

# 牛筋草 (*Eleusine indica*) 對嘉磷塞 抗藥性反應之測定

袁秋英\* 謝玉貞 蔣慕琰

台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所公害防治組

(接受日期：2005 年 3 月 7 日)

## 摘 要

袁秋英\*、謝玉貞、蔣慕琰 2005 牛筋草 (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) 對嘉磷塞抗藥性反應之測定 植保會刊 47 : 143 – 154

本研究針對台灣牛筋草 (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) 測試其與嘉磷塞劑量反應、shikimic acid 含量及 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 酵素等生理反應，探討其抗藥特性。高雄地區果園採集之 14 個族群牛筋草，經播種、育苗至 6-8 葉齡，噴施嘉磷塞 0.05-1.6 kg ai ha<sup>-1</sup> 劑量，施藥後 14 日，以乾重為基礎，經由 log-logistic 程度估算感性(S)及抗性(R)牛筋草之 ED<sub>50</sub> 分別為 0.12 及 0.57 kg ai ha<sup>-1</sup>。牛筋草幼葉 shikimic acid 含量之測定顯示，隨施藥後天數及藥劑劑量增加，感性牛筋草 shikimic acid 含量亦逐漸增加，施藥後 7 日，shikimic acid 大量累積為 70 μmol g<sup>-1</sup>，約為抗性牛筋草 shikimic acid 含量的 50 倍。利用 RT-PCR 擴增牛筋草抗性及感性植株之 EPSPS cDNA，經轉殖於大腸桿菌大量複製，純化之 EPSPS 蛋白質，分別以嘉磷塞藥劑反應，抗性牛筋草 EPSPS 活性之 I<sub>50</sub> 值為感性牛筋草之 4.3 倍。

(關鍵詞：嘉磷塞抗藥性、牛筋草、劑量反應、EPSP synthase 活性)

## 緒 言

嘉磷塞 (glyphosate, N-phosphomethyl glycine) 為非選擇性萌後除草劑，一般田間用量為 1.6-2.5 kg ha<sup>-1</sup>，可有效防除一年生及大部份多年生雜草，在台灣已登記於 12

種主要作物、休閒地及非耕地使用，為旱田最重要之萌後殺草劑<sup>(2, 3, 4)</sup>。嘉磷塞主要作用位置為 shikimic acid pathway 代謝路徑中 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP)，嘉磷塞與受質 phosphoenolpyruvate (PEP) 產生競爭性之抑制，並且阻

\* 通訊作者。E-mail: yci@tactri.gov.tw

止 EPSPS preprotein 運移至葉綠體<sup>(6, 10)</sup>，造成苯丙氨酸 (phenylalanine)、酪氨酸 (tyrosine) 及色氨酸 (tryptophan) 3 種芳香族氨基酸含量降低，影響蛋白質之合成，進而抑制植物生長<sup>(6, 15)</sup>，產生防除雜草之效果。

全球抗除草劑之雜草，至 2004 年已有 291 個生物型 (biotype)，分別對 17 種以上除草劑類別具抗性。1996 年起澳洲、美洲、南非及馬來西亞等地，陸續出現抗嘉磷塞之黑麥草 (*Lolium rigidum* Gaud.)、義大利黑麥草 (*Lolium multiflorum* Lam.)、加拿大蓬 (*Coryza Canadensis* L. Cronq.)、美洲假蓬 (*C. bonariensis* L. Cronq.)、車前草 (*Plantago lanceolata* L.) 及牛筋草等生物型。臺灣中部地區果園之華九頭獅子草 (*Dicliptera chinensis* Juss.) 亦已證明具有自然耐嘉磷塞藥劑之特性<sup>(1, 35)</sup>，近年來於高雄縣、南投縣以及宜蘭縣果園之觀察，陸續出現噴施嘉磷塞一般田間施用劑量，無法完全防除牛筋草之現象，因此牛筋草成為園區內主要之優勢雜草。牛筋草為禾本科一年生雜草，分佈於熱帶及亞熱帶地區，為全球性重要頑強雜草<sup>(15)</sup>，普遍生長於台灣全省低海拔之溝邊、路旁、休耕田及果園，牛筋草全年可萌芽生長，開花結果期主要於暖季，單株結籽可達 2000-3000 粒種子，繁殖潛勢強<sup>(4, 5)</sup>。

有關牛筋草抗嘉磷塞現象，首度出現於馬來西亞的果園及蔬菜園區<sup>(18, 31)</sup>，後續美國孟山都公司研究室亦針對牛筋草抗藥性機制進行試驗<sup>(8)</sup>。此外牛筋草亦有抗二硝基苯胺 (dinitroanilines)、芳烴氧苯羧酸 (aryloxyphenoxy carboxylic acids) 及環己烯氧 (cyclohexanedione) 類型除草劑生物型之報導<sup>(19, 20)</sup>。本研究之目的為針對台灣果園牛筋草族群，測試其與嘉磷塞劑量反應、shikimic acid 含量及 EPSPS 酵素等生理特性。

## 材料與方法

### 化學藥品及儀器

試驗用藥品、儀器及廠牌：嘉磷塞異丙胺鹽 (glyphosate-isopropylammonium, 年年春, 億豐公司)、嘉磷塞 (N-phosphonomethyl glycine, Sigma)、lactate dehydrogenase (Sigma)、isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (Sigma)、Pyruvate kinase (Sigma)、pGEM T-easy vector (Promega)、ligase (Promega)、BamHI 限制酶 (MBI) 及 EcoRI 限制酶 (MBI)、pET-28 vector (Amersham Pharmacia), Ni-NTA superflow (Amersham Pharmacia)、ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystem)、PCR thermal cycler (GeneAmp 2400, Perkin-Elmer)、DNA sequencer (ABI PRISM 377-96, Perkin-Elmer)、分光光度計 (WPA lightwave)。

### 嘉磷塞之劑量反應

自高雄縣燕巢鄉及岡山鎮等 14 處田區及果園，採集牛筋草種子，分別於溫室播種及培育，植株約 6-8 葉齡，噴施致死量 ( $0.3 \text{ kg ai ha}^{-1}$ ) 之嘉磷塞，施用藥劑為嘉磷塞異丙胺鹽 (41% 溶液)，行初步篩選，選出代表性之感抗牛筋草，再噴施  $0.05$ - $1.6 \text{ kg ai ha}^{-1}$  不同劑量嘉磷塞，各處理 6 重覆。施藥方式以二氧化碳加壓噴藥器 ( $2.1 \text{ kg cm}^{-2}$ ) 噴施，噴嘴為 Teejet 8002 型號，移動速率為  $0.5 \text{ m/sec}$ 。施藥後 14 日調查乾重所得資料，以 log-logistic 公式<sup>(25)</sup> 估算  $ED_{50}$  值。

### 牛筋草 shikimic acid 含量測定

根據劑量反應單元之結果，選用對嘉磷塞抗性最強及最敏感植株，分別採收單株種子，於溫室經播種育苗，植株約 6-8 葉齡，噴施  $0.5$ 、 $0.75$  及  $1.0 \text{ kg ai ha}^{-1}$  嘉磷

塞，施藥後 1、3、7、14 日摘取新生 1-2 片之幼葉，進行 shikimic acid 含量測定。參考 Singh 氏等人<sup>(27)</sup>之方法，取 3 g 幼葉以液態氮磨碎，添加 15 ml 0.25 N HCl(3:1, v/w, 鮮重)反應 30 分鐘，以 25,000  $\times g$  離心 15 分鐘，上層液再以 25,000  $\times g$  離心 5 分鐘，取上層液 50  $\mu$ l 添加 0.5 ml 1% periodic acid，於室溫下靜置 3 小時，添加 0.5 ml 1N NaOH、0.3 ml 0.1 M glycine，於波長 380 nm 測定 shikimic acid 含量。

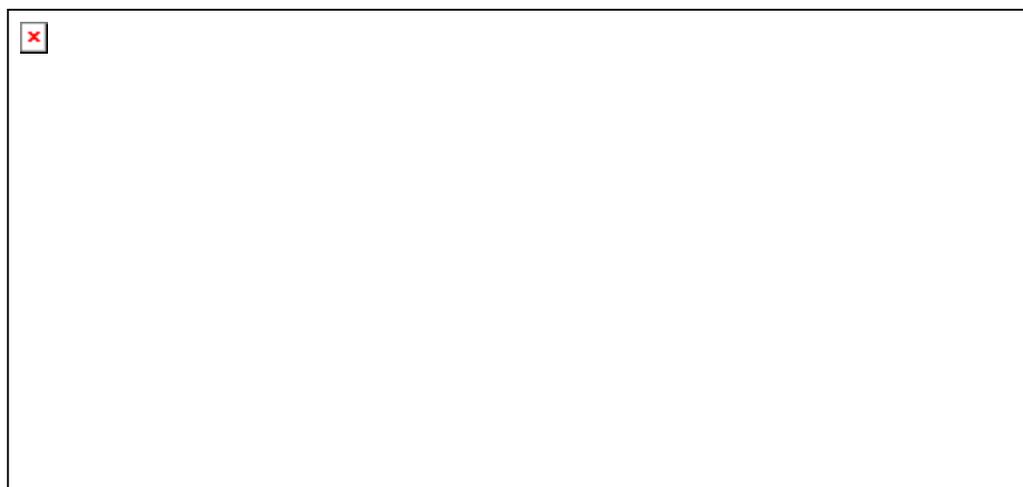
EPSPS 表現載體之構築及由大腸桿菌中純化此重組蛋白質

抽取抗性及感性牛筋草幼葉之 RNA，由 NCBI GenBank 中 EPSPS cDNA 序列設計含有 *Bam*H I 及 *Eco*R I 切位之二引子：5'- AATGGATCCGCTGCTGCAGCCG-3' 及 5'- ACGAATTCCTGTCATCTCCAC-3'，以 RT-PCR 擴增 EPSPS DNA 片段，將此 DNA 片段經由膠體溶洗出，再經接合反應

(ligation)，以 *Bam*H I 及 *Eco*R I 切位處插入 pET-28a 載體(圖一)，並轉殖至大腸桿菌 (*Escherichia coli*) BL21 菌株中，於 LB 培養基中添加最終濃度為 0.1 mM 之 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)，經於 28 $^{\circ}$ C 生長箱，培養 14-16 小時，可誘導此融合蛋白質之大量表現。以蛋白質萃取液 (150 mM sodium chloride、16 mM sodium phosphate、4 mM sodium dihydrogen phosphate dihydrate)，萃取大腸桿菌之蛋白質，經 23,000  $\times g$  4 離心去除細胞殘質，將懸浮液流經 Ni-NTA superflow 之 histidine 親和性樹脂吸附，再以沖提液收集純化之 EPSPS 蛋白質。

EPSPS 蛋白質酵素活性分析

EPSPS 酵素活性方法參考 Shyr 等人<sup>(26)</sup>及 Westwood 與 Weller<sup>(33)</sup>。取 2-5  $\mu$ l 純化之重組 EPSPS 蛋白質加反應緩衝液(50 mM HEPES buffer, pH 7.0, 5 mM kalium



圖一、 His-EPSPS 重組基因的構築圖。牛筋草 795 bp 之 EPSPS cDNA 片段接合於 pET-28a 載體，形成編碼為 29.0 KDa 之 EPSPS 融合蛋白質。

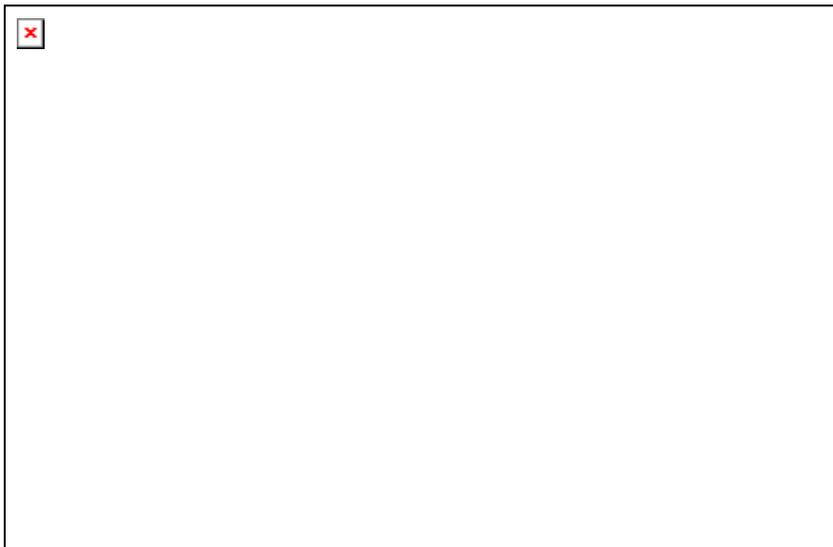
Fig. 1. Construction of His-EPSPS 29.0 fusion gene. A 795 bp cDNA fragment encoding the 29.0 KDa EPSPS of *Eleusine indica* was inserted into the pET-28a expression vector at *Bam*H I and *Eco*R I site.

fluoride( KF ), 0.6 mM phosphoenolpyruvate ( PEP ), 1 mM shikimate-3- phosphate ( S-3-P ), 0.1 mM ammonium molybdate ) 及不同濃度之嘉磷塞 ( 0-300  $\mu\text{M}$  ), 總體積為 400  $\mu\text{l}$  , 於 25  $^{\circ}\text{C}$  反應 20 分鐘, 再於 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 2 分鐘停止反應。經 23,000  $\times g$  離心 10 分鐘去除沉澱物, 取 200  $\mu\text{l}$  澄清液加 800  $\mu\text{l}$  分析緩衝液 ( 2mM ADP, 0.15 mM NADH, 25mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7.4, 及 Pyruvate kinase ( 2.5U ), lactate dehydrogenase ( 10U ) 各 10  $\mu\text{l}$  ), 比較反應前後於波長 340 nm 之讀值, 估算 PEP ( EPSPS 之受質 ) 含量之變化, 重組 EPSPS 之活性以 PEP (  $\mu\text{mole}$  )  $\text{min}^{-1}$  protein ( mg ) $^{-1}$  表示, 三重覆。蛋白質以 Lowry 方法<sup>(11)</sup> 定量, 小牛血清蛋白為標準品。

## 結 果

### 嘉磷塞之劑量反應

高雄縣燕巢鄉及岡山鎮等 14 處果園地區之牛筋草, 施藥後 14 日, 對藥劑敏感植株的外觀傷害徵狀為頂梢或側枝之新生葉黃化、葉形狹小, 生長速率緩慢, 由傷害程度可區別為對藥劑敏感度低、中及高者, 分別有 6、3 及 5 個牛筋草族群。選取對藥劑敏感度具明顯差異之抗及感性牛筋草, 再進行劑量反應測定, 6-8 葉齡之牛筋草, 噴施 0.6 kg ai ha $^{-1}$  嘉磷塞, 施藥後 14 日, 感性牛筋草即全株死亡, 藥劑劑量增加為 1.6 kg ai ha $^{-1}$  以上, 才可完全造成抗性牛筋草死亡。以 log-logistic 公式估算乾重為基礎之 ED<sub>50</sub>, 結果抗性植株之劑量反應方程式為  $y=100.51/1+\exp(2.6004x(\ln(x)-\ln(0.5724)))$ ,



圖二、抗感牛筋草對嘉磷塞之劑量反應關係。牛筋草採集於高雄縣, 於溫室栽種至 6-8 葉齡噴施嘉磷塞藥劑, 施藥後 14 日採收植株, 以乾重為指標利用 log-logistic 公式估算 ED<sub>50</sub> 值, 抗及感牛筋草之 ED<sub>50</sub> 值分別為 0.12 及 0.57 kg ai ha $^{-1}$ 。

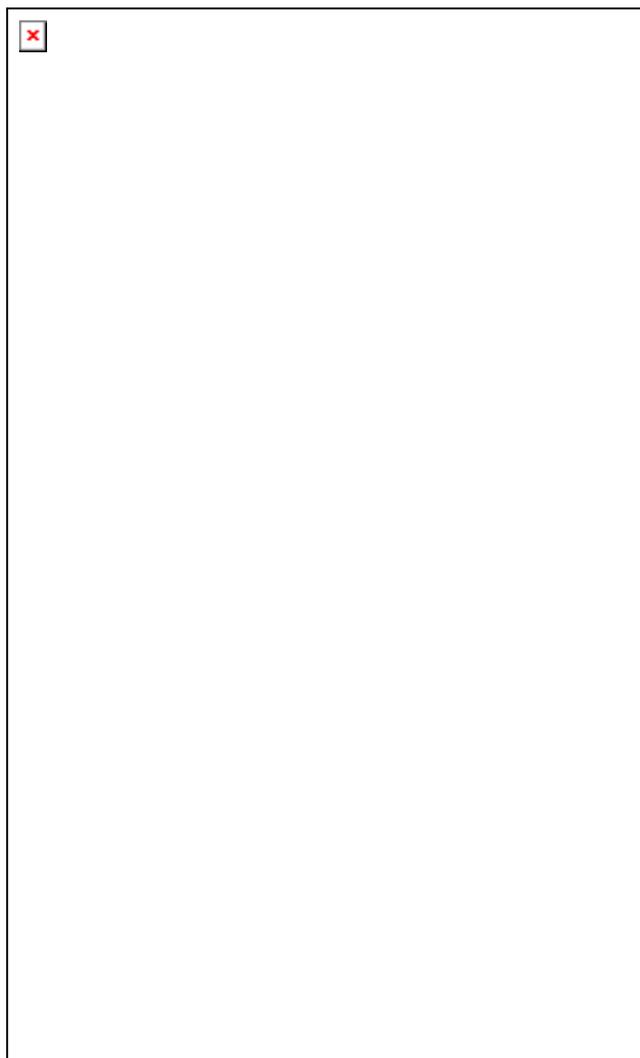
Fig. 2. Dose response of *Eleusine indica* seedlings against glyphosate. *E. indica* from Kaohsiung county was raised in greenhouse and foliar treated with glyphosate at 6~8 leaf stage. Dry weight was collected at 14 days after treatment. Log-logistic equation was used for curve fitting. Estimated ED<sub>50</sub> of glyphosate-susceptible (S) and -resistant (R) seedlings was 0.12 and 0.57 kg ai ha $^{-1}$ , respectively.

R 值為 0.990, 感性牛筋草之劑量反應方程式為  $y=101.0/1+\exp(2.1735 \times \ln(x)-\ln(0.1238))$ , R 值為 0.992 (圖二), 感性及具抗性牛筋草  $ED_{50}$  分別為 0.12 及 0.57 kg ai ha<sup>-1</sup>, R/S 比值為 4.62。

牛筋草 shikimic acid 含量變化

嘉磷塞對牛筋草葉片 shikimic acid 含

量之測定顯示, 施藥後 7 日, 感性牛筋草 shikimic acid 含量隨藥劑劑量增高而累積量增加 (圖三 A), 噴施 1.0 kg ai ha<sup>-1</sup> 嘉磷塞處理者累積量最多, 施藥後 7 日, 感性牛筋草 shikimic acid 含量為 70  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , 約為抗性牛筋草之 50 倍 (圖三 B)。抗性牛筋草 shikimic acid 含量於施藥前後無明顯變化。



圖三、對嘉磷塞具抗性及感性牛筋草之 shikimic acid 含量變化。(A)不同嘉磷塞劑量處理, 施藥後 7 日後採樣定量(B)噴施 1.0 kg ha<sup>-1</sup> 嘉磷塞。

Fig. 3. Accumulation of shikimic acid in seedlings of glyphosate-resistant(R) and -susceptible (S) *Eleusine indica*. (A) Samples collected at 7 days after foliar treatment of glyphosate. (B)Glyphosate of 1.0 kg ai ha<sup>-1</sup> was applied.

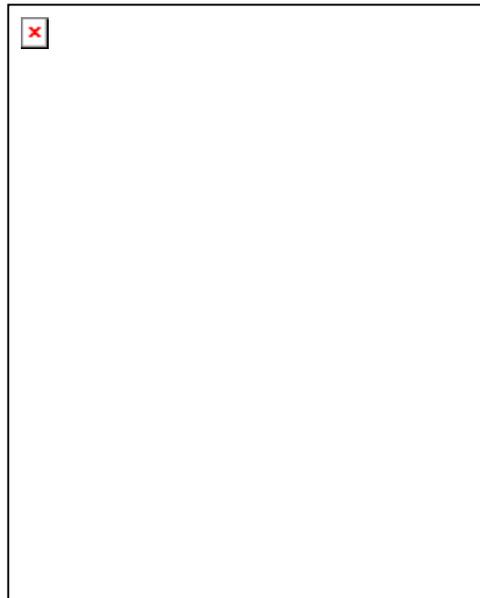
### 牛筋草 EPSPS 活性分析

抗性及感性牛筋草經由 RT-PCR 反應，分別擴增長度約 800 bp DNA 片段（圖四），經由解序及序列比對為 EPSPS 基因無誤，此 DNA 片段可編碼<sup>29</sup>Valine 至<sup>293</sup>Threonine 之蛋白質，其中包括 EPSPS 酵素之重要活性區間<sup>(8, 24)</sup>。再將此 DNA 片段轉殖至大腸桿菌，經 IPTG 誘導重組蛋白質 EPSPS 大量表現及純化，可回收分子量為 29.0 KDa 之 EPSPS 重組蛋白質（圖五）。抗性及感性牛筋草重組蛋白質 EPSPS 酵素經活性反應測定結果顯示，嘉磷塞藥劑處理後，感性牛筋草重組蛋白質 EPSPS 的活性於 20-30  $\mu\text{M}$  嘉磷塞藥劑處理後，即開始大幅降低，50  $\mu\text{M}$  劑量處理，則幾乎完全喪失酵素活性。50-200  $\mu\text{M}$  嘉磷塞藥劑處理後，抗性牛筋草重組蛋白質 EPSPS 的活性隨濃度增加而緩慢降低，牛筋草抗性及感性植株

重組蛋白質 EPSPS 活性之  $I_{50}$  值分別為 34.7 及 8.3 kg ai ha<sup>-1</sup>，R/S 值為 4.3 倍（圖六）。

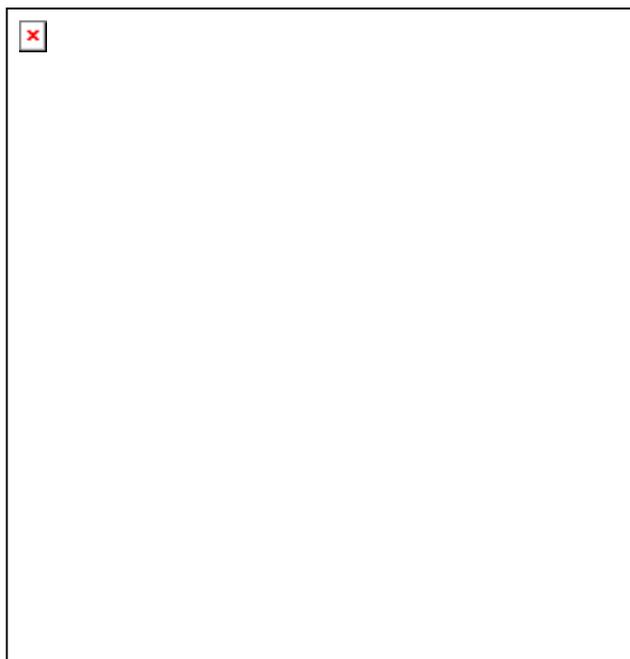
## 討 論

經由牛筋草噴施嘉磷塞之劑量反應測定結果顯示，牛筋草外觀傷害徵狀為頂梢或側枝之幼葉黃化、葉形狹小，生長速率緩慢，可區別為對藥劑之敏感度低、中及高者，分別有 6、3 及 5 個地區之牛筋草族群，抗性植株芽體未死亡可再發育為新生葉片而存活。藥劑造成牛筋草乾重減少之影響大於對植株外觀之傷害，嘉磷塞對華九頭獅子草<sup>(1)</sup>及黑麥草亦有相似現象<sup>(23)</sup>。牛筋草 6-8 葉齡對嘉磷塞以乾重為基礎之  $ED_{50}$  值，感及抗性牛筋草  $ED_{50}$  分別為 0.12 及 0.57 kg ai ha<sup>-1</sup>，R/S 比值為 4.62，抗性程度與馬來西亞牛筋草（R/S=2-4）<sup>(31)</sup>相近



圖四、嘉磷塞抗感牛筋草之 RT-PCR 產物。引子設計參考 NCBI 基因庫之 EPSPS cDNA 序列。第 1 欄為抗性植株，第 2 欄為感性植株。

Fig. 4. DNA fragment obtained from glyphosate-resistant and -susceptible *Eleusine indica* seedlings. RT-PCR was used for amplification with total RNA extracted from the weed. Primers used were designed based on cDNA library of target enzyme (EPSPS) from NCBI's GenBank. Lane 1 and 2 were from resistant(R) and susceptible(S) samples, respectively.



圖五、牛筋草 EPSPS 融合蛋白質經 IPTG 誘導之表現及純化之 EPSPS 蛋白質。第 1 欄為大腸桿菌 BL21 菌株之蛋白質，第 2 欄為經 0.1 mM IPTG 誘導表現之蛋白質，第 3-6 欄為分別沖提回收之重組 EPSPS 蛋白質。

Fig. 5. Induction and purification of EPSPS fusion protein from *Eleusine indica* by IPTG in pET-28a transformed cell. Lane 1 was from *E. coli* BL21 cell. Lane 2 were samples from EPSPS-transformed *E. coli* induced with 0.1 mM IPTG. Line 3~ 6 were purified EPSPS from transformed *E. coli*.



圖六、對嘉磷塞具抗性(R)及感性(S)牛筋草之 EPSPS 活性。EPSPS 之活性以受質 PEP 之含量( $\mu\text{mole}$ )  $\text{min}^{-1}$  protein ( $\text{mg}$ ) $^{-1}$  表示。

Fig. 6. EPSPS activity in glyphosate-resistant (R) and -susceptible (S) seedlings of *Eleusine indica*. EPSPS assays were conducted in presence of glyphosate and specific activity was the change of substrate as determined by  $\mu\text{moles}$  of PEP  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$  protein.

似。近年美洲發生之抗嘉磷塞加拿大蓬，其抗性亦為感性族群的 4 倍<sup>(32)</sup>。最早發生於澳洲地區的黑麥草，抗性黑麥草 ED<sub>50</sub> 值為 0.97 kg ai ha<sup>-1</sup>，為感性黑麥草之 9.5 倍<sup>(23)</sup>，其抗性較牛筋草及加拿大蓬顯著。於嘉磷塞抗性研究之初期，經由於植物細胞培養基中添加少量藥劑，再於存活細胞繼代培養，逐漸增加藥量，可篩選出抗嘉磷塞的細胞株，其中胡蘿蔔、菸草的抗性細胞，其 EC<sub>50</sub> 值分別為 6.3 及 4 mM，為感性細胞之 50 及 10 倍<sup>(26, 28)</sup>，此類抗藥性雖然較強，但抗性主要發生於嘉磷塞藥劑壓力下的結果，一旦將藥劑移除，其抗性會逐代遞減<sup>(9)</sup>，抗性的穩定度比自然發生者低。

由於嘉磷塞之作用為抑制芳香族胺基酸的合成，造成 shikimic acid 的累積<sup>(6)</sup>，因此植株快速累積 shikimic acid 之現象，成為對嘉磷塞感性植物及嘉磷塞藥害的指標反應<sup>(27)</sup>，例如馬齒莧、黃土香及黑麥草等植物大量累積 shikimic acid 為未施藥植株的 60-180 倍，同時降低芳香族胺基酸合成，直接影響二次代謝物之合成<sup>(16)</sup>，對嘉磷塞敏感之大豆於施藥後 8 日累積 shikimic acid 為 70 μmol g<sup>-1</sup>，抗性植株則僅為 0.2 μmol g<sup>-1</sup><sup>(27)</sup>。本研究結果與抗感大豆之變化相似，牛筋草抗性植株幼葉 shikimic acid 含量於施藥前後皆無顯著變化，感性牛筋草之 shikimic acid 含量隨藥劑劑量增高而增多。然而抗嘉磷塞之加拿大蓬被證明與感性植株皆於施藥後 2 日累積 shikimic acid (>1000 μg g<sup>-1</sup>)，感性加拿大蓬於施藥後 4 日含量增加，但於抗性加拿大蓬 shikimic acid 則降低<sup>(21)</sup>，抗性加拿大蓬於施藥後 Shikimic acid 含量先增後降現象，為首度之報導，因此以 shikimic acid 含量變化評估抗性與否，可能僅提供部份之訊息。

本研究分析台灣南部牛筋草的 EPSPS 活性，結果顯示抗性牛筋草 EPSPS 活性為

感性牛筋草之 4.3 倍，與馬來西亞抗性與感性牛筋草 EPSPS 活性比率相近<sup>(8)</sup>，此初步結果顯示台灣牛筋草對嘉磷塞之抗性機制，為施藥後 EPSPS 仍可維持較高活性之故。經由人為增加嘉磷塞藥量，篩選的矮牽牛、番茄、胡蘿蔔、菸草及 *Corydalis sempervirens* 抗性細胞，由於可誘導 EPSPS 基因的大量擴增，因此 EPSPS 活性較高，分別增加 8.5、8、30、20 及 10 倍<sup>(13, 14, 22, 29, 30)</sup>。自然發生抗嘉磷塞植株中，抗嘉磷塞黑麥草之 EPSPS 活性亦較感性植株高 2-3 倍<sup>(7)</sup>。加拿大蓬抗性及感性植株噴施嘉磷塞後皆會造成 shikimic acid 含量增加的現象<sup>(21)</sup>，因此作者推測抗性植株的 EPSPS 亦為對嘉磷塞敏感之酵素，而加拿大蓬的抗性可能與藥劑於植體內的傳導與分布有關，其作用機制仍不明確<sup>(12)</sup>。延續本研究結果，未來將進一步探討抗嘉磷塞牛筋草 EPSPS 基因之特性。

## 謝 辭

本文研究承蒙行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所之計畫經費(92 農科-1.2.1-藥-P5)支持，特以致謝。

## 引用文獻

1. 袁秋英、陳益明、蔣慕琰。2001。華九頭獅子草 (*Dicliptera chinensis*) 對嘉磷塞之反應。植保會刊 43: 29-38。
2. 費雯綺、王美玉。2002。植物保護手冊。行政院農委會農業藥物毒物試驗所編印。台中。791 頁。
3. 蔣慕琰、蔣永正。2001。農田雜草管理及除草劑簡介。政院農委會農業藥物毒物試驗所印行。台中縣。69 頁。
4. 蔣慕琰、蔣永正、袁秋英。2002。除草劑引起之草相變遷及抗藥性。第 25-30 頁。除草劑在台灣四十年回顧與展望研

- 討會。蔣慕琰、蔣永正編。中華民國雜草學會印行。台北。
5. 蔣慕琰、蔣永正、袁秋英、徐玲明、陳富永。2004。台灣農田雜草管理之現況及展望。2003 國際植物健康管理研討會專刊，第 245-258 頁。林信山、郭聰欽、柯南靖編。環球技術學院編印。雲林。
  6. Amrhein, N, Deus, B., Gehrke, P., and Steinrücken, H. C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* 65: 830-834.
  7. Baerson, S. R., Rodriguez, D. J., Biest, N. A., Tran, M., You, J., Kreuger, R. W., Dill, G. M., Pratley, J. E., and Gruys, K. J. 2002a. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 50: 721-730.
  8. Baerson, S. R., Rodriguez, D. J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N. A., and Dill, G. M. 2002b. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.* 129: 1265-75.
  9. Bradshaw, L. D., Pagette, S. R., Kimball, S. L., and Wells, B. H. 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technol.* 11: 189-198.
  10. Della-Cioppa, G., and Kishore, G. M. 1988. Import of a precursor protein into chloroplast is inhibited by the herbicide glyphosate. *EMBO* 7: 1299-1305.
  11. Eze, J. M. O., and Dumbroff, E. B. 1982. A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of protein in chlorophyllous tissue plants. *Can. J. Bot.* 60: 1046-1049.
  12. Feng, P. C. C., Tran, M., T. Chiu, Sammons, R. D., Sammons, R. D., Heck, G. R., and Cajacob, C. A. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci.* 52: 498-505.
  13. Goldsbrough, P. B., Hatch, E. M., Huang, B., Kosinski, W. G., Dyer, W. E., Hermann, K. M., and Weller, S. C. 1990. Gene amplification in glyphosate tolerant tobacco cells. *Plant Sci.* 72: 53-62.
  14. Hollander-Czytko, H., Johanning, D., Mayer, H. E., and Amrhein, N. 1988. Molecular basis for the overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant cell suspension culture of *Corydalis sempervirens*. *Plant Mol. Biol.* 11: 215-220.
  15. Holm, L. G., Plucknett, D. L. Pancho, J. V. and Herberger, J. P. 1977. The world's worst weeds: Distribution and Biology, pp. 47-53. *In*: J. C. Ellison [ed.], East-West Center/University Press of Hawaii. Honolulu. 609 pp.
  16. John, L., and Duke, S. O. 1989. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. *Pestic. Sci.* 25: 361-373.
  17. Kishore, G. M., and Shah, D. M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
  18. Lim, J. L., and Ngim, J. 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56: 336-339.
  19. Marshall, G., Kirkwood, R. C., and Leach, G. E. 1994. Comparative studies on graminicide-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica*. *Weed Res.* 34: 177-185.

20. Mudge, L. C., Gossett, B. J., and Murphy, T. R. 1984. Resistance of goose (*Eleusine indica*) to dinitroaniline herbicide. *Weed Sci.* 32: 591-594.
21. Mueller, T. C., Massey, J. H., Hayes, R. M., Main, C. L., and Stewart, C. N. 2003. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). *J. Agric. Food Chem.* 51: 680-684.
22. Nafziger, E. M., Wildholm, J. M., Steinrücken, H. C., and Killmer, J. L. 1984. Selection and characterization of a carrot cell line tolerance to glyphosate. *Plant Physiol.* 76: 571-574.
23. Powles, S. B., Lorraine-Colwill, D. F., Dellow, J. J., and Preston, C. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Sci.* 46: 604-607.
24. Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., and Kabsch, W. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS* 98: 1376-1380.
25. Seefeldt, S. S., Jensen, J. E., and Fuerst, E. P. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol.* 9: 218-227.
26. Shyr, Y. J., Hepburn, A. G., and Wildholm, J. M. 1992. Glyphosate selected amplification of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in cultured carrot cells. *Mol. Gen. Genet.* 232: 377-382.
27. Singh, B. K., and Shaner, D. L. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technol.* 12: 527-530.
28. Singer, S. R., and McDaniel, C. N. 1985. Selection of glyphosate-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants. *Plant Physiol.* 78: 411-416.
29. Smith, C. M., Pratt, D., and Thompson, G. A. 1986. Increased 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase activity in a glyphosate-tolerant variant strain of tomato cells. *Plant Cell Rep.* 5: 298-301.
30. Steinrücken, H. C., Schulz, A., Amrhein, N., Porter, C. A., and Fraley, R. 1986. Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 169-178.
31. Teng, Y. T., and Teo, K. C. 1999. Weed control and management of resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Malaysia. *Proceedings of 17th Asian-Pacific Weed Science Society Conference*. Bangkok, Thailand. I(B): 753-758.
32. VanGessel, H. J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci.* 49: 703-705.
33. Westwood, J. H., and Weller, S. C. 1997. Cellular mechanisms influence differential glyphosate sensitivity in field bindweed (*Convolvulus arvensis*) biotype. *Weed Sci.* 45: 2-11.
34. Wyrill, J. B., and Burnside, O. C. 1976. Absorption, translocation and metabolism of 2,4-D and glyphosate in Common Milkweed and Hemp Dogbane. *Weed Sci.* 24: 557-566.

35. Yuan, C. I., Chiang, C. M., and Chen, Y. M. 2002. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. *Plant Sci.* 163: 543-554.

## ABSTRACT

**Yuan, C. I.\*, Hsieh Y. C., and Chiang, M. Y. 2005. Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan: dose-response and enzyme activity.** Plant Prot. Bull. 47: 143-154. (Plant Toxicology Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 413, Taiwan (ROC))

Glyphosate -resistant and -susceptible types were obtained from preliminary screening on 14 populations of goosegrass from orchards in Kaoshiung country where suspected resistance have been reported. Goosegrass seedlings at 6~8 leaf stage were foliar sprayed with glyphosate ranging from 0.05~1.6 kg ai ha<sup>-1</sup>. Dose-response was established based on dry weight of seedlings at 14 days after spray. The 50% effect dose (ED<sub>50</sub>) estimated from log-logistic equation was 0.12 and 0.57 kg ai ha<sup>-1</sup> for susceptible and resistant type, respectively. Susceptible goosegrass showed obvious accumulation of shikimic acid starting one day after glyphosate spray. At 7 days after spray, shikimic acid of susceptible goosegrass was 70 μmol g<sup>-1</sup>, about 50 times higher than that of resistant type. We used RT-PCR and *E. coli* propagation to prepare the related target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) of goosegrass. EPSPS activity assay showed that 50% inhibition concentration (I<sub>50</sub>) of resistant type was 4.3 times higher than that of susceptible type.

(Key words: glyphosate-resistance, *Eleusine indica*, dose response, EPSP synthase activity)

\*Corresponding author. E-mail: yci@tactri.gov.tw