

# 台灣抗嘉磷塞牛筋草一標的酵素 EPSP synthase 基因選殖及抗藥性之分子鑑定

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 台灣抗嘉磷塞牛筋草 - 標的酵素 EPSP synthase 基因選殖及抗藥性之分子鑑定 植保會刊 47：251 - 261

本研究針對抗嘉磷塞 (glyphosate-resistant) 牛筋草 (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) 之 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 酵素，探討其分子特性。經由設計專一性引子進行 RT-PCR 反應，可擴增約 950 bp 之核酸片段，再以 RACE (5'- and 3'-rapid amplification of cDNA ends) 技術，完成抗性 (R) 及感性 (S) 嘉磷塞牛筋草 EPSPS cDNA 之解序 (National Center for Biotechnology Information, NCBI, accession number: AY395699 及 AY395700)，抗、感牛筋草 EPSPS cDNA 長度皆為 1338 bp，僅有 10 個鹼基之差異，其中於抗、感牛筋草之 EPSPS cDNA 的第 319 鹼基分別為 guanine (G) 及 cytosine (C)，敏感植株者之胺基酸 <sup>106</sup>proline，於抗性植株者則為 <sup>106</sup>alanine，而於馬來西亞牛筋草抗性植株者則為 <sup>106</sup>serine，此處之改變可能為抗性牛筋草對嘉磷塞親和性降低之主要原因。於抗感牛筋草 <sup>319</sup>G 及 <sup>319</sup>C 鹼基差異處，分別設計兩組專一性引子，利用 multiplex RT-PCR 技術，進行 14 個牛筋草抗感族群之分子鑑定，於其中 10 個抗性植株可檢出約 600 bp 之 DNA 條帶，4 個感性植株可檢出約 300 bp 之 DNA 條帶。此分子檢測方法可供抗除草劑雜草監測及管理之用。

(關鍵詞：嘉磷塞抗藥性、牛筋草、EPSP synthase 基因、複合式反轉錄-聚合酶鏈鎖反應)

---

\* 通訊作者。E-mail: yci@tactri.gov.tw

## 緒 言

嘉磷塞 (glyphosate, N-phosphomethyl glycine) 為非選擇性萌後殺草劑，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 (EPSPS)，嘉磷塞與受質 phosphoenolpyruvate (PEP) 產生競爭性之抑制，並且阻止 EPSPS 前趨蛋白質運移至葉綠體<sup>(5, 9)</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，影響蛋白質之生合成，進而抑制植物生長<sup>(5, 18)</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*)、義大利黑麥草 (*Lolium multiflorum*)、加拿大蓬 (*Conyza Canadensis* L.)、美洲假蓬 (*Conyza bonariensis*)、車前草 (*Plantago lanceolata*) 及牛筋草 (*Eleusine indica*) 等生物型。目前抗或耐嘉磷塞植物或微生物之機制種類各異，包括 (1) 吸收傳導方面之問題：field bindweed、鵝觀草 (quackgrass) 及加拿大蓬<sup>(8, 13, 17)</sup>，(2) EPSPS 酵素合成增加：利用於番茄及菸草植物細胞或組織培養基內逐漸增加藥劑量，篩選出具抗藥性品系<sup>(12, 26)</sup>，(3) EPSPS mRNA 轉錄速率增加：華九頭獅子草 (*Dicliptera chinensis*)<sup>(1, 29)</sup> 及 *Corydalis sempervirens*<sup>(15, 16)</sup>，(4) EPSPS 酵素與嘉磷塞親和力降低：玉米之 isozymes 作用及牛筋草 EPSPS 基因之作用點改變<sup>(7, 14)</sup>。

台灣近年來於高雄縣、南投縣、彰化

縣及宜蘭縣員山鄉果園之觀察，噴施嘉磷塞一般田間施用劑量，陸續出現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。有關台灣果園地區牛筋草抗嘉磷塞之研究，已針對牛筋草不同族群，測試其與嘉磷塞劑量反應、shikimic acid 含量及 EPSPS 酵素等生理特性變化，本研究之目的為探討抗嘉磷塞牛筋草 EPSPS 基因特性，並利用 multiplex RT-PCR 技術建立抗性植株之分子鑑定方法，應用於抗除草劑雜草之監測及管理。

## 材料與方法

### 化學藥品及儀器

試驗用藥品、儀器及廠牌：TRIZOL reagent (Life)、RNeasy Mini kit (Qiagen)、Oligotex mRNA mini kit (Qiagen)、ThermoScript RT-PCR kit (Invitrogen)、SMART RACE kit (Clontech)、pGEM T-easy vector (Promega)、ligase (Promega)、Restriction enzymes (MBI)、miniprep system kit (Viogen)、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)。

### 抗感嘉磷塞牛筋草材料製備

#### 1. 抗感嘉磷塞牛筋草 EPSPS 基因解序之材料

自高雄縣燕巢鄉、岡山鎮、南投縣草屯鎮及宜蘭縣員山鄉等處果園，採集牛筋草種子，分別於溫室播種及培育，植株約 6-8 葉齡，經由噴施次致死量 (0.3 kg ai ha<sup>-1</sup>) 之嘉磷塞，施用藥劑為嘉磷塞異丙胺鹽 (41% 溶液)，選取對藥劑敏感度最明顯差異之抗性及感性分別 4 及 2 植株，各稱取 0.5 g 新生幼葉，利用 TRIZOL reagent

抽取總 RNA，貯存於-70°C 備用。

## 2. Multiplex RT-PCR 檢測之材料

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，於溫室播種及培育，植株約 6-8 葉齡，稱取 0.1 g 新生幼葉，利用 RNeasy Mini kit 抽取總 RNA，貯存於-70°C 備用。

## 利用 RT-PCR、RACE 技術選殖 EPSPS cDNA 及解序

將牛筋草總 RNA 利用 Oligotex mRNA mini kit，依據 Qiagen 公司推薦之操作流程，分離出 mRNA。由 NCBI GenBank 之 EPSPS 基因序列，選取具高度保留的區間設計專一性引子 EPSPS-5/EPSPS-3 (表一)，取牛筋草樣品約 0.8 µg mRNA，利用 ThermoScript RT-PCR kit，依據 Invetrogen 公司推薦之操作流程進行 RT-PCR 反應，合成第一股 cDNA 之反應為 50°C 30 分鐘，94°C 2 分鐘，後續 PCR 之條件為起始變性 94°C 4 分鐘，之後以變性 94°C 1 分鐘，煉合 57°C 1 分鐘，延展 72°C 1 分鐘，循環 30 週期，最後延展 72°C 7 分鐘。取 5 µl PCR 產物，加入樣品 0.1 倍體積的 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% (w/v) agarose 的 0.5 X TBE 膠體，以 100 v 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。

RT-PCR 擴增之單一 950 bp DNA 條帶，利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出。進行接合反應，取此 3 µl DNA，添加於 pGEM-T Easy Vector kit，於 16°C 反應 14-16 小時。取 200 µl 大腸桿菌 (*Escherichia coli*) DH5α 菌株加入接合反應之 10 µl DNA，於 37°C 振盪培養 1 小時，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°C 培養 14-16 小時。使用 miniprep system kit 抽取 plasmid DNA，證實 plasmid 中 insert DNA 長度為 950 bp，進行定序。利用 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit，委託明欣生技公司解序。將 DNA 序列與 NCBI 基因庫中 EPSPS 基因序列比對，確證 950 bp PCR 產物為 EPSPS 基因，再於已知序列中設計 EPSPS-5' 及 EPSPS-3' 二引子 (表一) 進行 RACE 全長 cDNA 解序，依據 Clontech 公司推薦之操作流程，再經由 EPSPS-S 及 EPSPS-T 兩端引子 (表一) 擴增全長 cDNA 片段。

表一、試驗中使用之引子

Table 1. Primers used in this study

Primers	DNA sequences (5' → 3')
EPSPS-5	CATGCTCGGGGCCCTGAAAACCCT C
EPSPS-3	CGACCGACGCTCCCAGCTTTGTTA G
EPSPS-5'	GGAGCAGCCATCAGCAAGGCACTC
EPSPS-3'	CTGCCACCTGTTCTGTGTCAAGGG A
EPSPS-S	GCGGGCGCGGAGGAGGTGGTGCTG
EPSPS-T	TTAGTCTTGACGAAAGTGCTCAG
EPSPS-R 5	GCTGGAAGTCAATGCGAG
EPSPS-R 3	CCATGTAACCTTCGCTCCCA
EPSPS-S5	GCAGCCCATCAAGGAGATC
EPSPS-S3	GTCGCATTGCAGTTCACG

## Multiplex RT-PCR 之檢測方法

取高雄縣燕巢鄉及岡山鎮採集之 14 地區牛筋草樣品，參考 Delye 等人<sup>(10)</sup>之方法，利用抗、感牛筋草 EPSPS cDNA 於第 319 鹼基 guanine 及 cytosine 之差異，設計

EPSPS-R5/EPSPS-R3 及 EPSPS-S5/EPSPS-S3 兩組引子 (表一、圖四 A)，進行 multiplex RT-PCR 反應，合成第一股 cDNA 之反應為 50°C 30 分鐘，94°C 2 分鐘，後續 PCR 為起始變性 94°C 4 分鐘，之後以變性 94°C 30 秒，煉合 58°C 5 秒，延展 72°C 30 秒，循環 40 週期，最後延展 72°C 7 分鐘。電泳分析同 EPSPS 基因選殖及解序單元之方法。

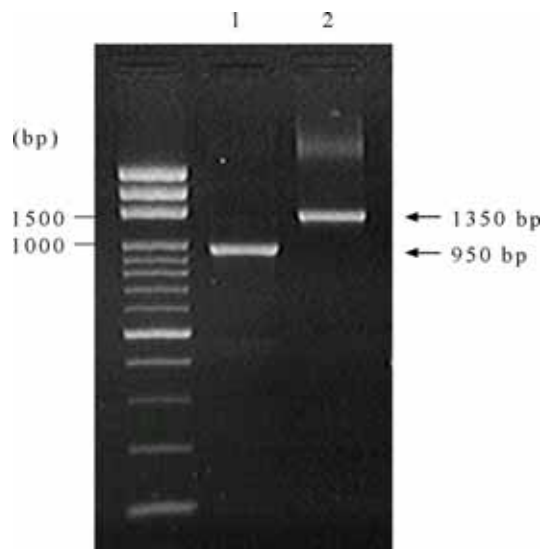
## 結 果

### 抗感嘉磷塞牛筋草 EPSPS 基因選殖

抗、感嘉磷塞牛筋草 RNA，經 RT-PCR 處理，可擴增 950 bp DNA 片段 (圖一)，此 PCR 產物，經選殖及定序，與 NCBI GenBank 中植物之 EPSPS 比較，相似度為 90% 以上，以此 DNA 序列設計 EPSPS-5' 及 EPSPS-3' 引子，利用 SMART RACE kit 擴增序列之 5' 及 3' 端片段，再經由 EPSPS-S/EPSPS-T 引子可擴增約 1350 bp 全長 cDNA 片段 (圖一)。

### 牛筋草 EPSPS 序列比較

分析抗性及感性牛筋草各 4 及 2 植株之總 RNA，經解序得抗、感牛筋草 EPSPS 各 4 及 2 條 cDNAs，長度皆為 1338 bp，序列比對詳列於圖二，感性及抗性牛筋草 EPSPS cDNA 共有 10 處鹼基之差異，分別為<sup>308</sup>C 及 M (A/C)、<sup>319</sup>C 及 G、<sup>396</sup>G 及 A、<sup>438</sup>A 及 R (A/G)、<sup>543</sup>A 及 R (A/G)、<sup>603</sup>C 及 M (A/C)、<sup>627</sup>T 及 Y (T/C)、<sup>720</sup>A 及 R (A/G)、<sup>878</sup>T 及 Y (T/C) 與<sup>1160</sup>T 及 C 鹼基。利用 DNASTART 軟體將 EPSPS DNA 序列轉換成胺基酸序列，感性及抗性牛筋草有 5 處胺基酸之差異，分別為<sup>106</sup>Proline (P) 及 Alanine (A)、<sup>129</sup>Leucine (L) 及 Arginine (R)、<sup>155</sup>Tyrosine (Y) 及 Cysteine (C)、<sup>292</sup>Methionine (M) 及 Threonine (T) 與<sup>388</sup>Isoleucine (I) 及 Threonine (T) (圖三)。抗感牛筋草 2 類別 EPSPS cDNAs 分別登錄於 NCBI GenBank，抗性牛筋草 EPSPS 接受編號為 AY395699，感性牛筋草 EPSPS 接受編號為 AY3956700。



圖一、牛筋草 mRNA 經由 RT-PCR 反應擴增之核酸片段。第 1 欄為使用 EPSPS-5/EPSPS-3 引子，第 2 欄為使用 EPSPS-S/EPSPS-T 引子。

Fig. 1. PCR products of mRNA of *Eleusine indica* amplified by RT-PCR. Lane 1, EPSPS-5/EPSPS-3 primers, lane 2, EPSPS-S/EPSPS-T primers.

```

EPSPS-S 1 GCGGGCGGGAGGAGGTGGTGCAGCCATCAAGGAGATCTCCGGGTCGTGAAGCTGCCGGGTCCAAAGTCGCTCTCCAACCGGATCCCTCCCTCTCT 100
EPSPS-R 1 ----- 100

EPSPS-S 101 CCGCCCTCGCCGAGGGAACAACCTGTGGTGGATAACCTTTTAAACAGTGAGGACGCCACTACATGCTCGGGGCCCTGAAAACCCCTCGGACTCTCTGTGGA 200
EPSPS-R 101 ----- 200

EPSPS-S 201 AGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCAGTTGAGAAGGATCGAAAAGGAGGTGCAGCTCTCTTTGGGGAAT 300
EPSPS-R 201 ----- 300

EPSPS-S 301 GCTGGAACTGCAATGCGACCATTGACAGCAGCCGTAACCTGCTGCTGGAGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAAGAAATGCGGGAGAGGCCCA 400
EPSPS-R 301 -----M-----G-----A----- 400

EPSPS-S 401 TTGGCGACTTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGCCACTGACTGCCACCTGTTCTGTGCAAGGAAATCGGAGGGCT 500
EPSPS-R 401 -----R----- 500

EPSPS-S 501 ACCTGGTGGCAAGGTTAAGTTATCTGGTTCATCAGCAGTCAATACITGAGTGCCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAA 600
EPSPS-R 501 -----R----- 600

EPSPS-S 601 ATCATTGATAAACTGATCTCCATCCCTTATGTTGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTCGCGTGAAGCAGAGCATCTGATAGCTGGGACAGAT 700
EPSPS-R 601 --M-----Y----- 700

EPSPS-S 701 TCTACATCAAGGAGGTCAAAAATACAAGTCCCTAAAAATGCCTACGTGGAAAGGTGATGCCCTCAAGTGGGAGCTATTTCTTGGCTGGTCTGCAATCAC 800
EPSPS-R 701 -----R----- 800

EPSPS-S 801 TGGAGGACTGTGACTGTTGAAGGTTGTGGCACCACCACTGCAAGGTGATGTGAAATTTGCCGAGTACTCGAGATGATGGGAGCGAAGGTTACATGG 900
EPSPS-R 801 -----Y----- 900

EPSPS-S 901 ACTGAACTAGCGTAACTGTTACCGGTCCACACGTTGAGCCATTGGGAGGAAACACCTAAAAGCTATTGATGTTAACATGAACAAAATGCCCGATGTCG 1000
EPSPS-R 901 ----- 1000

EPSPS-S1001 CCATGACTCTTGGCGTGGTGCCTTATTTGCTGATGGCCCACTGCTATCAGAGATGTGGCTTCCCTGGAGAGTAAAGGAGACCGAGAGGATGGTTGCAAT 1100
EPSPS-R1001 ----- 1100

EPSPS-S1101 CCGGACTGAGCTAACAAAGCTGGGAGCGTCCGTCGAGGAAAGACCGGACTACTGCATTATCACACCGCCCGAGAAGCTGAACGTAACGGCCATCGACACC 1200
EPSPS-R1101 -----C----- 1200

EPSPS-S 1201 TACGATGACCACAGGATGGCCATGGCTTCTCCCTCGCCGCTGCGCCGACGTGCTGTGACCATCCGGGACCCCGGCTGCACCCGCAAGACCTTCCAG 1300
EPSPS-R 1201 ----- 1300

EPSPS-S 1301 ACTACTTCGACGTGCTGAGCACTTTCGTCAAGAACTAA 1338
EPSPS-R 1301 ----- 1338
    
```

圖二、牛筋草之 EPSPS cDNA 序列。對嘉磷塞具抗性牛筋草之 EPSPS (EPSPS-R)標示於感性牛筋草(EPSPS-S)之下方。EPSPS cDNA 全長為 1338 bp，抗性牛筋草於 NCBI GenBank 之接受號碼為 AY395699，感性牛筋草於 NCBI GenBank 之接受號碼為 AY395700。鹼基代碼 K=G 或 T，M=A 或 C，Y=C 或 T。

Fig. 2. Sequence of the EPSPS cDNAs of glyphosate-resistant (EPSPS-R) and glyphosate-susceptible (EPSPS-S) *Eleusine indica*. The complete sequence of EPSPS-S is shown. Differences between EPSPS-S and -R are indicated below the EPSPS-S sequence. The open reading frame ends at nucleotide 1338. NCBI's GenBank accession numbers for the (R) and (S) EPSPS sequences are AY395699 and AY395700, respectively. The single letter code K = G or T, M = A or C, and Y = C or T.

multiplex RT-PCR 之抗藥性檢測  
經由專一性引子設計(圖四 A)之 multiplex

RT-PCR 反應，檢測高雄地區 14 個牛筋草  
樣品結果，其中有 10 個植株樣品可擴增約

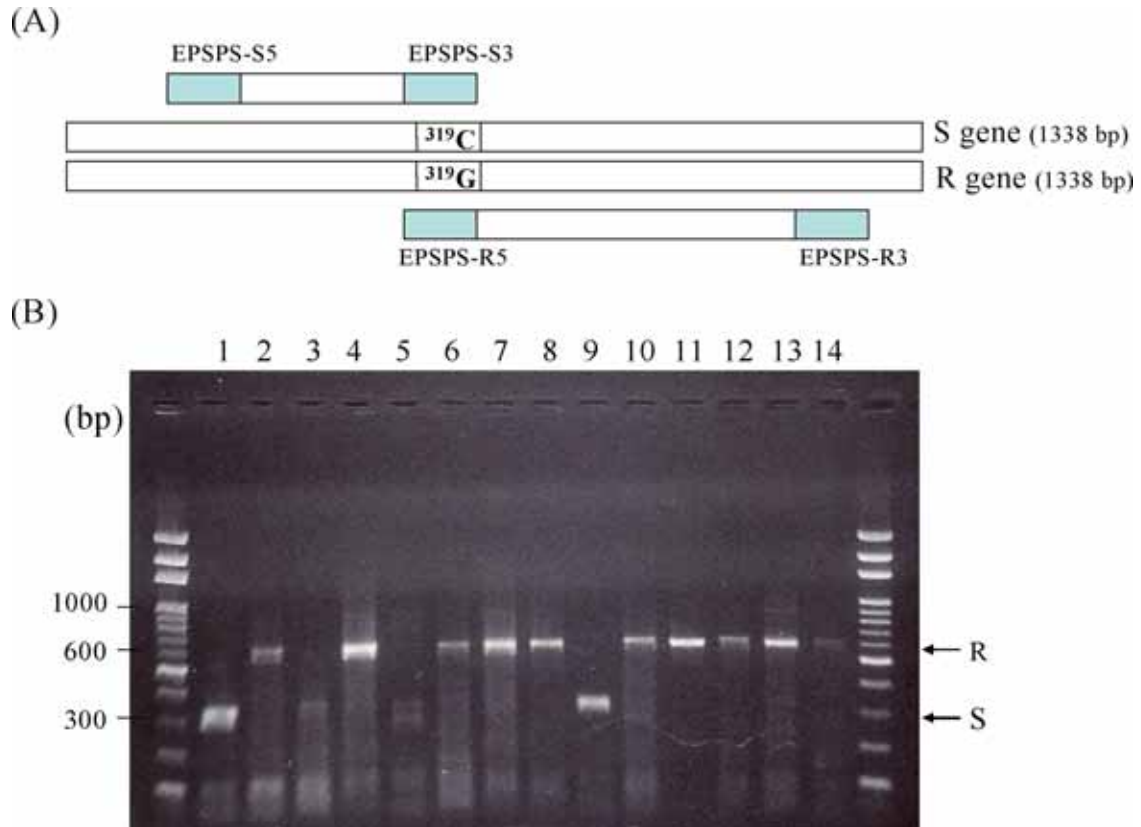
600 bp 之 DNA 條帶，顯示為含有<sup>319</sup>guanine 的抗性牛筋草；4 個植株樣品可擴增約 300

bp 之 DNA 條帶，顯示為含有<sup>319</sup>cytosine 的感性牛筋草（圖四 B）。



圖三、EPSPS 胺基酸序列之比較。台灣牛筋草(TW)、馬來西亞牛筋草(MA)、大腸桿菌、*Salmonella. Typhimuriuio*1EPSPS 及抗嘉磷塞轉基因大豆之 CP4 EPSPS 之比較。(\*) 標示處為牛筋草抗性(-R)及敏感(-S)植株 EPSPS 主要差異之胺基酸位置，台灣(TW) 及馬來西亞(MA)抗性牛筋草分別為<sup>109</sup>alanine(A)及 serine(S)。(▼) 標示處為大腸桿菌 EPSPS 與嘉磷塞結合位置(Schonbrunn *et al.*, 2001)。

Fig. 3. Sequence comparison of EPSPS from plants and microorganisms. EPSPS sequences of *Eleusine indica* from Taiwan were elucidated in this study. Sequences of EPSPS from other species are from NCBI's GenBank. The major difference among the resistant and susceptible types of *E. indica* occurred at position 109 as indicated by an asterisk (\*). The glyphosate-resistant types in Taiwan (TW) and Malaysia (MA) were associated with alanine (A) and serine (S), respectively. The inverted triangles (▼) indicate residues suggested for glyphosate binding to EPSPS in *E. coli* (Schonbrunn *et al.*, 2001).



圖四、利用 EPSPS-R5/EPSPS-R3 及 EPSPS-S5/EPSPS-S3 兩組專一性引子之 Multiplex RT-PCR，檢測 14 個牛筋草族群。(A)引子之設計，引子序列詳見表一。(B)multiplex RT-PCR 之結果，第 2、4、6、7、8、10、12 及 13 欄為抗性牛筋草，第 1、3、5 及 9 欄為感性牛筋草。

Fig. 4. Multiplex RT-PCR analysis on glyphosate responses of 14 field populations of *Eleusine indica*. (A). Primers used for multiplex RT-PCR. Primer sequences are listed in Table 1. (B) Resistant and susceptible populations were associated with characteristic fragments around 600 bp and 300 bp, respectively.

## 討 論

本研究牛筋草 EPSPS 基因選殖過程中，為確證序列之無誤，使用具有 proof reading 之 DNA polymerase 進行 RT-PCR 反應，每一植株樣品選殖 5 個 *E. coli* clones，經解序之 cDNA 序列皆相同，牛筋草之單一 EPSPS 基因現象（圖二），與馬來西亞牛筋草相同<sup>(7)</sup>，豌豆及綠豆亦只有單一

EPSPS 基因<sup>(19, 21)</sup>，阿拉伯芥及華九頭獅子草有 2 個基因<sup>(20, 29)</sup>，菸草則有 2-6 個基因<sup>(11)</sup>。EPSPS 序列比對之結果顯示台灣高雄、南投及宜蘭地區抗性牛筋草 EPSPS cDNA 序列相似，與感性牛筋草有 10 處鹼基之差異，分別位於第 308、319、396、438、543、603、627、720、878 與 1160 等鹼基（圖二），而馬來西亞牛筋草抗感牛筋草僅於第 225、319、651 及 1145 等 4 處鹼基有

差異<sup>(7)</sup>，台灣與馬來西亞牛筋草共同發生變異處為感性牛筋草皆為<sup>319</sup>C 鹼基，而抗性牛筋草分別為<sup>319</sup>G 及 T。

牛筋草 EPSPS 基因序列經轉譯後，敏感植株<sup>106</sup> Proline 胺基酸，而台灣與馬來西亞之抗性株則分別為<sup>106</sup> Alanine 及<sup>106</sup> Serine<sup>(7)</sup> (圖三)，根據 Stalker 等人<sup>(27)</sup>於沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) *aro A* 基因之研究顯示，經由與牛筋草 106 胺基酸相對位置之點突變處理，沙門氏菌 EPSPS 酵素之 Ki 值增加約 7.5 倍，表示此位置胺基酸改變會顯著降低對嘉磷塞的親和性<sup>(22)</sup>，因此牛筋草對嘉磷塞產生抗性的可能原因為第 106 胺基酸之改變，降低 EPSPS 酵素與嘉磷塞親和性之故。至於本研究抗性牛筋草於 129、155 及 292 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<sup>(23)</sup> (圖三，倒三角標示處)，於抗感牛筋草相關位置胺基酸之間並無差異。抗嘉磷塞轉基因大豆 (RoundUp Ready soybean) 之抗性基因是由 *Agrobacterium* 菌株篩選出來，其 CP4 EPSPS 酵素的胺基酸序列與牛筋草 EPSPS 之相似度僅約 30%，其中轉基因大豆<sup>102</sup> Alanine 被證明與嘉磷塞抗性具關聯性<sup>(22)</sup>，而牛筋草及一般植物相關位置胺基酸皆為<sup>101</sup> Glycine，顯示牛筋草抗藥性之分子機制與目前市售之轉基因大豆不同。

目前造成嘉磷塞抗或耐藥性植株之機制有 3 種以上，包括藥劑於植體吸收及傳導阻礙<sup>(6, 8, 13, 17)</sup>、EPSPS 基因增幅及 EPSPS 酵素含量增加<sup>(24, 25, 26)</sup>、EPSPS 轉錄速率增加<sup>(16, 29)</sup>有關。本研究經由牛筋草 EPSPS cDNA 序列比對結果，推測牛筋草對嘉磷塞之抗性主要為單一基因變異，造成 EPSPS 與藥劑親和性降低，因此抗性牛筋草之 I<sub>50</sub> 值高於感性牛筋草。利用抗感牛筋草性 EPSPS cDNA 於第 319 鹼基為 guanine 及 cytosine 之差異，設計專一性引子，以

multiplex RT-PCR 方法，可分別檢出抗感牛筋草 600 及 300 bp 長度之 DNA 條帶，此結果與藥劑劑量反應 (資料未呈現) 相符合。Delye 等人<sup>(11)</sup>亦曾針對抗環己烯氧 (cyclohexanedione) 及芳烴氧苯氧羧酸 (aryloxyphenoxypropionate) 類除草劑之黑麥草，利用 PCR 檢測 ACCase 單一基因變異，並用於鑑定抗感性黑麥草<sup>(11)</sup>。本研究建立 multiplex RT-PCR 之分子鑑定方法，應用於牛筋草對嘉磷塞抗藥性之檢測，具備快速及準確之特性，可提供抗除草劑雜草監測及管理之用。

## 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。行政院農委會農業藥物毒物試驗所印行。台中。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。除草劑在台灣四十年回顧與展望研討會，第 25-30 頁。蔣慕琰、蔣永正編。中華民國雜草學會印行。台北。
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. DeGennaro, F. P., and Weller, S. C. 1984. Differential susceptibility of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) biotype to glyphosate. *Weed Sci.* 32: 472-476.
9. Della-Cioppa, G., and Kishore, G. M. 1988. Import of a precursor protein into chloroplast is inhibited by the herbicide glyphosate. *The EMBO J.* 7: 1299-1305.
10. Delye, C., Matejicek, A., and Gasquez, J. 2002. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* gaud) *Pest. Manag. Sci.* 58: 474-478.
11. Doldsbrough, P. B., Hatch, E. M., Huang, B., Kosinski, W. G., Dyer, W. E., Herrmann, S. C., and Weller, K. M., 1990. Gene amplification in glyphosate tolerant tobacco cells. *Plant Sci.* 72: 53-62.
12. Dyer, W. E., Wellwe, S. C., Bressan, R. A., and Herrmann, K. M. 1988. Glyphosate tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Physiol.* 88: 661-666.
13. 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.
14. Forlani, G., Nielsen, E., and Racchi, M. L. 1992. A glyphosate-resistant 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase confers tolerance to a maize cell line. *Plant Sci.* 85: 9-15.
15. 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.
16. Hollander-Czytko, H., Sommer, I., and Amrhein, N. 1992. Glyphosate tolerance of cultured *Corydalis sempervirens* cells is acquired by an increased rate of transcription of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase as well as by a reduced turnover of the enzyme. *Plant Mol. Biol.* 20: 1029-1036.
17. Klevorn, T. B., and Wyse, D. L. 1984. Effect of leaf girdling and rhizome girdling on glyphosate and photoassimilate distribution in quackgrass (*Agropyron repens*). *Weed Sci.* 32: 402-407.
18. Kishore, G. M., and Shah, D. M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
19. Koshiha, T. 1979. Organization of enzymes in the shikimate pathway in *Phaseolus mungo* seedlings. *Plant Cell*

- Physiol. 20: 667-670.
20. Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T. P., Benito, M., Town, C. D., Fuji, C. Y., Mason, T., Bowman, C. L., Barnstead, M., Feldblyum, T. V., Buell, R., Ketchum, K. A., Lee, J., Ronning, C. M., Koo, H. L., Moffat, K. S., Cronin, L. A., Shen, M., Pai, G., Aken, S. V., Umayam, L., Tallon, L. J., Gill, J. E., Adams, M. D., Carrera, A. J., Creasy, T. H., Goodman, H. M., Someville, C. R., Copenhaver, G. P., Preuss, D., Nierman, W. C., While, O., Eisen, J. A., Salzberg, L., Fraser, M., and Venter, C. 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 402: 761-768.
21. Mousdale, D. M., and Cogging, J. R., 1984. Purification and properties of 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from seedlings of *Pisum sativum* L. Planta 160: 78-83.
22. Padgett, S. R., Re, D. B., Barry, G. F., Eichholtz, D. E., Delanny, X., Fuchs, R. L., Kishore, G. M., and Fraley, R. T. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene, pp. 53-84. In: S. O. Duck [ed.], Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida. 420 pp.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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 in Taiwan: cloning of target enzyme (EPSPS) and molecular assay of field populations.** Plant Prot. Bull. 47: 251-261. (Plant Toxicology Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 413, Taiwan (ROC))

We investigated the molecular characteristics of goosegrass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) resistant to glyphosate in Taiwan with emphasis on target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). EPSPS cDNA was generated by RT-PCR with specific primers designed based on sequence data from GenBank. EPSPS cDNA was 1338 bp for both resistant and susceptible goosegrass. Sequence data revealed a total 10 bp difference between the resistant and susceptible type. Resistant goosegrass was associated with guanine (G) at position 319, as compared with cytosine (C) for that of susceptible type. Sequence transcribed data showed that amino acids for resistant and susceptible type were <sup>106</sup>alanine and <sup>106</sup>proline, respectively. The amino acid at position 106 is the major difference between glyphosate resistant goosegrass from Taiwan (alanine) and Malaysia (serine). We designed two sets of primers with reference to <sup>319</sup>base specific to that of resistant and susceptible goosegrass. These primers were used in multiplex RT-PCR for molecular assay of goosegrass collected from south Taiwan. Ten of the 14 populations showed characteristic fragment around 600 bp of resistant goosegrass, and were clearly distinguishable with that of 4 susceptible types.

(Key words: glyphosate-resistance, *Eleusine indica*, EPSP synthase gene, multiplex RT-PCR)

\*Corresponding author. E-mail: [ycai@tactri.gov.tw](mailto:ycai@tactri.gov.tw)

