野茼蒿(*Conyza sumatrensis*)對嘉磷塞之抗藥性及5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)基因研究

袁秋英*　謝玉貞　林李昌　蔣慕琰

台中縣霧峰鄉　農委會農業藥物毒物試驗所　公害防治組

（接受日期：2006 年 9 月 30 日）

摘　要

袁秋英*、謝玉貞、林李昌、蔣慕琰　2006　野茼蒿(*Conyza sumatrensis*)對嘉磷塞之抗藥性及 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)基因研究　植保會刊　48：229 – 241

嘉磷塞（glyphosate）爲臺灣最常使用之非選擇性除草劑，於農地之使用約 20 年，近年各地野茼蒿（*Conyza sumatrensis* （Retz.） Walker）已呈現田間抗藥性之情況，構成防治管理上日趨嚴重之問題。本研究利用野茼蒿對嘉磷塞之劑量反應、shikimic acid 含量變化及 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase（EPSPS）基因選殖，探討野茼蒿對嘉磷塞之抗藥特性。由台中縣地區採集之 52 族群野茼蒿種子，經播種、育苗至 6-8 葉齡，噴施次致死量（0.3 kg ai ha^{-1}）之嘉磷塞（41% 溶液），初步篩選代表性之感性（susceptible, S）及抗性（resistant, R）野茼蒿。針對感、抗性野茼蒿幼苗，再進行 0.05-1.6 kg ai ha^{-1} 嘉磷塞之劑量反應，施藥後 14 日，以乾重爲基礎，經由 log-logistic 程式估算感、抗性野茼蒿之 ED_{50} 分別爲 0.07 及 0.56 kg ai ha^{-1}，ED_{50} R/S 值爲 8。抗性野茼蒿於施藥後 2-3 日，shikimic acid 含量略增加，但隨天數增加而逐漸降爲 1.9 μmol g^{-1}。感性野茼蒿於施藥後 7 日，shikimic acid 累積爲 18 μmol g^{-1}，約爲抗性野茼蒿 shikimic acid 含量的 9.5 倍。利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應（reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR）選殖感及抗性野茼蒿 EPSPS 基因，各有 3 條 cDNA（EPSPS-1、EPSPS-2、EPSPS-3），感及抗性野茼蒿 EPSPS-1 開放讀碼區（open reading frame, ORF）完全相同，長度爲 1341 bp，感及抗性野茼蒿 EPSPS-2 及 EPSPS-3 的 ORF 皆爲 1338 bp，相似度亦皆爲 96%。抗性野茼蒿 EPSPS2 有 11 個胺基酸與感性野

* 通訊作者。E-mail: yci@pu.edu.tw

苘蒿 EPSPS2 不同，其中抗性野苘蒿的 4 個高度保留胺基酸之變異分別爲 ^{68}glycine (Gly, G)→glutamic acid (Glu, E)、^{196}arginine (Arg, R)→Gly、^{416}Arg→cysteine (Cys, C)及 ^{428}serine (Ser, S)→Cys，此 4 處胺基酸的改變，可能爲抗藥性的原因之一。

（關鍵詞：嘉磷塞、抗藥性、野苘蒿、EPSP synthase 基因、分子特性）

緒　言

嘉磷塞(glyphosate, (N-phosphomethyl) glycine)爲全球使用最普遍的萌後除草劑，此藥劑於 1973 年起在臺灣取得登記，目前已合法使用於 14 種作物或田區。1986 年中期後此藥劑之使用已超過巴拉刈，爲臺灣使用最多之除草劑。登記的用量在 1.6-2.5 kg ai ha^{-1} 之間，但田間使用多介於 1-2 kg ai ha^{-1} 之間，可有效防除一年生及大部份多年生雜草[4, 6, 7]。嘉磷塞主要作用位置爲 shikimic acid pathway 代謝路徑中 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)，嘉磷塞與受質 phosphoenolpyruvate（PEP）產生競爭性之抑制，並且阻止 EPSPS pre-protein 運移至葉綠體[8, 11]，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，影響蛋白質之生合成，進而抑制植物生長[8, 17]，產生防除雜草之效果。

2006 年初全球抗除草劑之雜草，已有 306 種生物型（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，才開始陸續出現抗嘉磷塞之黑麥草（*Lolium rigidum*）、義大利黑麥草（*L. multiflorum*）、牛筋草（*Eleusine indica*）、加拿大蓬（*Conyza canadensis*）、美洲假蓬（*C. bonariensis*）、車前草（*Plantago lanceolata*）、豬草（*Ambrosia artemisiifolia*）及莧科植物（*Amaranthus palmeri*）等 8 種雜草生物型[15, 18]。臺灣中部地區果園之華九頭獅子草（*Dicliptera chinensis*）已證明具有自然耐嘉磷塞藥劑之特性[1, 36]，近年來在高雄縣、南投縣以及宜蘭縣果園也陸續出現抗嘉磷塞牛筋草，其抗性機制主要爲 EPSPS 基因發生變異[2, 3]。

野苘蒿（*C. sumatrensis*（Retz.）Walker）爲菊科假蓬屬一年生雜草，分佈於熱帶及亞熱帶地區[24]，普遍生長於臺灣全省低海拔之溝邊、路旁、休耕田及果園，野苘蒿主要於暖季萌芽、生長及開花結果，單株結籽數量約爲 3000-5000 粒種子，繁殖潛勢極強，且株型高大，經常造成農田管理之困擾。野苘蒿抗除草劑的現象，於 1980 年代已發生於日本及臺灣的果園、蔬菜田及路旁，出現抗巴拉刈及 diquat 的野苘蒿[5, 15]，經由更換使用嘉磷塞藥劑之後，臺灣的抗巴拉刈野苘蒿族群逐漸減少，已不易發現。由於經常性噴施嘉磷塞，造成抗嘉磷塞的生物型被篩選出來，近年在臺灣中部地區的果園、休耕田及路旁，普遍出現嘉磷塞防治不完全的野苘蒿族群。假蓬屬之加拿大蓬及美洲假蓬，自 2001 年起陸續出現於美國的抗嘉磷塞基改作物田，目前已散佈 13 州的 10 萬公頃農田[15, 35]，造成嚴重抗藥性問題。本研究之主要目的爲針對野苘蒿，測試其與嘉磷塞的劑量反應、shikimic acid 含量變化及嘉磷塞標的基因 EPSPS 的選殖及序列比對，以確證野苘蒿抗性族群的發生。

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)、shikimic acid (Sigma)、ThermoScript RT-PCR kit (Invitrogen)、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (Sigma)、pGEM T-easy vector (Promega)、ligase (Promega)、Gel extraction kit (GeneMark)、Plasmid miniprep purification kit (GeneMark)、*Eco*RI、*Sac* I、*Bsr*G I 及 *Sph* I 限制酶 (MBI)、PCR thermal cycler (PTC-200, MJ)、DNA sequencer (ABI PRISM 377-96, Perkin-Elmer、分光光度計 (Biowave II, WPA)。

嘉磷塞之劑量反應

自台中縣 52 個不同地點，採集野茼蒿種子，於溫室播種及培育，植株約 6-8 葉齡時，噴施次致死量（0.3 kg ai ha^{-1}）嘉磷塞（異丙胺鹽, 41%溶液），進行初步篩選。選出的感及抗性野茼蒿，再噴施不同劑量嘉磷塞（0.05-1.6 kg ai ha^{-1}）。施藥方式以二氧化碳加壓噴藥器（2.1 kg cm^{-2}）噴施，噴嘴爲 Teejet 8002 型號，移動速率爲 0.5 m sec^{-1}。施藥後 14 日記錄野茼蒿乾重，再以 log-logistic 公式[29]估算 ED_{50} 值，各處理 6 植株，3 重複。

野茼蒿 shikimic acid 含量測定

以篩選之感及抗性野茼蒿植株爲材料，單株採收種子，於溫室播種育苗，植株 6-8 葉齡時，噴施 1.0 kg ai ha^{-1} 嘉磷塞，施藥後 1-7 日摘取新生幼葉(指心葉下方 2-3 葉)及成熟葉(指完全展開葉)，進行 shikimic acid 含量測定。參考前人之方法[31]，取 3 g 葉片以液態氮磨碎，添加 15 ml 0.25 N HCl（1：3，w/v，鮮重）反應 30 分鐘，以 25,000 *g* 離心 20 分鐘，取上層液 50 µl 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 測定吸光值及估算 shikimic acid 含量。

EPSPS 基因選殖及解序

抽取感及抗性野茼蒿 0.5 g 幼葉之 RNA，參考 NCBI GenBank 資料庫之加拿大蓬 EPSPS cDNA 序列（AY545666、AY545667、AY545668）[14]設計 EPSPS-1F / EPSPS-1R 及 EPSPS-2F / EPSPS-2R 兩組引子（表一），利用 ThermoScript RT-PCR kit，取野茼蒿樣品約 0.5 µg mRNA，合成 cDNA 之反應爲 50℃30 分鐘，94℃2 分鐘，後續 PCR 之條件爲起始變性 94℃4 分鐘，之後以變性 94℃45 秒，煉合 52℃45 秒，延展 72℃45 秒，循環 35 週期，最後延展 72℃ 7 分鐘。取 10 µl PCR 產物，加入樣品 0.1 倍體積的 bromophenol blue 染劑，注入含 1.2%（w/v） agarose 的 0.5 X TBE 膠

表一、試驗中使用之引子
Table 1. Primers used in this study

Primers	DNA sequences （5’ -----> 3’）
EPSPS-1F	AAACCGTCAACGGTGCCGGAAATTG
EPSPS-1R	ATGCTTGGCAAATCTTTGAAGAAC
EPSPS-2F	TCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTG
EPSPS-2R	TTAATGCTTAGTGTATCTTTCAAG

體，以 100 伏特電壓進行電泳分析，時間約 25 分鐘，取出膠體於紫外燈下觀察結果，所得 DNA 片段與 DNA Marker 比較，利用內差法估計長度。

兩組引子經反轉錄聚合酶鏈鎖反應（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）增幅的核酸條帶皆約 1400 bp，利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出。接合反應步驟，取 3 µl PCR 之 DNA 產物，添加於 pGEM-T Easy Vector ，於 16℃反應 14-16 小時。10 µl 接合反應物加入 200 µl 大腸桿菌(*Escherichia coli*），42℃熱處理 2 分鐘，於 37℃振盪培養 1 小時，取培養液塗抹於 LB plate （含 40 µl 100 mM IPTG、40 µl 4% X-gal 及 50 µg/mL ampicillin），培養 14-16 小時，選取白色菌落，移入 3 ml LB 培養液中，再於 37℃培養 14-16 小時。使用 miniprep system kit 抽取 plasmid DNA，經由電泳分析證實轉殖之 DNA 長度約爲 1400 bp。再利用加拿大蓬 EPSPS 3 條 cDNA 於 *Eco*R I、*Sac* I 及 *Bsr*G I/ *Sph* I 等限制酶的差異[14]，取 1 µl 限制酶，分別添加於野茼蒿的 10 µl plasmid DNA，總體積爲 20 µl，放置於 37℃反應 1.5 小時，取 10 µl 經限制酶作用的 plasmid DNA，注入於 1.2% agarose 進行電泳分析，將可被 *Eco*R I、*Sac* I 及 *Bsr*G I/ *Sph* I 等限制酶分割的 3 條 plasmid DNA 解序（明欣生技公司）。再將解出核酸序列與 NCBI 基因庫中 EPSPS 基因序列比對。

結　果

嘉磷塞之劑量反應

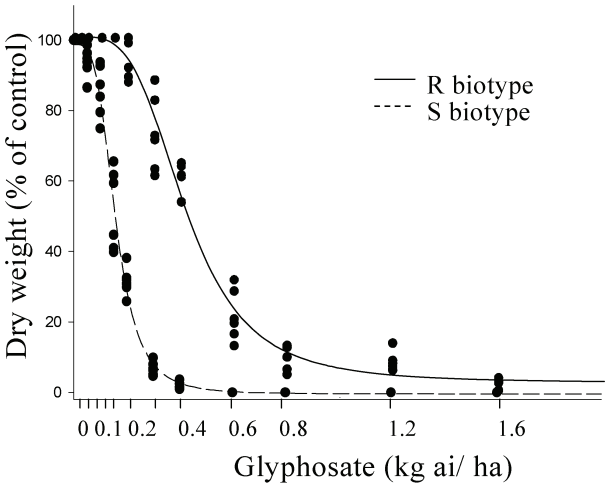
台中縣 52 處果園及非耕地之野茼蒿，噴施次致死量（0.3 kg ai ha^{-1}）嘉磷塞，施藥後 14 日，對藥劑敏感植株的外觀傷害徵狀爲頂梢或側枝之新生葉黃化或褐化、葉形狹小，生長速率緩慢，由傷害程度可區別爲對藥劑敏感度低、中及高者，分別有 6、19 及 27 個野茼蒿族群。選取對藥劑敏感度具明顯差異之感及抗性野茼蒿，再進行不同劑量反應測定。以 6-8 葉齡之野茼蒿，噴施 0.05-1.6 kg ai ha^{-1} 嘉磷塞，施藥後 14 日，感性野茼蒿於劑量 0.4 kg ai ha^{-1} 即全株死亡，劑量增至 1.6 kg ai ha^{-1}，抗性野茼蒿之生長完全被抑制（圖一）。以 log-logistic 公式估算乾重爲基礎之 ED_{50} 值，感、抗性野茼蒿之 ED_{50} 值分別爲 0.07 及 0.56 kg ai ha^{-1}，ED_{50} R/S 值爲 8。

野茼蒿 shikimic acid 含量變化

嘉磷塞對野茼蒿葉片 shikimic acid 含量之測定顯示，抗性野茼蒿於施藥後，幼葉 shikimic acid 含量增加，至第 3 日後逐漸降低，第 7 日時爲 1.9 µmol g^{-1} （圖二 A）；感性野茼蒿幼葉 shikimic acid 含量則持續增加，至第 7 日時可達爲 18 µmol g^{-1} ，約爲抗性野茼蒿 shikimic acid 含量的 9.5 倍。抗性野茼蒿成熟葉 shikimic acid 含量，於施藥前後無明顯差異，皆低於 1 µmol g^{-1}（圖二 B）；感性野茼蒿成熟葉 shikimic acid 含量變化與幼葉相似，於施藥 3 天後持續增加，至第 7 日時可達 15.7 µmol g^{-1}。

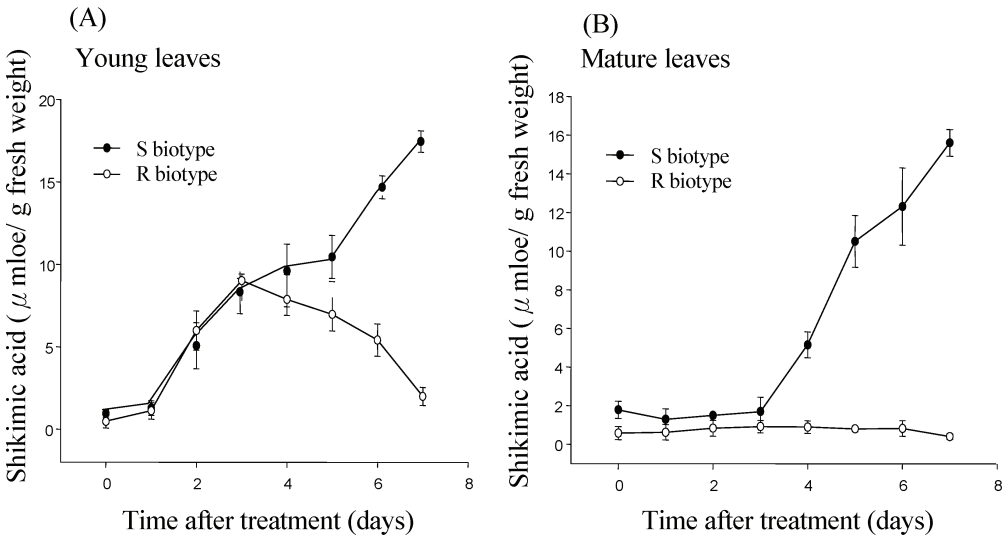
野茼蒿 EPSPS 基因選殖與序列比較

分析感及抗性野茼蒿之總 RNA，經 RT-PCR 反應，利用 EPSPS-1F / EPSPS-1R 及 EPSPS-2F / EPSPS-2R 兩組引子皆可增幅約 1400 bp 的核酸片段（圖三 A）。轉殖於 *E. coli* 的 plasmid DNA 再經 *Eco*R I、*Sac* I 及 *Bsr*G I/ *Sph* I 等 3 組限制酶反應，結果感及抗性野茼蒿 EPSPS 皆可分別區分爲 3 個 cDNA。抗性野茼蒿以 3EPSPS-1F / EPSPS-1R 引子增幅的核酸，只可被 *Eco*R I 切割爲約 400 及 1000 bp 的片段，將此質體 DNA 定爲 EPSPS1（圖三 B, 第 1 欄）；EPSPS-2F / EPSPS-2R 引子增幅的核酸，經轉殖於 *E. coli*，不同的



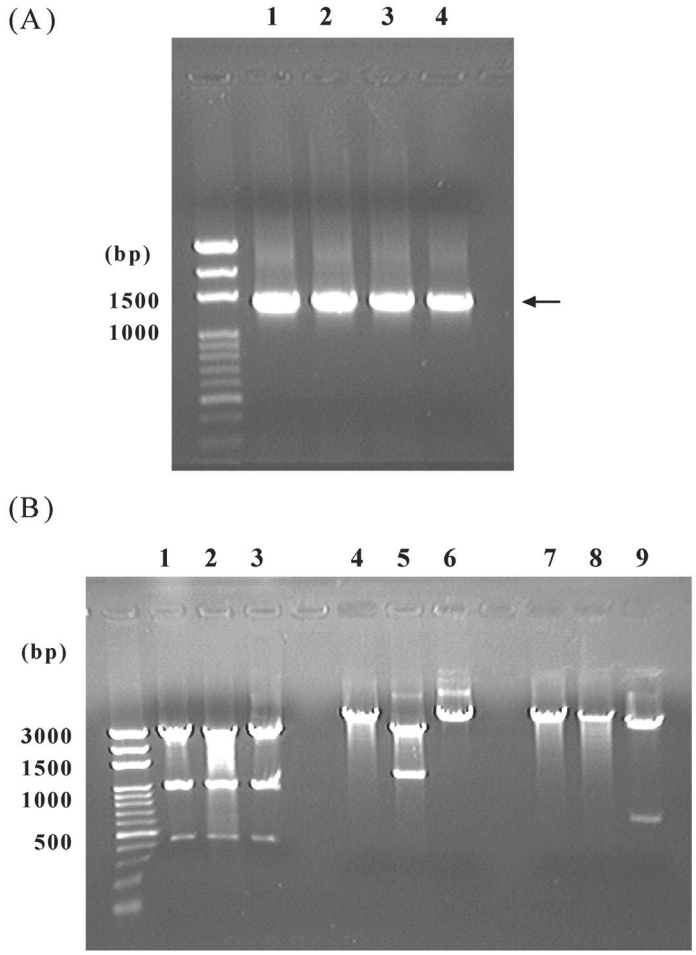
圖一、感及抗性野茼蒿對嘉磷塞之劑量反應關係。野茼蒿採集於台中縣，於溫室栽種至 6-8 葉齡噴施嘉磷塞藥劑，施藥後 14 日採收植株，以乾重爲指標，利用 log-logistic 公式估算 ED_{50} 值，感及抗性野茼蒿分別爲 0.07 及 0.56 kg ai ha^{-1}。

Fig. 1. Dose response of *Conyza sumatrensis* seedlings against glyposate. *C. sumatrensis* from Taichung county (central Taiwan) were raised in greenhouse and sprayed with glyphosate at 6-8 leaf stage. Dry matter weight was determined 14 days after treatment. Log-logistic equation was used for curve fitting. Estimated ED_{50} of glyphosate-susceptible (S) and glyphosate-resistant (R) was 0.07 and 0.56 kg ai ha^{-1}, respectively.



圖二、 嘉磷塞對感及抗性野茼蒿 shikimic acid 含量累積之影響。葉片樣品取自噴藥 1.0 kg ai ha^{-1} 嘉磷塞之 6-8 葉期植株。

Fig. 2. Accumulation of shikimic acid in seedlings of glyphosate-resistant (R) and glyphosate-susceptible (S) *Conyza sumatrensis*. Leaves for shikimate analysis were sampled from 6-8 leaf stage seedlings treated with glyphosate (1.0 kg ai ha^{-1}).



圖三、 嘉磷塞感及抗性野茼蒿之 RT-PCR 產物及抗性野茼蒿質體 DNA 分析。(A)RT-PCR 之引子設計參考 NCBI 基因庫 EPSPS cDNA 序列（表一）。第 1 及 3 欄爲抗性植株，第 2 及 4 欄爲感性植株。第 1 及 2 欄爲引子 EPSPS-1F /EPSPS-1R，第 3 及 4 欄爲引子 EPSPS-2F /EPSPS-2R。（B）抗性野茼蒿 Plasmid DNA 經限制酶反應之電泳圖譜。第 1、4 及 7 欄爲 EPSPS1 質體 DNA；第 2、5 及 8 欄爲 EPSPS2 質體 DNA；第 3、6 及 9 欄爲 EPSPS3 質體 DNA，第 1 至 3 欄爲 *Eco*R I；第 4 至 6 欄爲 *Sac* I；第 7 至 9 欄爲 *Bsr*G I/ *Sph* I。

Fig. 3. DNA fragment and plasmid DNA obtained from glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible *Conyza sumatrensis*. (A) 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 GenBank. Lane 1 and 3 were from resistant samples, lane 2 and 4 were from susceptible samples, lane1 and 2 were EPSPS-1F /EPSPS-1R, lane 3 and 4 were EPSPS-2F /EPSPS-2R, respectively. (B) Restriction enzyme digested-plasmid DNA of glyphosate-resistant plant. Lanes 1, 4 and 7 were EPSPS1, lanes 2, 5 and 8 were EPSPS2, lanes 3, 6 and 9 were EPSPS3, lanes 1 to 3 were *Eco*R I, lanes 4 to 6 were *Sac* I, and lanes 6 to 9 were *Bsr*G I/ *Sph* I。

菌株可分別被 *Sac* I 及 *Bsr*G I/ *Sph* I 切割爲約 1200 bp（圖三 B, 第 5 欄）及 600 bp（圖三 B, 第 9 欄）兩類別，前者定爲 EPSPS2，後者定爲 EPSPS3。感性野茼蒿 EPSPS 也可經 *Eco*R I、*Sac* I 及 *Bsr*G I/ *Sph* I 之 3 組限制酶反應，分別區分爲 3 個 cDNA，切割的核酸片段尺寸與抗性者相同（資料未呈現）。感及抗性野茼蒿之 3 條 EPSPS cDNA，經解序後登錄於 NCBI 基因庫，感性野茼蒿的簡稱及接受號碼爲 S-EPSPS1 （AY834203）、S-EPSPS2（AY834205）、S-EPSPS3（AY834207），抗性野茼蒿者爲 R-EPSPS1（AY834204）、R-EPSPS2（AY834206）、R-EPSPS3 （AY834208）。

感及抗性野茼蒿的 EPSPS1 開放讀碼區（open reading frame, ORF）長度爲 1341 bp，相似度爲 99%，僅有 4 個鹼基不同。感及抗性野茼蒿 EPSPS2 及 EPSPS3 的 ORF 較 EPSPS1 短，皆爲 1338 bp，分別有 43 及 53 個鹼基的差異，相似度皆爲 96%。野茼蒿 EPSPS1 與 EPSPS2 或 EPSPS3 的相似度較低，介於 85-86%之間。EPSPS 核酸序列經轉譯後，感及抗性野茼蒿 EPSPS1 胺基酸序列完全相同（圖四）；感及抗性野茼蒿之 EPSPS2 有 11 個胺基酸的差異，分別位於第 62、68、71、123、196、203、236、291、369、416 及 428 胺基酸，其中抗性野茼蒿於高度保留胺基酸區間的 4 個胺基酸之變異分別爲 ^{68}glycine (Gly, G)→glutaninc acid (Glu, E)、^{196}arginine (Arg, R)→Gly、^{416}Arg→cysteine (Cys, C)及 ^{428}serine (Ser, S)→Cys（圖四，*星號標示處）；感及抗性野茼蒿之 EPSPS3 有 17 個胺基酸的差異，分別位於第 10、62、71、102、108、113、123、148、174、182、203、213、220、221、232、410 及 432 胺基酸（圖四，▼標示處）。

討　論

經由野茼蒿噴施嘉磷塞之劑量反應測定結果顯示，野茼蒿外觀傷害徵狀爲頂梢或側枝之幼葉黃化式褐化、葉形狹小，生長速率緩慢，可區別爲對藥劑之敏感度低、中及高者，分別有 6、19 及 27 個野茼蒿族群，抗性植株下位葉片及芽體未死亡可再發育而存活。藥劑造成野茼蒿乾重減少之影響大於對植株外觀之傷害，嘉磷塞對牛筋草[2]、華九頭獅子草[1]及黑麥草亦有相似現象[26]。野茼蒿 6-8 葉齡對嘉磷塞以乾重爲基礎之 ED_{50} 值，感及抗性野茼蒿 ED_{50} 分別爲 0.07 及 0.56 kg ai ha^{-1}，R/S 比值爲 8。抗性程度較牛筋草（R/S=2-4）[2]及加拿大蓬（R/S=4）[35]者強。但野茼蒿的抗藥性仍低於澳洲地區的黑麥草，其 ED_{50} 值爲 0.97 kg ai ha^{-1}，R/S 比值爲 9.5 倍[26]。植物對嘉磷塞之抗性，可由組織培養之篩選產生，文獻顯示胡蘿蔔及菸草所篩選出的抗性細胞，其 EC_{50} 值分別爲 6.3 及 4 mM，爲感性細胞之 50 及 10 倍[30, 32]，一旦藥劑壓力移除，抗藥性會逐代遞減[10]。

由於嘉磷塞之作用爲抑制 EPSP synthase 的作用及芳香族胺基酸的生合成，造成 shikimic acid 的累積[8]，因此植株快速累積 shikimic acid 之現象，成爲對嘉磷塞感性植物及嘉磷塞藥害的指標反應[31]，例如馬齒莧、黃土香及黑麥草等植物大量累積 shikimic acid 爲未施藥植株的 60-180 倍，同時降低芳香族胺基酸生合成，直接影響二次代謝物之合成[16]，對嘉磷塞敏感之大豆於施藥後 8 日累積 shikimic acid 爲 70 μmol g^{-1}，具抗性之基因改造大豆則僅爲 0.2 μmol g^{-1} [31]。本研究結果顯示，抗性野茼蒿幼葉 shikimic acid 的含量於施藥後 2-3 日略上升，但隨施藥天數增加而逐漸降低；感性野茼蒿幼葉 shikimic acid 含量隨施藥天數增加而持續累積爲 18 μmol g^{-1} （圖二 A），此現象與

```
                                 ▼                                                                ▼    *  ▼
S-EPSPS1 (CS)   1   KPSTVPEIVLQPIKEISGTVNLPGSKSLSNRILLLAALAEGTTIVDNLLNSDDVHYMLGALRTLGLNVEEDVAIKRAIVE  80
R-EPSPS1 (CS)   1   ................................................................................  80
EPSPS-1  (CC)   1   ................................................................................  80
S-EPSPS2 (CS)   1   -SKAPE....K..Q......H.................S....V.................A.......NA.........  79
R-EPSPS2 (CS)   1   -SKAPE....K..Q......H.................S....V.................V.....G.NS.........  79
EPSPS-2  (CC)   1   -SKAPE....K..Q......H.................S....V.................A.......NS.........  79
S-EPSPS3 (CS)   1   -SKAPE....R..Q......H.................S....V.................A.......NA.........  79
R-EPSPS3 (CS)   1   -SKAPE....K..Q......H.................S....V.....S...........V.......NS.........  79
EPSPS-3  (CC)   1   -SKAPE....K..Q......H.................S....V.................A....I..NA.........  79

                                      ▼   ▼   ▼           ▼                           ▼
S-EPSPS1 (CS)  81   GCGGVFPVGKEAKDDIQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNSSYVLDGVPRMRERPIGDLVTGLKQLGADVDCSLGTNCPP 160
R-EPSPS1 (CS)  81   ................................................................................ 160
EPSPS-1  (CC)  81   ..........................................I..................................... 160
S-EPSPS2 (CS)  80   ..............E.............................................N.......... 159
R-EPSPS2 (CS)  80   ..............E.............................I...............N.......... 159
EPSPS-2  (CC)  80   ..............E.............................I...............N.......... 159
S-EPSPS3 (CS)  80   ..............E.......S.....T....I.....................VN.......... 159
R-EPSPS3 (CS)  80   ..............E.............................I...............N.......... 159
EPSPS-3  (CC)  80   ....L.........E.............T...........L.....................VN.......... 159

                               ▼       ▼               *       ▼         ▼      ▼▼          ▼
S-EPSPS1 (CS)  161  VRVVGGGGLPGGKVKLSGSISSQYLTALLMASPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLKLMERFGVSVEHSDSWDQFFIRG 240
R-EPSPS1 (CS)  161  ................................................................................ 240
EPSPS-1  (CC)  161  ................................................................................ 240
S-EPSPS2 (CS)  160  .....S.....................S....A.................V.....................T..R.YV.. 239
R-EPSPS2 (CS)  160  .....S.....................S....A....R......V.....V.....................T..R.HV.. 239
EPSPS-2  (CC)  160  .....S.....................S....A...........V.....V.....................T..R.HV.. 239
S-EPSPS3 (CS)  160  .....S........R.......V...S....A.................V...Q......KQ.........TL.R.HV.. 239
R-EPSPS3 (CS)  160  .....S.....................S....A...........V.....V.....................T..R.HV.. 239
EPSPS-3  (CC)  160  .H...S.................V...S....A.................V...R......Q.........TL.R.HV.. 239

S-EPSPS1 (CS)  241  GQKYKSPGNAYVEGDASSASYFLAGAAITGGTITVEGCGTSSLQGDVKFAEVLGQMGAEVTWTENSVTVKGPPRDSSGRK 320
R-EPSPS1 (CS)  241  ................................................................................ 320
EPSPS-1  (CC)  241  ................................................................................ 320
S-EPSPS2 (CS)  240  ................................V.................A.....................N....G 319
R-EPSPS2 (CS)  240  ................................V.....................................N....G 319
EPSPS-2  (CC)  240  ................................V.....................................N....G 319
S-EPSPS3 (CS)  240  ................................V.....................................N....G 319
R-EPSPS3 (CS)  240  ................................V.....................................N....G 319
EPSPS-3  (CC)  240  ............S.................V.....................................N....G 319

S-EPSPS1 (CS)  321  HLRAVDVNMNKMPDVAMTLAVVALYADGPTAIRDVASWRVKETERMIAICTELRKLGATVEEGPDYCVITPPEKLNVTAI 400
R-EPSPS1 (CS)  321  ................................................................................ 400
EPSPS-1  (CC)  321  ................................................................................ 400
S-EPSPS2 (CS)  320  ...P............................................................................ 399
R-EPSPS2 (CS)  320  ...P.........................................R...................... 399
EPSPS-2  (CC)  320  ...P............................................................................ 399
S-EPSPS3 (CS)  320  ...P.....................R...................................... 399
R-EPSPS3 (CS)  320  ...P............................................................................ 399
EPSPS-3  (CC)  320  ...P.....................................................T.......... 399

                                  ▼   *           *   ▼
S-EPSPS1 (CS)  401  DTYDDHRMAMAFSLAACADVPVTIKDPSCTRKTFPNYFEVLQRFAKH 447
R-EPSPS1 (CS)  401  ..................................................... 447
EPSPS-1  (CC)  401  ..............................D.......... 447
S-EPSPS2 (CS)  400  ................E.......G.......D.....E.YT.. 446
R-EPSPS2 (CS)  400  ..............R.E.......GS......D.....E.YT.. 446
EPSPS-2  (CC)  400  ................E.......G.......D.....E.YT.. 446
S-EPSPS3 (CS)  400  ..........T.............G....S..D.....E.YT.. 446
R-EPSPS3 (CS)  400  ................E.......G.......D.....E.YT.. 446
EPSPS-3  (CC)  400  ..........T.............G....S..D.....E.YT.. 446
```

圖四、 感及抗性野茼蒿 EPSPS 胺基酸序列之比較。感性野茼蒿（*C. sumatrensis*）S-EPSPS1（AY834203）、S-EPSPS2（AY834205）、S-EPSPS3（AY834207）；抗性野茼蒿 R-EPSPS1 (AY834204）、R-EPSPS2（AY834206）、R-EPSPS3（AY834208）；加拿大蓬（*C. canadensis*）EPSPS-1（AY545666）、EPSPS-2（AY545667）、EPSPS-3（AY545668）胺基酸序列之比較。（*） 標示處爲感及抗性野茼蒿 EPSPS2 主要差異之胺基酸位置。（▼） 標示處爲感及抗性野茼蒿 EPSPS3 差異之胺基酸位置。粗體字之胺基酸爲感性野茼蒿 EPSPS2 及加拿大蓬 EPSPS-3 與 NCBI 基因資料庫中其他植物差異處。

Fig. 4. Sequence comparison of EPSPS from *Conyza sumatrensis* and *C. canadensis*. EPSPS sequences (S-EPSPS1, AY834203; S-EPSPS2, AY834205; S-EPSPS3, AY834207) of glyphosate-susceptible *Conyza sumatrensis* and EPSPS sequences (S-EPSPS1, AY834203; S-EPSPS2, AY834205; S-EPSPS3, AY834207) of glyphosate-resistant *C. sumatrensis* were elucidated in this study. Sequences of EPSPS (EPSPS-1, AY545666; EPSPS-2, AY545667; EPSPS-3, AY545668) from *C. canadensis* were from NCBI's GenBank. The difference between EPSPS2 of resistant and susceptible *C. sumatrensis* occurred at position 68, 196, 416 and 428 as indicated by an asterisk (*). The inverted triangles (▼) indicate position on S-EPSPS3 with different amino acids in susceptible *C. sumatrensis*. Boldface characters indicated that the amino acids of EPSPS3 of susceptible *C. sumatrensis* and EPSPS-3 of *C. canadensis* were different from those plants from NCBI's GenBank.

加拿大蓬葉片 shikimic acid 含量的變化模式相似。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^{-1}），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[22]，以加拿大蓬葉片的癒傷組織於含 20-200 μM 嘉磷塞的培養基測定，亦顯示抗性品系 shikimic acid 含量明顯低於感性品系[28]，是否抗性加拿大蓬的 EPSPS 酵素並未完全被嘉磷塞結合，因此 shikimic acid 未大量累積，仍有待進一步研究。有關嘉磷塞藥液傳導的研究顯示，^{14}C-嘉磷塞於抗性加拿大蓬中運移至非施藥葉片及根部的含量，皆明顯低於感性加拿大蓬[13]，作者推論加拿大蓬的抗性與嘉磷塞於細胞內的分佈，以及韌皮部裝載（phloem loading）的差異有關。

目前全球發生的抗嘉磷塞雜草已有 8 種，其抗藥性可涉及不同之機制。最早發生抗性的黑麥草，初期被認爲抗性的可能原因是 EPSPS 大量擴增，或是具有對藥劑不敏感的 EPSPS 酵素所造成[12, 19, 21]，近年經由遺傳分析顯示黑麥草抗性與單一不完全顯性基因有關[21]，其抗性可能涉及嘉磷塞於細胞內的運移與分佈[20]。義大利黑麥草的抗性與藥劑的吸收及傳導無關聯性[25]。牛筋草的研究顯示，台灣與馬來西亞的抗性牛筋草 EPSPS 第 106 胺基酸由 Proline 分別變異爲 Alanine 及 Serine[3, 9]，根據沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*） *aro A* 基因之研究顯示，此位置胺基酸改變會顯著降低對嘉磷塞的親和性[33]，因此牛筋草對嘉磷塞產生抗性的可能原因爲第 106 胺基酸的改變，降低 EPSPS 酵素與嘉磷塞親和性之故。其他例如美洲假蓬、車前草、豬草及莧科植物（*A. palmeri*）等抗性草，尚無與抗性機制相關的報導。

本研究分析野茼蒿 EPSPS 基因，感與抗性野茼蒿 EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3 3

條 cDNA 的相似度分別爲 99、96 及 96%，EPSPS 基因經轉譯後，感及抗性野茼蒿 EPSPS1 胺基酸序列完全相同，EPSPS2 與 EPSPS3 分別有 11 及 17 個胺基酸的差異。NCBI 基因庫登錄的加拿大蓬 EPSPS 基因也有 3 條 cDNA：EPSPS-1、EPSPS-2 及 EPSPS-3（AY545666、AY545667、AY545668）[14]。前人研究顯示加拿大蓬 EPSPS1 及 EPSPS2 爲對嘉磷塞敏感的酵素，而 EPSPS3 基因爲不具功能性之僞基因（pseudogene）[27]。本研究感性野茼蒿 S-EPSPS3 與加拿大蓬 EPSPS-3 分別有 13 個胺基酸異於一般植物者（圖四，粗體字者），由於加拿大蓬 EPSPS-3 是僞基因，因此推測感性野茼蒿 S-EPSPS3 亦可能爲不具功能的基因。感及抗性野茼蒿之 EPSPS2 有 11 個胺基酸的差異，其中抗性野茼蒿 R-EPSPS2 有 4 個胺基酸與感性野茼蒿 S-EPSPS2，以及 NCBI 基因庫中登錄的菸草（M61904）、矮牽牛（M21071）、番茄（M21071）、玉米（X63374）、阿拉伯芥（X06613）與牛筋草 EPSPS（AY395699 及 AY395700）皆不相同[14]，胺基酸變異處分別爲 ^{68}Gly→Glu、^{196}Arg→Gly、^{416} Arg→Cys 及 ^{428}Ser→Cys（圖四，*星號標示處），由於此 4 處胺基酸之改變，目前尚無與嘉磷塞抗性有關之報導，而大腸桿菌 EPSPS 酵素與嘉磷塞、PEP 及 S3P 結合有關之 18 個胺基酸位置[34]，與野茼蒿 EPSPS2 相關位置胺基酸之間並無差異。因此初步推論抗性野茼蒿 R-EPSPS2 之 ^{68}Gly、^{196}Arg、^{416} Arg 及 ^{428}Ser 4 處胺基酸的改變，可能與抗藥性具關聯性，有待進一步之研究與探討。

謝　辭

本研究承蒙行政院農業委員會經費補助『93 農科-1.21-藥-P5』計畫，謹致謝意。

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. 袁秋英、謝玉貞、蔣慕琰。2005。牛筋草（*Eleusine indica*）對嘉磷塞抗藥性反應之測定。植保會刊 47：129-140。
3. 袁秋英、謝玉貞、蔣慕琰。2005。抗嘉磷塞牛筋草 EPSP synthase 基因選殖及抗藥性之分子鑑定。植保會刊 47：251-262。
4. 費雯綺、王喻其。2004。植物保護手冊。行政院農委會農業藥物毒物試驗所編印。台中縣。701-799 頁。
5. 蔣永正、蔣慕琰、朱德民。1994。臺灣野塘蒿（*Erigeron sumatrensis*）對巴拉刈（paraquat）抗藥性之研究。雜草會刊 15：1-19。
6. 蔣慕琰、蔣永正。2001。農田雜草管理及除草劑簡介。行政院農委會農業藥物毒物試驗所印行。1-69 頁。
7. 蔣慕琰、蔣永正、袁秋英。2002。除草劑引起之草相變遷及抗藥性。除草劑在台灣四十年回顧與展望研討會。中華民國雜草學會印行。25-30 頁。
8. 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.
9. Baerson, S. R., Rodriguez, D. J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N. A., and Dill, G. M. 2002. Glyphosate-resistant broodleaf fleabane. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Plant Physiol. 129: 1265-1275.
10. Bradshaw, L. D., Pagette, S. R., Kimball, S. L., and Wells, B. H. 1997. Perspectives on glyphosate resistance.

Weed Technol. 11: 189-198.
11. Della-Cioppa, G., and Kishore, G. M. 1988. Import of a precursor protein into chloroplast is inhibited by the herbicide glyphosate. EMBO J. 7: 1299-1305.
12. Feng, P. C. C., Pratley, J. E., and Bohn, J. A. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation, and metabolism. Weed Sci. 47: 412-415.
13. Feng, P. C. C., Tran, M., Chiu, T., 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.
14. GenBank of National Center for Biotechnology Information. 2006. (http://www.ncbi.nih.gov/)
15. Heap, I. M. 2004. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online Internet. Sep 1, 2004. Available at www.weedscience.com.
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 broodleaf fleabane (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) in Malaysia. Pest Management Science, 56: 336-339.
19. Lorraine-Colwill, D. F., Hawkes, T. R., Williams, P. H., Warner, S. A. J., Sutton, P. B., Powles, S. B., and Preston, C. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. Pestic. Sci. 55: 489-491.
20. Lorraine-Colwill, D. F., Powles, S. B., Hawkes, T. R., Hollinshead, P. H., Warner, S. A. L., and Preston, C. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pestic. Biochem. Physiol. 74: 62-72.
21. Lorraine- Colwill, D. F., Powles, S. B., Hawkes, T. R., and Preston, C. 2001. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* (Gaud.). Theor. Appl. Genet. 102: 545-550.
22. 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.
23. 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.
24. Peng, C. I., Chung, K. F., and Li, H. L.1998. Compositae. p. 919. *In*: Flora of Taiwan 2nd ed. Vol.4, Dept. of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
25. Petez, A., and Kogan, M. 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchard. Weed Res. 43: 12-19.
26. 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.

27. Sammons, R. D., Heck, G., Feng, P., Bunkers, G., Tran, M., Alibhai, M., Qi, Y., Flasinski, S., Malven, M., and Hubmeier, C. 2004. Characterizing the mechanism of glyphosate resistance in Horseweed (*Conyza canadensis*). Annual meeting abstract p. 32. *In*: American Society of Plant Biologists. Lake Buena Vista, FL USA.
28. Scheiber, P. A., Tran, M., and Duncan, D. R. 2006. Tissue culture and transient transformation of Marestail (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist). Plant Cell Rep. 25: 507-512.
29. Seefeldt, S. S., Jensen, J. E., and Fuerst, E. P. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. Weed Technol. 9: 218-227.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Stalker, D. M., Hiatt, W. R., and Comai, L. 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. J. Biol. Chem. 260: 4724-4728.
34. 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.
35. VanGessel, H. J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. Weed Sci. 49: 703-705.
36. Yuan, C. I., Chiang, C. M., and Chen, Y. M. 2002. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glypbosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. Plant Sci. 163: 543-554.

ABSTRACT

Yuan, C. I.*, Hsieh Y. C., Lin L. C. and Chiang, M. Y. 2006. Glyphosate-resistant broadleaf fleabane (*Conyza sumatrensis*): dose response and variation associated with target enzyme (EPSPS). Plant Prot. Bull. 48: 229-241. (Department of Plant Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan (ROC))

Glyphosate -resistant and -susceptible types were obtained from preliminary screening of 52 populations of Broodleaf fleabane from orchards in Taichung country where suspected resistance have been reported. Broadleaf fleabane (*Conyza sumatrensis* (Retz.)Walker)) seedlings at 6-8 leaf stage were sprayed with glyphosate at rates ranging from 0.05-1.6 kg ai ha^{-1}. Dose-response relationship was established based on dry weight of seedlings 14 days after spray. The median effective doses (ED_{50}) estimated from log-logistic equation were 0.07 and 0.56 kg ai ha^{-1} for susceptible and resistant type, respectively. Susceptible broadleaf fleabane accumulated more shikimic acid than resistant type under 1 kg ai ha^{-1} of glyphosate. Seven days after spray, shikimic acid of susceptible broadleaf fleabane was 18 μmol g^{-1}, about 9.5 times higher than that of resistant type. We explored the molecular characteristics of target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) of broadleaf fleabane using RT-PCR, *E. coli* transformation and restriction enzymes to generate the related target enzyme. There are three EPSPS cDNAs for both resistant and susceptible broadleaf fleabane. Open reading frame for EPSPS1, EPSPS2 and EPSPS3 of resistant and susceptible type were 1341, 1338 and 1338 bp, respectively. Sequence data revealed 96% identity and 11 amino acids difference between EPSPS2 for the resistant and susceptible type. Resistant broadleaf fleabane was associated with ^{68}glycine, ^{196}arginine, ^{416}arginine and ^{428}serine, as compared with glutamic acid, glycine, cysteine and cysteine. GenBank data comparison suggested that variation of amino acid position at 68, 196, 416 and 428 is important in the change from susceptibility to resistance.

(Key words: glyphosate, resistance, *Conyza sumatrensis* , EPSP synthase, molecular characteristics)

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