 2018b). Ob sich damit bei Kopfsalat oder anderen Kulturarten eine kommerziell verwertbare Resistenz erzeugen lässt, bleibt unklar.

#### **4.4.10 PSII-Hemmer**

PSII-Hemmer wirken giftig auf Pflanzen, weil sie in Chloroplasten an das D1-Protein des Photosystem II (PSII)-Komplexes binden und damit nicht nur die Photosynthese hemmen, sondern auch den Elektronentransport blockieren. Die Transportblockade führt zur Bildung reaktiver Moleküle, die die Pflanzen schliesslich zum Absterben bringen. Da Aminosäuresubstitutionen bekannt sind, die das D1-Protein unempfindlich für PSII-Hemmer machen (Tabelle 3 und Abschnitt 5.3 im Anhang), könnte es möglich sein, mit Genomeditierungsverfahren transgenfreie Pflanzen zu erzeugen, die resistent gegen PSII-Hemmer sind. Anders als bei den anderen Wirkstoffgruppen müssten die Resistenzmutationen jedoch nicht im Kerngenom, sondern im Erbgut der Chloroplasten erzeugt werden. Dort findet sich nämlich das *psbA*-Gen, das für das D1-Protein codiert. Ob sich das Chloroplastengenom mit den gängigen Genomeditierungsverfahren gezielt verändern lässt, ist derzeit unklar. In der Literatur finden sich keine entsprechenden Arbeiten (Piatek et al. 2018; siehe Abschnitt 4.1.8). Von einer Arbeitsgruppe in Kanada ist jedoch bekannt,

dass mit CRISPR Kichererbsen erzeugen will, die gegen den PSII-Hemmer Metribuzin resistent sind (Saskpulse 2018). Offen bleibt auch, ob sich TSR-Mutationen im *psbA*-Gen erzeugen lassen, die zu einer ausreichend hohen Resistenz führen, ohne das Ertragsniveau zu senken. Von der Aminosäuresubstitution Ser-264-Gly beispielsweise ist bekannt, dass sie zwar eine hohe Resistenz bringt, gleichzeitig aber auch substantielle Fitnesskosten verursacht (Powles & Yu 2010, Darmeny et al. 2017).

#### **4.4.11 Synthetische Auxine**

Synthetische Auxine haben eine ähnliche Aktivität wie das pflanzeigene Hormon Indol-3-Essigsäure. Anders als die pflanzeigenen Auxine bringen sie jedoch das Wachstum sensitiver Pflanzen durcheinander und lassen sie wachsen, „bis sie tot sind“. Wie diese Wirkung im Detail abläuft, ist nicht genau bekannt (Figueiredo et al. 2018). In der Literatur wird der Wirkmechanismus als „komplex“ bewertet (Goggin et al. 2018). Die Wirkorte der verschiedenen synthetischen Auxine können sich unterscheiden und bestehen aus einem großen Komplex von Auxin-bindenden Proteinen, transkriptionellen Repressoren und Aktivatoren, Ubiquitin-verwandten Proteinen und Proteasomen (Dinesh et al. 2016, Goggin et al. 2018).

Im Laufe der vorliegenden Arbeit sind keine Vorhaben entdeckt worden, bei denen durch gezielte oder ungezielte Mutagenese versucht wurde, in Kulturarten eine TS-Resistenz gegen synthetische Auxine zu erzeugen. Ob sich Sorten mit einer TS-Resistenz via Mutagenese überhaupt erzeugen lassen, wird unterschiedlich beurteilt. Endo & Toki (2013) stufen diese Strategie als problematisch ein, weil synthetische Auxine einen komplexen Wirkmechanismus haben und verschiedene Auxin-Rezeptoren unterschiedlich auf unterschiedliche Auxin-Herbizide reagieren. Gleason et al. (2011) hingegen halten es für möglich, bei Kulturarten mittels TILLING Mutationen in den Enzymen des Auxin-Rezeptor-Signalisierungs-Komplexes zu identifizieren, die Herbizidresistenz verleihen. Identifizierte Mutationen könnten dann auch mit Verfahren der Genomeditorierung erzeugt werden.

Eine Gly-Asp-Substitution im Auxin-Corezeptor IAA16 ist derzeit die einzige aus Wildarten bekannte Mutation, die zu einer TS-Resistenz gegen synthetische Auxine führt. Ob sie bei Kulturarten für die Herstellung von HR-Sorten nutzbar ist, bleibt offen. In der Wildart, in der sie entdeckt wurde, ist sie mit Fitnessseinbußen verbunden (LeClere et al. 2018).

#### **4.4.12 Zellulosesynthese-Hemmer**

ZS-Hemmer sind giftig für Pflanzen, weil sie die Produktion von Zellulose und dadurch die Bildung der Zellwände unterbinden. Wie die einzelnen Wirkstoffe genau fungieren, ist Gegenstand der Forschung. Nach Stand des Wissens haben sie im komplexen Syntheseweg der Zellulose unterschiedliche molekulare Wirkungsorte, wobei sie die Synthese entweder direkt oder indirekt hemmen können (Brabham et al. 2014, Tateno et al. 2016). Einer der Wirkungsorte können Cellulose Synthase A (CESA)-Enzyme sein.

In den gesichteten Unterlagen sind keine Mutationen dokumentiert, die Kulturpflanzen eine TS-Resistenz gegen ZS-Hemmer verleihen. Auch bei Wildpflanzen sind keine TSR-Mutationen bekannt (Heap 2018). Bei Arabidopsis hingegen sind Punktmutationen in *cesa*-Genen beschrieben, die die Modellpflanze unempfindlich gegen gewisse ZS-Hemmer machen. Ob diese Punktmutatio-

nen nutzbar sind, um in Kulturpflanzen eine kommerziell verwertbare Herbizidresistenz zu erzeugen, bleibt jedoch unklar. In der Literatur finden sich keine entsprechenden Arbeiten. Bei Arabidopsis sind die Punktmutationen – zumindest in einigen Fällen – mit Fitnessseinbussen verbunden (Brabham et al. 2014, Tateno et al. 2016).

## 4.5 Genomeditierte HR-Kulturpflanzen

Im Laufe der vorliegenden Arbeit sind in der wissenschaftlichen Literatur 18 Veröffentlichungen gefunden worden, in denen die Herstellung von punktmutierten HR-Kulturpflanzen mit Verfahren der Genomeditierung beschrieben wird. Tabelle 4 gibt diese Veröffentlichungen wieder. Dreizehn der publizierten Arbeiten handeln von Resistenzen gegen ALS-Hemmer, vier Arbeiten befassen sich mit der Erzeugung von Glyphosat-Resistenz und bei einer der Arbeiten geht es um Resistenz gegen ACC-Hemmer.

Wie bereits weiter oben erwähnt sind bei Raps bereits punktmutierte HR-Sorten bis zur Marktreife entwickelt worden: Der *SU*-Raps von Cibus ist in Nordamerika kommerziell erhältlich (Cibus 2018a/b), und der *Clearfield*-Raps CLB-1 von BASF ist in Kanada für den Anbau bewilligt (CFIA 2014).

**Tabelle 4**  
**Veröffentlichte Arbeiten zur Herstellung von HR-Kulturpflanzen mittels gezielter Mutagenese**

Kulturpflanze	Erzeugte Veränderung	Wirkstoffgruppe	Verfahren	Quelle
Flachs	EPSPS mit Thr-102-Ile + Pro-106-Ala	EPSPS-Hemmer	CRISPR	Sauer et al. 2016
Kartoffel	ALS mit Trp-574-Leu, Ser-653-Thr	ALS-Hemmer	CRISPR/TALEN	Butler et al. 2016
Mais	ALS mit Pro-165-Ser	ALS-Hemmer	CRISPR	Svitashev et al. 2015/2016
Maniok	EPSPS mit Thr-102-Ile + Pro-106-Ala	EPSPS-Hemmer	CRISPR	Hummel et al. 2018
Raps	ALS mit Trp-574-Leu	ALS-Hemmer	ODM	Gocal et al. 2015
Reis	ACC mit Cys-2088-Arg	ACC-Hemmer	CRISPR	Li et al. 2018a
	ALS mit Ala-122-Val	ALS-Hemmer	CRISPR	Shimatani et al. 2017/2018
	ALS mit Trp-574-Leu+Ser-653-Ile	ALS-Hemmer	T-DNA-Mut.	Endo et al. 2007
	ALS mit Trp-574-Leu+Ser-653-Ile	ALS-Hemmer	CRISPR	Sun et al. 2016, Butt et al. 2017, Li et al. 2018c
	ALS mit Trp-574-Leu+Ser-653-Ile	ALS-Hemmer	TALEN	Li et al. 2016b
	EPSPS mit Pro-106-Leu	EPSPS-Hemmer	TALEN	Wang et al. 2015
	EPSPS mit Thr-102-Ile + Pro-106-Ser	EPSPS-Hemmer	CRISPR	Li et al. 2016a
Soja	ALS mit Pro-197-Ser	ALS-Hemmer	CRISPR	Li et al. 2015
Wassermelone	ALS mit Pro-197-Ser	ALS-Hemmer	CRISPR	Tian et al. 2018

ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase; ALS: Acetolactate-Synthase; EPSPS: 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase.

Von den Firmen Calyxt, Cibus und Bioheuris ist bekannt, dass sie Verfahren der Genomeditierung einsetzen, um transgenfreie HR-Sorten herzustellen. Gegen welche Wirkstoffgruppen dabei Resistenzen entwickelt werden, bleibt jedoch meist unbekannt. Calyxt arbeitet laut Firmenwebseite bei Raps, Soja, Weizen und Luzerne an der Entwicklung von HR-Sorten und will erste Produkte ab 2024 auf den Markt zu bringen. Cibus entwickelt Herbizidresistenz bei Raps, Reis, Mais, Flachs, Weizen und Kartoffeln. Und Bioheuris will bei Soja, Sorghum und Weizen HR-Sorten herstellen.

## 5. Anhang

### 5.1 HRAC-Gruppe A: ACC-Hemmer

Die HRAC-Gruppe A enthält die ACC-Hemmer. Mitte der 1970er sind erstmals Vertreter dieser Wirkstoffgruppe auf den Markt gekommen. Heute enthält die Gruppe 21 Substanzen, die aus einer der folgenden drei chemischen Familien stammen (Heap 2018): Cyclohexandione (DIM), Phenylpyrazoline (DEN) und Aryloxyphenoxypropionate (FOP). Herbizide mit ACC-Hemmern wirken in der Regel nicht bei dikotyledonen Pflanzen.

#### **Wirkmechanismus**

Wirkstoffe der HRAC-Gruppe A hemmen die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC oder ACCase). Mit diesem Enzym bilden Pflanzen aus Acetyl-CoA und Kohlenstoffdioxid Malonyl-CoA und somit eine Substanz, die für die Synthese von Fettsäuren unerlässlich ist. Ohne Lipide können Pflanzen die Zellmembrane nicht aufbauen und sterben ab.

#### **Resistenzmechanismen**

Bei 48 Wildarten sind Fälle bekannt, in denen Pflanzen eine Resistenz gegen ACC-Hemmer entwickelt haben (Heap 2018). Ursache für die Unempfindlichkeit können TS- und/oder NTS-Mechanismen sein (Kaundun et al. 2014, Vrbničanin et al. 2017).

Die NTS-Fälle beruhen meistens auf der Fähigkeit der Pflanzen, die FOP-, DIM- oder DEN-Wirkstoffe in ungiftige Substanzen zu verstoffwechseln (Kaundun et al. 2014, Vrbničanin et al. 2017). Zumindest in einem Fall werden dabei Aminosäuresubstitutionen in den beiden Enzymen Glutathion-S-Transferases und UDP-Glycosyltransferase als Ursache für die Resistenz diskutiert (Pan et al. 2016a). In einem weiteren NTS-Fall ist ein Mechanismus entdeckt worden, der auf einer microRNA (miRNA) beruht: Eine erhöhte Produktion der miRNA mir397 führt zu einer verminderten Bildung von Laccase, was wiederum die Empfindlichkeit gegenüber dem ACC-Hemmer Fenoxap-P-ethyl senkt (Pan et al. 2016b/2017).

#### **Tabelle 5:**

**Aminosäuresubstitutionen in der ACC, die mit einer Resistenz gegen ACC-Hemmer in Verbindung gebracht werden.**

Ile-1781-Leu/Val/Arg/Thr	Asp-2078-Gly
Trp-1999-Cys/Leu/Ser	Cys-2088-Arg
Trp-2027-Cys	Gly-2096-Ala/Ser
Ile-2041-Asn/Val	

---

Quellen: Vrbničanin et al. (2017), Kaundun (2014) und Beckie & Tardiff (2012).

Die genetische Basis für TS-Resistenzen sind Mutationen im acc-Gen, die an einer der folgenden sieben Positionen der ACC zum Austausch einer Aminosäure führen: 1781, 1999, 2027, 2041, 2078, 2088 und 2096 (Tabelle 5; Powles & Yu 2010, Beckie & Tardiff 2012, Kaundun 2014, Vrb-

ničanin et al. 2017). Bisher sind vierzehn allelische Varianten des Gens bekannt, die die Empfindlichkeit gegenüber ACC-Hemmern verringern (Barrantes-Santamaría et al. 2018). Bei einem der bekannten TS-Fälle geht die Resistenz auf eine Vervielfachung des *acc*-Gens zurück (Laforest et al. 2018).

### Resistenzzüchtung

Sorten mit einer Resistenz gegen ACC-Hemmern gelten vor allem bei einkeimblättrigen Kulturarten als interessant (Kaundun 2014). Die bisherigen Strategien bei der Entwicklung entsprechender Pflanzen beruhen vorwiegend auf Selektion, Einkreuzung und/oder Erzeugung von Mutationen im *acc*-Gen, die eine Resistenz gegen ACC-Hemmer vermitteln (Tabelle 6). Zumindest bei Reis, Mais, Weizen und Kolbenhirse hat die Nutzung solcher Mutationen zur Kommerzialisierung von HR-Sorten geführt. In Europa bieten der Konzern BASF und seine Partner Cycloxydim-resistente Maissorten an (Markenname *DUO System*; Vanèetoviæ et al. 2014). In den USA hat BASF Sethoxydim-resistente Sorten von Süßmais (*Poast Protected*) sowie Quizalofop-resistente Reissorten (*Provisia*) im Angebot (BASF 2018). Limagrain hat in den USA kürzlich Quizalofop-resistente Weizensorten (*Coaxium*) lanciert (Hopkins 2017). Und in China sind Sethoxydim-resistente Kolbenhirsensorten auf dem Markt (Darmency et al. 2017).

**Tabelle 6:**  
Vorhaben zur Züchtung von Pflanzen mit Resistenz gegen ACC-Hemmer.

Pflanze	Genetische Basis	Herbizid	Verfahren	Quelle
Bermudagrass	<i>unbekannt (NTSR-Mechanismus)</i>	Sethoxydim	Selektion	Grimshaw et al. 2014
Flechtstrausgras	Native ACC mit Ile-1781-Leu	Sethoxydim	In-Vitro Selektion	Heckart et al. 2016
Kolbenhirse	Borstenhirse-ACC mit Ile-1781-Leu	Sethoxydim	Einkreuzung	Darmency et al. 2017
Mais	Native ACC mit Ile-1781-Leu	Sethoxydim	In-Vitro Selektion	Parker et al. 1990
	AAD-1 aus <i>S. herbicidovorans</i>	Quizalofop	Transgenese	Herman et al. 2010
Papsalum-Gras	Native ACC mit Ile-1781-Leu	Sethoxydim	In-Vitro Selektion	Heckart et al. 2010
Reis	Native ACC mit Ile-1781-Leu	Cycloxydim	In-Vitro Selektion	Mankin et al. 2011
	Native ACC mit Trp-2027-Cys	Quizalofop	Mutagenese	Mankin et al. 2012
	Native ACC mit Cys-2088-Arg	Haloxypop	CRISPR	Li et al. 2018a
	Native ACC mit Gly-2096-Ser	Quizalofop	AZ-Mutagenese	Hinga et al. 2011
	Überexpression miR397	Fenoxaprop	Transgenese	Pan et al. 2017
Sorghum	Mohrenhirse-ACC mit Trp-2027-Cys	Fluazifop	Einkreuzung	Tuinstra & Al-Khatib 2017
Weizen	Native ACC mit Ala-2004-Val	Quizalofop	EMS-Mutagenese	Ostlie et al. 2012

EMS: Ethylmethansulfonat;

Der Einsatz der Gentechnik hat bisher allein bei Mais in einer kommerziellen Resistenz gegen ACC-Hemmer resultiert (Duke 2014). Das Gen, das dabei genutzt wird, ist *aad-1* aus *Spingobium herbicidovorans*. Es codiert für eine Dioxygenase, die neben 2,4-D auch ACC-Hemmer wie

Quizalofop entgiften kann (Wright et al. 2010). Maissorten mit diesem Gen werden in den USA und Kanada von Corteva Agriscience unter dem Markennamen Enlist vermarktet.

Bei Reis ist kürzlich gezeigt worden, dass die Überexpression der miRNA miR397 die Empfindlichkeit gegenüber dem ACC-Hemmer Fenaxoprop-P-ethyl senken kann (Pan et al. 2017).

### **Genomeditierung und Resistenz gegen ACC-Hemmer**

Mutationen im acc-Gen, die zu einer TS-Resistenz gegen ACC-Hemmer führen können, sind bekannt (Tabelle 5). Laut Endo & Toki (2013) und Gao & Jiang (2018) sind ACC-codierende Gene denn auch potenzielle Ziele, um mit Genomeditierung transgenfreie HR-Sorten zu erzeugen. In der Literatur findet sich gegenwärtig eine entsprechende Arbeit. Li et al. (2018a) haben bei Reis eine Resistenz gegen ACC-Hemmer erzeugt, indem sie mit CRISPR eine Mutation ins acc-Gen einführten, die aus einem Raygras bekannt ist.

Da die Nutzung von TSR-Mutationen in herkömmlichen Züchtungsprogrammen bei Reis (BASF 2018), Mais (Vanèetoviæ et al. 2014), Weizen (Hopkins 2017) und Kolbenhirse (Darmenc et al. 2017) zur Kommerzialisierung von HR-Sorten geführt hat, ist anzunehmen, dass sich auch via Genomeditierung Resistenzen erzeugen lassen, die ausreichend hoch für eine kommerzielle Verwertung sind.

Neben den TSR-Mutationen sind auch zwei NTSR-Mutationen bekannt, die mit einer Resistenz gegen ACC-Hemmer in Verbindung stehen: Aminosäuresubstitutionen in den beiden Enzymen Glutathion-S-Transferase und UDP-Glycosyltransferase sollen eine Entgiftung ermöglichen (Pan et al. 2016a). Ob diese NTSR-Mutationen Kandidaten für die Herstellung transgener HR-Sorten sind, bleibt jedoch offen.

Zu nennen ist schliesslich noch die miRNA mir397. Da bekannt ist, dass ihre Überproduktion die Empfindlichkeit gegenüber dem ACC-Hemmer Fenoxaprop-P-ethyl senken kann, gehen Mangrathia et al. (2017) davon aus, dass regulatorische Sequenzen von mir397 gute Kandidaten sind, um mittel Genomeditierung Herbizidresistenz zu erzeugen.

## **5.2 HRAC-Gruppe B: ALS-Hemmer**

Die HRAC-Gruppe B besteht aus den ALS-Hemmern und enthält 57 unterschiedliche Wirkstoffe (Heap 2018). Diese Stoffe können einer der folgenden fünf chemischen Familien zugeordnet werden: den Imidazolinen (IMI), den Sulfonylharnstoffen (SU), den Triazolopyrimidinen (TP), den Pyrimidinylthiobenzoaten (PB) oder den Sulfonylaminocarbonyl-Triazolinonen (SCT). ALS-Hemmer kamen in den frühen 1980er erstmals auf den Markt. Heute haben sie einen Marktanteil von rund 16 Prozent und sind nach Glyphosat die am häufigsten verkauften Herbizide (Peters & Streck 2018).

### **Wirkmechanismus**

Die Wirkstoffe der HRAC-Gruppe B wirken giftig auf Pflanzen, indem sie die Acetolactate-Synthase (ALS) hemmen. Dieses Enzym ist an der Bildung der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin beteiligt.

## Resistenzmechanismen

Bei 160 Wildarten sind Fälle bekannt, in denen Pflanzen resistent gegen ALS-Inhibitoren geworden sind (Heap 2018). Die am häufigsten beobachtete Ursache für die Resistenz sind Mutationen im Zielprotein der Herbizide (Powles & Yu 2010, Yu & Powles 2014). Mindestens 28 Aminosäuresubstitutionen an acht Stellen des *als*-Gens sind in verschiedenen Wildarten als Ursache für die Resistenz identifiziert worden (Tabelle 7; Tranel et al. 2018). Je nach Ort und Art der Substitution sind Mono- oder Kreuzresistenzen zu beobachten. Die Asp-376-Glu Mutation zum Beispiel verleiht Resistenz gegen Wirkstoffe aus allen fünf chemischen Familien der ALS-Hemmer. Trp-574-Gly sorgt in der Regel für Resistenz gegen SU-, IMI-, PB- und TB-Wirkstoffe. Ser-653-Thr wiederum wirkt allein bei IMI-Wirkstoffen und Pro-197-Ser ist hauptsächlich gegen Wirkstoffe der Familie der SU wirksam (Tranel et al. 2018).

Neben den TS-Resistenzfällen sind bei Wildarten auch Fälle bekannt, in denen NTS-Mechanismen allein oder in Kombination mit TS-Mechanismen die Empfindlichkeit gegenüber ALS-Inhibitoren senken (Yu & Powles 2014). Am häufigsten sind dabei Entgiftungsmechanismen die Ursache für die Resistenz. Zu den Enzymen, die an den NTS-Mechanismen beteiligt sind, gehören P450 Monoxygenasen, Glutathion-S-Transferasen, Glycosyltransferasen und ABC-Transporter (Yu & Powles 2014, Liu et al. 2018)

Tabelle 7

Aminosäuresubstitutionen in der ALS, die mit einer Resistenz gegen ALS-Hemmer in Verbindung gebracht werden.

Ala-122-Thr/Val/Tyr/Ser/Asn	Arg-377-His
Pro-197-Thr/His/Arg/Leu/Gln/Ala/Ile/Ser/Asn	Trp-574-Leu/Gly/Met/Arg
Ala-205-Val/Phe	Ser-653-Thr/Asn/Ile
Asp-376-Glu	Gly-654-Glu/Asp

Quelle: Tranel et al. (2018).

## Resistenzzüchtung

Programme zur Züchtung von Sorten, die resistent gegen ALS-Hemmer sind, gibt es bei mehreren Kulturarten. Sie beruhen auf der Nutzung pflanzlicher Genen, die für eine Herbizidunempfindliche ALS codieren. Solche Gene werden einerseits mit gentechnischen Methoden in Pflanzen transferiert. Bei Flachs, Nelke, Soja, Mais und Baumwolle sind entsprechende Sorten für den Anbau zugelassen worden (ISAAA 2019). Andererseits werden solche Gene auch eingekreuzt oder durch chemische Mutagenese und Verfahren der Genomeditierung direkt in den Pflanzen erzeugt (Tabelle 8). Bei mehreren Kulturarten sind entsprechende Sorten lanciert worden. BASF hat bei Raps, Reis, Mais, Gerste, Linsen, Weizen, Hartweizen, Sonnenblume und Sareptasenf Imidazoline-resistente Sorten (Marke *Clearfield*) entwickelt. DuPont Pioneer hat bei Soja (*BOLT* und *STS*), Sonnenblume (*ExpressSun*) und Sorghum (*Inzen*) Sorten hergestellt, die gegen Sulfonylharnstoffe resistent sind. Bayer CropScience und KWS wiederum lancieren derzeit die *Conviso*-Zuckerrübe. Zu nennen bleibt der Sulfonylharnstoff-resistente Raps der Firma Cibus, die weltweit erste kommerzialisierte Pflanze, die mit Genomeditierung hergestellt worden ist.

**Tabelle 8**

**Vorhaben zur Herstellung von ALS-Hemmer-resistenten Pflanzen mittels gezielter oder ungezielter Mutagenese**

Pflanze	Substitution	Wirkstoff- familie	Verfahren	Quelle
Gerste	Ser-653-Asn	IMI	AZ-Mutagenese	Lee et al. 2011
Hartweizen	Ser-653-Asn	IMI	EMS-Mutagenese	Health Canada 2007
Kartoffel	Trp-574-Leu, Ser-653-Thr	IMI	CRISPR/TALEN	Butler et al. 2016
Linse	<i>n.b.</i>	IMI	EMS-Mutagenese	Slinkard et al. 2007
Mais	Ala-122-Thr	IMI	EMS-Mutagenese	Tan et al. 2005
	Pro-165-Ser	SU	CRISPR	Svitashev et al. 2015/2016
	Trp-574-Leu	IMI + SU	In Vitro Selektion	Tan et al. 2005
	Ser-653-Asn	IMI	In Vitro Selektion	Tan et al. 2005
Raps	Ala-122-Thr+Ser-653-Asp	IMI	ODM	CFIA 2014
	Trp-574-Leu	IMI + SU	ODM	BCH 2016, CFIA 2013
	Trp-574-Leu	IMI + SU	EMS-Mutagenese	Hu et al. 2017
	Ser-653-Asn	IMI	Mutagenese	Tan et al. 2005
Reis	Ala-122-Thr	IMI	NA-Mutagenese	Livore et al. 2011
	Ala-122-Val	IMI	CRISPR	Shimatani et al. 2017/2018
	Trp-574-Leu+Ser-653-Ile	PB	T-DNA-Mutagenese	Endo et al. 2007
	Trp-574-Leu+Ser-653-Ile	PB	CRISPR/TALEN	Butt et al. 2017, Li et al. 2016b/2018c
	Ser-653-Asp	IMI	EMS-Mutagenese	Croughan 2002
	Gly-654-Glu	IMI	EMS-Mutagenese	Croughan 1998
	Sareptasenf	Ser-653-Asn	IMI	EMS-Mutagenese
Soja	Pro-197-Ser	SU	EMS-Mutagenese	Sebastian et al. 1989
	Pro-197-Ser	SU	CRISPR	Li et al. 2015
	Pro-197-Ser+Trp-574-Leu	SU	EMS-Mutagenese	Walter et al. 2014
Sonnenblume	Ala-122-Thr	IMI	EMS-Mutagenese	Sala et al. 2008
	Ala-205-Val	IMI	Selektion	Tan et al. 2005
	Pro-197-Leu	SU	Einkreuzung	Kaya 2015
Sorghum	Val-560-Ile+Trp-574-Leu	IMI+SU	Einkreuzung	Tuinstra & Al-Khatib 2008
	Ala-122-Thr	IMI	EMS-Mutagenese	Uriarte et al. 2014
Tritordeum	Ser-627-Asn	IMI	EMS-Mutagenese	Rodríguez-Suárez et al. 2009
Wassermelone	Pro-197-Ser	SU	CRISPR	Tian et al. 2018
Weizen	Ala-122-Thr	IMI	NA-Mutagenese	Li et al. 2008
	Ser-653-Asn	IMI	ZFN	Ran et al. 2018
Zuckerrohr	Ser-627-Asn	IMI	EMS-Mutagenese	Koetle et al. 2018
Zuckerrübe	Trp-574-xx	SCT+SU	In Vitro Selektion	Hain et al. 2012

**EMS:** Ethylmethansulfonat; **IMI:** Imidazoline; **NA:** Natriumazid; **PB:** Pyrimidinylthiobenzoate; **SCT:** Sulfonylaminocarbonyl-Triazolinonen; **SU:** Sulfonylharnstoffe.

### **Genomeditierung und Resistenz gegen ALS-Hemmer**

Da Mutationen im *als*-Gen bekannt sind, die zu einer TS-Resistenz führen können (Tabelle 7) sind ALS-codierende Gene potenzielle Ziele, um mit Verfahren der Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen herzustellen (Endo & Toki 2013, Gao & Jiang 2018). Bei Raps sind entsprechende Sorten bereits bis zur Marktreife entwickelt worden: Der *SU*-Raps von Cibus, der in Nordamerika kommerziell erhältlich ist (Cibus 2018a/b), und der *Clearfield*-Raps CLB-1 von BASF, der in Kanada für den Anbau bewilligt ist (CFIA 2014). Bei Mais, Reis, Soja, Weizen und Wassermelone finden sich entsprechende Arbeiten in der Literatur (Tabelle 8). Ob in diesen Arbeiten jeweils ein Resistenzniveau erreicht wurde, das ausreichend hoch für eine kommerzielle Verwertung ist, wurde hier nicht untersucht. Dass sich mit der Erzeugung von TSR-Mutationen kommerziell verwertbare Resistenzen gegen ALS-Hemmer erzielen lassen, zeigen jedoch nicht nur die editierten Rapsorten von BASF und Cibus sondern auch die erfolgreiche Nutzung von TSR-Mutationen in herkömmlichen Züchtungsprogrammen (siehe oben).

### **5.3 HRAC-Gruppen C1, C2 und C3: PSII-Hemmer**

Die HRAC-Gruppen C1, C2 und C3 bestehen aus Wirkstoffen, welche das Photosystem II hemmen. Die Gruppe C1 enthält 28 Wirkstoffe aus sechs chemischen Familien (Triazine, Triazinone, Triazolinone, Uracile, Pyridazinone und Phenylcarbamate; Heap 2018). Die Gruppe C2 hat 24 Mitglieder, die aus den chemischen Familien der Amide oder Harnstoffe stammen (Heap 2018). Und bei der Gruppe C3 sind es sechs verschiedene Wirkstoffe, die den chemischen Familien der Nitrile, Phenylpyridazine oder Benzothiadiazinone zugeordnet werden können (Heap 2018).

#### **Wirkmechanismus**

Die Wirkstoffe der HRAC-Gruppen C1, C2 und C3 wirken giftig auf Pflanzen, weil sie in Chloroplasten an das D1-Protein des Photosystem II (PSII)-Komplexes binden und damit nicht nur die Photosynthese hemmen, sondern auch den Elektronentransport blockieren. Die Transportblockade führt zur Bildung reaktiver Moleküle, die die Pflanzen schliesslich zum Absterben bringen. Die Wirkstoffe der drei Gruppen C1, C2 und C3 unterscheiden sich insofern in ihrer Aktion, als sie an verschiedene Stellen des D1-Proteins binden (Vrbničanin et al. 2017, Sardrood & Goltapeh 2018).

#### **Resistenzmechanismen**

Bei mehreren Wildarten sind Fälle, in denen Resistenzen gegen PSII-Hemmer aufgetreten sind: Bei 74 Wildarten gegen Wirkstoffe der Gruppe C1, bei 29 Arten gegen Wirkstoffe der Gruppe C2 und bei vier Arten gegen Wirkstoffe der Gruppe C3 (Heap et al. 2018). Die Grundlage für die Resistenzen können sowohl TS- wie auch NTS-Mechanismen sein (Vrbničanin et al. 2017). Bei den TS-Mechanismen sind mehrere Aminosäuresubstitutionen im D1-Protein als Ursache bekannt (Tabelle 9).

**Tabelle 9**

**Aminosäuresubstitutionen im D1-Protein, die mit einer Resistenz gegen PSII-Hemmer in Verbindung gebracht werden.**

Aminosäuresubstitution	PSII-Hemmer	Quelle
Leu-218-Val	Metribuzin, Metanitron	Thiel & Varrelmann 2014
Val-219-Ile	DCMU, Metribuzin, Propanil	Mengistu et al. 2000, Pedroso et al. 2016
Ala-251-Val	Metamitron	Mechant et al. 2008
Phe-255-Ile	Hexazinon	Perez-Jones et al. 2009
Ser-264-Gly/Thr	Atrazin, Diuron, Metamitron, Metribuzin	Ashworth et al. 2016
Asn-266-Thr	Bromoxynil, Hexazinon, Metribuzin, Terbacil	Park & Mallory-Smith 2006
Phe-274-Val	Atrazin, Diuron	Lu et al. 2019

### **Resistenzzüchtung**

Um Kulturpflanzen mit einer Resistenz gegen PSII-Hemmer herzustellen, sind bisher sowohl herkömmliche als auch gentechnische Methoden eingesetzt worden (Tabelle 10). Gentechnische Methoden kamen zum Einsatz, um ein Gen aus *Klebsiella pneumoniae* zu transferieren, das für eine Nitrilase codiert. Dieses Enzym kann in den Pflanzen den PSII-Hemmer Bromoxynil abbauen. Bei Raps und Baumwolle führte dieser Transfer zur Lancierung kommerzieller Sorten, die heute aber nicht mehr auf dem Markt erhältlich sind (Duke 2014).

In herkömmlichen Züchtungsprogrammen wurde mittels Mutagenese-Verfahren sowie Introgressionen versucht, HR-Sorten zu entwickeln. Bei Raps gelang dabei die Herstellung kommerzieller Sorten – und zwar durch das Einkreuzen eines Gens aus Rübsen, das für ein D1-Protein mit der Aminosäuresubstitution Ser-264-Gly codiert (Berversdorf et al. 1980). Da die Herbizidresistenz mit Ernteeinbussen verbunden ist, kamen die Sorten jedoch nur beschränkt zum Einsatz. Heute sind sie nur noch in Australien auf dem Markt (Beckert & Dessaux 2016) – unter anderem auch in Kombination mit einer transgenen Glyphosatresistenz. Bei der Kolbenhirse wurde ebenfalls ein Gen für ein D1-Protein mit Ser-264-Gly eingekreuzt. Hier kam die resultierenden Pflanzen wegen den wiederum auftretenden Ernteeinbussen nie als Sorte auf den Markt (Darmeny et al. 2017).

### **Genomeditierung und Resistenz gegen PSII-Hemmer**

Da Aminosäuresubstitutionen bekannt sind, die das D1-Protein unempfindlich für PSII-Hemmer machen (Tabelle 9), könnte es möglich sein, mit Genomeditierungsverfahren transgenfreie Pflanzen zu erzeugen, die resistent gegen PSII-Hemmer sind. Anders als bei den anderen Wirkstoffgruppen müssten die Resistenzmutationen jedoch nicht im Kerngenom, sondern im Erbgut der Chloroplasten erzeugt werden. Dort findet sich nämlich das *psbA*-Gen, das für das D1-Protein codiert. Ob sich das Chloroplastengenom mit den gängigen Genomeditierungsverfahren gezielt verändern lässt, ist derzeit unklar. In der Literatur finden sich keine entsprechenden Arbeiten (Piatek et al. 2018; siehe Abschnitt 4.1.8). Von einer Gruppe in Kanada ist jedoch bekannt, dass sie mit CRISPR Kichererbsen erzeugen will, die gegen den PSII-Hemmer Metribuzin resistent sind

(Saskpulse 2018). Offen bleibt zudem, ob sich TSR-Mutationen im *psbA*-Gen erzeugen lassen, die zu einer ausreichend hohen Resistenz führen, ohne das Ertragsniveau zu senken. Von der Aminosäuresubstitution Ser-264-Gly beispielsweise ist bekannt, dass sie zwar eine hohe Resistenz bringt, gleichzeitig aber auch substantielle Fitnesskosten verursacht (siehe oben; Powles & Yu 2010, Darmeny et al. 2017).

**Tabelle 10**  
Vorhaben zur Züchtung von Kulturpflanzen mit Resistenz gegen PSII-Hemmer.

Pflanze	Basis der Resistenz	Wirkstoff	Verfahren	Quelle
Baumwolle	Nitrilase von <i>K. pneumoniae</i>	Bromoxynil	Transgenese	Duke 2014
Blaue Lupine	Native P450-Monooxygenase	Metribuzin	NA-Mutagenese	Pan et al. 2012
Gerste	Natives D1 mit Ser-264-Gly	Atrazin	CMP	Rios et al. 2003
Kolbenhirse	Borstenhirse D1 mit Ser-264-Gly	Atrazin	Einkreuzung	Darmency et al. 2017
Linse	Natives D1 mit Ala-251-Thr	Metribuzin	Mutagenese	McMurray et al. 2018
Raps	Rübsen D1 mit Ser-264-Gly	Atrazin	Einkreuzung	Beversdorf et al. 1980
	Nitrilase von <i>K. pneumoniae</i>	Bromoxynil	Transgenese	Duke 2014
Weizen	nicht bekannt	Bentazon	Co60-Mutagenese	Kim et al. 2007

CMP: *Chloroplast-Mutator Plants*; Co60: Cobalt-60; NA: Natriumazid;

## 5.4 HRAC-Gruppe D: PSI-Hemmer

Hemmer der Photosynthese I bilden die HRAC-Gruppe D. Mitglieder dieser Gruppe sind die beiden aus der chemischen Familie der Bipyridine stammenden Wirkstoffe Diquat und Paraquat (Heap 2018). Beide wirken weitgehend unselektiv, das heißt auf die meisten Pflanzenarten.

### **Wirkmechanismus**

Paraquat und Diquat wirken als Elektronenfänger im Photosystem I. Die entstehenden Radikale geben ihre überschüssigen Elektronen an Sauerstoffmoleküle weiter, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die zum Tod der Pflanzenzellen führen.

### **Resistenzmechanismen**

Bei 32 Wildarten sind Fälle bekannt, in denen Pflanzen eine Resistenz gegen Bipyridine entwickelt haben (Heap 2018). Die Resistenzen werden in der Regel auf eine verringerte Translokation und Sequestration der Herbizide zurückgeführt sowie auf antioxidative Enzyme, die die Menge der ROS verringern (Hawkes 2014, Brunhaor & Hanson 2017, Moretti & Hanson 2017, Tahmasebi et al. 2018). Die genetische Basis der Resistenzen bei Wildpflanzen ist nicht bekannt.

Bei *Arabidopsis* sind mehrere Paraquat-resistente Mutanten bekannt, wie beispielsweise *pst1*, *rcd1*, *par2*, *atpdr11*, *rmv1* und *pqr2* (Tsugane et al. 1999, Ahlfors et al. 2004, Chen et al. 2009, Fujita et al. 2012, Xi et al. 2012, Dong et al. 2016). Die Mutationen betreffen entweder Transportproteine oder Enzyme, deren Aktivität zu einer Verringerung der ROS-Menge führt.

### **Resistenzzüchtung**

Beispiele für die Herstellung von Paraquat-resistenten Kulturarten gibt es bei Tabak, Reis und Kopfsalat. Bei Tabak erfolgte die Herstellung mittels Transgenese und zwar durch den Transfer von Genen, die entweder für Transportproteine codieren oder für Enzyme, die die ROS-Menge verringern (Aono et al. 1995, Kwon et al. 2002, Jo et al. 2004). Bei Reis wiederum beruhte die Erzeugung der Paraquat-Resistenz auf chemischer Mutagenese (Shih et al. 2018) oder der RNAi-Technik (Li et al. 2013). Das RNAi-Konstrukt, das Li et al. (2013) einsetzten, zielt auf die Stilllegung eines Proteins, das beim Transport von Paraquat einer Rolle spielt. Bei Kopfsalat ist kürzlich mit CRISPR/Cas9 die Sequenz des vorangestellten offenen Leserasters (uORF) des Enzyms LsGGP2 verändert worden, um die Translation dessen mRNA zu modulieren. LsGGP2 ist an der Bildung von Ascorbinsäure beteiligt und die Veränderung seines uORFs führt dazu, dass Kopfsalat mehr oxidativen Stress verträgt und unempfindlicher auf Paraquat reagiert (Zhang et al. 2018b).

Es wurden keine Hinweise auf eine Kommerzialisierung von Sorten mit Resistenz gegen PSI-Hemmer gefunden.

### **Genomeditierung und Resistenz gegen PSI-Hemmer**

Da PSI-Hemmer kein Zielprotein haben, können nur NTSR-Mutationen Kandidaten sein, um mittels Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen zu erzeugen. Ein möglicher Kandidat ist der oben erwähnte vorangestellte offene Leseraster (uORF) des Enzyms LsGGP2. Ob sich damit bei Kopfsalat oder anderen Kulturarten ein kommerziell verwertbares Resistenzniveau erzeugen liesse, ist jedoch unklar. Ob sich unter den bei Arabidopsis bekannten Paraquat-resistenten Mutanten weitere Kandidaten finden lassen, bleibt offen.

## **5.5 HRAC-Gruppe E: PPO-Hemmer**

Die HRAC-Gruppe E enthält die PPO-Hemmer und besteht gegenwärtig aus 31 Mitgliedern. Die Wirkstoffe der Gruppe können neun chemischen Familien zugeordnet werden: den Triazinonen, Oxadiazolen, Thiadiazolen, Triazolinonen, Phenylpyrazolen, Oxazolidinedionen, Pyrimidindionen oder den N-Phenylphthalimiden. Drei der Wirkstoffe sind keiner chemischen Familie zugeordnet (Heap 2018).

### **Wirkmechanismus**

Die Wirkstoffe der Gruppe E hemmen die Protoporphyrinogen-Oxidase (PPO). Dieses Enzym, das für Pflanzen essentiell ist, oxidiert Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX und katalysiert damit den letzten gemeinsamen Reaktionsschritt in den Stoffwechselwegen, die zur Bildung von Häm und Chlorophyll führen. PPO-hemmende Wirkstoffe führen zu einer Akkumulation von Protoporphyrinogen IX. Da diese Substanz photoaktiv ist, kommt es zur Bildung einer giftigen Menge an Singulett-Sauerstoff und weiteren oxidativen Chemikalien, was letztendlich zum Tod der Pflanze führt (Green & Owen 2011).

### **Resistenzmechanismen**

Bei 13 Wildarten sind Fälle bekannt, in denen Pflanzen eine Resistenz gegen PPO-Hemmer entwickelt haben (Heap 2018). Ursache für die Resistenzen sind je nach Fall TS- oder NTS-Mechanismen (Dayan et al. 2014, Varanasi et al. 2018). Die genetische Basis der NTS-Mechanismen ist nicht bekannt.

Die bekannte genetische Basis der Resistenzfälle mit TS-Mechanismus sind Mutationen im *ppo*-Gen, die zu Aminosäuresubstitutionen an der Position 98 der PPO oder zur Deletion der Aminosäure Glycin an der Position 210 führen (Giacomini et al. 2017, Salas et al. 2016, Rousonelos et al. 2012, Patzold et al. 2006, Gressel & Levy 2006; siehe Tabelle 11). Syngenta hat laut einem Patent insgesamt 18 Aminosäuresubstitutionen innerhalb der PPO identifiziert, die eine Resistenz gegen PPO-Hemmer verleihen sollen (Volrath et al. 1999). Hervorzuheben ist dabei eine Doppelmutation, die zu den Substitutionen Ser-305-Leu und Tyr-426-Met führt. Arabidopsis-Pflanzen mit dieser Doppelmutation sind resistent gegen Butafenacil (Hanin et al. 2001).

**Tabelle 11**

**Änderungen in der Aminosäuresequenz der PPO, die mit einer Resistenz gegen PPO-Hemmer in Verbindung gebracht werden.**

Änderungen in der PPO	Quelle
Arg-98-Leu/Gly/Met	Rousonelos et al. 2012, Giacomini et al. 2017
Gly-210 Deletion	Patzold et al. 2006, Salas et al. 2016
Ser-305-Leu + Tyr-426-Met	Hanin et al. 2001

### **Resistenzzüchtung**

Die Erzeugung von Pflanzen mit einer Resistenz gegen PPO-Hemmer ist bei verschiedenen Kulturarten, wie beispielsweise Reis, Mais, Soja, Tabak und Tomate, verfolgt worden (Li & Nicholl 2005). Die wesentliche Strategie bestand dabei darin, Pflanzen mit Genen auszurüsten, die für eine Herbizid-unempfindliche PPO codieren. Neben *ppo*-Genen aus Bakterien kam dabei insbesondere ein doppelt mutiertes *ppo*-Gen (Ser-305-Leu + Tyr-426-Met) aus Arabidopsis zum Einsatz (Li & Nicholl 2005). Syngenta entwickelte mit diesem Arabidopsis-Gen bei Reis, Mais und Tomate resistente Pflanzen. Auch wenn für diese Pflanzen bereits der Handelsname *Acuron* vorlag (Li et al. 2003), wurden sie nicht als Sorten auf den Markt gebracht (Green & Owen 2011). Auch aus den anderen Züchtungsvorhaben resultierten keine kommerziellen Sorten mit Resistenz gegen PPO-Hemmer.

### **Genomeditierung und Resistenz gegen PPO-Hemmer**

Mutationen im *ppo*-Gen, die zu einer TS-Resistenz gegen PPO-Hemmer führen können, sind bekannt. Laut Endo & Toki (2013) und Gao & Jiang (2018) sind *ppo*-codierende Gene denn auch potenzielle Ziele, um mit Genomeditierung transgenfreie HR-Sorten zu erzeugen. Hinweise auf entsprechende Züchtungsvorhaben finden sich aber nicht.

Pflanzen besitzen in der Regel zwei Isoformen der PPO, wobei die eine in den Mitochondrien und die andere in den Chloroplasten wirkt. In den Fällen, in denen zwei unterschiedliche *ppo*-Gene vorliegen, ist davon auszugehen, dass beide mutiert werden müssten, um eine Resistenz zu erzeugen (Patzold et al. 2006). Da zudem die Resistenzmutationen dazu tendieren, die Funktion der PPO zu schwächen (Li et al. 2003), ist es denkbar, dass zusätzlich zur Erzeugung der Mutationen eine Erhöhung der Genexpression notwendig sein könnte, um Feldresistenz zu erzeugen.

Bei Arabidopsis sind mit ZFN und CRISPR die PPO-Doppelmutation Ser-305-Leu/Tyr-426-Met erzeugt worden, was die Modellpflanze resistent gegen Butafenacil macht (de Pater et al. 2013/2018). Die Resistenz diente dabei als Selektionssystem, um die Machbarkeit neuer Verfahren der Genomeditierung prüfen zu können.

## 5.6 HRAC-Gruppe F1: PDS-Hemmer

PDS-hemmende Wirkstoffe bilden die HRAC-Gruppe F1. Die ersten Herbizide mit PDS-Hemmern kamen zu Beginn der 1970er auf den Markt. Heut gehören sieben Wirkstoffe zur Gruppe F1 (Heap 2018). Sie stammen aus den beiden chemischen Familien der Pyridazinone und Pyridinocarboxamides oder sind keiner chemischen Familie zugeordnet. Da PDS-Hemmer Pflanzen zum Ausbleichen bringen, werden sie auch als Bleichmittel bezeichnet.

### **Wirkmechanismus**

Wirkstoffe der Gruppe F1 hemmen die Phytyl-Desaturase (PDS), ein Enzym, das an der Biosynthese von Carotenoiden beteiligt ist. Die PDS ist in den Chloroplasten aktiv und führt dort zur Dehydrogenierung von Phytyl. Ohne funktionierende PDS fehlen den Pflanzen Carotinoide, was zur Folge hat, dass auch das UV-Schutzschild fehlt. Die Folge: In den Chloroplasten werden die Membrane und das Chlorophyll zerstört, weshalb die Pflanzen ausbleichen und absterben.

### **Resistenzmechanismen**

Vier Wildarten haben bisher eine Resistenz gegen PDS-hemmende Herbizide entwickelt (Heap 2018). In zwei dieser Arten ist der Mechanismus unbekannt (Heap 2018, Dang et al. 2018). Bei den beiden anderen Arten gelten Mutationen im *pds*-Gen als Ursache für die Resistenz. Eine Substitution des Arginins zu Serin, Cystein oder Histidin an der Stelle 304 der PDS kann Resistenz gegen Fluridon verleihen, einem PDS-Hemmer, der keiner chemischen Familie zugeordnet ist (Michel et al. 2004, Benoit & Les 2013). An der Resistenz gegenüber Diflufenican und Picolinafen, den beiden PDS-Hemmern aus der chemischen Familie der Pyridincarbonsäureamide, können die Substitutionen Glu-425-Asp und Leu-498-Val beteiligt sein (Dang et al. 2018/2019). Die Firma SePro beschreibt in einem Patentantrag weitere Aminosäuresubstitutionen in einer pflanzlichen PDS, die resistent gegen PDS-hemmende Herbizide machen soll (Michel et al. 2011).

**Tabelle 12**

**Aminosäuren-Substitutionen in der PDS, die mit einer Resistenz gegen PDS-hemmende Herbizide in Verbindung gebracht werden.**

Aminosäuren-Substitution	Quelle
Arg-304-Ser/Cys/His	Michel et al. 2004, Puri et al. 2007, Benoit & Les 2013
Glu-425-Asp	Dang et al. 2019
Leu-498-Val	Dang et al. 2018

### **Resistenzzüchtung**

In der Literatur finden sich ein paar wenige Vorhaben, bei denen mit gentechnischen Methoden versucht worden ist, Kulturpflanzen mit einer Resistenz gegen PDS-hemmende Herbizide zu erzeugen. Dabei sind sowohl TS- wie auch NTS-Mechanismen erprobt worden. Keines der Vorhaben führte zur einer Kommerzialisierung von HR-Sorten.

Die TS-Mechanismen beruhten auf dem Einsatz von *pds*-Genen, die Pflanzen unempfindlich für Norflurazon machen. Die Gene, die dazu ins Erbgut von Pflanzen transferiert worden sind, stammen aus Bakterien (Misawa et al. 1993) oder Cyanobakterien (Wagner et al. 2002). Zudem wurde auch ein mutiertes *pds*-Gen (Arg-303-Ser/Cys/His) aus der Grundnessel als möglicher Kandidat für die Herstellung von HR-Pflanzen diskutiert (Arias et al. 2005/2006). Syngenta beschreibt in einer Patentschrift mehrere bakterielle *pds*-Gene, die eine Resistenz gegen PDS-Hemmer verleihen sollen (Que et al. 2013).

Ein NTS-Mechanismus wurde bei Reis und Kartoffel getestet, indem die Pflanzen mit einem P450-Gen aus dem Menschen transformiert worden sind (Kawahigashi et al. 2005, Inui et al. 1999).

### **Genomeditierung und Resistenz gegen PDS-Hemmer**

Da Mutationen im *pds*-Gen bekannt sind, die mit einer Herbizidresistenz in Verbindung stehen, gelten *pds*-Gene als mögliche Ziele, um via Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen zu erzeugen (Brausemann et al. 2017, Gao & Jiang 2018). In der Literatur finden sich gegenwärtig jedoch keine entsprechenden Arbeiten.

Brausemann et al. (2017) nennen insbesondere die Bindungsstelle des PDS-Hemmers Norflurazon als möglichen Ort, an dem gezielte Punktmutationen zu einer Herbizidresistenz führen könnten. Diese Bindungsstelle liegt an der Position Arg-304 der PDS. Wie oben beschrieben ist bei der Grundnessel bekannt, dass an dieser Position Substitutionen des Arginins zu Serin, Cystein oder Histidin zu einer Resistenz führen können. Von Arabidopsis wiederum weiss man, dass Individuen, die eine PDS-Version mit Arg-304 Mutationen bilden, eine Behandlung mit Norflurazon überleben können (Arias et al. 2006). Unklar ist jedoch, wie sich Mutationen an der Position Arg-304 auf die Aktivität der PDS auswirken (Koschmieder et al. 2017, Brausemann et al. 2017). Falls die Mutationen die Aktivität schmälern, könnte dies einer kommerziellen Verwertung der Herbizidresistenz entgegenstehen.

In der Literatur finden sich mehrere Arbeiten, in denen mit Genomeditierungsverfahren Indels in *pds*-Genen erzeugt wurden – so zum Beispiel bei Banane (Kaur et al. 2018, Naim et al. 2018), Maniok (Odipio et al. 2017) oder Weinreibe (Nakajima et al. 2017). Diese Arbeiten haben jedoch nichts mit der Entwicklung von Herbizidresistenz zu tun. Da das Ausschalten des *pds*-Gens in einem (gut sichtbaren) Albino- und Zwergphänotyp resultiert, dienen *pds*-Gene als Ziele in Studien, in denen die Machbarkeit von Genomeditierungsverfahren getestet wird.

## 5.7 HRAC-Gruppe F2: HPPD-Hemmer

Die HRAC-Gruppe F2 besteht aus den HPPD-Hemmern. Diese Wirkstoffe werden wegen ihrer bleichenden Wirkung wie die Mitglieder der HRAC-Gruppen F1, F3 und F4 auch als Bleichmittel bezeichnet. Ihre Vermarktung begann in den 1990er Jahre (Santucci et al. 2017) und heute gibt es dreizehn verschiedene Wirkstoffe, die in Herbiziden als HPPD-Hemmer wirken (Heap 2018). Diese Wirkstoffe stammen aus den drei folgenden chemischen Gruppen: Pyrazole, Triketone und Isoxazole.

### **Wirkmechanismus**

HPPD-Hemmer hemmen die Aktivität des Enzyms 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD), was dazu führt, dass Pflanzen kein Homogentisat und somit weder Plastoquinon noch Carotinoide bilden können. Ohne Carotinoide wiederum bricht das UV-Schutzschild in den Blättern zusammen: UV-Strahlen dringen ungehindert zu den Chloroplasten, zerstören den grünen Blattfarbstoff (*bleaching*) und töten die Pflanze letztlich ab, weil die Photosynthese ausfällt.

### **Resistenzmechanismen**

Zwei Wildarten haben bisher eine Resistenz gegen HPPD-hemmende Herbizide entwickelt (Heap 2018). Die Resistenzen basieren dabei auf NTS-Mechanismen oder einer Kombination von TS- und NTS-Mechanismen und sind polygener Natur. Als Mechanismen diskutiert werden hauptsächlich eine verstärkte Verstoffwechslung der Herbizide durch verschiedene P450-Monooxygenasen und eine erhöhte *hppd*-Genexpression (Nakka et al. 2017, Kohlhase et al. 2018, Küpper et al. 2018, Oliveira et al. 2018a/b). Die genetische Basis der Resistenzmechanismen ist nicht bekannt.

Während bei Wildarten bisher keine Resistenzmutationen identifiziert worden sind, sind bei Kulturarten Mutationen beschrieben, welche die HPPD weniger empfindlich gegenüber HPPD-hemmenden Herbiziden machen sollen. Die Beschreibungen dieser Mutationen finden sich in Patentanträgen von Syngenta (Hawkes et al. 2012), BASF (Pasternak et al. 2017) und Bayer CropScience (Busch et al. 2011, Boudec et al. 2001). Zu den darin beschriebenen Mutationen gehören beispielsweise die Substitutionen Pro-215-Leu, Gly-336-Glu, Gly-336-Ile und Gly-336-Trp, die eine erhöhte Resistenz gegenüber HPPD-hemmenden Wirkstoffen aus der Gruppe der Isoxazole verleihen sollen. Bei Arabidopsis soll es eine Mutation im *hppd*-Gen geben, die das Kraut resistent gegenüber Isoxazol- und Triketon-HPPD-Hemmern machen. Beschrieben sind auch Fälle, in denen zwei Mutationen im *hppd*-Gen zu einer erhöhten Resistenz führen. Bei

Gerste beispielsweise soll das gleichzeitige Auftreten der beiden Substitutionen Leu-320-His und Pro-321-Ala die Empfindlichkeit gegenüber HPPD-Hemmern verringern.

### **Resistenzzüchtung**

Es sind mehrere Vorhaben bekannt, bei denen die Transgenese zum Einsatz kam, um Kulturarten mit einer Resistenz gegen HPPD-Hemmer zu erzeugen. Die Strategien beruhen dabei hauptsächlich auf der Überexpression bakterieller HPPDs oder dem Transfer mutierter *hppd*-Gene von Pflanzen (Matringe et al. 2005). Bayer CropScience hat bei Soja und Baumwolle Sorten entwickelt, die durch die Überexpression eines mutierten *hppd*-Gens aus *Pseudomonas fluorescens* unempfindlich auf Behandlungen mit dem Wirkstoff Isoxaflutol reagieren (Matringe et al. 2005). Zudem hat der Konzern gemeinsam mit Syngenta Sojasorten erzeugt, die durch den Transfer eines mutierten *hppd*-Gens aus Hafer resistent gegen Mesotrion sind (Hawkes et al. 2010). DuPont Pioneer arbeitet an der Herstellung von Sojasorten, die resistent gegen die drei HPPD-Hemmer Mesotrion, Isoxaflutol und Tembotrion sind. Die genetische Basis dazu ist ein chimärisches Gen, das aus Sequenzen der *hppd*-Gene von Mais und Soja besteht (Siehl et al. 2014).

DuPont Pioneer setzt neben der Transgenese auch herkömmliche Verfahren ein, um in Soja die Empfindlichkeit gegen HPPD-Hemmern zu verringern. So beschreibt der Konzern in einem Patentantrag QTLs im Sojagenom, die Resistenz gegen Mesotrion und/oder Isoxaflutol verleihen sollen (Bogner et al. 2018).

Die Firma RiceTec wiederum hält in einem Patentantrag fest, wie sie mittels chemischer Mutagenese Reispflanzen erzeugt hat, deren Resistenz gegenüber Mesotrion erhöht ist (Hinga et al. 2018). Da die Resistenz dabei nicht auf eine Mutation im *hppd*-Gen zurückgeht, dürfte sie durch ein NTS-Mechanismus verursacht sein.

### **Genomeditierung und Resistenz gegen HPPD-Hemmer**

Da mehrere Patentschriften Mutationen in *hppd*-Genen beschreiben, die mit einer TS-Resistenz in Verbindung stehen, könnten *hppd*-Gene ein mögliches Ziel sein, um via Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen zu erzeugen. Entsprechende Arbeiten finden sich in der Literatur bisher jedoch nicht.

Ob die gezielte Erzeugung von TSR-Mutationen in *hppd*-Genen ausreicht, um ein kommerziell verwertbares Resistenzniveau zu erzielen, bleibt fraglich. Da TSR-Mutationen die katalytische Aktivität der HPPD schmälern dürften und Mutagenese-Studien darauf hindeuten, dass einzelne Mutationen noch keine ausreichende Resistenz verleihen (Kaundun et al. 2017), ist anzunehmen, dass zusätzlich eine Überproduktion der unempfindlichen HPPD notwendig sein könnte. Für diese Annahme spricht auch das Beispiel der SYHT0H2-Soja von Syngenta, die unter anderem resistent gegen den HPPD-Hemmer Mesotrion ist. Um diese Resistenz zu erzeugen, musste nicht nur das Gen für eine unempfindliche HPPD aus Hafer übertragen werden, sondern auch mehrere regulatorische Elemente, die für eine Überexpression des transferierten *hppd*-Gens sorgen.

In der Literatur findet sich eine Arbeit, in der Mitarbeitende von Bayer CropScience beschreiben, wie sie mit Genomeditierung im Erbgut von Baumwolle Resistenzgene gegen HPPD-Hemmer und Glyphosat stapeln (D'Halluin et al. 2013).

## 5.8 HRAC-Gruppe F3: Bleichmittel mit unbekanntem Angriffspunkt

Die HRAC-Gruppe F3 enthält die Hemmer der Carotinoid-Biosynthese, deren Angriffspunkt unbekannt ist. Derzeit besteht sie aus zwei Wirkstoffen: Aclonifen aus der chemischen Familie der Diphenylether und Amitrol aus der Familie der Triazole (Heap 2018). Wie die Wirkstoffe der HRAC-Gruppen F1, F2 und F4 werden Aclonifen und Amitrol auch als Bleichmittel bezeichnet. Der Wirkmechanismus der beiden Substanzen ist nicht bekannt (Vencill et al. 2012). Bei sechs Wildarten sind Resistenzen gegen Amitrol dokumentiert (Heap 2018). Die Mechanismen, die dabei zur Unempfindlichkeit gegenüber Amitrol führen, sind jedoch nicht bekannt. Da die genetische Basis für die Resistenzen unerforscht ist und keine Züchtungsvorhaben gefunden wurden, die das Ziel verfolgen, Aclonifen- oder Amitrol-resistente Kulturpflanzen zu erzeugen, erhält die HRAC-Gruppe F3 hier keine weitere Aufmerksamkeit.

## 5.9 HRAC-Gruppe F4: DOXPS-Hemmer

Die HRAC-Gruppe F4 enthält einen Wirkstoff: Clomazon. Er gehört zur chemischen Familie der Isoxazolidinone und wird – wie die Stoffe der HRAC-Gruppen F1, F2 und F3 – zu den Bleichmitteln gezählt. Clomazon wird innerhalb von Pflanzen zur 5-Ketoclomazon metabolisiert, das wiederum die Desoxyxylulosephosphatsynthase (DOXPS) hemmt – eine Schlüsselkomponente der Isoprenoid-Synthese in den Plastiden. Da ohne Isoprenoide auch keine Carotinoide gebildet werden, führt die Hemmung der DOXPS dazu, dass in den Blättern der UV-Schutz fehlt und die Pflanzen absterben. Bei zwei Wildarten sind bisher Resistenzfälle gegen Clomazon dokumentiert (Heap 2018). Als Ursache stehen NTS-Mechanismen zur Diskussion (Yasuor et al. 2008). Da die genetische Basis der Resistenzen unbekannt ist und keine Züchtungsvorhaben gefunden wurden, die das Ziel verfolgen, Clomazon-resistente Kulturpflanzen zu erzeugen, erhält die HRAC-Gruppe F4 hier keine weitere Aufmerksamkeit.

## 5.10 HRAC-Gruppe G: EPSPS-Hemmer

Die HRAC-Gruppe G besteht aus den EPSPS-Hemmern und enthält zwei Mitglieder: die beiden aus der chemischen Familie der Glycine stammenden Wirkstoffe Glyphosat und Glyphosat-trimesium (Heap 2018). Letzterer wird auch Sulfosat genannt. Beide Wirkstoffe wirken auf fast alle Pflanzen toxisch und sind deshalb so genannte Totalherbizide. Glyphosat wird seit Anfang der 1970er verkauft und ist heute das weltweit am häufigsten eingesetzte Herbizid (Duke 2018)

### **Wirkmechanismus**

Glyphosat hemmt die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS), ein Enzym, das in Chloroplasten von Pflanzen aus Shikimat-3-Phosphat (S3P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat (EPSP) bildet. Durch die Hemmung der EPSPS blockiert Glypho-

sat den Shikimatweg, mit dem Pflanzen aromatische Aminosäuren produzieren. Ohne aromatische Aminosäuren stirbt die Pflanze ab.

### **Resistenzmechanismen**

Bei 43 Wildarten sind Fälle bekannt, in denen Pflanzen resistent gegen Glyphosat geworden sind (Heap 2018). Für die Ausbildungen der Resistenzen sind sowohl TS- wie auch NTS-Mechanismen verantwortlich, wobei in einigen Fällen auch Kombinationen von Mechanismen zusammenwirken (Sammons & Gaines 2014, Heap & Duke 2018, Vrbničanin et al. 2017). Die TS-Mechanismen beruhen auf Mutationen im *epsps*-Gen, welche die EPSPS Glyphosat-unempfindlich machen (Gaines & Heap 2018, Heap & Duke 2018), auf einer Überexpression des *epsps*-Gens (Dinelli et al. 2006, Zhang et al. 2018) und/oder auf einer Vervielfachungen des *epsps*-Gen (Powles 2010, Heap & Duke 2018). Die NTS-Mechanismen, die zu Glyphosat-Resistenz führen oder an deren Ausbildung beteiligt sein können, sind die verringerte Aufnahme und/oder Translokation von Glyphosat, die Absonderung des Wirkstoffs in Vakuolen oder die Entgiftung (Sammons & Gaines 2014, Vrbničanin et al. 2017, Heap & Duke 2018). Bei den TS-Mechanismen gibt es Fälle, bei denen die genetische Basis bekannt ist: Eine moderate Glyphosat-Resistenz verleihen Punktmutationen im *epsps*-Gen, die an der Position 106 der EPSPS dazu führen, dass Prolin mit Serin, Alanin, Theronin oder Leucin ausgetauscht wird (Vrbničanin et al. 2017; Heap & Duke 2018, Tabelle 13). Auch eine Punktmutation, die zu einer EPSPS mit Thr-102-Ser führt, ist als Ursache für Glyphosat-Resistenz bekannt (Li et al. 2018b). Eine starke Resistenz resultiert aus der so genannten TIPS-Doppelmutation, die zu den beiden Aminosäuresubstitutionen Thr-102-Ile und Pro-106-Ser führt (Yu et al. 2015). In einem weiteren Fall wird eine 12-Basenpaar lange Insertion im Promotor des *epsps*-Gens mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat in Verbindung gebracht (Zhang et al. 2018a).

**Tabelle 13**

**Beispiele von Aminosäuresubstitutionen in der EPSPS, die mit einer Resistenz gegen Glyphosat in Verbindung gebracht werden.**

Aminosäuresubstitution(en) in der EPSPS	Quelle
Gly-101-Ala	Eichholtz et al. 2001
Gly-101-Ala + Gly-144-Asn	Eichholtz et al. 1994
Thr-102-Ile/Ser	Alibhai et al. 2010, Li et al. 2018b
Thr-102-Ile + Pro-106-Ser/Met/Ala	LeBrun et al. 1992, Alibhai et al. 2010, Gocal et al. 2012, Chen et al. 2015, Yu et al. 2015
Pro-106-Ala/Leu/Ser/Thr	Sammons & Gaines 2014

Neben den Resistenzmutationen bei Wildpflanzen sind auch bei Kulturpflanzen Mutationen bekannt, die Glyphosat-Resistenz verleihen (Tabelle 13). Tian et al. (2013) beschreiben beispielsweise eine mittels DNA-Shuffling erzeugte Doppelmutation (Thr-101-Ala und Ala-187-Thr) im *epsps*-Gen von Apfel, die die Pflanzen Glyphosat-resistent macht. Eine ebenfalls mit DNA-

Shuffling hergestellte Glyphosat-unempfindliche EPSPS von Weinrebe weist sieben Aminosäuresubstitutionen auf (Tian et al. 2015a). Weitere Resistenzmutationen im *epsps*-Gen finden sich in Patenanträgen von Firmen wie Corteva Agriscience (Dong et al. 2018), Syngenta (Watts & Ganesan 2017), Keygene (Bundock 2017), Cibus (Gocal et al. 2012) und Monsanto (heute Bayer; Alibhai et al. 2010, Eichholtz et al. 1994/2001, LeBrun et al. 1992).

### Resistenzzüchtung

Die Herstellung Glyphosat-resistenter Pflanzen ist bei zahlreichen Kulturarten erprobt worden, insbesondere mittels Transgenese. Bei Raps, Mais, Soja, Luzerne, Zuckerrübe und Baumwolle haben diese Bemühungen zur Lancierung kommerzieller Sorten geführt. Die Erzeugung der Resistenz gelang dabei durch den Transfer von Genen, die für Glyphosat-unempfindliche EPSPS codieren, und/oder durch den Transfer von Genen, deren Produkte Glyphosat abbauen (Dill 2005, Green 2009, Green & Owen 2011, Duke 2014, ISAAA 2019). Zu den ersteren gehören das *cp4-epsps*-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*, das *grg23-epsps*-Gen aus *Arthrobacter globiformis* sowie das *epsps*-Gen aus Mais, das die TIPS-Mutation trägt. Die transferierten Entgiftungsgene sind *gat4601* oder *gat4621* aus *Bacillus licheniformis* sowie *goxv247* aus *Ochrobactrum anthropi* (ISAAA 2018).

Ohne den Einsatz der Gentechnik gelang die Entwicklung von Glyphosat-resistenten Sorten des Weissen Weidelgrases (Baldwin et al. 2012). Diese Sorten besitzen ein *epsps*-Gen mit Mutationen an den Positionen 25 und 274 (Samudio et al. 2011).

Bei Flachs, Reis, Maniok, Weizen und Paprika sind Vorhaben bekannt, in denen versucht wird, mit herkömmlicher Mutagenese und/oder Genomeditierung transgenfreie, Glyphosat-resistente Pflanzen herzustellen (Tabelle 14).

**Tabelle 14**  
Vorhaben zur Herstellung transgenfreier Glyphosat-resistenter Pflanzen mit Mutationen im *epsps*-Gen

Pflanze	EPSPS-Veränderung	Verfahren	Quelle
Flachs	TIPA	CRISPR	Sauer et al. 2016
Maniok	TIPA	CRISPR	Hummel et al. 2018
Paprika	TIPS	Intragenese/PCR-Mutagenese	Ortega et al. 2018
Reis	Pro-106-Leu	Mutagenese	Zhou et al. 2006
	Pro-106-Leu	TALEN	Wang et al. 2015
	TIPS	CRISPR	Li et al. 2016a
Weizen	Leu-239-Phe	Mutagenese	Aramrak et al. 2018
Weidelgras	Doppelmutation	Selektion	Samudio et al. 2011

EMS: Ethylmethansulfonat; PCR: Polymerasekettenreaktion; TIPA: Thr-102-Ile + Pro-106-Ala; TIPS: Thr-102-Ile + Pro-106-Ser.

## **Genomeditierung und Resistenz gegen Glyphosat**

Da Mutationen im *epsps*-Gen bekannt sind, die mit einer TS-Resistenz in Verbindung stehen (Tabelle 13), sind *epsps*-Gene potenzielle Ziele, um mit Verfahren der Genomeditierung transgenfreie HR-Pflanzen herzustellen (Abdallah et al. 2015, Huang et al. 2016, Gao & Jiang 2018, Aramrak et al. 2018, Dong et al. 2019). In der Literatur finden sich gegenwärtig entsprechende Arbeiten bei Flachs (Sauer et al. 2016), Maniok (Hummel et al. 2018) und Reis (Wang et al. 2015, Li et al. 2016a). Am vielversprechendsten gilt derzeit, Pflanzen mit den Doppelmutationen TIPS oder TIPA auszustatten, von denen bekannt ist, dass sie eine hohe Resistenz bringen. TIPS führt in der EPSPS zu den beiden Aminosäuresubstitutionen Thr-102-Ile und Pro-106-Ser und TIPA resultiert in Thr-102-Ile und Pro-106-Ala (Sauer et al. 2016, Li et al. 2016a, Hummel et al. 2018). Ob die damit erzielbare Glyphosat-Resistenz auch kommerziell verwertbar ist, ist jedoch fraglich. Die bekannten Resistenzmutationen sind meist mit Funktionseinbußen der EPSPS verbunden und die bisherigen Erfahrungen mit TIPS und TIPA deuten darauf hin, dass zusätzlich zu den Punktmutationen auch eine Überproduktion der mutierten EPSPS notwendig sein dürfte, um eine robuste Glyphosat-Resistenz zu erzeugen (Ortega et al. 2018, Hummel et al. 2018, Sammons et al. 2018, Dong et al. 2019). Für die Notwendigkeit einer Überproduktion spricht auch das Beispiel des GA21-Mais. Dieser transgene Mais, den Monsanto Ende der 1990er auf den Markt brachte, bildet eine Mais-eigene EPSPS mit TIPS. Die Robustheit seiner Glyphosat-Resistenz kommt jedoch nur dadurch zu Stande, dass Monsanto das korrespondierende *epsps*-Gen gemeinsam mit einem starken Promotor sowie in dreifacher Kopie ins Erbgut inserierte. Ob die weiter oben beschriebene 12-Basenpaar lange Insertion im Promotor eines *epsps*-Gens ein Vorbild sein kann, um auch bei Kulturpflanzen eine Überproduktion Glyphosat-unempfindlicher EPSPS zu erzielen, bleibt unklar. Corteva Agriscience testet derzeit EPSPS-Varianten auf ihre Funktionalität, die zusätzlich zu TIPS oder TIPA weitere, künstlich erzeugte Mutationen aufweisen (Dong et al. 2018/2019). Falls sich geeignete Mutationen finden lassen, könnten sie mittels Genomeditierung gezielt im Erbgut von Pflanzen erzeugt werden.

### **5.11 HRAC-Gruppe H: GS-Hemmer**

Die HRAC-Gruppe H enthält die beiden Wirkstoffe Glufosinat und Bialaphos. Beide GS-Hemmer gehören der chemischen Familie der Phosphinsäuren an. Sie wirken auf fast alle Pflanzen toxisch und sind so genannte Breitbandherbizide. Die beiden Stoffe ähneln in ihrem Aufbau der Aminosäure Glutamat und werden deshalb auch als aminosäureantagonistische Herbizide bezeichnet. Die Vermarktung von Glufosinat begann Anfang der 1980er.

#### **Wirkmechanismus**

Glufosinat und Bialaphos hemmen die Glutaminsynthetase (GS). Die GS ist ein Enzym, das Ammonium auf Glutamat überträgt und dadurch Glutamin bildet. Durch die Hemmung reichert sich in den Blättern Ammonium an, Glutamin und andere Aminosäuren hingegen fehlen. Als Folge bilden sich Chlorosen und die Pflanzen sterben ab.

### **Resistenzmechanismen**

Vier Wildarten haben bisher eine Resistenz gegen Glufosinat-haltige Herbizide entwickelt (Heap 2018). Die wenigen dazu vorhandenen Daten zeigen, dass sowohl TS- wie auch NTS-Mechanismen involviert sein können (Avila-Garcia & Mallory-Smith 2011, Avila-Garcia et al. 2012, Jalaludin et al. 2017). Im Fall des TS-Mechanismus ist die genetische Basis bekannt: Eine Asp-171-Asn Substitution im *gs*-Gen macht, dass die GS Glufosinat-unempfindlich wird (Avila-Garcia et al. 2012). Im Fall des NTS-Mechanismus wird eine verringerte Translokation als Ursache für die Resistenz vermutet (Avila-Garcia & Mallory-Smith 2011).

Neben der Asp-171-Asn Substitution aus Wildpflanzen sind auch künstlich erzeugte Veränderungen in der GS von Kulturarten bekannt, die zu einer Resistenz gegen Glufosinat führen können (Tabelle 15).

**Tabelle 15**

**Aminosäuresubstitutionen in der GS von Kulturpflanzen, die mit einer Glufosinat-Resistenz in Verbindung gebracht werden.**

Aminosäuresubstitution in der GS	Quelle
x-207-Gly	Goodman et al. 1990
Gly-245-Ser/Cys/Arg	Goodman et al. 1990
His-249-Tyr	Pornprom et al. 2009
Arg-295-Lys	Tian et al. 2015b
Glu-297-Ala	Clemente & Marquez 1999
Arg-332-Lys	Goodman et al. 1990

### **Resistenzzüchtung**

Die bisherigen Vorhaben zur Züchtung von Glufosinat-resistenten Kulturarten basieren auf gentechnischen Methoden. Dabei werden sowohl bakterielle Gene als auch mutierte pflanzliche Gene genutzt. Im ersten Fall werden das *pat*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* und das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygrosopicus* eingesetzt. Beide Gene codieren für eine Phosphinothricin N-Acetyltransferase (PAT), ein Enzym, das Glufosinat durch Acetylierung inaktiviert und damit entgiftet. Es gibt eine ganze Reihe von Kulturarten, die mit diesen Genen transformiert worden sind. Das *bar*-Gen wird dabei häufig auch als Selektionsmarker eingesetzt (Duke 2014). Bei Mais, Raps, Soja und Baumwolle sind Glufosinat-resistente Sorten heute unter dem Markennamen LibertyLink auf dem Markt (CropLife 2018). Bei Reis, Rübsen, Chicorée und Zuckerrübe bestehen zudem Anbauzulassungen (ISAAA 2019).

Die zweite Strategie zur Herstellung von HR-Sorten beruht auf der Überexpression pflanzlicher Gene, die derart mutiert sind, dass sie für eine Glufosinat-unempfindlichere GS kodieren (Tian et al. 2015b, James et al. 2018a/b). Diese Strategie hat bisher nicht zur Lancierung von Glufosinat-resistenten Sorten geführt.

### **Genomeditierung und Resistenz gegen Glufosinat**

Da Mutationen in *gs*-Genen bekannt sind, die mit einer Resistenz gegen Glufosinat in Verbindung stehen (Tabelle 15), gelten *gs*-Gene als mögliches Ziel, um mittels Verfahren der Genomeditierung transgenfreie Glufosinat-resistente Pflanzen zu erzeugen (James et al. 2018a/b, Gao & Jiang 2018). Offen bleibt jedoch, ob die Erzeugung einer TSR-Mutation im *gs*-Gen genügt, um ein kommerziell verwertbares Resistenzniveau zu erreichen. Laut James et al. (2018a/b) ist davon auszugehen, dass ein ausreichend hohes Resistenzniveau nur dann erzielt werden kann, wenn zusätzlich eine Überproduktion der Glufosinat-unempfindlichen GS erfolgt. In der Literatur finden sich derzeit keine Arbeiten zur Herstellung transgenfreier Glufosinat-resistenter Pflanzen mittels Genomeditierung.

### **5.12 HRAC-Gruppe I: DHPS-Hemmer**

Die HRAC-Gruppe I enthält ein einzelnes Mitglied: Asulam, ein Wirkstoff aus der chemischen Familie der Carbamate (Heap 2018). Herbizide mit Asulam wirken selektiv und werden vor allem gegen Farne und Ampfer eingesetzt. Die giftige Wirkung basiert dabei auf einer Hemmung der Dihydropteroat-Synthase (DHPS), einem Enzym, das beim Folsäure-Stoffwechsel von Pflanzen eine Rolle spielt. Da keine Wildarten mit Asulam-Resistenz bekannt sind (Heap 2018) und neben den gentechnischen Versuchen mit einem bakteriellen DHPS-Gen namens *sul1* aus den 1990er (Guerineau et al. 1990, Cole 1994, Surov et al. 1998) keine weiteren Vorhaben zur Resistenzzüchtungen bekannt sind, erhält die HRAC-Gruppe I hier keine weitere Aufmerksamkeit.

### **5.13 HRAC-Gruppe K1: Mikrotubuli-Hemmer**

Mikrotubuli-Hemmer bilden die HRAC-Gruppe K1. Gegenwärtig enthält die Gruppe 16 Wirkstoffe, die aus insgesamt fünf chemischen Familien stammen (Benzamide, Benzoesäuren, Dinitroaniline, Phosphoramidate und Pyridine; Heap 2018).

#### **Wirkmechanismus**

Wirkstoffe der HRAC-Gruppe K1 binden an Tubulindimere von Pflanzen und unterbrechen dadurch das Mikrotubuli-Wachstum. Mikrotubuli sind Polymere, die aus Heterodimeren von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgebaut sind. Sie spielen für Pflanzen eine wichtige Rolle, weil sie an essentiellen zellulären Prozessen beteiligt sind, so zum Beispiel an der Mitose, der Zellteilung und dem vesikulären Transport.

#### **Resistenzmechanismen**

Es sind 12 Wildarten bekannt, bei denen Pflanzen eine Resistenz gegen Mikrotubuli-Hemmer entwickelt haben. In der Mehrheit der Fälle richtet sich die Resistenz gegen Wirkstoffe aus der Familie der Dinitroaniline, insbesondere gegen Trifluralin (Heap 2018). Für die Entwicklung der Resistenzen werden sowohl TS- wie auch NTS-Mechanismen verantwortlich gemacht (Chen et al. 2018a, Powles & Yu 2010). Die bei Dinitroanilin-Resistenzen bisher aufgedeckten TS-Mechanismen

men beruhen auf Mutationen im  $\alpha$ -Tubulin-Gen. Diese Mutationen führen jeweils zu Aminosäuresubstitutionen und sind in Tabelle 16 aufgelistet. Ein Teil dieser Mutationen kann auch Kreuzresistenz gegen Mikrotubuli-Hemmer aus den Familien der Pyridine, Benzoesäuren und Phosphoramidate verleihen (Beckie & Tardiff 2012). Bemerkenswert ist, dass die durch Mutationen im  $\alpha$ -Tubulin-Gen bewirkten Resistenzen rezessiv vererbt werden und deshalb nur homozygote Individuen die Behandlung mit Herbiziden überleben (Powles & Yu 2010).

Neben den beschriebenen Mutationen im  $\alpha$ -Tubulin-Gen findet sich in der Literatur ein Beispiel, bei dem die Resistenz auf eine Änderung im  $\beta$ -Tubulin-Gen zurückgeht: Pflanzen der Tabakart *Nicotiana plumbaginifolia* wiesen nach einer Behandlung mit Gammastrahlen eine Aminosäuresubstitution im  $\beta$ -Tubulin auf und konnten deshalb erhöhte Mengen an Mikrotubuli-Hemmern überleben (Yemets et al. 2008b).

**Tabelle 16**

**Aminosäuresubstitutionen im  $\alpha$ -Tubulin, die mit einer Resistenz gegen Dinitroanilin-Herbizide in Verbindung gebracht werden.**

Aminosäuresubstitution(en)	Quelle
Leu-125-Met	Hashim et al. 2012
Leu-136-Phe	Délye et al. 2004, Hashim et al. 2012
Val-202-Phe	Hashim et al. 2012, Chen et al. 2018b
Thr-239-Ile	Anthony et al. 1998, Délye et al. 2004, Chen et al. 2018b
Arg-243-Met/Lys	Chu et al. 2018, Chen et al. 2018a
Met-268-Thr	Yamamoto et al. 1998

### **Resistenzzüchtung**

Mutierte  $\alpha$ -Tubulin-Gene, die Resistenz gegen Dinitroanilin-Herbizide verleihen, gelten als gute Kandidaten, um HT-Pflanzen zu erzeugen (Darmency et al. 2011). Entsprechende Vorhaben finden sich jedoch nur wenige. Bei Mais wurde mit herkömmlicher Selektion sowie mit Transformation eines mutierten  $\alpha$ -Tubulin-Gens (Thr-239-Ile) aus *Eleusine indica* versucht, Resistenz gegen Dinitroanilin-Herbizide zu erzeugen (Anthony et al. 1998, Anthony & Hussey 1999, Landi et al. 1999). Bei Reis findet sich ein Beispiel, bei dem Forschende das Erbgut der Pflanze mit einem mutierten  $\alpha$ -Tubulin-Gen (Arg-243-Met oder Arg-243-Lys) aus dem Ray-Gras transformierten, um eine Resistenz gegen Trifluralin herzustellen (Chu et al. 2018). Bei Kolbenhirse wiederum wurde ein  $\alpha$ -Tubulin-Gen mit der Thr-239-Ile Substitution aus der Grünen Borstenhirse eingekreuzt (Wang et al. 1996, Darmency et al. 2011). Soweit aus den gesichteten Unterlagen hervorgeht, führte bisher keines der beschriebenen Vorhaben zu einer Kommerzialisierung von HR-Sorten. Das  $\alpha$ -Tubulin-Gen mit der Thr-239-Ile Mutation aus *Eleusine indica* wurde bei Soja, Flachs, Tabak und Fingerhirse auch als Selektionsmarker für die Herstellung transgener Pflanzen getestet (Yemets et al. 2008a/b).

### **Genomeditierung und Resistenz gegen Mikrotubuli-Hemmer**

Im  $\alpha$ -Tubulin sind acht Positionen bekannt, an denen Aminosäuresubstitutionen dazu führen können, dass die Empfindlichkeit gegenüber einzelnen Mikrotubuli-Hemmern sinkt. Da TSR-Mutationen bekannt sind, sind die Gene für  $\alpha$ -Tubulin Kandidaten für die Herstellung transgenfreier HR-Pflanzen mittels Genomeditierung (Endo & Toki 2013). Dass die Resistenz – anders als bei den TS-Mechanismen anderer Wirkstoffgruppen – rezessiv vererbt ist (Powles & Yu 2010), sollte kein Hindernis sein, da sich mit Verfahren der Genomeditierung Homozygotie herstellen lässt. Ob sich in Kulturpflanzen durch das gezielte Mutieren des  $\alpha$ -Tubulins eine Resistenz erzeugen lässt, die kommerziell verwertbar ist, kann hier nicht abschliessend beantwortet werden. In der Literatur finden sich gegenwärtig keine entsprechenden Arbeiten. Gegen eine Verwertbarkeit spricht, dass TSR-Mutationen im  $\alpha$ -Tubulingen die Funktion des Tubulins einschränken und zu Fitnessseinbussen führen können (Darmency et al. 2011/2017, Chu et al. 2018). Bei Kolbenhirse führte das Einkreuzen eines mutierten  $\alpha$ -Tubulins aus einer Wildart zwar zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Mikrotubuli-Hemmern aus der Familie der Dinitroaniline, aber die Erhöhung war zu niedrig, um Unkräuter ausreichend bekämpfen zu können, weshalb eine Kommerzialisierung ausblieb (Darmency et al. 2017).

### **5.14 HRAC-Gruppe K2: Mikrotubuliorganisations-Hemmer**

Die drei Mikrotubuliorganisations-Hemmer Carbetamid, Chlorpropham und Propham bilden die HRAC-Gruppe K2 (Heap 2018). Alle drei Wirkstoffe stammen aus der chemischen Familie der Carbamate. Sie wirken giftig auf Pflanzen, weil sie die Organisation von Mikrotubuli inhibieren (Rao 2015, Vencill et al. 2012). Bei Wildarten ist bisher ein Fall mit Resistenz gegen Mikrotubuliorganisations-Hemmer dokumentiert (Heap 2018). Da der Resistenzmechanismus unbekannt ist und keine Züchtungsvorhaben gefunden worden sind, die Sorten mit Resistenz gegen Mikrotubuliorganisations-Hemmer zum Ziel haben, erhält die HRAC-Gruppe K2 hier keine weitere Aufmerksamkeit.

### **5.15 HRAC-Gruppe K3: VLCFA-Synthese-Hemmer**

Die HRAC-Gruppe K3 enthält die Inhibitoren der VLCFA-Synthese und besteht aus 26 Wirkstoffen, die einer der folgenden fünf chemischen Familien zugeordnet werden können: Acetamide, Chloroacetamide, Oxyacetamide, Phosphordithioate und Tetrazolinone (Heap 2018). Die Wirkstoffe der Gruppe k3 wirken giftig auf sensitive Pflanzen, indem sie an Elongasen wie beispielsweise die 3-Ketoacyl-Coa-Synthase binden und dadurch die Synthese sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFA, *very long chain fatty acids*) hemmen (Busi 2014, Strom et al. 2018). Bei fünf Wildarten sind bisher Resistenzfälle dokumentiert (Heap 2018). Über die den Resistenzen zu Grunde liegenden Mechanismen ist jedoch wenig bekannt; die Daten deuten auf NTS-Mechanismen hin, insbesondere auf Entgiftungsmechanismen (Busi et al. 2014, Dücker et al. 2016, Busi et al. 2018a, Strom et al. 2018). Da die genetische Basis für die Resistenzen unbekannt ist und im Laufe dieser Arbeit keine Vorhaben zur Züchtung von Kulturpflanzen mit Resistenz gegen

VLCFA-Synthese-Hemmern entdeckt wurden, findet die HRAC-Gruppe K3 hier keine weitere Aufmerksamkeit.

## 5.16 HRAC-Gruppe L: Zellulosesynthese-Hemmer

Die HRAC-Gruppe L besteht aus den Zellulosesynthese-Hemmern und enthält derzeit sechs Wirkstoffe, die aus einer der vier folgenden chemischen Familien stammen: Nitrile, Alkylazine, Benzamide, und Triazolocarbonsäureamide (Heap 2018). Zur Gruppe L gehört auch Quinclorac. Dieser Wirkstoff entfacht bei Monokotyledonen eine hemmende Wirkung auf die Zellwandbildung. Da er wegen seiner Ähnlichkeit zu Auxin das Wachstum von Pflanzen negativ beeinflusst, wird er auch als Mitglied der HRAC-Gruppe O geführt (siehe unten).

### **Wirkmechanismus**

Wirkstoffe der Gruppe L sind giftig für Pflanzen, weil sie die Produktion von Zellulose und damit die Bildung der Zellwände unterbinden. Wie die einzelnen Zellulosesynthese-Hemmer genau wirken, ist Gegenstand der Forschung. Nach Stand des Wissens haben sie im komplexen Syntheseweg der Zellulose unterschiedliche molekulare Wirkungsorte, wobei sie die Synthese entweder direkt oder indirekt hemmen können (Brabham et al. 2014, Tateno et al. 2016). Einer der Wirkungsorte können Cellulose Synthase A (CESA)-Enzyme sein.

### **Resistenzmechanismen**

Bei drei Wildarten sind bisher Fälle bekannt, in denen Pflanzen eine Resistenz gegen Zellulosesynthese-Hemmer entwickelt haben (Heap 2018). In allen Fällen handelt es sich dabei um eine Resistenz gegen den Wirkstoff Quinclorac (Heap 2018). Diese Resistenzen werden unter der HRAC-Gruppe O behandelt (siehe unten).

Bei Arabidopsis sind mit EMS-Mutagenese Aminosäuresubstitutionen in CESA-Enzymen erzeugt worden, die dazu führen, dass die Pflanzen resistent gegen die Wirkstoffe Isoxaben oder Fluxopam sind (Scheible et al. 2001, Desprez et al. 2002, Harris et al. 2012, Tateno et al. 2016, Shim et al. 2018).

### **Resistenzzüchtung**

Im Laufe dieser Arbeit sind keine Züchtungsvorhaben gefunden worden, die das Ziel verfolgen, Kulturpflanzen mit Resistenz gegen Zellulosesynthese-Hemmern zu entwickeln.

### **Genomeditierung und Resistenz gegen Zellulosesynthese-Hemmer**

Bei Wild- und Kulturpflanzen scheinen keine Allele bekannt zu sein, die zur einer Resistenz gegen Zellulosesynthese-Hemmer führen könnten. Bei Arabidopsis hingegen sind Punktmutationen in *cesa*-Genen dokumentiert, die die Modellpflanze unempfindlich gegen gewisse Zellulosesynthese-Hemmer machen. Ob diese Punktmutationen Kandidaten für die Erzeugung von transgenfreien HR-Sorten mittels Genomeditierung sind, ist unklar. Bei Arabidopsis sind sie – zumindest in einigen Fällen – mit Fitnessseinbußen verbunden (Brabham et al. 2014, Tateno et al. 2016).

In der Literatur sind keine Veröffentlichungen gefunden worden, in denen die Erzeugung von Resistenzen gegen Zellulosesynthese-Hemmer mittels Genomeditierung ein Thema ist.

### **5.17 HRAC-Gruppe M: Entkoppler**

Die drei Wirkstoffe Dinoseb, Dinoterb und DNOC bilden die HRAC-Gruppe M. Sie stammen alle aus der chemischen Familie der Dinitrophenole. Ihre giftige Wirkung auf Pflanzen beruht darauf, dass sie die oxidative Phosphorylierung entkoppeln. Da die Entkoppler nicht mehr länger kommerziell genutzt werden (Dayan et al. 2015), keine Resistenzen bei Wildarten bekannt sind (Heap 2018) und keine Beispiele für Resistenzzüchtungen gefunden worden sind, erhält die HRAC-Gruppe M hier keine weitere Aufmerksamkeit.

### **5.18 HRAC-Gruppe N: Hemmer der Lipidsynthese**

Wirkstoffe, die als Hemmer der Lipidsynthese fungieren, bilden die HRAC-Gruppe N. Derzeit enthält diese Gruppe 20 Mitglieder aus vier chemischen Familien (Benzofurane, Chlorcarbon-säuren, Phosphordithioate und Thiocarbamate; Heap 2018). Wie die Wirkstoffe der HRAC-Gruppe A hemmen auch die Mitglieder Gruppe N die Lipid-Biosynthese. Anders als bei der Gruppe A ist der molekulare Wirkungsort jedoch nicht die ACC. Der genaue Wirkmechanismus bzw. Wirkungsort der Gruppe N-Wirkstoffe ist nicht bekannt (Sardrood & Goltapeh 2018). Bei zehn Wildarten gibt es Fälle, in denen Pflanzen eine Resistenz gegen Wirkstoffe der HRAC-Gruppe N entwickelt haben (Heap 2018). Weder die zu Grunde liegenden Mechanismen noch deren genetische Basis sind genau bekannt. Je nach Wirkstoff und Wildart stehen eine Erhöhung der Gibberellin-Menge oder eine metabolische Resistenz durch P450- und/oder GST-Enzyme zur Diskussion (Beckie & Tardiff 2012, Busi & Powles 2013, Busi 2014). Da die Resistenz-mechanismen und ihre genetische Basis unbekannt sind und neben den gentechnischen Versuchen mit einem bakteriellen Dehydrogenase-Gen aus den 1990er (Buchanan-Wollaston et al. 1992) keine weiteren Vorhaben zur Resistenzzüchtungen gefunden wurden, erhält die HRAC-Gruppe N hier keine weitere Aufmerksamkeit.

### **5.19 HRAC-Gruppe O: Synthetische Auxine**

Synthetische Auxine sind selektiv wirkende Herbizide. Sie bilden die HRAC-Gruppe O. Der älteste und bekannteste Wirkstoff aus dieser Gruppe ist die Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D); sie wurde bereits 1945 auf den Markt gebracht (Busi et al. 2018b). Heute sind 25 synthetische Auxine als Herbizide erhältlich (Heap 2018). Sie kommen aus insgesamt sieben chemischen Familien: Aryl-Picolinate, Benzoessäure, Chinolincarbonsäuren, Phenoxy-carbonsäuren, Pyridincarboxylate und Pyridyloxycarboxylate (Busi et al. 2018b).

### **Wirkmechanismus**

Synthetische Auxine haben eine ähnliche Aktivität wie das pflanzeneigene Hormon Indol-3-Essigsäure. Anders als die pflanzeneigenen Auxine bringen sie jedoch das Wachstum sensitiver Pflanzen durcheinander und lassen sie wachsen, «bis sie tot sind». Wie diese Wirkung im Detail abläuft, ist nicht genau bekannt (Figueiredo et al. 2018). In der Literatur wird der Wirkmechanismus als «komplex» bewertet (Goggin et al. 2018). Die Wirkungsorte der verschiedenen synthetischen Auxine können sich unterscheiden und bestehen aus einem großen Komplex von Auxin-bindenden Proteinen, transkriptionellen Repressoren und Aktivatoren, Ubiquitin-verwandten Proteinen und Proteasomen (Dinesh et al. 2016, Goggin et al. 2018).

### **Resistenzmechanismen**

Bei 38 Wildarten sind Resistenzen gegenüber synthetischen Auxinen bekannt (Heap 2018). Die zu Grunde liegenden Mechanismen scheinen sich je nach Wirkstoff, Wildart oder auch Wildartpopulation zu unterscheiden (Busi et al. 2018b, Goggin et al. 2018). Dem komplexen Wirkmechanismus der synthetischen Auxine entsprechend (siehe oben) werden in den meisten Fällen NTS-Mechanismen für die Resistenz verantwortlich gemacht, wie beispielsweise verringerte Aufnahme der Herbizide durch die Blätter oder veränderte Translokation (Busi et al. 2018b, Goggin et al. 2018). Kürzlich ist erstmals ein TS-Mechanismus identifiziert worden: Eine Mutation des Auxin-Corezeptors IAA16 kann Resistenz gegen die synthetischen Auxine Dicamba, 2,4-D, und Fluroxypyr verleihen (LeClere et al. 2018). Die Mutation besteht aus einem Wechsel von GG zu AA innerhalb einer hoch konservierten Region des *iaa16*-Gens und resultiert im Enzym in einer Glycin zu Asparagin-Substitution (LeClere et al. 2018).

Bei Arabidopsis sind verschiedene Mutanten erzeugt worden, die weniger empfindlich auf synthetische Auxine reagieren (z.B. Walsh et al. 2006, Gleason et al. 2011, Prigge et al. 2016). Die Mutationen betreffen dabei vor allem Gene, die für Komponenten des Auxin-Rezeptor-Signaling-Komplexes codieren. Dow Agrosiences besitzt ein Patent auf die veränderten Auxin-Rezeptoren AFB4, AFB5 und SGT1b (Walsh et al. 2010).

### **Resistenzzüchtung**

Die Erzeugung von Pflanzen mit einer Resistenz gegen synthetische Auxine ist bei verschiedenen Kulturarten, wie beispielsweise Raps, Mais, Soja, Rübse, Rettich und Baumwolle, verfolgt worden. Zum Einsatz kamen dabei sowohl herkömmliche wie auch gentechnische Verfahren.

Die mittels Gentechnik erzeugten Resistenzen beruhen auf einem NTS-Mechanismus. Die Gene, die dabei eingesetzt wurden, sind *aad-1*, *aad-12* und *dmo*. Sie stammen aus Bakterien und codieren für Enzyme, die 2,4-D (AAD-1 und AAD-12) und Dicamba (DMO) in ungiftige Metabolite umwandeln können (Behrens et al. 2007, Wright et al. 2010). Bayer/Monsanto verfügt über Anbauzulassungen für Dicamba-resistente Sorten von Soja, Mais und Baumwolle. Corteva Agriscience hat unter dem Markennamen *Enlist* Soja-, Mais- und Baumwollsorten im Angebot, die resistent gegen 2,4-D sind (ISAAA 2019).

Bei Raps, Rübse und Rettich gibt es Züchtungsvorhaben, in denen Resistenzen aus wilden *Brassica*-Arten via Einkreuzung oder Embryo-Rescue-Verfahren in die Kulturart eingeführt werden (Mithila & Hall 2013, Jugulam et al. 2014/2015, Dillon et al. 2016; siehe Tabelle 17). Bei Rotklee wird

daran gearbeitet, via natürliche Selektion 2,4-D resistente Sorten zu entwickeln (Munoz et al. 2015, Quesenberry et al. 2015).

**Tabelle 17**  
**Vorhaben zur Herstellung von Kulturpflanzen mit Resistenz gegen synthetische Auxine**

Pflanze	Genetische Basis	Wirkstoff	Verfahren	Quelle
Baumwolle	aad-12 Gen von <i>D. acidovorans</i>	2,4-D	Transgenese	Dow 2013
	dmo-Gen von <i>S. maltophilia</i>	Dicamba	Transgenese	Monsanto 2012
Garten-Rettich	Resistenzgen(e) aus Acker-Rettich	MCPA	Einkreuzung	Jugulam et al. 2014
Mais	aad-1 Gen von <i>S. herbicidovorans</i>	2,4-D	Transgenese	Wright et al. 2010
	aad-1 Gen von <i>S. herbicidovorans</i>	2,4-D	ZFN-Transgenese	Ainley et al 2013
	dmo-Gen von <i>S. maltophilia</i>	Dicamba	Transgenese	Monsanto 2015
Raps	Resistenzgen(e) aus Acker-Rettich	2,4-D	Embryo-Rescue	Dillon et al. 2016
	Resistenzgen(e) aus Acker-Senf	Dicamba	Embryo-Rescue	Jugulam et al. 2015
Rotklee	Resistenzgen(e) aus Rotklee	2,4-D	Selektion	Munoz et al. 2015
Rübse	Resistenzgen(e) aus Acker-Senf	Dicamba	Embryo-Rescue	Mithila & Hall 2013
Soja	aad-12 Gen von <i>D. acidovorans</i>	2,4-D	Transgenese	Wright et al. 2010
	dmo-Gen von <i>S. maltophilia</i>	Dicamba	Transgenese	Behrens et al. 2007

### **Genomeditierung und Resistenz gegen synthetische Auxine**

Im Laufe der vorliegenden Arbeit sind keine Vorhaben entdeckt worden, bei denen durch gezielte oder ungezielte Mutagenese versucht wurde, in Kulturarten eine TS-Resistenz gegen synthetische Auxine zu erzeugen. Ob sich Sorten mit einer TS-Resistenz via Mutagenese überhaupt erzeugen lassen, wird unterschiedlich beurteilt. Endo & Toki (2013) stufen diese Strategie als problematisch ein, weil synthetische Auxine einen komplexen Wirkmechanismus haben und verschiedene Auxin-Rezeptoren unterschiedlich auf unterschiedliche Auxin-Herbizide reagieren. Gleason et al. (2011) hingegen halten es für möglich, bei Kulturarten mittels TILLING Mutationen in den Enzymen des Auxin-Rezeptor-Signalisierungs-Komplexes zu identifizieren, die Herbizidresistenz verleihen. Identifizierte Mutationen könnten dann auch mit ortsspezifischer Mutagenese erzeugt werden.

Die weiter oben beschriebene Gly-Asp-Substitution im Auxin-Corezeptor IAA16 ist derzeit die einzige aus Wildarten bekannte Mutation, die zu einer Resistenz gegen synthetische Auxine führt. Ob sie bei Kulturarten für die Herstellung von HR-Sorten nutzbar ist, bleibt offen. In der Wildart, in der sie entdeckt wurde, ist sie mit Fitnessseinbußen verbunden (LeClere et al. 2018).

In der Literatur finden sich zwei Veröffentlichungen zu Genomeditierungsverfahren und Resistenz gegen synthetische Auxine. Beide stammen von Mitarbeitenden von Dow AgroSciences (heute Corteva Agriscience) und beschreiben Versuche, in denen bei Soja und Mais Strategien erprobt werden, um mit ZFN mehrere Transgene an einem einzelnen Ort des Pflanzenerbguts zu stapeln (Ainley et al. 2013, Bonawitz et al. 2018). Eines der dabei jeweils gestapelten Gene ist *aad-1* aus

*Sphingobium herbicidovorans*, das für ein Enzym codiert, mit dem Pflanzen 2,4-D entgiften können.

## 5.20 HRAC Gruppe P: Auxintransport-Hemmer

Die HRAC-Gruppe P besteht aus den Auxintransport-Hemmern und enthält zwei Wirkstoffe: Naptalam aus der chemischen Familie der Phtalamate und Diflufenzopyr aus der Familie der Semicarbazone (Heap 2018). Beide Wirkstoffe hemmen in Pflanzen den Transport von Indol-3-Essigsäure, einem natürlich vorkommenden Auxin. Diese Hemmung verursacht eine Akkumulation von Auxin im Meristem und bringt dadurch die Auxinbalance durcheinander, was dem Wachstum der Pflanzen schadet (Grossmann 2010). Duke (2012) gibt ABCB-Proteine als Wirkungsorte von Naptalam und Diflufenzopyr an. Da bei Wildarten keine Resistenzfälle bekannt sind (Heap 2018) und keine Vorhaben zur Züchtung Naptalam- oder Diflufenzopyr-resistenter Kulturpflanzen gefunden wurden, erhält die HRAC-Gruppe P hier keine weitere Aufmerksamkeit.

## 5.21 HRAC-Gruppe Z: Unbekannter Wirkmechanismus

In der Gruppe Z fasst das HRAC-Komitee die Wirkstoffe zusammen, deren Wirkmechanismus bzw. molekularer Wirkungsort unbekannt ist. Heap (2018) ordnet der Gruppe 20 Wirkstoffe zu. Die chemischen Familien, aus denen diese Stoffe stammen, sind Arylaminopropionsäure, Pyrazolium und Organoarsen sowie Andere. Der Gruppe Z wird bis anhin auch Cinmethylin zugeordnet. Neue Untersuchungen haben den Wirkmechanismus jedoch gelüftet. Demnach bindet Cinmethylin an eine Acyl-ACP-Thioesterase, wodurch die Synthese von Fettsäuren gehemmt wird (Campe et al. 2018). Heap (2018) listet sechs Wildarten auf, bei denen Pflanzen resistent gegen Wirkstoffe aus der Gruppe Z geworden sind. Die Resistenzmechanismen sind in der Regel jedoch unbekannt oder nicht veröffentlicht. Eine Ausnahme findet sich bei einer Resistenz gegen den Wirkstoff Difenzoquat, bei der eine P450-vermittelte Entgiftung als Mechanismus vermutet wird (Keith et al. 2015). Da die Resistenzmechanismen und deren genetische Basis unbekannt sind und keine Vorhaben zur Züchtung resistenter Kulturpflanzen gefunden wurden, erhält die HRAC-Gruppe Z hier keine weitere Aufmerksamkeit.

## Literatur

- Abdallah, N.A., Prakash, C.S. & McHughen, A.G. (2015). Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food* 6(4): 183-205.
- Ahlfors, R., Lång, S., Overmyer, K., Jaspers, P., Brosché, M., Tauriainen, A., Kollist, H., Tuominen, H., Belles-Boix, E., Piippo, M., Inzé, D., Palva, E.T. & Kangasjärvi, J. (2004). Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *The Plant Cell* 16(7): 1925-1937.
- Ainley, W.M., Sastry-Dent, L., Welter, M.E., Murray, M.G., Zeitler, B., Amora, R., Corbin, D. R., Miles, R.R., Arnold, N.L., Strange, T.L., Simpson, M.A., Cao, Z., Carroll, C., Pawelczak, K.S., Blue, R., West, K., Rowland, L.M., Perkins, D., Samuel, P., Dewes, C.M., Shen, L., Sriram, S., Evans, S.L., Rebar, E.J., Zhang, L., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Webb, S.R. & Petolino, J.F. (2013). Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal* 11(9): 1126-1134.
- Alibhai, M.F., CaJacob, C., Feng, P.C.C., Heck, G.R., Qi, Y., Flasiński S, et al. (2010). Glyphosate resistant Class I 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). Patent 7723575. U.S. Patent and Trademark Office.
- Anthony, R.G. & Hussey, P.J. (1999). Double mutation in Eleusine indica alpha-tubulin increases the resistance of transgenic maize calli to dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides. *The Plant Journal* 18(6): 669-674.
- Anthony, R.G., Waldin, T. R., Ray, J.A., Bright, S.W. & Hussey, P.J. (1998). Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin. *Nature* 393: 260-263.
- Aono, M., Saji, H., Sakamoto, A., Tanaka, K., Kondo, N. & Tanaka, K. (1995). Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant and Cell Physiology* 36(8): 1687-1691.
- Aramrak, A., Lawrence, N.C., Demacon, V.L., Carter, A.H., Kidwell, K.K., Burke, I.C. & Steber, C.M. (2018). Isolation of mutations conferring increased glyphosate resistance in spring wheat. *Crop Science* 58: 84-9.
- Arias, R. S., Netherland, M.D., Scheffler, B.E., Puri, A. & Dayan, F.E. (2005). Molecular evolution of herbicide resistance to phytoene desaturase inhibitors in *Hydrilla verticillata* and its potential use to generate herbicide-resistant crops. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 61(3): 258-268.
- Arias, R.S., Dayan, F.E., Michel, A., Howell, J.L. & Scheffler, B.E. (2006). Characterization of a higher plant herbicide-resistant phytoene desaturase and its use as a selectable marker. *Plant Biotechnology Journal* 4(2): 263-273.
- Ashworth, M.B., Han, H., Knell, G. & Powles, S.B. (2016). Identification of triazine-resistant *Vulpia bromoides*. *Weed Technology* 30(2): 456-463.
- Avila, E.M., Gisby, M.F. & Day, A. (2016). Seamless editing of the chloroplast genome in plants. *BMC Plant Biology* 16(1): 168
- Avila-Garcia, W.V. & Mallory-Smith, C. (2011). Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne*) populations also exhibit resistance to glufosinate. *Weed Science* 59(3): 305-309.
- Avila-Garcia, W.V., Sanchez-Olguin, E., Hulting, A.G. & Mallory-Smith, C. (2012). Target-site mutation associated with glufosinate resistance in Italian ryegrass (*Lolium perenne* L. ssp. *multiflorum*). *Pest Management Science* 68(9): 1248-1254.
- Baldwin, C.M., Brede, A.D. & Mayer, J.J. (2012). 'JS501' and 'Replay' perennial ryegrass glyphosate tolerance and rates required for annual bluegrass (*Poa annua* L.) control. *HortScience* 47(7): 932-935.
- Baltes, N.J., Gil-Humanes, J. & Voytas, D. F. (2017). Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges. In: Weeks, D.P. & Yang, B. (eds), *Gene editing in plants. Progress in molecular biology and translational science* Vol. 149, Academic Press, pp. 1-26.

- Barrantes-Santamaría, W., Castillo-Matamoros, R., Herrera-Murillo, F., Brenes-Angulo, A. & Gómez-Alpizar, L. (2018). Detection of the Trp-2027-Cys mutation in fluzifop-P-butyl-resistant itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) using high-resolution melting analysis (HRMA). *Weed Science* 66(3): 286-292.
- BASF (2018). BASF releases Provisia rice system for the 2018 season. <https://agriculture.basf.com/us/en/Crop-Protection/News-Events/Press-releases/BASF-releases-Provisia-Rice-System-for-the-2018-season.html>
- BCH (2016). Herbicide tolerant canola. Record ID: 110268. Biosafety Clearing-House. <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=110268>
- Beckert, M. & Dessaux, Y. (2016). Effects of herbicide-tolerant crop cultivation. Springer
- Beckie, H.J. & Tardif, F.J. (2012). Herbicide cross-resistance in weeds. *Crop Protection* 35: 15-28.
- Behrens, M.R., Mutlu, N., Chakraborty, S., Dumitru, R., Jiang, W. Z., LaVallee, B.J., Herman, P.L., Clemente, T.E. & Weeks, D.P. (2007). Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316(5828): 1185-1188.
- Benoit, L.K. & Les, D.H. (2013). Rapid identification and molecular characterization of phytoene desaturase mutations in fluridone-resistant hydrilla (*Hydrilla verticillata*). *Weed Science* 61(1): 32-40.
- Beversdorf, W.D., Weiss-Lerman, J., Erickson, L.R. & Machado, V.S. (1980). Transfer of cytoplasmically-inherited triazine resistance from bird's rape to cultivated oilseed rape (*Brassica campestris* and *B. napus*). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 22(2): 167-172.
- Bogner, M., Chaky, J., Klaiber, J.A., Kyle, D. & Vogt, M.D. (2018). HPPD-inhibitor herbicide tolerance. Patent No. 9,970,02. U.S. Patent and Trademark Office.
- Bonawitz, N. D., Ainley, W. M., Itaya, A., Chennareddy, S. R., Cicak, T., Effinger, K., Jiang, K., Mall, T.K., Marri, P.R., Samuel, J.P., Sardesai, N., Simpson, M., Folkerts, O., Sarria, R., Webb, S.R., Gonzales, D.O., Simmonds, D.H., Pareddy, D.R. (2018). Zinc finger nuclease-mediated targeting of multiple transgenes to an endogenous soybean genomic locus via non-homologous end joining. *Plant Biotechnology Journal* *early view*
- Boudec, P., Rodgers, M., Dumas, F., Sailland, A., & Bourdon, H. (2001). Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain such a gene and which are tolerant to herbicides. Patent No. 6,245,968. U.S. Patent and Trademark Office.
- Brabham, C., Lei, L., Gu, Y., Stork, J., Barrett, M. & DeBolt, S. (2014). Indaziflam herbicidal action: a potent cellulose biosynthesis inhibitor. *Plant Physiology* 166(3): 1177-1185.
- Brausemann, A., Gemmecker, S., Koschmieder, J., Ghisla, S., Beyer, P. & Einsle, O. (2017). Structure of phytoene desaturase provides insights into herbicide binding and reaction mechanisms involved in carotene desaturation. *Structure* 25(8): 1222-1232.
- Brunharo, C.A., & Hanson, B.D. (2017). Vacuolar sequestration of paraquat is involved in the resistance mechanism in *Lolium perenne* L. spp. multiflorum. *Frontiers in Plant Science* 8: 1485.
- Buchanan-Wollaston, V., Snape, A., & Cannon, F. (1992). A plant selectable marker gene based on the detoxification of the herbicide dalapon. *Plant Cell Reports* 11(12): 627-631.
- Bundock, P. (2017). Glyphosate resistance enhancement. Patent No. 9,624,506. U.S. Patent and Trademark Office.
- Busch, M., Fischer, K., Laber, B. & Sailland, A. (2011). New mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which are tolerant to HPPD inhibitor herbicides. Patent No. 20110039706. U.S. Patent and Trademark Office.
- Busi, R. (2014). Resistance to herbicides inhibiting the biosynthesis of very-long-chain fatty acids. *Pest Management Science* 70: 1378-1384.
- Busi, R. & Powles, S.B. (2013). Cross-resistance to prosulfocarb and triallate in pyroxasulfone-resistant *Lolium rigidum*. *Pest Management Science* 69(12): 1379-1384.

- Busi, R., Porri, A., Gaines, T.A. & Powles, S. B. (2018a). Pyroxasulfone resistance in *Lolium rigidum* is metabolism-based. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148: 74-80.
- Busi, R., Goggin, D.E., Heap, I.M., Horak, M.J., Jugulam, M., Masters, R.A., Napier, R.M., Riar, D.S., Satchivi, N.M., Torra, J., Westra, P. & Wright, T.R. (2018b). Weed resistance to synthetic auxin herbicides. *Pest Management Science* 74(10): 2265-2276.
- Butler, N.M., Baltes, N.J., Voytas, D.F. & Douches, D.S. (2016). Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Frontiers in Plant Science* 7: 1045.
- Butt, H., Eid, A., Ali, Z., Atia, M.A., Mokhtar, M.M., Hassan, N., Lee, C.M., Bao, G. & Mahfouz, M.M. (2017). Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Frontiers in Plant Science* 8: 1441.
- Campe, R., Hollenbach, E., Kämmerer, L., Hendriks, J., Höffken, H.W., Kraus, H., Lerchl, J., Mietzner, T., Tresch, T., Witschel, M. & Hutzler, J. (2018). A new herbicidal site of action: Cinmethylin binds to acyl-ACP thioesterase and inhibits plant fatty acid biosynthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148: 116-125.
- CFIA (2103). Decision document DD 2013-100: Determination of the safety of Cibus Canada Inc.'s canola (*Brassica napus* L.) event 5715. [www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2013-100/eng/1427383332253/1427383674669](http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2013-100/eng/1427383332253/1427383674669)
- CFIA (2014). Decision document DD2014-101: determination of the safety of BASF Canada Inc.'s canola (*Brassica napus*) event CLB-1. Canadian Food Inspection Agency. [www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd2014-101/eng/1454107718197/1454107776755](http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd2014-101/eng/1454107718197/1454107776755)
- Chen, R., Sun, S., Wang, C., Li, Y., Liang, Y., An, F., Li, C., Dong, H., Yang, X., Zhang, J. & Zuo, J. (2009). The Arabidopsis PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* 19(12): 1377-1387.
- Chen, Y., Wang, Z., Ni, H., Xu, Y., Chen, Q. & Jiang, L. (2017). CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in Arabidopsis. *Science China Life Sciences* 60(5): 520-523.
- Chen, J., Goggin, D., Han, H., Busi, R., Yu, Q. & Powles, S. (2018a). Enhanced trifluralin metabolism can confer resistance in *Lolium rigidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(29): 7589-7596.
- Chen, J., Yu, Q., Owen, M., Han, H. & Powles, S. (2018b). Dinitroaniline herbicide resistance in a multiple-resistant *Lolium rigidum* population. *Pest Management Science* 74(4): 925-932.
- Chu, Z., Chen, J., Nyporko, A., Han, H., Yu, Q. & Powles, S. (2018). Novel alpha-tubulin mutations conferring resistance to dinitroaniline herbicides in *Lolium rigidum*. *Frontiers in Plant Science* 9: 97.
- Cibus (2018a). SU Canola USA. [www.cibuscanola.com](http://www.cibuscanola.com)
- Cibus (2018b). SU Canola Canada. [www.cibuscanola.ca](http://www.cibuscanola.ca)
- Clemente, M.T. & Márquez, A.J. (1999). Site-directed mutagenesis of Glu-297 from the alpha-polypeptide of *Phaseolus vulgaris* glutamine synthetase alters kinetic and structural properties and confers resistance to L-methionine sulfoximine. *Plant Molecular Biology* 40(5): 835-845.
- Cole, D.J. (1994). Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science* 42: 209-222.
- CropLife (2018). Biotradestatus. CropLife International. <http://www.biotradestatus.com>
- Croughan, T.P. (1998). Herbicide resistant rice. Patent No. 5 773 704. U.S. Patent and Trademark Office
- Croughan, T.P. (2002). Herbicide resistant rice. Patent No. 2002 0019 313. U.S. Patent and Trademark Office.
- Dang, H.T., Malone, J.M., Boutsalis, P., Gill, G. & Preston, C. (2018). The mechanism of diflufenican resistance and its inheritance in oriental mustard (*Sisymbrium orientale* L.) from Australia. *Pest Management Science* 74(6): 1279-1285.
- Dang, H.T., Malone, J.M., Gill, G. & Preston, C. (2019). Cross-resistance to diflufenican and picolinafen and its inheritance in oriental mustard (*Sisymbrium orientale* L.). *Pest Management Science* 75(1): 195-203.

- Darmency, H., Picard, J.C. & Wang, T. (2011). Fitness costs linked to dinitroaniline resistance mutation in *Setaria*. *Heredity* 107(1): 80-86.
- Darmency, H., Wang, T. & Délye, C. (2017). Herbicide resistance in *Setaria*. In: Doust, A. & Diao, X. (eds.), *Genetics and Genomics of Setaria*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 251-266.
- Dayan, F.E., Owens, D.K., Corniani, N., Silva, F.M.L., Watson, S.B., Howell, J.L. & Shaner, D.L. (2015). Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed Science* 63(SP1): 23-63.
- 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 Management Science* 69(2): 176-187.
- Délye, C., Menchari, Y., Michel, S. & Darmency, H. (2004). Molecular bases for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail. *Plant Physiology* 136: 3920-3932.
- Délye, C., Jasieniuk, M. & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* 29(11): 649-658.
- Délye, C., Duhoux, A., Pernin, F., Riggins, C.W., & Tranel, P.J. (2015). Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science* 63(SP1): 91-115.
- Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refrégier, G., Desnos, T., Aletti, E., Pelletier, S. & Höfte, H. (2002). Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiology* 128(2): 482-490.
- D'Halluin, K., Vanderstraeten, C., Van Hulle, J., Rosolowska, J., Van Den Brande, I., Pennewaert, A., D'Hont, K., Bossut, M., Jantz, D., Ruiters, R. & Broadhvest, J. (2013). Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnology Journal* 11(8): 933-941.
- Dill, G.M. (2005). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 61(3): 219-224.
- Dillon, A.J., Kron, P., Walsh, M. & Jugulam, M. (2016). Transfer of 2, 4-D-resistance from *Raphanus raphanistrum* into *Brassica napus*: production of F1 hybrids through embryo rescue. *Canadian Journal of Plant Science* 96(3): 384-386.
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. & Barnes, J. (2006). Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86(1): 30-41.
- Dinesh, D.C., Villalobos, L.I.A.C. & Abel, S. (2016). Structural biology of nuclear auxin action. *Trends in Plant Science* 21(4): 302-316.
- Dong, S., Hu, H., Wang, Y., Xu, Z., Zha, Y., Cai, X., Peng, L. & Feng, S. (2016). A *pqr2* mutant encodes a defective polyamine transporter and is negatively affected by ABA for paraquat resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 129(5): 899-907.
- Dong, Y., Lu, J., Ng, E., Siehl, D. & Tao, Y. (2018). Improved plant *epsps* synthases and methods of use. Patent Application WO2018183050A2.
- Dong, Y., Ng, E.C., Lu, J., Fenwick, T.K., Tao, Y., Bertain, S., Sandoval, M., Bermudez, E., Hou, Z., Patten, P., Lassner, M.W. & Siehl, D. (2019). Desensitizing plant EPSP synthase to glyphosate: Optimized global sequence context accommodates a glycine-to-alanine change in the active site. *Journal of Biological Chemistry* *in press*
- Dow (2013). Petition for determination of nonregulated status for herbicide tolerant DAS-8191Ø-7 cotton. [www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/13\\_26201p.pdf](http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/13_26201p.pdf)
- Dücker, R., Lorentz, L., Hull, R., Anderson, M., Moss, S. & Beffa, R. (2016). Discovering the mechanism of enhanced metabolism in flufenacet resistant grass weeds. *Julius-Kühn-Archiv* 35(452): 35-41.
- Duke, S.O. (2012). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?. *Pest Management Science* 68(4): 505-512.

- Duke, S.O. (2014). Biotechnology: herbicide-resistant crops. *In: van Alfen, N.K. (ed.), Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. Elsevier, Academic Press, pp. 94-116.*
- Duke, S.O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science* 74(5): 1027-1034.
- Eichholtz, D.A., Gasser, C.S., Kishore, G.M. (1994). Glyphosate-tolerant 3-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthases. Patent 5310667. U.S. Patent and Trademark Office.
- Eichholtz, D.A., Gasser, C.S. & Kishore, G.M. (2001). Modified gene encoding glyphosate-tolerant 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase. Patent 6225114. U.S. Patent and Trademark Office.
- Endo, M. & Toki, S. (2013). Creation of herbicide-tolerant crops by gene targeting. *Journal of Pesticide Science* 38(2): 49-59.
- Endo, M., Osakabe, K., Ono, K., Handa, H., Shimizu, T. & Toki, S. (2007). Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *The Plant Journal* 52(1): 157-166.
- Esvelt, K.M., Smidler, A.L., Catteruccia, F. & Church, G.M. (2014). Emerging technology: concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife* 3: e03401.
- Fichtner, F., Castellanos, R.U. & Ülker, B. (2014). Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement. *Planta* 239(4): 921-939.
- Figueiredo, M.R., Leibhart, L.J., Reicher, Z.J., Tranel, P.J., Nissen, S.J., Westra, P., Bernards, M.L., Kruger, G.R., Gaines, T.A. & Jugulam, M. (2018). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contributes to resistance in a common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. *Pest Management Science* 74(10): 2356-2362.
- Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2012). Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6343-6347
- Gabard, J.M. & Huby, J.P. (2004). Sulfonylurea-tolerant sunflower line M7. Patent No. 6,822,146. U.S. Patent and Trademark Office.
- Gaines, T.A. & Heap, I.M. (2018) Mutations in herbicide-resistant weeds to EPSP synthase inhibitors. <http://www.weedscience.com>.
- Gallego-Bartolomé, J., Gardiner, J., Liu, W., Papikian, A., Ghoshal, B., Kuo, H.Y., Zhao, J.M.C., Segal, D.J. & Jacobsen, S. E. (2018). Targeted DNA demethylation of the *Arabidopsis* genome using the human TET1 catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(9): E2125-E2134.
- Gao, C. & Jiang, L. (2018). Creation of herbicide resistant gene and use thereof. Patent application WO/2018/205995. World Intellectual Property Organization.
- Ghanizadeh, H. & Harrington, K.C. (2017). Perspectives on non-target site mechanisms of herbicide resistance in weedy plant species using evolutionary physiology. *AoB Plants* 9(5).
- Giacomini, D.A., Umphres, A.M., Nie, H., Mueller, T.C., Steckel, L.E., Young, B.G., Scott, R.C. & Tranel, P. J. (2017). Two new PPX2 mutations associated with resistance to PPO-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri*. *Pest Management Science* 73(8): 1559-1563.
- Gleason, C., Foley, R.C. & Singh, K.B. (2011). Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. *PLoS one* 6(3): e17245.
- Gocal, G.F., Knuth, M.E. & Beetham, P.R. (2012). EPSPS mutants. Patent No. 8,268,622. U.S. Patent and Trademark Office.
- Gocal, G.F., Schöpke, C. & Beetham, P.R. (2015). Oligo-mediated targeted gene editing. *In: Zhang, F., Puchta, H. & Thomson, J.G. (eds), Advances in new technology for targeted modification of plant genomes. Springer, New York, pp. 73-89.*
- Goggin, D.E., Kaur, P., Owen, M.J. & Powles, S.B. (2018). 2, 4-D and dicamba resistance mechanisms in wild radish: subtle, complex and population specific?. *Annals of Botany* 122: 627-640.

Goodman, H., DasSarma, S., Tischer, E. & Peterman, T.K. (1990). Expression of wild type and mutant glutamine synthetase in foreign hosts. Patent No. 4,975,374. U.S. Patent and Trademark Office.

Green, J.M. (2009). Evolution of glyphosate-resistant crop technology. *Weed Science* 57(1): 108-117.

Green, J.M. & Owen, M.D. (2011). Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(11): 5819-5829.

Gressel, J. & Levy, A.A. (2006). Agriculture: the selector of improbable mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(33): 12215-12216.

Grimshaw, A.L., Schwartz, B.M., Grey, T.L., McCullough, P.E., Raymer, P.L., Webster, T.M., Kowalewski, A.R., Tate, T.M. & Parrott, W.A. (2014). Acetyl-coA carboxylase herbicide tolerance in bermudagrass. *Agronomy Journal* 106(3): 925-930.

Grossmann, K. (2010). Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 66(2): 113-120.

Guerineau, F., Brooks, L., Meadows, J., Lucy, A., Robinson, C. & Mullineaux, P. (1990). Sulfonamide resistance gene for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 15: 127-136.

Hain, R., Benting, J., Donn, G., Knittel-Ottleben, N., Holtschulte, B., Loock, A., Springmann, C., Jansen, R. (2012). ALS inhibitor herbicide tolerant *Beta vulgaris* mutants. Patent application WO2012049268. World Intellectual Property Organization.

Hanin, M., Volrath, S., Bogucki, A., Briker, M., Ward, E. & Paszkowski, J. (2001). Gene targeting in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 28(6): 671-677.

Harris, D.M., Corbin, K., Wang, T., Gutierrez, R., Bertolo, A.L., Petti, C., Smilgies, D.M., Estevez, J.M., Bonetta, D., Urbanowicz, B.R., Ehrhardt, D.W., Somerville, C.R., Rose, J.K., Hong, M. & Debolt, S. (2012). Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1A903V and CESA3T942I of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 4098–4103.

Hashim, S., Jan, A., Sunohara, Y., Hachinohe, M., Ohdan, H. & Matsumoto, H. (2012). Mutation of alpha-tubulin genes in trifluralin-resistant water foxtail (*Alopecurus aequalis*). *Pest Management Science* 68: 422-429.

Hawkes, T.R. (2014). Mechanisms of resistance to paraquat in plants. *Pest Management Science* 70(9): 1316-1323.

Hawkes, T.R., Langford, M.P., Viner, R.C., Vernooij, B.T.M. & Dale, R. (2010). Mutant hydroxyphenylpyruvate dioxygenase polypeptides and methods of use. US Patent Application No. 2010/0197503

Hawkes, T.R., Langford, M.P., Viner, R.C. Vernooij, B.T.M. & Dale, R. (2012). Mutant hydroxyphenylpyruvate dioxygenase polypeptides and methods of use. Patent No. 8,269,068. U.S. Patent and Trademark Office.

Health Canada (2007). Clearfield durum wheat varieties with an Als2 or Als3 imidazolinone tolerance trait. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/clearfield-durum-wheat-varieties-als2-als3-imidazolinone-tolerance-trait.html>

Heap, I. (2018). The international survey of herbicide resistant weeds. Online available: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)

Heap, I., & Duke, S. O. (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science* 74(5): 1040-1049.

Heckart, D.L., Parrott, W.A. & Raymer, P. L. (2010). Obtaining sethoxydim resistance in seashore paspalum. *Crop Science* 50(6): 2632-2640.

Heckart, D. L., Tate, T. M., Parrott, W. A., & Raymer, P. L. (2016). In vitro selection of sethoxydim-resistant creeping bentgrass. *Crop Science* 56(2): 845-850.

- Herman, R.A., Phillips, A.M., Lepping, M.D., Fast, B.J. & Sabbatini, J. (2010). Compositional safety of event DAS-40278-9 (AAD-1) herbicide-tolerant maize. *GM Crops* 1(5): 294-311.
- Hinga, M., Griffin, S., Moon, M.S., Rasmussen, R.D. & Cuevas, F. (2011). Methods and compositions to produce rice resistant to ACCase inhibitors. Patent No. US9370149B2. U.S. Patent and Trademark Office.
- Hinga, M., Moon, M.S., Channarayappa, V.R., Rasmussen, R.D. & Cuevas, F. (2016). Rice resistant to HPPD and ACCase inhibiting herbicides. Patent No. 9,303,270. U.S. Patent and Trademark Office.
- Hinga, M., Moon, M.S., Channarayappa, V.R., Rasmussen, R.D. & Cuevas, F. (2018). Rice resistant to HPPD and ACCase inhibiting herbicides. Patent No. 9,994,862. U.S. Patent and Trademark Office.
- Hopkins, M. (2017). Collaboration launches new wheat varieties for the CoAXium wheat production system. CropLife. <https://www.croplife.com/crop-inputs/collaboration-launches-new-wheat-varieties-coaxium-wheat-production-system/>
- Hu, M., Pu, H., Gao, J., Long, W., Chen, F., Zhou, X., Zhang, W., P, Q., Chen, S., & Zhang, J. (2017). Inheritance and molecular characterization of resistance to AHAS-inhibiting herbicides in rapeseed. *Journal of Integrative Agriculture* 16: 2421-2433.
- Huang, S., Weigel, D., Beachy, R.N. & Li, J. (2016). A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nature Genetics* 48(2): 109-111.
- Hummel, A.W., Chauhan, R.D., Cermak, T., Mutka, A.M., Vijayaraghavan, A., Boyher, A., Starker, C.G., Bart, R., Voytas, D.F. & Taylor, N.J. (2018). Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava. *Plant Biotechnology Journal* 16(7): 1275-1282.
- Inui, H., Ueyama, Y., Shiota, N., Ohkawa, Y. & Ohkawa, H. (1999). Herbicide metabolism and cross-tolerance in transgenic potato plants expressing human CYP1A1. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64(1): 33-46.
- ISAAA (2019). GM approval database. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application, <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>
- Jalaludin, A., Yu, Q., Zoellner, P., Beffa, R. & Powles, S. B. (2017). Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Management Science* 73(6) 1091-1100.
- James, D., Borphukan, B., Fartyal, D., Ram, B., Singh, J., Manna, M., Sheri, V., Panditi, V., Yadav, R., Achary, V.M.M. & Reddy, M.K. (2018a). Concurrent overexpression of OsGS1;1 and OsGS2 genes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.): impact on tolerance to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* 9.
- James, D., Borphukan, B., Fartyal, D., Achary, V.M.M. & Reddy, M.K. (2018b). Transgenic manipulation of glutamine synthetase: a target with untapped potential in various aspects of crop improvement. In: Gosal, S.S. & Wani, S.H. (eds.), *Biotechnologies of crop improvement, Volume 2: transgenic approaches*. Springer, p. 367-416
- Jo, J., Won, S. H., Son, D. & Lee, B.H. (2004). Paraquat resistance of transgenic tobacco plants over-expressing the *Ochrobactrum anthropi* pqrA gene. *Biotechnology Letters* 26(18): 1391-1396.
- Jugulam, M., Walsh, M. & Hall, J.C. (2014). Introgression of phenoxy herbicide resistance from *Raphanus raphanistrum* into *Raphanus sativus*. *Plant Breeding* 133(4): 489-492.
- Jugulam, M., Ziauddin, A., So, K.K., Chen, S. & Hall, J.C. (2015). Transfer of Dicamba tolerance from *Sinapis arvensis* to *Brassica napus* via embryo rescue and recurrent backcross breeding. *PloS one* 10(11): e0141418.
- Jung, C., Capistrano-Gossmann, G., Braatz, J., Sashidhar, N. & Melzer, S. (2018). Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. *Plant Breeding* 137(1): 1-9.
- Kaundun, S.S. (2014). Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. *Pest Management Science* 70(9): 1405-1417.
- Kaundun, S.S., Hutchings, S.J., Dale, R.P., Howell, A., Morris, J.A., Kramer, V.C., Shivrain, V.K. & Mcindoe, E. (2017). Mechanism of resistance to mesotrione in an *Amaranthus tuberculatus* population from Nebraska, USA. *PloS one* 12(6): e0180095.

- Kaur, N., Alok, A., Kaur, N., Pandey, P., Awasthi, P. & Tiwari, S. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome. *Functional & Integrative Genomics* 18(1): 89-99.
- Kawahigashi, H., Hirose, S., Inui, H., Ohkawa, H. & Ohkawa, Y. (2005). Enhanced herbicide cross-tolerance in transgenic rice plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Plant Science* 168(3): 773-781.
- Kaya, Y. (2015). Herbicide resistance breeding in sunflower, current situation and future directions. *Journal of ASM. Life Sciences* 2 (326): 101-106.
- Keith, B.K., Lehnhoff, E.A., Burns, E.E., Menalled, F.D. & Dyer, W. E. (2015). Characterisation of *Avena fatua* populations with resistance to multiple herbicides. *Weed Research* 55(6): 621-630.
- Kershner, K.S., Al-Khatib, K., Krothapalli, K. & Tuinstra, M.R. (2012). Genetic resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase-inhibiting herbicides in grain sorghum. *Crop Science* 52(1): 64-73.
- Khan, M.H.U., Khan, S.U., Muhammad, A., Hu, L., Yang, Y. & Fan, C. (2018). Induced mutation and epigenetics modification in plants for crop improvement by targeting CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Cellular Physiology* 233(6): 4578-4594.
- Kim, J.Y., Kim, D.Y., Jang, C.S., Seo, Y.W., Kim, D.S., Kim, J.B. & Kim, K. (2007). Development of molecular markers for bentazone-resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by gamma-ray irradiation. *Journal of the Korean Physical Society* 50(5): 1499.
- Koetle, M.J., Evans, D.L., Singh, V., Snyman, S.J., Rutherford, R.S. & Watt, M.P. (2018). Agronomic evaluation and molecular characterisation of the acetolactate synthase gene in imazapyr tolerant sugarcane (*Saccharum hybrid*) genotypes. *Plant Cell Reports* 37:1201–1213
- Kohlhase, D., Edwards, J. & Owen, M. (2018). Inheritance of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide resistance in *Amaranthus tuberculatus*. *Plant Science* 274: 360-368.
- Koo, D.H., Molin, W.T., Saski, C. A., Jiang, J., Putta, K., Jugulam, M., Friebe, B. & Gill, B.S. (2018). Extrachromosomal circular DNA-based amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(13): 3332-3337.
- Koschmieder, J., Fehling-Kaschek, M., Schaub, P., Ghisla, S., Brausemann, A., Timmer, J. & Beyer, P. (2017). Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications. *PloS one* 12(11): e0187628.
- Kraehmer, H., van Almsick, A., Beffa, R., Dietrich, H., Eckes, P., Hacker, E., Hain, R., Streck, H.J., Stuebler, H. & Willms, L. (2014). Herbicides as weed control agents—state of the art. II. Recent achievements. *Plant Physiology* 166: 1132-1148.
- Kumlehn, J., Pietralla, J., Hensel, G., Pacher, M. & Puchta, H. (2018). The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology. *Journal of Integrative Plant Biology* 60(12): 1127-1153.
- Küpper, A., Peter, F., Zöllner, P., Lorentz, L., Tranel, P.J., Beffa, R. & Gaines, T.A. (2018). Tembotrione detoxification in 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitor-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Wats.). *Pest Management Science* 74(10): 2325-2334.
- Kwon, S.Y., Jeong, Y.J., Lee, H.S., Kim, J.S., Cho, K.Y., Allen, R.D. & Kwak, S.S. (2002). Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant, Cell & Environment* 25(7): 873-882.
- Laforest, M., Soufiane, B., Simard, M. J., Obeid, K., Page, E., & Nurse, R. E. (2017). Acetyl-CoA carboxylase overexpression in herbicide-resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Pest Management Science* 73(11): 2227-2235.
- Landi, P., Frascaroli, E. & Giuliani, M.M. (1999). Genetic variability for resistance to trifluralin in *Zea mays*. *Weed Science* 47(4): 369-374.

- LeBrun, M., Leroux, B. & Sailland, A. (1992). New double transit peptide coding sequences for use in genes coding for increased herbicide tolerance in plants. European Union Patent 0507698.
- LeClere, S., Wu, C., Westra, P. & Sammons, R.D. (2018). Cross-resistance to dicamba, 2, 4-D, and fluroxypyr in *Kochia scoparia* is endowed by a mutation in an AUX/IAA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E2911–E2920.
- Lee, H., Rustgi, S., Kumar, N., Burke, I., Yenish, J.P., Gill, K.S., von Wettstein, D. & Ullrich, S.E. (2011). Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(21): 8909-8913.
- Li, X. & Nicholl, D. (2005). Development of PPO inhibitor-resistant cultures and crops. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 61(3): 277-285.
- Li, X., Volrath, S.L., Nicholl, D.B., Chilcott, C.E., Johnson, M.A., Ward, E.R. & Law, M.D. (2003). Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize. *Plant Physiology* 133(2): 736-747.
- Li, D., Barclay, I., Jose, K., Stefanova, K. & Appels, R. (2008). A mutation at the Ala122 position of acetohydroxyacid synthase (AHAS) located on chromosome 6D of wheat: improved resistance to imidazolinone and a faster assay for marker assisted selection. *Molecular Breeding* 22(2): 217-225.
- Li, J., Mu, J., Bai, J., Fu, F., Zou, T., An, F., Zhang, J., Jing, H., Wang, Q., Li, Z., Yang, S. & Zuo, J. (2013). Paraquat resistant 1, a golgi-localized putative transporter protein, is involved in intracellular transport of paraquat. *Plant Physiology* 162: 470-483.
- Li, Z., Liu, Z. B., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., Ward, R.T., Clifton, S.C. & Cigan, A.M. (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiology* 169(2): 960-970.
- Li, J., Meng, X., Zong, Y., Chen, K., Zhang, H., Liu, J., Li, J. & Gao, C. (2016a). Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR–Cas9. *Nature Plants* 2(10): 16139.
- Li, T., Liu, B., Chen, C.Y. & Yang, B. (2016b). TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. *Journal of Genetics and Genomics* 43: 297-305.
- Li, C., Zong, Y., Wang, Y., Jin, S., Zhang, D., Song, Q., Zhang, R. & Gao, C. (2018a). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biology* 19(1): 59.
- Li, J., Peng, Q., Han, H., Nyporko, A., Kulynych, T., Yu, Q. & Powles, S. (2018b). Glyphosate resistance in *Tridax procumbens* via a novel EPSPS Thr-102-Ser Substitution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(30): 7880-7888.
- Li, S., Li, J., Zhang, J., Du, W., Fu, J., Sutar, S., Zhao, Y. & Xia, L. (2018c). Synthesis-dependent repair of Cpf1-induced double strand DNA breaks enables targeted gene replacement in rice. *Journal of Experimental Botany* 69(20): 4715-4721.
- Liu, W., Bai, S., Zhao, N., Jia, S., Li, W., Zhang, L. & Wang, J. (2018). Non-target site-based resistance to tribenuron-methyl and essential involved genes in *Myosoton aquaticum* (L.). *BMC Plant Biology* 18(1): 225.
- Lu, H., Yu, Q., Han, H., Owen, M. J., & Powles, S. B. (2019). A novel psbA mutation (Phe-274-Val) confers resistance to PSII herbicides in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Pest Management Science* 75(1): 144-151.
- Mangrauthia, S.K., Maliha, A., Prathi, N.B. & Marathi, B. (2017). MicroRNAs: potential target for genome editing in plants for traits improvement. *Indian Journal of Plant Physiology* 22(4): 530-548.
- Mankin, S.L., Ulrich, S., Hong, H., Wenck, A.R., Neuteboom, L., Whitt, S.R. & Carlson, D.R. (2011). Herbicide tolerant plants. Patent application WO 2011/028832 A2. World Intellectual Property Organization.
- Mankin, S.L., Schofl, U., Hong, H., Wenck, A.R., Neuteboom, L., Whitt, S.R. & Carlson, D.R. (2012). Herbicide-tolerant plants. Patent EP2473022 A2. European Patent Office.
- Margaritopoulou, T., Tani, E., Chachalis, D. & Travlos, I. (2018). Involvement of epigenetic mechanisms in herbicide resistance: The case of *Conyza canadensis*. *Agriculture* 8(1): 17.

Markus, C., Pecinka, A., Karan, R., Barney, J. N., & Merotto Jr, A. (2018). Epigenetic regulation—contribution to herbicide resistance in weeds?. *Pest Management Science* 74(2): 275-281.

Marshall, J.M. & Akbari, O.S. (2018). Can CRISPR-based gene drive be confined in the wild? A question for molecular and population biology. *ACS Chemical Biology* 13(2): 424-430.

Matringe, M., Sailland, A., Pelissier, B., Rolland, A. & Zink, O. (2005). P-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 61(3): 269-276.

McMurray, L.S., Preston, C., Vandenberg, A., Mao, D., Oldach, K.H., Meier, K.S. & Paull, J.G. (2018). Development of high levels of metribuzin tolerance in lentil. *Weed Science early view*

Mechant, E., De Marez, T., Hermann, O., Olsson, R. & Bulcke, R. (2008). Target site resistance to metarnitron in *Chenopodium album* L. *Journal of Plant Diseases and Protection Special Issue XXI*: 37-40.

Mengistu, L.W., Mueller-Warrant, G.W., Liston, A. & Barker, R.E. (2000). psbA mutation (valine219 to isoleucine) in *Poa annua* resistant to metribuzin and diuron. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 56(3): 209-217.

Menne, H. & Köcher, H. (2012). HRAC classification of herbicides and resistance development. In: Krämer, W., Schirmer, U., Jeschke, P. & Witschel, M. (eds.), *Modern crop protection compounds*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 5-28.

Michel, A., Arias, R.S., Scheffler, B.E., Duke, S.O., Netherland, M. & Dayan, F.E. (2004). Somatic mutation-mediated evolution of herbicide resistance in the nonindigenous invasive plant hydrilla (*Hydrilla verticillata*). *Molecular Ecology* 13(10): 3229-3237.

Michel, A., Netherland, M.D., Scheffler, B.E., Dayan, F.E. & De Ares, R.S.A. (2011). Herbicide-resistant plants, and polynucleotides and methods for providing same. U.S. Patent Application No. 10/521,478.

Misawa, N., Yamano, S., Linden, H., de Felipe, M. R., Lucas, M., Ikenaga, H. & Sandmann, G. (1993). Functional expression of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthesis gene *crtl* in transgenic plants showing an increase of Beta-carotene biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon. *The Plant Journal* 4(5): 833-840.

Mishra, R., Joshi, R.K. & Zhao, K. (2018). Genome editing in rice: recent advances, challenges, and future implications. *Frontiers in Plant Science* 9: 1361.

Mithila, J. & Hall, J.C. (2013). Transfer of auxinic herbicide resistance from *Brassica kaber* to *Brassica juncea* and *Brassica rapa* through embryo rescue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 49(4): 461-467.

Møller, H. D., Lin, L., Xiang, X., Petersen, T. S., Huang, J., Yang, L., Kjeldsen, E., Jensen, U.B., Zhang, X., Liu, X., Xu, X., Wang, J., Yang, H., Church, G.M., Bolund, L., Regenberg, B. & Luo, Y. (2018). CRISPR-C: circularization of genes and chromosome by CRISPR in human cells. *Nucleic Acids Research* 46(22): e131.

Monsanto (2012). Petition for the determination of nonregulated status for dicamba and glufosinate-tolerant cotton MON 88701. [www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/12\\_18501p.pdf](http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/12_18501p.pdf)

Monsanto (2015). Petition for the determination of nonregulated status for dicamba and glufosinate tolerant MON 87419 Maize. [www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/15\\_11301p.pdf](http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/15_11301p.pdf)

Moretti, M.L. & Hanson, B.D. (2017). Reduced translocation is involved in resistance to glyphosate and paraquat in *Coryza bonariensis* and *Coryza canadensis* from California. *Weed Research* 57(1): 25-34.

Munoz, P.R., Quesenberry, K.H., Blount, A.R., Ferrell, J.A. & Dubeux, J.C. (2015). A new red clover 2, 4-D-resistant cultivar to improve broadleaf weed control and elucidate the molecular mechanism of resistance. In: Budak, H. & Spanegnberg, G. (eds.), *Molecular breeding of forage and turf*. Springer, Cham, pp. 31-40.

Naim, F., Dugdale, B., Kleidon, J., Brinin, A., Shand, K., Waterhouse, P. & Dale, J. (2018). Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. *Transgenic Research* 27(5): 451-460.

Nakajima, I., Ban, Y., Azuma, A., Onoue, N., Moriguchi, T., Yamamoto, T., Toki, S. & Endo, M. (2017). CRISPR/ Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLoS one* 12(5): e0177966.

- Nakka, S., Godar, A.S., Wani, P.S., Thompson, C.R., Peterson, D.E., Roelofs, J. & Jugulam, M. (2017). Physiological and molecular characterization of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD)-inhibitor resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Wats.). *Frontiers in Plant Science* 8: 555.
- Neve, P. (2018). Gene drive systems: do they have a place in agricultural weed management?. *Pest Management Science* 74(12): 2671-2679.
- Odipio, J., Alicai, T., Ingelbrecht, I., Nusinow, D.A., Bart, R. & Taylor, N.J. (2017). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in Cassava. *Frontiers in Plant Science* 8: 1780.
- Oliveira, M.C., Gaines, T.A., Dayan, F.E., Patterson, E.L., Jhala, A.J. & Knezevic, S.Z. (2018a). Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors. *Pest Management Science* 74(10): 2296-2305.
- Oliveira, M.C., Gaines, T.A., Jhala, A.J. & Knezevic, S. Z. (2018b). Inheritance of mesotrione resistance in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA. *Frontiers in Plant Science* 9: 60.
- Ortega, J. L., Rajapakse, W., Bagga, S., Apodaca, K., Lucero, Y., & Sengupta-Gopalan, C. (2018). An intragenic approach to confer glyphosate resistance in chile (*Capsicum annuum*) by introducing an in vitro mutagenized chile EPSPS gene encoding for a glyphosate resistant EPSPS protein. *PLoS one* 13(4): e0194666.
- Ostlie, M., Haley, S., Westra, P. & Valdez, V. (2012). Acetyl co-enzyme A carboxylase herbicide resistant plants. Patent WO 2012/106321.
- Pan, G., P. Si, Q. Yu, J. Tu, and S. Powles (2012). Non-target site mechanism of metribuzin tolerance in induced tolerant mutants of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Crop and Pasture Science* 63: 452-458
- Pan, L., Gao, H., Xia, W., Zhang, T. & Dong, L. (2016a). Establishing a herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance. *Journal of Experimental Botany* 67(6): 1745-1757.
- Pan, L., Wang, Z., Cai, J., Gao, H., Zhao, H. & Dong, L. (2016b). High-throughput sequencing reveals differential regulation of miRNAs in fenoxaprop-P-ethyl-resistant *Beckmannia syzigachne*. *Scientific Reports* 6: 28725.
- Pan, L., Zhao, H., Yu, Q., Bai, L. & Dong, L. (2017). miR397/Laccase gene mediated network improves tolerance to fenoxaprop-p-ethyl in *Beckmannia syzigachne* and *Oryza sativa*. *Frontiers in Plant Science* 8: 879.
- Park, K.W. & Mallory-Smith, C.A. (2006). psbA mutation (Asn266 to Thr) in *Senecio vulgaris* L. confers resistance to several PS II-inhibiting herbicides. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 62(9): 880-885.
- Parker, W.B., Marshall, L.C., Burton, J.D., Somers, D.A., Wyse, D.L., Gronwald, J.W. & Gengenbach, B.G. (1990). Dominant mutations causing alterations in acetyl-coenzyme A carboxylase confer tolerance to cyclohexanedione and aryloxyphenoxypropionate herbicides in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(18): 7175-7179.
- Pasternak, M., Tresch, S., Kraus, H., Hutzler, J., Lerchl, J., Mietzner, T., Weston, B., Witschel, M. & Paulik, J.M. (2017). Plants having increased tolerance to herbicides. Patent Application No. 2017/0067075A. U.S. Patent and Trademark Office.
- de Pater, S., Pinas, J.E., Hooykaas, P.J.J. & van der Zaal, B.J. (2013). ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium* -mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnology Journal* 11: 510-515.
- de Pater, S., Klemann, B.J. & Hooykaas, P.J. (2018). True gene-targeting events by CRISPR/Cas-induced DSB repair of the PPO locus with an ectopically integrated repair template. *Scientific Reports* 8(1): 3338.
- Patzoldt, W.L., Tranel, P.J. & Hager, A.G. (2005). A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype with multiple resistance across three herbicide sites of action. *Weed Science* 53(1): 30-36.

Patzoldt, W.L., Hager, A.G., McCormick, J.S. & Tranel, P.J. (2006). A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(33): 12329-12334.

Pedroso, R.M., Al-Khatib, K., Abdallah, I., Alarcón-Reverte, R. & Fischer, A.J. (2016). Resistance to propanil in ricefield bulrush (*Schoenoplectus mucronatus*) is conferred by a *psbA* mutation, val 219 to ile. *Weed Science* 64(4): 562-569.

Perez-Jones, A., Intanon, S. & Mallory-Smith, C. (2009). Molecular analysis of hexazinone-resistant shepherd's-purse (*Capsella bursa-pastoris*) reveals a novel *psbA* mutation. *Weed Science* 57(6): 574-578.

Peters, B. & Strek, H.J. (2018). Herbicide discovery in light of rapidly spreading resistance and ever-increasing regulatory hurdles. *Pest Management Science* 74(10): 2211-2215.

Piatek, A.A., Lenaghan, S.C. & Stewart Jr, C.N. (2018). Advanced editing of the nuclear and plastid genomes in plants. *Plant Science* 273: 42-49.

Pornprom, T., Prodmatee, N. & Chatchawankanphanich, O. (2009). Glutamine synthetase mutation conferring target-site-based resistance to glufosinate in soybean cell selections. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 65(2): 216-222.

Powles, S.B. (2010). Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(3): 955-956.

Powles, S.B. & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61: 317-347.

Prigge, M., Greenham, K., Zhang, Y., Santner, A., Castillejo, C., Mutka, A.M., OMalley, R.C., Ecker, J.R., Kunkle, B.N. & Estelle, M. (2016). The Arabidopsis auxin receptor F-box proteins AFB4 and AFB5 are required for response to the synthetic auxin picloram. *G3* 6: 1383-1390.

Puchta, H. (2016). Using CRISPR/Cas in three dimensions: towards synthetic plant genomes, transcriptomes and epigenomes. *The Plant Journal*: 87(1): 5-15.

Puchta, H. (2017). Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current Opinion in Plant Biology* 36: 1-8.

Puri, A., MacDonald, G.E., Altpeter, F. & Haller, W.T. (2007). Mutations in phytoene desaturase gene in fluridone-resistant *Hydrilla* (*Hydrilla verticillata*) biotypes in Florida. *Weed Science* 55(5): 412-420.

Que, Q., Dawson, J.L. & Chen, Z. (2013). Genes providing tolerance to pds inhibitors. Patent No. US20140342913A1. U.S. Patent and Trademark Office.

Quesenberry, K., Blount, A., Munoz, P., Ferrell, J. & Dubeux, J. (2015). Registration of 'FL24D', a red clover selected for tolerance to 2, 4-D herbicide. *Journal of Plant Registrations* 9(3): 288-293.

Ran, Y., Patron, N., Kay, P., Wong, D., Buchanan, M., Cao, Y.Y., Sawbridge, T., Davies, J.P., Webb, S.R., Spangenberg, G., Ainley, W.M, Walsh, T.A. & Hayden, M.J. (2018). Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnology Journal* 16: 2088-2101.

Rao, V.S. (2015) *Transgenic herbicide resistance in plants*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Rios, R., Saione, H., Robredo, C., Acevedo, A., Colombo, N. & Prina, A. (2003). Isolation and molecular characterization of atrazine tolerant barley mutants. *Theoretical and Applied Genetics* 106(4): 696-702.

Rodríguez-Suárez, C., Ramírez, M.C., Martínez, C., Nadal, S., Martín, A., & Atienza, S.G. (2009). Selection and molecular characterization of imidazolinone resistant mutation-derived lines of *Triticum aestivum* HT621. *Molecular Breeding* 23(4): 565-572.

Rousonelos, S.L., Lee, R.M., Moreira, M.S., VanGessel, M.J. & Tranel, P.J. (2012). Characterization of a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) population resistant to ALS-and PPO-inhibiting herbicides. *Weed Science* 60(3): 335-344.

- Sala, C.A., Bulos, M., Echarte, M., Whitt, S.R. & Ascenzi, R. (2008). Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 118(1): 105-112.
- Salas, R.A., Burgos, N.R., Tranel, P.J., Singh, S., Glasgow, L., Scott, R.C. & Nichols, R.L. (2016). Resistance to PPO-inhibiting herbicide in Palmer amaranth from Arkansas. *Pest Management Science* 72(5): 864-869.
- Sammons, R.D. & Gaines, T.A. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science* 70(9): 1367-1377.
- Sammons, R.D., You, J., Qi, Y., Flasinski, S., Kavanaugh, C., Washam, J., Ostrander, E., Wang, D. & Heck, G. (2018). Evaluation of glyphosate resistance in *Arabidopsis thaliana* expressing an altered target site EPSPS. *Pest Management Science* 74(5): 1174-1183.
- Samudio, S., Brede, A.D., Ye, J. & Rommens, C. (2011) Breeding and development of JS501 and Replay glyphosate-tolerant perennial ryegrass. ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings, San Antonio, TX. <https://a-c-s.confex.com/crops/2011am/webprogram/Paper64580.html>
- Santucci, A., Bernardini, G., Braconi, D., Petricci, E. & Manetti, F. (2017). 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and its inhibition in plants and animals: small molecules as herbicides and agents for the treatment of human inherited diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* 60(10): 4101-4125.
- Sardood, B.P. & Goltapeh, E.M. (2018). Weeds, herbicides and plant disease management. In: Lichtfouse, Eric (ed.), *Sustainable Agriculture Reviews* 31. Springer, Cham. Pp. 41-178.
- Saskpulse (2018). Development of metribuzin tolerant chickpea: Proof of concept validation of CRISPR based gene editing tools in chickpea. <https://saskpulse.com/research/research-project-listings/dr-bunyamin-taran-10>
- Sauer, N.J., Narváez-Vásquez, J., Mozoruk, J., Miller, R.B., Warburg, Z.J., Woodward, M.J., Mihiret, Y.A., Lincoln, T.A., Segami, R.E., Sanders, S.L., Walker, K.A., Beethma, P.R., Schöpke, C.R. & Gocal, G.F.W. (2016). Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *Plant Physiology* 170: 1917-1928
- Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H. & Edwards, D. (2017). Towards CRISPR/Cas crops – bringing together genomics and genome editing. *New Phytologist* 216(3): 682-698.
- Scheible, W. R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., & Somerville, C. (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* lxr1 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(18): 10079-10084.
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R.L., Yang, M., Hakimi, S.M., Mo, H. & Habben, J.E. (2017). ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal* 15(2): 207-216.
- Shih, N., Lin, D., Wang, C. & Wang, C. (2018). A paraquat tolerance mutant in rice (*Oryza sativa* L.) is controlled by maternal inheritance. *American Journal of Plant Sciences* 9(10): 2086-2099.
- Shim, I., Law, R., Kileeg, Z., Stronghill, P., Northey, J.G., Strap, J.L. & Bonetta, D.T. (2018). Alleles causing resistance to isoxaben and flupoxam highlight the significance of transmembrane domains for CESA protein function. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., Teramura, H., Yamamoto, T., Komatsu, H., Miura, K., Ezura, H., Nishida, K., Ariizumi, T. & Kondo, A. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology* 35: 441-443.
- Shimatani, Z., Fujikura, U., Ishii, H., Matsui, Y., Suzuki, M., Ueke, Y., Taoka, K., Terada, R., Nishida, K. & Kondo, A. (2018). Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 131: 78-83.
- Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKolver, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.C., Arnold, N.L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., Rock, J.M., Wu, Y.-Y., Katibah, G.E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M.A., Blakeslee, B., Greenwalt, S.A., Butler, H.J., Hinkley, S.J., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D. &

- Urnov, F.D. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 437 – 441.
- Si, P., Buirchell, B., & Sweetingham, M. (2009). Improved metribuzin tolerance in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) by induced mutation and field selection. *Field Crops Research* 113(3): 282-286.
- Siehl, D. L., Tao, Y., Albert, H., Dong, Y., Heckert, M., Madrigal, A., Lincoln-Cabatu, B., Lu, J., Fenwick, T., Bermudez, E., Sandoval, M., Horn, C., Green, J.M., Hale, T., Pagano, P., Clark, J., Udranszky, I.A., Rizzo, N., Bourett, T., Howard, R.J., Johnson, D.H., Vogt, M., Akinsola, G. & Castle, L.A. (2014). Broad 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide tolerance in soybean with an optimized enzyme and expression cassette. *Plant Physiol* 166(3): 1162-1176.
- Slinkard, A.E., Vanderberg, A. & Holm, F. (2007). Lentil plants having increased resistance to imidazolinone herbicides. Patent No. 7232942. U.S. Patent and Trademark Office.
- Springer, N.M. & Schmitz, R.J. (2017). Exploiting induced and natural epigenetic variation for crop improvement. *Nature Reviews Genetics* 18(9): 563-575.
- Strom, S. A. (2018). Preemergence activity of chloroacetamide herbicides on a multiple herbicide-resistant population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). Doctoral Dissertation. <https://www.ideals.illinois.edu/bitstream/handle/2142/101048/STROM-THESIS-2018.pdf?sequence=1>
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., Guo, X., Du, W. & Xia, L. (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Molecular Plant* 9(4): 628-631.
- Surov, T., Aviv, D., Aly, R., Joel, D.M., Goldman-Guez, T. & Gressel, J. (1998). Generation of transgenic asulam-resistant potatoes to facilitate eradication of parasitic broomrapes (*Orobancha* spp.), with the *su1* gene as the selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 132-137.
- Svitashev, S., Young, J., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S.C. & Cigan, A.M. (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology* 169: 931-945.
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J.K. & Cigan, A.M. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications* 7: 13274.
- Tahmasebi, B.K., Alcántara-de la Cruz, R., Alcántara, E., Torra, J., Domínguez-Valenzuela, J.A., Cruz-Hipólito, H.E., Rojano-delgado, A.M. & De Prado, R. (2018). Multiple resistance evolution in bipyridylum-resistant *Epilobium ciliatum* after recurrent selection. *Frontiers in Plant Science* 9: 695.
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K. & Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 61(3): 246-257.
- Tang, J. & Chu, C. (2017). MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nature Plants* 3(7): 17077.
- Tateno, M., Brabham, C. & DeBolt, S. (2016). Cellulose biosynthesis inhibitors – a multifunctional toolbox. *Journal of Experimental Botany* 67(2): 533-542.
- Thiel, H. & Varrelmann, M. (2014). Identification of a new PSII target site *psbA* mutation leading to D1 amino acid Leu218Val exchange in the *Chenopodium album* D1 protein and comparison to cross-resistance profiles of known modifications at positions 251 and 264. *Pest Management Science* 70(2): 278-285.
- Tian, Y.S., Xu, J., Peng, R. H., Xiong, A.S., Xu, H., Zhao, W., Fu, X.Y., Han, H.J. & Yao, Q. H. (2013). Mutation by DNA shuffling of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Malus domestica* for improved glyphosate resistance. *Plant Biotechnology Journal* 11(7): 829-838.
- Tian, Y.S., Xu, J., Xing, X.J., Zhao, W., Fu, X.Y., Peng, R.H. & Yao, Q.H. (2015a). Improved glyphosate resistance of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Vitis vinifera* in transgenic *Arabidopsis* and rice by DNA shuffling. *Molecular Breeding* 35(7): 148.
- Tian, Y.S., Xu, J., Zhao, W., Xing, X.J., Fu, X.Y., Peng, R.H. & Yao, Q.H. (2015b). Identification of a phosphinothricin-resistant mutant of rice glutamine synthetase using DNA shuffling. *Scientific Reports* 5: 15495.

- Tian, S., Jiang, L., Cui, X., Zhang, J., Guo, S., Li, M., Zhang, H., Ren, Y., Gong, G., Liu, F., Chen, Q. & Xu, Y (2018). Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Reports* 37: 1353-1356.
- Tranel, P.J., Wright, T.R. & Heap, I.M. (2018). Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. <http://www.weedscience.com>.
- Tschuy, F. & Wirth, J. (2015). Die aktuelle Situation der Herbizidresistenzen in der Schweiz. *Agrarforschung Schweiz* 6(11-12): 516-523.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K. & Kobayashi, H. (1999). A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell* 11(7): 1195-1206.
- Tuinstra, M.R. & Al-Khatib, K. (2008). Acetolactate synthase herbicide resistant sorghum. Patent No. 20080216187. U.S. Patent and Trademark Office.
- Tuinstra, M.R. & Al-Khatib, K. (2017). Acetyl-CoA carboxylase herbicide resistant sorghum. Patent No. 9,617,530. U.S. Patent and Trademark Office.
- Uriarte, V.T., Zambelli, A.D., Kaspar, M. & Pardo, P.A. (2014). Sorghum plants having a mutant polynucleotide encoding the large subunit of mutated acetohydroxyacid synthase protein and increased resistance to herbicides. Patent Application No. 13/822,276. U.S. Patent and Trademark Office.
- Vanèetoviæ, J., Simiæ, M. & Božinoviæ, S. (2014). The use of CTM (cycloxydim tolerant maize) mutation in maize weeds control. In: Tomlekova, N.B., Kozgar M.I. & Wani, M.R. (eds.), *Mutagenesis: exploring novel genes and pathways*. Wageningen Academic Publishers 2014, pp. 203-214.
- Varanasi, V.K., Brabham, C. & Norsworthy, J. K. (2018). Confirmation and characterization of non-target site resistance to fomesafen in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science* 6: 702-709.
- Vencill, W.K., Nichols, R.L., Webster, T.M., Soteris, J.K., Mallory-Smith, C., Burgos, N.R., Johnson, W.G. & McClelland, M.R. (2012). Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. *Weed Science* 60(SP1): 2-30.
- Verkest, A., Bourout, S., Debaveye, J., Reynaert, K., Saey, B., Van den Brande, I. & D'Halluin, K. (2018). Impact of differential DNA methylation on transgene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) events generated by targeted sequence insertion. *Plant Biotechnology Journal early view*
- Volrath, S.L., Johnson, M.A., Ward, E.R. & Heifetz, P.B. (1999). DNA molecules encoding plant protoporphyrinogen oxidase and inhibitor-resistant mutants thereof. Patent No. 5939602. U.S. Patent and Trademark Office.
- Vrbničanin, S., Pavlović, D., & Božić, D. (2017). Weed resistance to herbicides. In: Pacanoski, Z. (ed.), *Herbicide resistance in weeds and crops*. InTech: [www.intechopen.com/books/herbicide-resistance-in-weeds-and-crops](http://www.intechopen.com/books/herbicide-resistance-in-weeds-and-crops)
- Wagner, T., Windhövel, U. & Römer, S. (2002). Transformation of tobacco with a mutated cyanobacterial phytoene desaturase gene confers resistance to bleaching herbicides. *Zeitschrift für Naturforschung C* 57(7-8): 671-679.
- Walsh, T.A., Neal, R., Merlo, A.O., Honma, M., Hicks, G.R., Wolff, K., Matsumura, W. & Davies, J.P. (2006). Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiology* 142(2): 542-552.
- Walsh, T.A., Hicks, G.R., Honma, M. & Davies, J.P. (2010). Resistance to auxinic herbicides. Patent Nr US7820883B2. U.S. Patent and Trademark Office.
- Walter, K.L., Strachan, S.D., Ferry, N.M., Albert, H.H., Castle, L.A. & Sebastian, S. A. (2014). Molecular and phenotypic characterization of Als1 and Als2 mutations conferring tolerance to acetolactate synthase herbicides in soybean. *Pest Management Science* 70(12):1831-1839.

- Wang, T., Fleury, A., Ma, J. & Darmency, H. (1996). Genetic control of dinitroaniline resistance in foxtail millet (*Setaria italica*). *Journal of Heredity* 87(6): 423-426.
- Wang, M., Liu, Y., Zhang, C., Liu, J., Liu, X., Wang, L., Wang, W., Chen, H., Wie, C., Ye, X., Li, X. & Tu, J. (2015). Gene editing by co-transformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice OsEPSPS gene and the inheritance of mutations. *PLoS One* 10(4): e0122755.
- Watts, J.M. & Ganesan, S. (2017). Glyphosate resistant class 1 EPSPS genes. Patent No. 9,758,792. U.S. Patent and Trademark Office.
- Werle, R., Begcy, K., Yerka, M.K., Mower, J.P., Dweikat, I., Jhala, A.J. & Lindquist, J.L. (2017). Independent evolution of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in weedy Sorghum populations across common geographic regions. *Weed Science* 65(1): 164-176.
- Westwood, J.H., Charudattan, R., Duke, S.O., Fennimore, S.A., Marrone, P., Slaughter, D.C., Swanton, C. & Zollinger, R. (2018). Weed management in 2050: Perspectives on the future of weed science. *Weed Science* 66(3): 275-285.
- Wolter, F. & Puchta, H. (2018). Application of CRISPR/Cas to understand cis-and trans-Regulatory elements in plants. In: Yamaguchi, N. (ed.), *Plant Transcription Factors*. Humana Press, New York, pp. 23-40.
- Wright, T.R., Shan, G., Walsh, T.A., Lira, J.M., Cui, C., Song, P., Zhuang, M., Arnold, N.L., Lin, G., Yau, K., Russell, S.M., Cicchillo, R.M., Peterson, M.A., Simpson, D.M., Zhou, N., Ponsamuel, J. & Zhang, Z. (2010). Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(47): 20240-20245.
- Xi, J., Xu, P. & Xiang, C.B. (2012). Loss of AtPDR11, a plasma membrane-localized ABC transporter, confers paraquat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 69(5): 782-791.
- Yasuor, H., TenBrook, P.L., Tjeerdema, R.S. & Fischer, A.J. (2008). Responses to clomazone and 5-ketoclozomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)* 64(10): 1031-1039.
- Yamamoto, E., Zeng, L. & Baird, W. V. (1998).  $\alpha$ -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica*. *Plant Cell* 10: 297-308.
- Yemets, A., Radchuk, V., Bayer, O., Bayer, G., Pakhomov, A., Baird, W.V. & Blume, Y. B. (2008a). Development of transformation vectors based upon a modified plant  $\alpha$ -tubulin gene as the selectable marker. *Cell Biology International* 32(5): 566-570.
- Yemets, A. I., Baird, W. V., & Blume, Y. B. (2008b). Modified tubulin genes as selectable markers for plant transformation. In: Blume, Y.B., Baird, W.V., Yemets, A.I. & Breviario, D. (eds.), *The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology*. Springer, Dordrecht, pp. 435-454.
- Yu, Q. & Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science* 70(9): 1340-1350.
- Yu, Q., Jalaludin, A., Han, H., Chen, M., Sammons, R.D. & Powles, S.B. (2015). Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiology* 167(4): 1440-1447.
- Zhang, F., & Voytas, D. F. (2018). Modulating gene translational control through genome editing. *National Science Review*.
- Zhang, Y.C., Yu, Y., Wang, C.Y., Li, Z.Y., Liu, Q., Xu, J., Liao, J.Y., Wang, X.J., Qu, L.H., Chen, F., Xin, P., Yan, C., Chu, J., Li, H.Q. & Chen, Y.Q. (2013). Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nature Biotechnology* 31(9): 848-852.
- Zhang, C., Feng, L., & Tian, X. S. (2018a). Alterations in the 5' untranslated region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Pest Management Science* 74(11): 2561-2568.
- Zhang, H., Si, X., Ji, X., Fan, R., Liu, J., Chen, K., Wang, D. & Gao, C. (2018b). Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nature Biotechnology* 36: 894-898.

Zhou, M., Xu, H., Wei, X., Ye, Z., Wei, L., Gong, W., Wang, Y. & Zhu, Z. (2006). Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. *Plant Physiology* 140(1): 184-195.