

嘉磷塞(glyphosate)抗藥性一

(2)雜草之抗性機制

袁秋英

摘 要

嘉磷塞 (glyphosate) 為全球使用最普遍的萌後除草劑，自市售以來20年內不曾發生抗藥性雜草，部份學者推測可能因為嘉磷塞的標的酵素 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(EPSPS)變異後，同時會降低酵素與其 PEP受質的鍵結，使得植株無法存活。然而孟山都公司於2002年首度證明馬來西亞的抗性牛筋草(*Eleusine indica* (L.) Gaertn.)為EPSPS發生變異之故。至今全球共有23種雜草出現抗嘉磷塞生物型，其中僅牛筋草、瑞士黑麥草(*Lolium rigidum* Gaudin)、義大利黑麥草(*L. Multiflorum* Lam.)、加拿大蓬(*Conyza canadensis* (L.) Cronq.)、美洲假蓬(*C. Bonariensis* Retz.)、長芒莧(*Amaranthus palmeri* S. Wats.)、塊莖莧(*A. Tuberculatus* (Moq.) Sauer)及繖花龍吐珠(*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam)等8種雜草陸續有抗性機制之相關研究，可歸納為3種作用機制，包括EPSPS基因突變、EPSPS基因拷貝數增加，以及嘉磷塞於植體吸收或傳導方式改變。

其中於EPSPS基因突變的牛筋草、瑞士黑麥草、義大利黑麥草及繖花龍吐珠，皆於相對位置第106或107個脯氨酸(proline)發生變異，分別改變為絲氨酸(serine)、蘇氨酸(threonine)或丙氨酸(alanine)，皆可導致EPSPS與嘉磷塞的親和力降低，其抗性強度各不相同，介於2~100倍之間；長芒莧及塊莖莧因EPSPS拷貝數(copy No.)增加而有3~8倍抗性，此為雜草抗藥性的新穎機制；加拿大蓬及美洲假蓬則因嘉磷塞傳導方式改變或藥液被輸送至液胞隔離，抗性約增加8~13倍。其中3種禾本科抗性草皆於EPSPS變異或嘉磷塞傳導方式產生多樣性的生物型，具有2種以上的抗性機制，此現象將是嘉磷塞於雜草防治上的重要屏障，應即早輪用不同機制之除草劑，避免抗性植株之持續變異及繁衍。目前臺灣中、南部果園及非耕地已出現抗嘉磷塞的牛筋草及繖花龍吐珠，此2雜草皆為EPSPS第106或107個脯

氨酸分別變異為丙氨酸及絲氨酸，藥毒所已建立multiplex RT-PCR及PCR-RFLP等分子鑑定方法，可快速檢測抗性株，避免抗嘉磷塞雜草持續擴散，並可協助抗性生物之監控及管理。

一、嘉磷塞及其標的酵素EPSPS

嘉磷塞(glyphosate)為非選擇性萌後除草劑，由美國孟山都公司(Monsanto)於1974年研發上市之有機磷類藥劑，化學名為N-(phosphonomethyl) glycine，一般田間用量為1.6~2.5 kg ai ha⁻¹，可有效防除一年生及大部份多年生雜草，在台灣已登記於14種主要作物、休閒地及非耕地使用，為旱田最重要之萌後除草劑(費等2010)。嘉磷塞主要作用位置為草莽酸(shikimic acid)代謝路徑中5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(EPSPS)(EC 2.5.1.19)酵素，造成下游苯丙氨酸(phenylalanine)、酪氨酸(tyrosine)及色氨酸(tryptophan)等3種芳香族胺基酸含量降低，影響植物蛋白質之合成及正常生長(Jaworski 1972, Amrhein et al. 1980, Marshall et al. 1994)，達成防除雜草之目的。由於嘉磷塞作用之shikimate pathway代謝路徑僅存在於高等植物、真菌、細菌與藻類等生物(Bradshaw et al.1997)，因此，嘉磷塞對哺乳動物、昆蟲、鳥類及魚類等生物具低毒性之特點，成為目前全球使用量最多的萌後除草劑。

嘉磷塞的主要標的酵素EPSPS作用於shikimic acid代謝路徑第6步驟，催化phosphoenol pyruvate(PEP)及shikimate-3-phosphate(S3P)產生5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate(EPSP)及無機磷(Pi)(Bentley 1990)。由大腸桿菌(*Escherichia coli*) EPSPS晶體結構顯示，EPSPS蛋白呈現2個球型區間，以2條絞鏈狀部份相連接(圖1. A.)(Stalling et al. 1991)，進而發現由S3P先鍵結於EPSPS，使2球型區間互相靠近，形成的微空間使S3P的氫氧基(hydroxyl group)易於與PEP鍵結(圖1. A.)(Schonbrunn et al. 2001)。嘉磷塞的作用主要因為嘉磷塞與受質PEP立體結構極相似，造成與PEP可逆之競爭性抑制，而無法形成下游EPSP產物；同時嘉磷塞亦會阻止pre-EPSPS(前趨蛋白)運移至葉綠體(shikimic acid代謝反應的胞器)(Amrhein et al. 1980)，而造成shikimic acid代謝路徑受阻。

(一)EPSPS特性與類別

依EPSPS對嘉磷塞的敏感度差異性，可將EPSPS區分為2類：一般植物及大部份革蘭氏陰性細菌的EPSPS屬於第1類EPSPS，如大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)，僅數微摩爾(μM)濃度之嘉磷塞即可抑制

酵素活性；對嘉磷塞具天然耐受性者的EPSPS屬於第2類，如農桿菌(*Agrobacterium* sp. strain CP4)、正無色桿菌(*Achromobacter* sp. LBAA)及假單胞菌(*Pseudomonas* sp. PG2982)(Barry et al. 1992)，以及大部份革蘭氏陽性細菌EPSPS，如沙門桿菌肺炎(*S. pneumonia*)及金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (Priestman et al. 2005)，嘉磷塞濃度超過數毫摩爾(mM)才可抑制其活性(Funke et al. 2009)。

嘉磷塞上市近20年以來，全球未曾出現抗性草，部份學者認為是EPSPS變異後，可能同時降低酵素與其PEP受質的鍵結，使得植株無法存活之故。因此，陸續有以篩選或人為點突變方式探討嘉磷塞與EPSPS鍵結構型之研究，自1983年起由鼠傷寒沙門氏菌(屬第1類EPSPS)，其耐嘉磷塞突變株aroA基因編碼的EPSPS活性較野生種者高，主要差異為突變株EPSPS位於胺基酸第101的脯氨酸(proline)改變為絲氨酸(serine) (P101S) (Stalker et al. 1985)。經利用x-ray繞射技術得知Pro101並不位於酵素活性區，若將Pro置換為結構小於Leu的胺基酸，因立體構型改變，使Gly96及Thr97移向嘉磷塞的鍵結位置，造成原子間排斥力(repulsive forces)之故，雖然抗性程度較低，僅略影響PEP與EPSPS之鍵結(Healy-Fried et al. 2007)。另於大腸桿菌EPSPS的G96A變異株，發現其對嘉磷塞具有較高抗性，主要因為丙氨酸的甲基伸出於嘉磷塞的鍵結處，降低EPSPS與嘉磷塞的親和性，但也影響與PEP的鍵結，而抑制EPSPS的活性(Eschenburg et al. 2002)。

由於EPSPS在P101S或G96A的變異，對抗性及EPSPS自身活性的效果各異，進而有諸多研究利用多點突變技術，探討可同時具有對嘉磷塞高抗性及高活性EPSPS的主要鍵結位點。其中以大腸桿菌EPSPS的T97I/P101S雙點突變效果最佳(圖1. B.) (Funke et al. 2009)，此突變EPSPS亦簡稱為TIPS EPSP，由晶體結構顯示此雙點突變主要為Ile97遠離受質之鍵結位置，利於PEP ($K_m=0.1$ mM)與EPSPS連結，同時Gly96移向嘉磷塞，而降低嘉磷塞與EPSPS的親和力($K_i=2.4$ mM)，若僅單一T97I變異，其對嘉磷塞的抗性與對PEP的鍵結仍較弱，另再加上P101S的補強作用，此TIPS EPSP可維持高催化活性及對嘉磷塞的抗性(Funke et al. 2009)。

農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens* strain CP4)之EPSPS為第2類EPSPS，其Ala100及Leu105相對於大腸桿菌的Gly96及Pro101(圖1. C.)，由

於Ala100的甲基(methyl group)捕捉嘉磷塞磷酸根之1氧原子，干擾嘉磷塞與EPSPS的鍵結($k_i > 6 \text{ mM}$)，同時CP4 EPSPS與PEP的親和力較第1類EPSPS者強(Funke et al. 2006)。

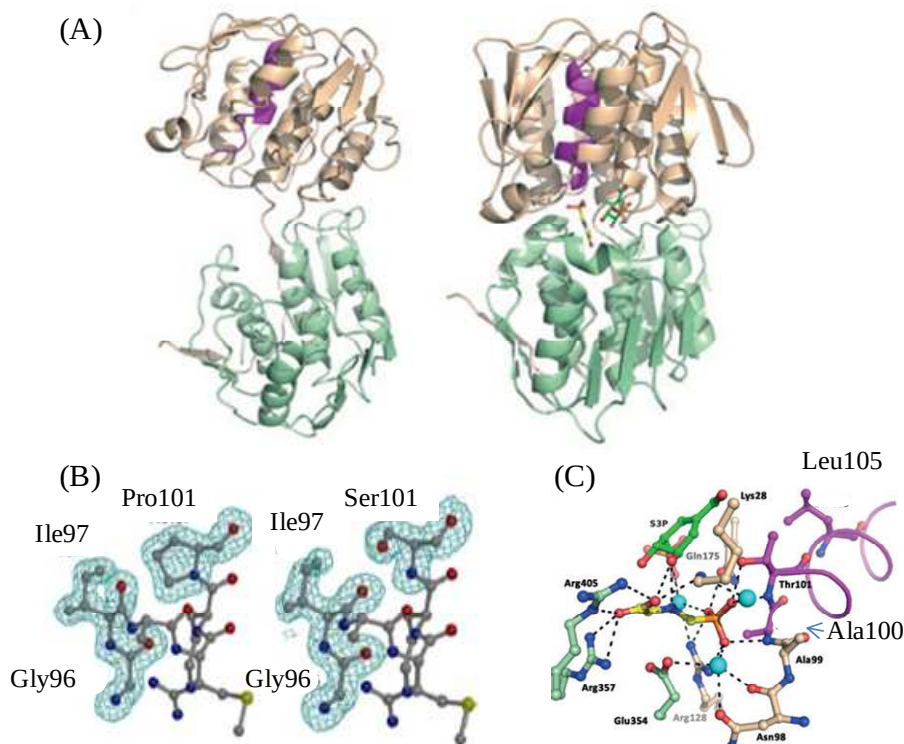


圖1. 以大腸桿菌 EPSPS 晶體之構型為例，模擬抗性 EPSPS 與嘉磷塞之分子鍵結關係。(A)大腸桿菌 EPSPS 之2個球型開放區間，N 端位於下方灰綠色區間，C 端位於上方棕色區間(左圖)，經 S3P 受質鍵結後，2區間互相靠近，利於 PEP 受質(綠色)或嘉磷塞(黃色)加入鍵結(右圖)。(B)抗嘉磷塞 T97I EPSPS(左圖)單點突變與 TISP EPSPS(右圖)之構型。(C)農桿菌 CP4 EPSPS 與嘉磷塞鍵結，其 Ala100及 Leu105相對於大腸桿菌的 Gly96及 Pro101，嘉磷塞為黃色、與嘉磷塞鍵結相關之胺基酸殘基為紅色、水分子為淡藍色圓球。

二、雜草之抗嘉磷塞機制

一般而言，雜草因噴施除草劑而漸產生於生態、生化及遺傳之適應性，造成抗藥性雜草的形成，大都因為長時期使用1種或多種作用機制相同的除草劑所致。抗性植株產生的速率常依雜草的生物及遺傳特性、除草劑選汰壓力與栽種方式而定，其中以雜草自身的種子量、易變性及多型性為重要內在因素。通常一年生雜草生活史短、種子量多、種內異花授粉機率高，易發生基因交換與重組現象，子代遺傳質的多型性高，因此易經藥劑噴施後篩選出抗藥的生物型(Caseley et al. 1991, Putwain and Collin 1998)。

現階段全球已有209種雜草的388個生物型具抗除草劑特性(Heap 2012)，歸納

抗性的作用機制可區分為二類別，一類為除草劑標的酵素改變造成之抗性，另一類為非標的酵素改變造成之抗性，前者標的酵素改變的可能原因為基因突變、基因拷貝數增加或mRNA轉錄增加；後者非標的酵素因素者，如藥劑於植體吸收、輸導改變，或被代謝、阻隔，致使藥液無法充份抵達標的處而產生抗性現象。

目前抗嘉磷塞雜草共有23種，依發生順序分別為瑞士黑麥草(*Lolium rigidum* Gaudin)、牛筋草(*Eleusine indica* (L.) Gaertn)、加拿大蓬(*Conyza Canadensis* Retz.)、義大利黑麥草(*L. Multiflorum* Lam.)、美洲假蓬(*C. Bonanensis* Retz.)、長葉車前草(*Plantago lanceolata* L.)、三裂葉豬草(*Ambrosia Trifida* L.)、豬草(*A. artemisifolia* L.)、銀膠菊(*Parthenium hysterophorus* L.)、長芒莧(*Amaranthus palmeri* S. Wats.)、塊莖莧(*A. tuberculatus* Moq.)、強生草(*Sorghum halepense* L.)、禾本科植物(*Digitaria insular*)、芒稷(*Echinochloa colona* L.)、地膚(*Kochia scoparia* (L.) Schrad)、多年生黑麥草(*L. Perenne* L.)、禾本科植物(*Urochloa panicoides* P. Beauv)、野苧蒿(*Conyza sumatrensis* Retz.)、早熟禾(*Poa annua* L. Bluegrass)、禾本科植物(*Chloris truncata* R.Br.、*Leptochloa virgata* (L.) P. Beauv.)、繖花龍吐珠(*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam)及大扁雀麥(*Bromus diandrus* Roth)等(袁 2012, Heap 2012)。

抗性機制已被證實的雜草僅有牛筋草、瑞士黑麥草、義大利黑麥草、加拿大蓬、美洲假蓬、長芒莧、塊莖莧及繖花龍吐珠等8種雜草(表1.)，其他大部分雜草的抗性機制仍不明確。目前嘉磷塞的抗性已被證實至少有3種模式，而且抗性草不同生物型可能存在1種以上的抗性機制，包括EPSPS基因突變、EPSPS基因拷貝數增加，以及嘉磷塞於植體吸收或傳導方式改變之故，不同之抗性機制其抗性強度亦有明顯差異，以下分別列舉說明。

表1. 8種雜草之嘉磷塞抗性機制

抗性機制	抗性草	文獻
EPSPS 基因突變	牛筋草(<i>Eleusine indica</i>)	Baerson et al. 2002 Ng et al. 2005 袁等 2005b
	瑞士黑麥草(<i>Lolium rigidum</i>)	Powles et al. 1998 Preston et al. 2009 Wakelin & Preston 2006 Simarmata & Penner 2008 Yu et al. 2007
	義大利黑麥草(<i>L. Multiflorum</i>)	Jasieniuk et al. 2008 Perez-Jones et al. 2007
	繖花龍吐珠(<i>Hedyotis corymbosa</i>)	Yuan et al. (未發表)

抗性機制	抗性草	文獻
EPSPS 基因拷貝數增加	長芒莧(<i>Amaranthus palmeri</i>)	Gaines et al. 2010
		Gressel et al. 2011
	塊莖莧(<i>A. tuberculatus</i>)	Tranel et al. 2011
	加拿大蓬(<i>Conyza Canadensis</i>) ⁽¹⁾	Dinelli 2006
	美洲假蓬(<i>C. Bonanensis</i>) ⁽¹⁾	Dinelli 2008
嘉磷塞傳導或吸收方式改變	加拿大蓬	Koger & Reddy 2005
		Dinelli et al. 2006
	美洲假蓬	Dinelli et al. 2008
	瑞士黑麥草	Wakelin et al. 2004
		Perez-Jones et al. 2007
	義大利黑麥草 (澳洲)	Perez et al. 2004
	義大利黑麥草 (智利) ⁽²⁾	Perez et al. 2007

1)抗性加拿大蓬及美洲假蓬 EPSPS mRNA 較感性者增加 2 倍。

2)僅智利的義大利黑麥草抗性機制為吸收量改變。

(一)EPSPS基因突變

目前因EPSPS基因改變而出現抗嘉磷塞生物型的雜草，如牛筋草、瑞士黑麥草、義大利黑麥草及繖花龍吐珠等4種(表2.)。最早報導的抗嘉磷塞雜草為瑞士黑麥草，然而首度被證實因EPSPS基因發生突變而具抗嘉磷塞特性的雜草為馬來西亞果園的牛筋草，抗藥性為8~10倍(Lee and Ngim 2000)，孟山都研發團隊進一步估算抗性約為2~4倍，同時證明抗性株EPSPS基因發生點突變，於第319個核苷酸鹼基胞嘧啶(C)變為胸腺嘧啶(T)，其編碼之胺基酸於第106的脯氨酸(proline)改變為絲氨酸(serine)，P106S相對於大腸桿菌的P101S處(表2.)(Baerson et al. 2002)，之後於馬來西亞不同地區抗性牛筋草族群，亦發現有Pro106變異為蘇氨酸(threonine)的植株(Ng et al. 2005)。經由檢測抗嘉磷塞牛筋草對嘉磷塞ki值的增加現象，推論抗性株EPSPS於Pro106的改變，影響EPSPS的構形，進而降低與嘉磷塞鍵結的親和力(Baersaon et al. 2002)，另由抗性株遺傳特性分析，顯示EPSPS P106S的變異是經由部份顯性單一基因調控 (Ng et al. 2004)，此為牛筋草的主要抗性機制。

嘉磷塞是臺灣農地使用量最多的萌後除草劑，約2000年代初於臺灣南部果園，因經常噴施嘉磷塞亦發生無法完全防除的牛筋草，藥毒所經嘉磷塞藥效測定，可明顯區別抗及感性植株，抗性約為5倍，再經比對EPSPS基因序列，結果也是於抗性株Pro106發生變異，但胺基酸改變為丙氨酸(alanine)(表2.)(袁等 2005b)，不同於馬來西亞牛筋草的絲氨酸或蘇氨酸，進

一步已建立multiplex RT-PCR分子鑑定方法，可快速檢測抗性株(圖2. A.)。近年於臺灣中、南部非耕地亦出現抗嘉磷塞的繖花龍吐珠，抗性約為10倍，其P107S EPSPS變異處相對於馬來西亞牛筋草(P106S)，此為第一個闊葉型雜草因EPSPS變異的抗性草，由於繖花龍吐珠生活史短，萌芽後3~4週即開花，故抗性植株仍持續增加中，宜經由更換除草劑種類，達有效降低抗性生物型族群，已建立PCR-RFLP方法(圖2. B.)，可快速檢測抗性株。

此外，抗嘉磷塞瑞士黑麥草也是於第106個胺基酸發生變異，澳洲抗性株的LD₅₀(R/S)介於7~20之間，EPSPS 有P106T或P106S不同變異(Wakelin and Preston 2006, Preston et al. 2009)；南非及美國抗性株LD₅₀(R/S)分別為14及100，EPSPS則變異為P106A及P106S (Yu et al. 2007, Simarmata and Penner 2008)(表2.)。抗嘉磷塞義大利黑麥草於智利出現者，抗性約增加5倍，EPSPS變異為P106S，而於美國之抗性株，抗性介於5~15倍之間，EPSPS變異為P106S或P106A (Perez-Jones et al. 2007, Jasieniuk et al. 2008) (表2.)。

表2. 抗嘉磷塞雜草EPSPS及基改作物轉基因與抗性相關胺基酸序列之比較

雜草或基改作物(轉基因)	發生國	生物型 ⁽¹⁾	抗性倍數	EPSPS 部份序列
牛筋草	臺灣	S	0	---GNAGTAMRPLTA ¹⁰⁶ AVTA---
		R	5	-----A-----
	馬來西亞	S	0	-----
		R1	2-4	-----S-----
		R2	-	-----T-----
瑞士黑麥草	澳洲	S	0	-----V--
		R1	20	-----T-----V--
		R2	7-14	-----S-----V--
	美國	R	100	-----S-----V--
	南非	R	14	-----A-----V--
義大利黑麥草	智利	S	0	-----V--
		R	5	-----S-----V--
	美國	R1	5	-----S-----V--
		R2	5-15	-----A-----V--
繖花龍吐珠 ⁽²⁾	臺灣	S	0	-----V--
		R	10	-----S-----V--
玉米 GA21 品系 (TIPS EPSPS)		R	-	-----I-----S-----
大豆 GTS 40-3-2 (CP4 EPSPS) ⁽³⁾		R	-	-----A-----L-----

1)S為對嘉磷塞敏感植株，R為抗性株。

2)繖花龍吐珠感性株proline或抗性株serine為第107個胺基酸。

3)與抗藥性相關之主要2胺基酸。

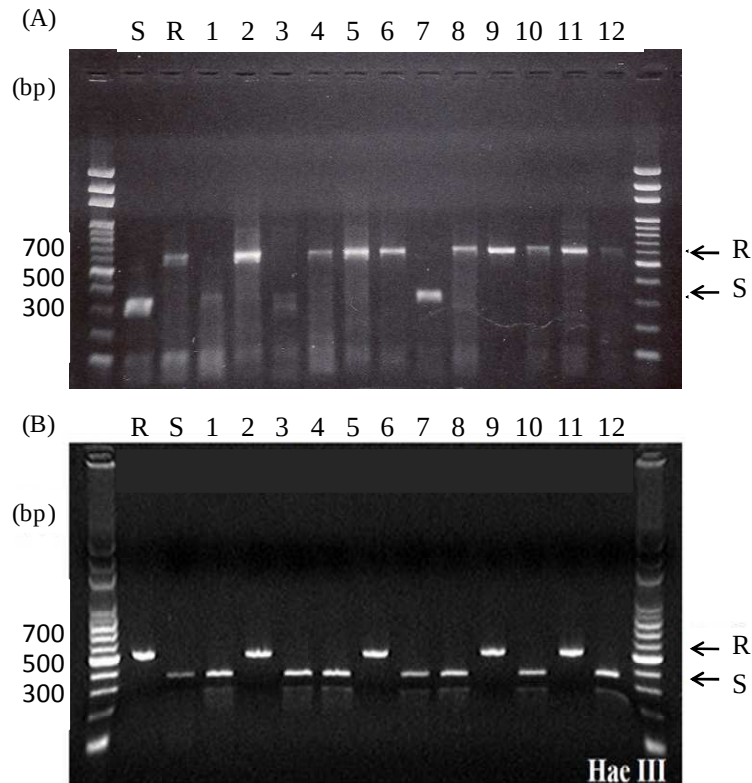


圖 2. 抗嘉磷塞牛筋草及繖花龍吐珠之分子鑑定。(A)利用專一性引子以 multiplex RT-PCR 技術檢測抗及感性牛筋草，(B)利用 Hae III 限制酶以 PCR-RFLP 技術檢測抗及感性繖花龍吐珠。R 及 S 為經嘉磷塞藥劑反應區別之抗及感性株、編號 1~12 者為田間採集之雜草樣品。

(二)EPSPS基因拷貝數增加

早期有關嘉磷塞的抗性是經由人為方式誘導產生，如以細胞或組織培養漸進增加嘉磷塞藥劑量，可誘導產生抗24~35 mM嘉磷塞的胡蘿蔔 (*Daucus carota* L. subsp. *sativus*)細胞株，而野生型細胞於1 mM即死亡 (Nafziger et al. 1984)，其抗性的增加主要為EPSPS拷貝數(copy No.)增加4~25倍，且EPSPS蛋白質增加12倍，另於矮牽牛、菸草(*Nicotiana tabacum* L.)、大豆及苜蓿(*Medicago sativa* L.)細胞亦有相似現象，其中EPSPS拷貝數至少增加20倍(Pline-Srnic W 2006)。然而此等細胞株於無藥劑壓力之下，EPSPS拷貝數即明顯減少，子代開始漸喪失抗性(Pline-Srnic W 2006)。

美國喬治亞州棉花田於2004年出現抗嘉磷塞的長芒莧族群，對嘉磷塞的抗性約為6~8倍(Culpepper et al. 2006)，經EPSPS特性研究顯示，抗性及感性株的EPSPS皆為對嘉磷塞敏感的酵素，進一步利用定量PCR證明抗性株EPSPS拷貝數為感性株的5~160倍，且EPSPS蛋白質含量約增加20倍，同時

EPSPS拷貝數及蛋白質含量增加皆與抗性具正相關性，經由FISH技術觀察增加的EPSPS基因分布於各染色體中(圖3.)，此因作者推論長芒莧因EPSPS拷貝數大量增加而對嘉磷塞產生抗性(Gaines et al. 2010)，此為雜草抗藥性的新穎機制，然而因基因拷貝數增加的昆蟲抗藥機制，約於20年前即已發生(Devonshire and Field 1991)。此等由於選拔壓力造成基因數量劇增，為植物演化的一種方式，例如超量生產EPSPS酵素，即可間接稀釋細胞中的嘉磷塞濃度，且可能涉及藥劑逆境誘導可移動遺傳元素(如轉位子)，使EPSPS幾乎可於所有染色體中增殖(圖3.)，此等增加EPSPS基因數是否具遺傳穩定性仍不明確(Powles 2010, Gasquez et al. 1995)。同屬的抗性塊莖莧亦有EPSPS拷貝數增加的報導(Tranel et al. 2011)，加拿大蓬及美洲假蓬抗性株的EPSPS mRNA表現量為感性株的2倍，是否與EPSPS拷貝數增加有關，尚無進一步研究(Dinelli 2006, 2008)，另於臺灣中部梨園及葡萄園發現的耐嘉磷塞華九頭獅子草(*Dicliptera chinensis* (L.) Juss)亦有EPSPS mRNA表現量較高現象(Yuan et al. 2002)。

(三)嘉磷塞於植物吸收、傳導方式改變

除草劑是否可於吸收後傳導至標的酵素，常為影響防除效率的重要因素，嘉磷塞主要作用的草莽酸代謝途徑，以植物根尖或頂梢的生長點活性最高，因此藥劑需可輸送至相關位置，方可達最佳藥效。嘉磷塞屬於雙向輸導(ambimobile)藥劑，藥液經葉表吸收進入韌皮部後，如同蔗糖於植體內的輸送方式，屬於源庫關係(sink-source relationship)之模式，若嘉磷塞結構改變影響其兩性離子(zwitterionic)特性，則會降低其於植體內的移動效率(Shaner 2009)。

嘉磷塞由細胞共質體(symplasm)進入韌皮部，可有2種方式，一為經質流擴散(mass diffusion)至葉肉細胞，再經原生質絲(plasmodesmata)進入韌皮部，另一為主動運輸，進入葉肉細胞或伴細胞，再以擴散方式經原生質絲進入韌皮部，嘉磷塞一旦進入篩管，因其自身的親水性，驅使向養分主要蓄積的組織輸送(Shaner 2009)(圖4.)。經利用¹⁴C-嘉磷塞探討藥劑於抗性雜草吸收與傳導之研究，大部份顯示藥液進入對嘉磷塞敏感植株的葉片後，依蒸散流而輸送至未施藥處或細小葉脈；而抗性株的藥液主要停留於處理葉面內，未進入細小葉脈(Preston and Wakelin 2008)。

於美國德拉威州大豆田出現的抗嘉磷塞加拿大蓬，抗性為敏感植株的8~13倍，其抗性機制即為藥劑於植體內傳導機制改變 (Feng et al. 2004, Koger and Reddy 2005)。嘉磷塞於感性株的傳導主要在於韌皮部，以共質體方式移行，藥液由莖向下移動至根部，故於莖及根累積的藥劑量為感性株的2倍；而嘉磷塞於抗性株的傳導主要位於木質部，以質外體或非共質體 (apoplast) 方式移行，藥液由莖桿移向上部葉片為主，於葉片累積的藥劑量為感性株的1.6倍 (Dinelli et al. 2006)。嘉磷塞藥液於同屬的抗性美洲假蓬植體內的傳導方式也相似 (Dinelli et al. 2008)。除了嘉磷塞的傳導問題之外，近年Ge等學者(2011)以³¹P-NMR技術檢測加拿大蓬，顯示嘉磷塞於抗性株會快速被隔離於液胞，降低韌皮部細胞內的藥劑濃度，作者推論可能於抗性加拿大蓬體內有一未知的障礙物質(barrier)，存在於葉肉細胞或韌皮部，阻止嘉磷塞輸送至韌皮部 (Shaner 2009)。抗巴拉刈(paraquat)的瑞士黑麥草也有類似將藥劑輸送至液胞的相關報導 (Qin et al. 2010)。

另如澳洲的瑞士黑麥草研究顯示，嘉磷塞分布於感性株的處理葉片頂梢及根部分別為15%及20%，抗性株則為50%及6% (Perez-Jones et al. 2007, Wakelin et al. 2004)，當地的抗性義大利黑麥草的藥液傳導模式亦相似 (Perez et al. 2004)。然而於智利的抗性及感性義大利黑麥草，主要的差異在於藥劑吸收部份，抗性株葉片對嘉磷塞吸收量較感性株少約40%，且藥液傳導至葉尖多於停滯於施藥葉片 (Michette et al. 2005)。經由F2子代回交等遺傳分析，抗性瑞士黑麥草及加拿大蓬於嘉磷塞藥液傳導之差異，可能皆由細胞核編碼的部份顯性單一基因所控制 (Lorraine-Colwill et al. 2001, Zelaya et al. 2004)。

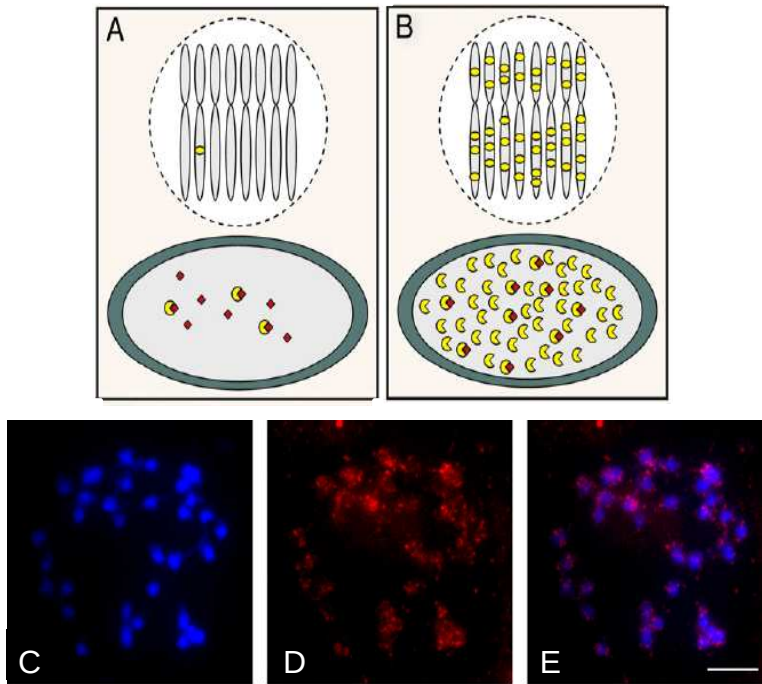


圖3. 抗嘉磷塞雜草因 EPSPS 拷貝數增加之遺傳質特性。(A)及(B)分別為感性及抗性植株 EPSPS(黃色)於染色體及葉綠體之分布圖示。(C)至(E)為抗嘉磷塞長芒莧(*Amaranthus palmeri* S. Wats.)利用 FISH 技術檢測 EPSPS，(C)細胞分裂中期之染色體，(D)以 EPSPS 為探針之 FISH 影像，(E)為(C)及(D)的重疊影像，結果顯示大量增加的 EPSPS 基因分布於各染色體中。

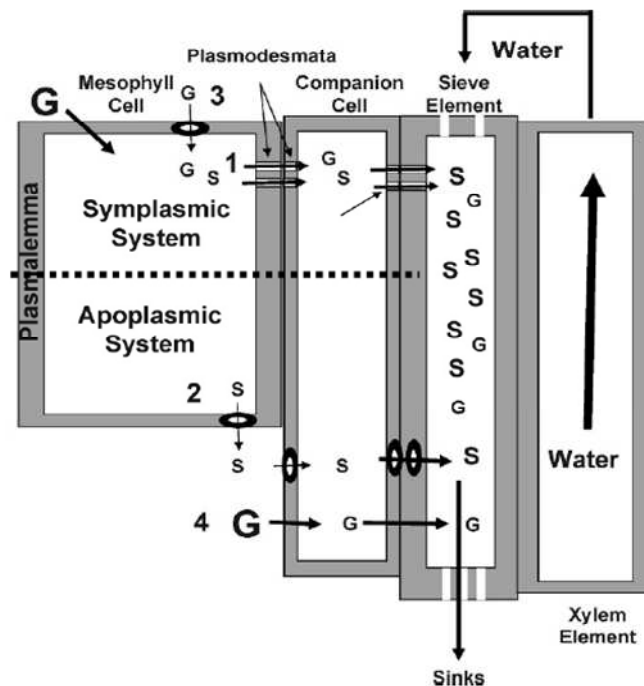


圖4. 嘉磷塞、蔗糖及水分於植物體內之輸送模式圖。G 為嘉磷塞、S 為蔗糖，字體尺寸表示胞器間之相對濃度。嘉磷塞由細胞共質體系統(symplasmic system)進入韌皮部，可有2種方式，一為經質流擴散(mass diffusion)至葉肉細胞，再經原生質絲(plasmodesmata)進入韌皮部，另一為主動運輸，進入葉肉細胞或伴細胞，再以擴散方式經原生質絲進入韌皮部。

三、抗嘉磷塞基因於基改作物研發之應用

(一)第一類EPSPS變異後利用

長芒莧為第1個因EPSPS基因拷貝數增加的抗嘉磷塞雜草，然而早期研究即有針對大豆及苜蓿，以藥劑漸進處理，而篩選出EPSPS拷貝數增加20倍的抗性細胞株，但因此等細胞株於無藥劑壓力之下，EPSPS拷貝數即明顯減少，子代開始漸喪失抗性(Pline-Srnic W 2006)，因此增大基因拷貝數之策略，並未被應用於作物的基因改造。

牛筋草、瑞士黑麥草及義大利黑麥草皆因Pro106變異而具抗性，僅此單一點突變，以6公升/公頃 41%嘉磷塞劑量噴施抗性牛筋草，雖未能完全防治，但仍有50%以上之傷害徵狀(袁等2005a)。前人研究亦曾從番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)、油菜(*Brassica napus* L.)、大豆(*Glycine max* (L) Merrill)、玉米及阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)等作物，篩選出高抗性突變細胞株，雖然EPSPS變異後對嘉磷塞之 k_i 值明顯增加，但對PEP的 k_m 值也增加數倍，使得EPSPS活性降低(Padgett et al. 1996)，因此未被利用於抗性轉基因作物之開發。經由多點突變探討，以大腸桿菌EPSPS的T97I/P101S雙點突變效果最佳(Funke et al. 2009)，此經修飾後的EPSPS稱之為TIPS EPSP，先正達公司(Syngenta Seeds, Inc.)將此原理應用於玉米自身EPSPS基因鹼基之修飾，並開發為抗嘉磷塞基改玉米GA21品系(GM crop Database from Center for Environmental Risk Assessment 2012)(圖1. B., 表2.)，後續拜耳公司(Bayer CropScience Inc.)又以玉米的TIPS EPSPS為轉基因，開發棉花GHB614新品系，皆具良好抗嘉磷塞效果。

(二)第二類EPSPS之利用

參考基因改造作物資料庫(GM crop Database from Center for Environmental Risk Assessment 2012)訊息，目前已上市抗嘉磷塞基改作物的35個品系，包括大豆3品系(如GTS 40-3-2)、玉米17品系(如NK603)、棉花7品系(如MON888913)、油菜3品系(如GT200)、甜菜2品系，以及苜蓿、馬鈴薯與小麥各1品系，主要皆是利用農桿菌CP4 EPSPS為轉基因，此EPSPS屬於第2類EPSPS，其Ala100及Leu105相對於大腸桿菌的Gly96及Pro101(圖1. C., 表2.)，CP4 EPSPS不僅與嘉磷塞的親和力極低，同時與PEP受質之鍵結較第一類EPSPS者強，故以玉米NK603衍生的新品系漸增多(Funke et al. 2006)。

結 語

目前全球抗嘉磷塞的23種雜草，其中約50%為近5年內發生者，除了於作物田區高頻率及經常性使用嘉磷塞除草劑之外，另一重要原因為抗嘉磷塞基改作物栽種面積持續增加且僅噴施嘉磷塞單一藥劑，導致抗性雜草快速而大量增加。現階段僅有8種雜草的抗性機制較為明確，其中於EPSPS基因突變的牛筋草、瑞士黑麥草、義大利黑麥草及繖花龍吐珠，分別改變為絲氨酸、蘇氨酸或丙氨酸，此3種胺基酸皆為小分子胺基酸，使EPSPS與嘉磷塞的親和力降低，其抗性強度各不相同；長芒莧及塊莖莧因EPSPS拷貝數增加；加拿大蓬及美洲假蓬則因嘉磷塞輸送方式改變，或藥液被輸送至液胞中，與葉綠體等胞器隔離，故仍可存活，尤以開花期的加拿大蓬及美洲假蓬抗性更明顯增強。瑞士黑麥草、義大利黑麥草、加拿大蓬及美洲假蓬抗性株中存在不同抗性機制，可能因為1年生禾草或菊科雜草生活史短、種子量多、種內異花授粉機率高，易發生基因交換與重組，以致同時存在2種以上抗性機制的雜草逐漸增加，將使得嘉磷塞的防治效果大幅降低，應立即更換使用不同作用機制的除草劑，以及配合快速之分子檢測技術，方可有效抑制抗性族群的滋長及擴散。

參考文獻

1. 袁秋英。2012。嘉磷塞(glyphosate)抗藥性-(1)耐及抗嘉磷基雜草之發生。藥毒所專題報導。105期：1-18。
2. 袁秋英、謝玉貞、蔣慕琰。2005a。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。2005b。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、陳富翔、林曉民、李貽華。2010。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。874-925頁。
5. Amrhein N, B Deus, P Gehrke, HC Steinrücken(1980)The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. Plant Physiol. 65：830-834.
6. Baerson SR, DJ Rodriguez, M Tran, Y Feng, NA Best, GM Dill GM(2002) Glyphosate-resistant goosegrass：identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Plant Physiol. 129：1265-1275.
7. Barry GF, GM Kishmore, SR Padgett (1992) A herbicidal composition comprising glyphosate in the form of a mixture of the potassium and ammonium salts. International Patent 9204449.
8. Bentley R(1990) The shikimate pathway-a metabolic tree with many branches. Crit Rev Biochem Mol Biol 25：307-384.
9. Bradshaw LD, SR Pagette, SL Kimball, BH Wells(1997)Perspectives on glyphosate resistance. Weed Technol. 11：189-198.
10. Culpepper AS, TL Grey, WK Vencill, JM Kichler, TM Webster, SM Brown(2006) Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. Weed Sci. 54：620-626.
11. Devonshire AL, LM Field(1991)Gene amplification and insecticide resistance. Ann Rev Entomol 36：1-21.
12. Dinelli G, I Marottii, A Bonettia, P Catizone, JM Urbano, J Barnes (2008) Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. Weed Res 48：257-265.
13. Dinelli G, I Marottii, A Bonettia, M Minelli, P Inelli, P Catizone, J Barnes(2006) Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis*(L.)Cronq. biotypes. Pestic Biochem Physiol 86：30-41.
14. Eschenburg S, ML Healy, MA Priestman, GH Lushington, E Schonbrunn(2002)How the mutation glycine 96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from Escherichia coli. Planta 216：129-135.
15. Feng PCC, M Tran, T Chui, RD Sammons, GR Heck, CA CaJacob(2004)Investigations into glyphosate-resistant horseweed(*Conyza canadensis*)：retention, uptake, translocation and metabolism. Weed Sci 52：498-505.
16. Funke T, H Han, ML Healy-Fried, M Fischer, E Schonbrunn (2006) Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. Proc Natl Acad Sci 103：13010-13015.

17. Funke T, Y Yang, H Han, M Healy-Fried, S Olesen, A Becker, E Schonbrunn (2009) Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97→Ile and Pro101→Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. J Bio Chem 284 : 9854-9860.
18. Gaines TA, W Zhang, D Wang, B Bukun, ST Chisholm, DL Shaner, SJ Nissen, et al. (2010) Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. Proc Natl Acad Sci 107 : 1029-1034.
19. Gasquez J (1995) Inheritance of herbicide resistance within weeds. In Proceedings of the International Symposium on Weed and Crops Resistance to the herbicides. Cordoba. Spain : Cordobesa de Impresiones Graficas. p.114.
20. Ge X, AD Avignon, JJH Ackerman, B Duncan, MB Spaur, RD Sammons (2011) Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate : low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ³¹P NMR. Pest Manag Sci 67 : 1215-1221.
21. GM crop Database from Center for Environmental Risk Assessment (CERA) (2012) Available at : http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database. Accessed Jul 10, 2012.)
22. Gressel J (2011) Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. Pest Manag Sci 67 : 253-257.
23. Healy-Fried ML, T Funke, MA Priestman, H Han, E Schonbrunn (2007) Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. J Biol Chem 282 : 32949-32955.
24. Heap I (2012) The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Available at : <http://www.weedscience.org>. Accessed Jul 10, 2012.
25. Jasieniuk M, R Ahmad, AM Sherwood, JL Firestone, A Perez-Jones, WT Lanini, C Mallory-Smith, Z Stednick (2008) Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California : Distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. Weed Sci 56 : 496-502.
26. Jaworski EG (1972) The mode of action of N-(phosphonomethyl)glycine : inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. J. Agric. Food Chem. 20 : 1195-1198.
27. Koger CH, KN Reddy (2005) Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). Weed Sci 53 : 84-89.
28. Lee LJ, J Ngim (2000) A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. Pest. Manag. Sci. 56 : 336-339.
29. Lorraine-Colwill DF, SB Powles, TR Hawkes, C Preston (2001) Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* Gaud. Theor Appl Genet 102 : 545-550.
30. Marshall G, RC Kirkwood, GE Leach (1994) Comparative studies on graminicide-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica*. Weed Research. 34 : 177-185.
31. Michette P, R de Prado, N Espinosa, C Gauvrit (2005) Glyphosate resistance in a Chilean *Lolium multiflorum*. Comm Agric Appl Biol Sci 70 : 507-513.
32. Nafziger EM, JM Wildholm, HC Steinrücken, JL Killmer (1984) Selection and characterization of a carrot cell line tolerance to glyphosate. Plant Physiol. 76 : 571-574.

33. Ng CH, R Wickneswary, S Salmuah, YT Teng, BS Ismail(2003) Gene Polymorphisms in Glyphosate resistant and susceptible Bio types of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res* 43 : 108-115.
34. Ng CH, R Wickneswary, S Salmuah, YT Teng, BS Ismail(2004) Glyphosate resistant in *Eleusine indica*(L.) Gaertn. From different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Australian J Agric Res* 55 : 407-414.
35. Padgett SR, DB Re, GF Barry, DE Eichholtz, X Delanny, RL Fuchs, GM Kishore, RT Fraley(1996) New weed control opportunities : development of soybeans with a Roundup Ready gene. In *Herbicide-Resistant Crops : Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*, edited by S. O. Duck. Boca Raton FL : CRC Press, pp 53-84.
36. Pérez A, C Alister, M Kogan (2004) Absorption, translocation and allocation of glyphosate in resistant and susceptible Chilean biotypes of *Lolium multiflorum*. *Weed Biol Manag* 4 : 56-58.
37. Pérez-Jones A, KW Park, N Polge, J Colquhoun, C Mallory-Smith(2007) Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226 : 395-404.
38. Pline-Srnic W(2006) Physiological mechanisms of glyphosate resistance. *Weed Technol* 20 : 290-300.
39. Powles SB(2010) Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution. *Proc Natl Acad Sci* 107 : 955-956.
40. Preston CA, AM Wakelin, FC Dolman, Y Bostamam, P Boutsails(2009) A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world : Mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Sci* 57 : 435-441.
41. Preston C, AM Wakelin(2008) Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns, *Pest Manag Sci* 64 : 372-376.
42. Priestman MA, Funke T, Singh IM, Crupper SS & Schonbrunn E(2005) 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Lett* 579 : 728-732.
43. Putwain PD, A Collinh (1998) Mechanism involved in the evolution of herbicide resistance in weeds. England, Cambridge University Press, p.24.
44. Qin Y, S Huang, S Powles(2010) Direct measurement of paraquat in leaf protoplasts indicates vacuolar paraquat sequestration as a resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Pestic Biochem Physiol* 26 : 104-109.
45. SchÖnbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JN & Kabsch W(2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci* 98 : 1376-1380.
46. Simarmata M, D Penner(2008) The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Sci* 56 : 181-188.
47. Shaner DL(2009) Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Sci* 57 : 118-123.

48. Shuttleworth WA, ME Pohl, GL Helms, DL Jakeman, JNS Evans(1999) Site-directed mutagenesis of putative active site residues of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochemistry* 38 : 296–302
49. Stalker DM, WR Hiatt, L Comal(1985) A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J Bio Chem* 260 : 4724-4728.
50. Stallings WC, SS Abdel-Meguid, LW Lim, HS Shieh, HE Dayringer, NK Leimgruber, RA Stegeman, KS Anderson, JA Sikorski, SR Padgett(1991) Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase : a distinctive protein fold. *Proc Natl Acad Sci* 88 : 5046-5050.
51. Tranel PJ, CW Riggins, MS Bell, AG Hager(2011) Herbicide resistances in *Amaranthus tuberculatus* : a call for new options. *J Ag Food Chem* 59 : 5808-5812.
52. Wakel AM, C Preston(2006) Inheritance of Glyphosate resistance in several populations of Rigid Ryegrass(*Lolium rigidum*) from Australia. *Weed Sci* 54 : 212-219.
53. Wakelin AM, DF Lorraine-Colwill DF, C Preston(2004) Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Res* 44 : 453-459.
54. Yu Q, A Cairns, SB Powles(2007) Glyphosate, paraquat and ACCase multiple resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225 : 499-513.
55. Yuan CI, MY Chaing, YM Chen(2002) Triple mechanisms of glyphosate-tolerance in a naturally occurring glyphosate-tolerant plant *Dicliptera chinensis*. *Plant Sci.* 163 : 543-554
56. Zelaya IA, MDK Owen, MJ VanGessel(2004) Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis*(L.)Cronq. *Theor Appl Genet* 110 : 58-70.

藥毒所專題報導

發行人：費雯綺
發行所：行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
地址：臺中市霧峰區舊正里光明路 11 號
網址：<http://www.tactri.gov.tw>
電話：(04)23302101
總編輯：蔡勇勝
編輯委員：蔣永正 何明勳 李宏萍
 曾經洲 蔡建任 蘇文瀛

展售書局：

- 1.國家書店松江門市/台北市松江路 209 號 1 樓 (02)25180207
網路書店/ <http://www.govbooks.com.tw> (02)26598074
- 2.五南文化廣場/台中市中山路 6 號 (04)22260330

印刷：財政部印刷廠
地址：臺中市大里區中興路一段 288 號
電話：04-24953126

中華民國 101 年 7 月出版

定價：新台幣 30 元

GPN：2007600007

ISSN：1017-9569(平裝)