

抗嘉磷塞雜草 - 繖花龍吐珠 (*Hedyotis corymbosa*) 5- 烯醇丙酮酸莽草酸 -3- 磷酸合酶之點突變及分子快速鑑定

林李昌¹ 張家彥² 袁秋英^{1*}

摘要

林李昌、張家彥、袁秋英。2016。抗嘉磷塞雜草 - 繖花龍吐珠 (*Hedyotis corymbosa*) 5- 烯醇丙酮酸莽草酸 -3- 磷酸合酶之點突變及分子快速鑑定。臺灣農藥科學 1: 70-90。

農地雜草對化學除草劑的抗藥性問題日漸嚴重，目前全球抗除草劑之雜草已有 249 種，造成藥劑使用量的增加及農地生態多樣性的失衡等問題。本研究針對抗嘉磷塞 (glyphosate) 的繖花龍吐珠 (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam.)，測試其對嘉磷塞的劑量反應、莽草酸 (shikimic acid) 含量及關鍵酵素 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 活性，探討其點突變 (point mutation) 的抗藥特性。以 12 ~ 15 葉齡的繖花龍吐珠植株，經噴施 0.10 ~ 26.24 kg a.e./ha 不同濃度之嘉磷塞，施藥後 14 日，以乾重為基礎，經由 log-logistic 程式估算繖花龍吐珠感性生物型 (S biotype) 及抗性生物型 (R biotype) 之 ED₅₀ (50% 傷害程度) 分別為 0.46 及 4.58 kg a.e./ha，抗性增加約 10 倍。感性繖花龍吐珠於施藥後莽草酸含量亦逐漸增加，施藥後 10 日，莽草酸約為抗性生物型的 36.5 倍。利用 RT-PCR 增幅及比對抗及感性生物型 EPSPS cDNA 長度皆為 1,551 bp，僅有 11 個鹼基之差異，其中於抗及感性生物型第 532 鹼基分別為胸腺嘧啶 (thymidine) 及胞嘧啶 (cytosine)，經序列轉譯後第 178 個胺基酸分別為絲氨酸 (serine) 及脯氨酸 (proline)，此處之改變可能為抗性生物型 EPSPS 對嘉磷塞親和性降低之主要原因。再將抗性及感性生物型之 EPSPS cDNA，經轉殖於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 大量複製，純化的 EPSPS，經 1 mM 嘉磷塞藥劑反應，顯示抗性生物型 EPSPS 活性為感性生物型的 3 倍。於抗及感性生物型 EPSPS cDNA 第 532 鹼基差異處，分別設計兩組專一性引子，利用單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 及聚合酶鏈鎖反應—限制性片段長度多型性 (PCR-RFLP) 技術，進行 11 個繖花龍吐珠抗及感性生物型之分子鑑定，於其中 4 個抗性植株可檢出約 350 bp 之 DNA 條帶，7 個感性植株可利用

接受日期：2016 年 9 月 13 日

* 通訊作者。Email: yci@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

² 臺中市 朝陽科技大學生化科技研究所

HaeIII 酵素檢出。此分子檢測方法針對現階段臺灣農地的繖花龍吐珠因目標酵素之變異，建立快速檢驗抗嘉磷塞的生物型，可應用於抗性生物型的分布與擴散之監測，亦做為調整用藥種類與管理方法之依據。

關鍵詞：嘉磷塞、抗藥性、繖花龍吐珠、5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶活性、點突變、分子鑑定。

緒言

嘉磷塞 (glyphosate, *N*-phosphomethyl glycine) 為一種非選擇性萌後型除草劑，一般田間用量為 1.6 ~ 2.5 kg/ha，可有效防除 1 年生及大部分多年生雜草，在臺灣登記於 13 種主要作物、休閒地及非耕地使用，為旱田使用最普遍的萌後除草劑^(6, 7, 8)。嘉磷塞主要作用位置為莽草酸路徑 (shikimic acid pathway) 中的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) 酵素，因嘉磷塞與 EPSPS 的受質磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 結構極相似，產生競爭性抑制，並且阻止 EPSPS 前趨蛋白 (preprotein) 運移至葉綠體^(10, 15)，造成代謝路徑下游的苯丙氨酸 (phenylalanine)、酪氨酸 (tyrosine) 及色氨酸 (tryptophan) 3 個芳香族胺基酸含量大幅降低，影響蛋白質的生合成，進而抑制植物生長^(10, 23)，另也可能因為代謝途徑回饋抑制受到影響，大量的碳源流向莽草酸路徑，使得其他需要碳源的生理反應受到影響，導致植株代謝失衡而死亡^(20, 21, 24)。

自 1932 年有機合成除草劑二硝酚出現，由於噴施除草劑具有省時、省力和高效的特性，化學藥劑除草已成為現今農作物栽培防除雜草的最主要方式。然而單一種藥劑持續施用於農田，易對農業生態系造成衝擊，如降低生物多樣性、草相種類或密度改變，甚至可能演化產生抗藥性雜草^(8, 14, 38)。全球自 1950 年起即開始有抗藥性雜草的報導，生長於夏威夷甘蔗田的竹仔菜 (*Commelina diffusa* Burm. f.) 出現抗二，四-地 (2,4-D) 的植株⁽¹³⁾。根據「除草劑抗藥性作用委員會」(The Herbicide Resistance Action Committee, HRAC) 網站登錄資料顯示，全球抗除草劑之雜草，至 2016 年 3 月在 66 個國家或地區已經有 249 種雜草 467 個抗性案例，分別對 22 種以上除草劑類別具抗性⁽¹⁸⁾。美國孟山都公司研發的嘉磷塞於 1974 年上市銷售以來，使用時間已超過 20 年，一直沒有關於嘉磷塞抗性雜草的報導。然而自 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瑞士黑麥草 (*Lolium rigidum*)、義大利黑麥草 (*L. multiflorum*)、加拿大蓬 (*Conyza Canadensis* L.)、

美洲假蓬 (*C. bonariensis*)、車前草 (*Plantago lanceolata*) 及牛筋草 (*Eleusine indica* L.) 等抗性生物型 (biotype)，至今全球抗嘉磷塞雜草共有 35 種，分布於 16 個國家以上，危害的面積已超過 10 萬公頃，以禾本科植物為主有 19 種，其次為菊科及莧科植物分別為 9 及 5 種，依據各國於除草劑抗藥性雜草國際調查 (International Survey of Herbicide Resistant Weeds) 將抗嘉磷塞基改 (glyphosate-resistant, GR) 作物面積與抗性草數量作圖，結果顯示隨著 GR 作物栽種面積上升，抗性草數量亦明顯大量增加^(13,18)。

臺灣中部地區果園之華九頭獅子草 (*Dicliptera chinensis* (L.) Juss) 已證明具有自然耐嘉磷塞藥劑之特性^(2,39)、牛筋草、美洲假蓬也在全臺出現抗嘉磷塞植株^(1,3,4,5)。近年來於臺中市、南投縣以及高雄縣的果園與農地田埂，陸續出現噴施嘉磷塞一般田間施用劑量，無法有效防除繖花龍吐珠 (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam.)，致使繖花龍吐珠成為園區內的覆蓋度增加的雜草。繖花龍吐珠為茜草科 1 年生雜草，分布於熱帶及亞熱帶地區，普遍生長於臺灣低海拔之溝邊、路旁、休耕田及果園，繖花龍吐珠全年可萌芽生長，開花結果期主要於暖季，嘉磷塞無法有效防治的生物型持續增加及擴散中。現今全球尚未出現繖花龍吐珠抗除草劑的相關報導，本研究測試繖花龍吐珠對嘉磷塞的耐受性、EPSPS 酵素及莽草酸含量等生理反應，同時選殖 EPSPS 基因，探討因點突變的抗藥特性，建立檢測方法，做為後續調整用藥種類之依據。

材料與方法

一、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-isopropyl ammonium, 41% S，億豐公司)、嘉磷塞 (*N*-phosphonomethyl glycine, Sigma)、TRIzol (Thermo)、異丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Sigma)、甘氨酸 (glycine, Sigma)、過碘酸 (periodic acid, Sigma)、乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, Sigma)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, Sigma)、pGEM T-easy vector 載體 (Promega)、pET-28 vector 載體 (Amersham Pharmacia)、連接酶 (ligase, Promega)、*Bam*HI 限制酶 (MBI)、*Eco*RI 限制酶 (MBI)、gel extraction kit (GeneMark)、反轉錄聚合酶鏈反應試劑組 (one-step RT-PCR kit, Invetrogen)、SMART RACE kit (Clontech)、聚合酶反應器 (PCR thermal cycler, GeneAmp 2400, Perkin-Elmer)。

二、測試繖花龍吐珠對嘉磷塞之耐受性

自臺中市及高雄縣 5 處田區及果園，採集繖花龍吐珠種子，分別於溫室播種及培育，植株約 12~15 葉齡，噴施次致死量 (0.82 kg a.e./ha) 之嘉磷塞，施用藥劑為嘉磷塞異丙胺鹽 (41% 溶液)，進行初步篩選，選出代表性之感、抗繖花龍吐珠，感性植株噴施 0、0.10、0.20、0.41、0.82、1.64 及 3.28 kg a.e./

ha 嘉磷塞，抗性植株噴施 0、0.82、1.64、3.28、6.56、13.12 及 26.24 kg a.e./ha，各處理 6 重覆。施藥方式以二氧化碳加壓噴藥器穩壓 (30 psi) 噴施嘉磷塞，噴嘴為 Teejet 8002 型號，移動速率為 0.5 m/sec。施藥後 14 日稱取繖花龍吐珠地上部乾重，以 log-logistic 公式⁽³²⁾ 估算抗 (R) 及感性 (S) 繖花龍吐珠 50% 抑制率之嘉磷塞劑量 (ED₅₀) 值。

三、測定嘉磷塞噴施繖花龍吐珠後之莽草酸 (Shikimic Acid) 含量變化

根據劑量反應分析之結果，選用對嘉磷塞抗性最強及最敏感生物型，分別採收單株種子，於溫室經播種育苗，植株約 12 ~ 15 葉齡，噴施 0.82 kg a.e./ha 嘉磷塞次致死劑量，施藥後第 0、2、4、6、8 及 10 日採集幼葉，進行莽草酸含量測定。參考 Singh et al. (1998) 之方法⁽³⁵⁾，取 3 g 幼葉以液態氮磨碎，添加 15 mL 0.25 N HCl (1:3, w/v) 反應 30

分鐘，以 15,000 g 離心 15 分鐘，取上層液再以 15,000 g 離心 5 分鐘，之後取上層液 50 μ L 添加 0.5 mL 1% 過碘酸 (periodic acid)，於室溫下靜置 3 h，添加 0.5 mL 1N NaOH、0.3 mL 0.1 M glycine，於波長 380 nm 測定吸光量，並估算莽草酸含量 (μ mol/g)。

四、抗及感性繖花龍吐珠 EPSPS 之基因選殖

於前述方法 2 的藥劑劑量反應結果，選取對嘉磷塞具有明顯差異的抗及感性生物型單一植株，各稱取 0.5 g 新生幼葉，利用 TRIzol 商品萃取總 RNA，貯存於 -70°C 備用。依據 NCBI GenBank 中 EPSPS cDNA 序列，設計 EPSPS-F1 及 EPSPS-R1 引子組 (表一)，利用反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 其中 PCR 之煉合溫度為 55°C 1 min，預估增幅約 1,100 bp 的 EPSPS DNA 片段。利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出，轉殖於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌

表一、本研究於繖花龍吐珠 EPSPS 基因選殖及檢測使用之引子

Table 1. Primers used in the cloning and detection of *Hedyotis corymbosa* EPSPS

	Primers	DNA sequence (5' → 3')	Amplified DNA (bp)
(1)	EPSPS-F1	AACAGTGATGATGTTTCATTACATGCTTG	1,156
	EPSPS-R1	GCAAGAGAGAAAGCCATGGCCATCCTG	
(2)	EPSPS-F2	ATGGCACAAGCTATTCAAGCCCTTC	1,551
	EPSPS-R2	ATGCTTTGAGACCCTTTTAAGGACA	
(3)	R-EPSPS-5	ATTGTTGCTTGGAGCATGAAGC	350
	R-EPSPS-3	TCACAACCAAGCTGCTTAAGCCC	
(4)	EPSPS-D1	CATTACATGCTTGGTGCCTTGAG	495
	EPSPS-D2	TCACAACCAAGCTGCTTAAGCCA	

株，抽取 plasmid DNA，證實 plasmid DNA 長度為 1,100 bp，即進行解序及序列比對，確證此 1,100 bp PCR 產物為 EPSPS 基因，再於已知序列中設計 GSP-1：ACGGC-CAGAGTCATGGCAACATCTGGCA 及 GSP-2：TGGCGTTCCTAGAATGCGTGAGC-GACCCA 引子組，進行 Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 全長 cDNA 增幅，煉合溫度為 68°C 30 s，依據 Clontech 公司推薦之操作流程，再經由 EPSPS-F2 及 EPSPS-R2 (表一) 兩端引子，以煉合溫度為 68°C 30 s，針對增幅全長 EPSPS cDNA 及定序。

五、測定嘉磷塞噴施繖花龍吐珠後之 EPSPS 酵素活性

利用 RT-PCR 增幅繖花龍吐珠抗性及感性生物型之 EPSPS cDNA，經轉殖於大腸桿菌 (*E. coli*) 大量複製，純化的 EPSPS 進行酵素活性測試，EPSPS 酵素活性分析是利用孔雀石綠法 (malachite green dye method)，經由 EPSPS 酵素與 phosphoenol pyruvate (PEP) 及 shikimic-3-phosphate (S3P) 受質結合之後，合成 EPSP 及釋出磷酸根，由磷酸根的釋出含量估算酵素的活性⁽²⁵⁾。將純化的 EPSPS 蛋白分別加入 0、0.001、0.01、0.1、1 及 10 mM 嘉磷塞，再加入反應液 (含終濃度分別為 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、1 mM S3P、1 mM PEP，pH 調整為 7.0)，使最終反應體積為 50 μ L。置於 28°C 下反應 5 min，加入 800 μ L 孔雀綠—鉬酸鉍呈色

溶液 (malachite green-ammonium molybdate colorimetric solution)，再於 1 min 後加入 800 μ L 34% 檸檬酸鈉 (sodium citrate) 停止呈色反應，室溫下放置 30 min 後，測定於波長 660 nm 的吸光度。空白對照組為不添加 S3P 的反應。

六、利用單核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 及聚合酶鎖反應—限制性片段長度多型性分析 (PCR-RFLP) 分子標誌技術，檢測抗性繖花龍吐珠

(一) SNP 方法：參考 Delye et al. (2002) 之方法，比對抗性牛筋草及瑞士黑麥草 EPSPS 的胺基酸序列，於第 178 位置的脯氨酸 (proline) 變異為絲氨酸 (serine) 的核酸序列，即利用抗及感性繖花龍吐珠 EPSPS 基因於第 532 鹼基胸腺嘧啶 (thymine) 及胞嘧啶 (cytosine) 之差異，設計 R-EPSPS-5 及 R-EPSPS-3 引子組 (表一)，進行單核苷酸多型性技術的核測，煉合溫度為 70°C 10 s，循環 30 週期，預估可於抗性檢體增幅出 350 bp EPSPS 片段。

(二) PCR-RFLP 分子標誌技術：利用抗及感性繖花龍吐珠 EPSPS 基因序列具有 *Hae*III 限制酶之差異，取約 20 μ g 繖花龍吐珠的基因組 DNA，以 EPSPS-D1/EPSPSP-D2 引子分別增幅 495 bp 的部分 EPSPS，取 2 μ L PCR 產物，添加 1 μ L *Hae*III 限制酶及 2 μ L buffer 及 15 μ L 無菌去離子水，總體積為

20 μL ，置於 37°C 水浴反應 1.5 h，再於 2.0% agarose 中進行電泳分析。

利用建立的單核苷酸多型性檢測技術，鑑定採自臺南市關廟區 (TA1)；高雄市田寮區 (KH1)、鳳山市 (KH2)、美濃區 (KH3)、左鎮區 (KH4)、燕巢區 (KH5)、旗山區 (KH6)；屏東縣里港鄉 (PT1)、內埔鄉 (PT2)、春日鄉 (PT3)、滿州鄉 (PT4) 等 11 地區農地的繖花龍吐珠，各樣品為隨機採集的 12 ~ 16 葉齡繖花龍吐珠，植株皆具有含土根系，並栽種於盆鉢，置於溫室培育備用。

結果

一、繖花龍吐珠對嘉磷塞之耐受性

臺中市及高雄縣果園採集對嘉磷塞不同耐受性的繖花龍吐珠種子，培育至 12 ~ 15 葉齡，分別噴施 0.10 ~ 26.24 kg a.e./ha 嘉磷塞劑量，施藥後第 3 日開始，對藥劑敏感的植株在劑量 0.20 kg a.e./ha 處理下，頂芽組織開始出現不同程度黃化、捲曲等傷害徵狀；噴施 0.82 kg a.e./ha 劑量的植株於第 5 日出現較明顯的傷害；施用 0.82 kg a.e./ha 劑量處理後第 14 日，感性植株於即全株死亡。抗性植株部分則生長被抑制、節間變短、葉片變小。抗性植株在劑量 13.12 kg a.e./ha 處理下，才出現較明顯的傷害，嘉磷塞劑量高達 26.24 kg a.e./ha 才會造成全株死亡。以 log-logistic 公式估算以乾重為基礎之 ED_{50} 值，感及抗性繖花龍吐珠 ED_{50} 值分別為 0.46 及

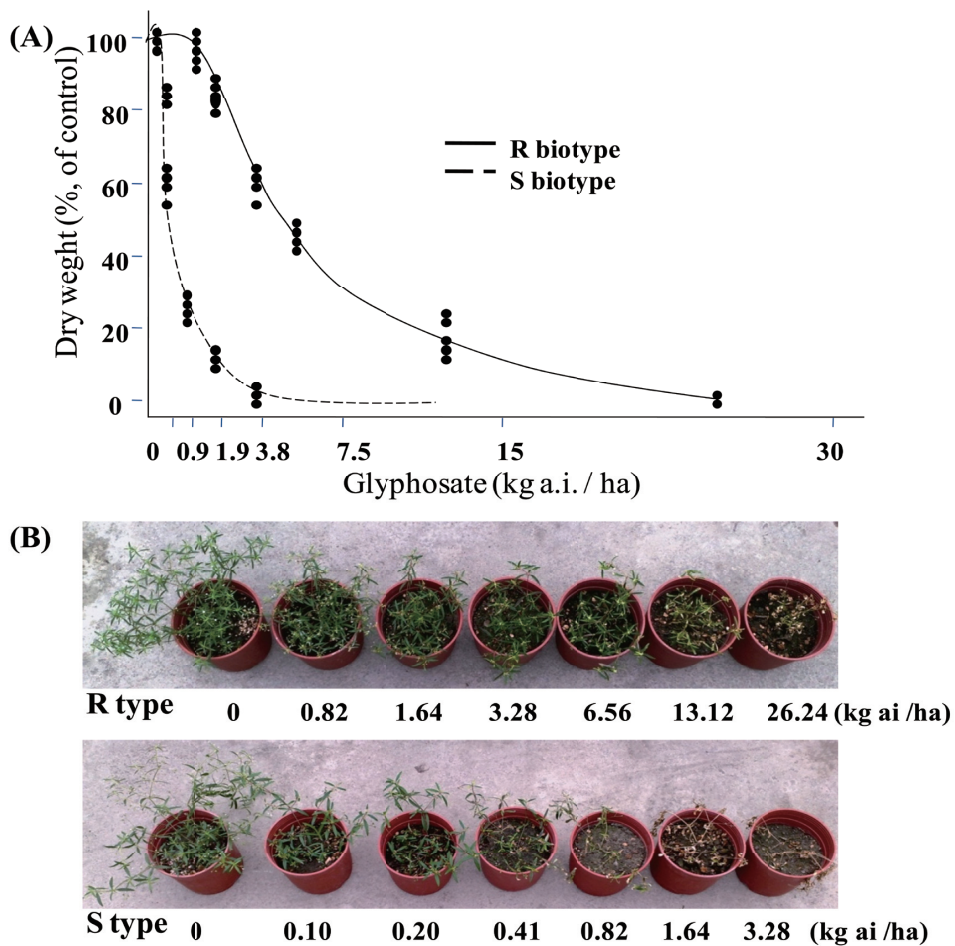
4.58 kg a.e./ha，顯示抗性植株對嘉磷塞的耐受性約為感性植株的 10 倍 (圖一)。

二、嘉磷塞噴施繖花龍吐珠後之莽草酸含量變化

抗及感性繖花龍吐珠噴施次致死劑量 0.82 kg a.e./ha 嘉磷塞，進行幼葉莽草酸含量分析。於藥劑處理後 10 日內採取頂梢第 1 ~ 3 葉片，測定莽草酸含量。結果顯示抗性植株於施藥後第 2 日莽草酸含量增加，達 1.33 $\mu\text{mol/g}$ ，為未施藥抗性植株的 3.3 倍 (圖二)，隨後於第 4 日含量開始下降，至第 10 日莽草酸含量為 0.38 $\mu\text{mol/g}$ ，僅略高於未施藥抗性植株含量。而感性植株於施藥後第 2 日莽草酸含量大幅增加至 2.3 $\mu\text{mol/g}$ ，為未施藥感性植株的 75 倍，隨後第 8 日增為 115 倍，含量未出現明顯的下降，施藥後第 10 日感性繖花龍吐珠莽草酸含量為抗性植株的 36.5 倍 (圖二)。

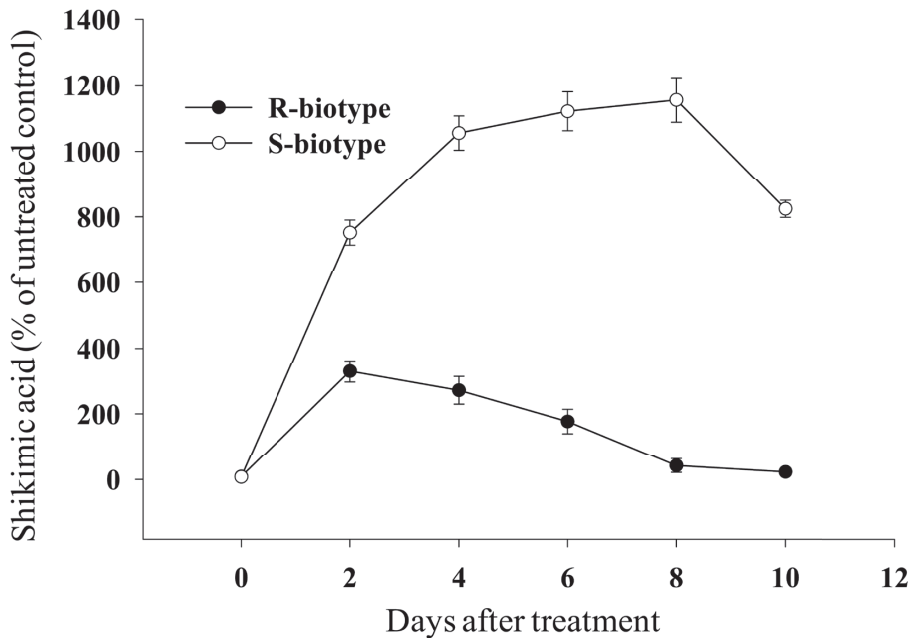
三、抗及感性繖花龍吐珠 EPSPS 基因序列之差異性

萃取抗及感性繖花龍吐珠幼葉總 RNA，以 EPSPS-F1 及 EPSPS-R1 為引子 (表一)，利用 RT-PCR 技術進行 EPSPS 基因選殖，結果皆可增幅出 1,156 bp 的核酸片段 (圖三 A)，將此核酸片段經解序後與 NCBI GeneBank 中之高等植物 EPSPS 核酸序列比對，確證此 1,156 bp 核酸片段為繖花龍吐珠 EPSPS 基因的部分 cDNA。再於此序列中設計專一性 GSP1 及 GSP2 引子，利用



圖一、抗及感性繖花龍吐珠對嘉磷塞之劑量反應。繖花龍吐珠採集於臺中市，於溫室栽種至 12 ~ 15 葉齡噴施嘉磷塞藥劑，(A) 施藥後 14 日採收植株，以乾重為指標利用 log-logistic 公式估算 ED₅₀ 值，抗及感性繖花龍吐珠分別為 0.41 及 5.04 kg a.e./ha。(B) 抗及感性繖花龍吐珠施藥後 14 日之傷害徵狀。

Fig. 1. Dose response of *Hedyotis corymbosa* seedlings against glyphosate. *H. corymbosa* from Taichung was raised in a greenhouse and foliar treated with glyphosate at the 12 ~ 15 leaf stage. (A) Dry matter weight was determined at 14 days after treatment, and the log-logistic equation was used for curve fitting. The estimated ED₅₀ values for glyphosate-susceptible (S) and glyphosate-resistant (R) were 0.46 and 4.58 kg a.e./ha, respectively. (B) *H. corymbosa* seedlings 14 days after treatment.



圖二、抗性及感性繖花龍吐珠於 0.82 kg a.e./ha 嘉磷塞處理後 10 日內莽草酸含量之變化。

Fig. 2. Accumulation of shikimic acid in glyphosate-resistant (R) and glyphosate-susceptible (S) *Hedyotis corymbosa* seedlings 10 days after treatment with 0.82 kg a.e./ha glyphosate.

RACE 技術延伸增幅 2 端核酸，結果獲得繖花龍吐珠 EPSPS 全長 cDNA，抗及感性株的 EPSPS 皆為 1,551 bp (圖三 B)。二者序列相互比較後之相似度為 99.3%，其間有 11 個鹼基之差異 (圖四)，轉譯後皆有 517 個胺基酸，抗及感性株 EPSPS 胺基酸則有 7 處差異點，分別為 P96S、L107P、P178S、R213K、V259M、V283E 及 C299S (圖五 A)。

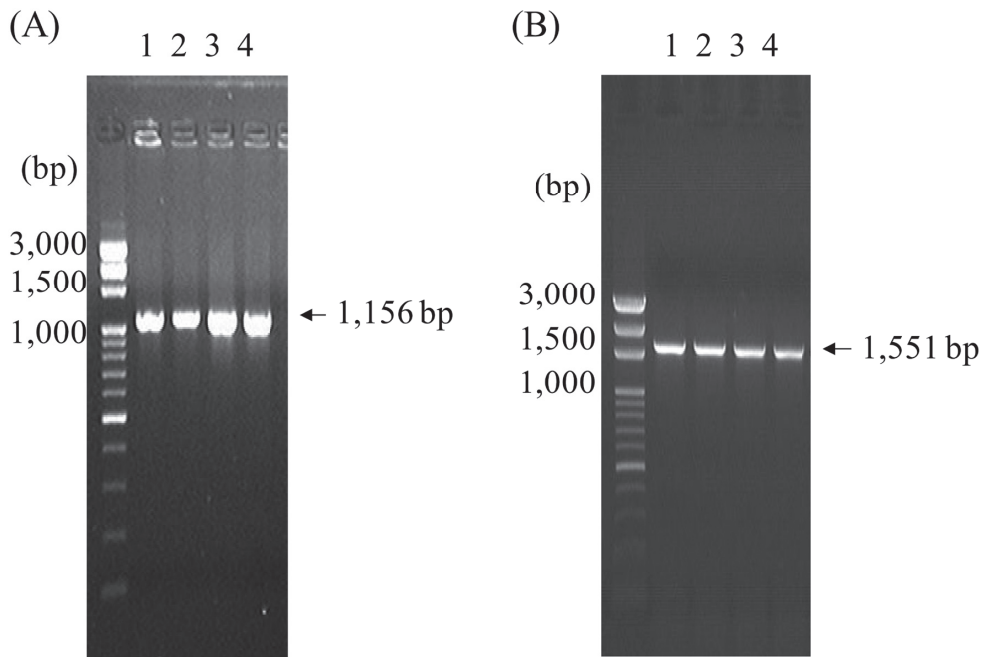
四、嘉磷塞噴施繖花龍吐珠後之 EPSPS 酵素活性

將抗及感性繖花龍吐珠純化後的 EPSPS 蛋白進行定量，分別取 5 μ g EPSPS 蛋白進

行活性測定。結果感性繖花龍吐珠的 EPSPS 酵素於未施嘉磷塞前，其活性即高於抗性株 EPSPS 活性，分別為 28 及 17 unit/mg，但 0.1 mM 及 1.0 mM 嘉磷塞即造成感性株的 EPSPS 活性下降約 30% 及 72% (圖六)；感性株的 EPSPS 活性仍可維持約 97% 及 92%，顯示抗性繖花龍吐珠 EPSPS 酵素活性於 1 mM 嘉磷塞仍高於感性株的 3 倍 (圖六)。

五、利用單核苷酸多型性技術檢測抗及感性繖花龍吐珠

於繖花龍吐珠 EPSPS 蛋白第 178 的胺



圖三、抗及感性繖花龍吐珠利用 (A) RT-PCR 及 (B) RACE 技術增幅 EPSPS 核酸。RT-PCR 利用的引子為 EPSPS-F1/EPSPS-R1，RACE 利用的引子為 EPSPS-F2/EPSPS-R2，第 1 ~ 2 欄為抗性繖花龍吐珠，第 3 ~ 4 欄為感性繖花龍吐珠。

Fig. 3. PCR products of EPSPS from leaves of *Hedyotis corymbosa* that were amplified by (A) RT-PCR using EPSPS-F1/EPSPS-R1 primers or (B) RACE using EPSPS-F2/EPSPS-R2 primers. Lanes 1 and 2 show glyphosate-resistant *H. corymbosa*, lanes 3 and 4 show glyphosate-susceptible *H. corymbosa*.

基酸，由對嘉磷塞感性植株的脯氨酸 (proline) 變異為抗性植株絲氨酸 (serine)，依其基因序列單一鹼基對差異處，即第 320 鹼基胞嘧啶 (cytosine) 及胸腺嘧啶 (thymine) 設計抗性專一性引子，經由 PCR 測定，抗性繖花龍吐珠可明顯增幅一 350 bp 的核酸條帶 (圖七 A)，感性株則無此增幅片段。針對 11 處高屏農地繖花龍吐珠，分別萃取其基因組 DNA，經專一性引子之單核苷酸多型性技術檢測，結果共有 4 株為抗性株，可

增幅 350 bp 核酸條帶，分別為高雄市燕巢區及鳳山市；屏東縣里港鄉及春日鄉的繖花龍吐珠 (圖七 B)。另利用 PCR-RFLP 鑑定結果亦為此 4 株為抗性株，無法經由 *HaeIII* 酵素切為 332 bp 及 163 bp 2 片段 (圖八)，顯示此等檢測樣品的 EPSPS 基因序列中，無可被 *HaeIII* 限制酶作用的 5'-GG/CC-3' 序列，此等差異亦為抗及感性生物型可鑑別之處。

```

S   1  ATGCCACAAGCTATTCAA GCCCTTCAATTTACAA CCCCTAACCTCTCAAAC CAAAAACCCTTTGTTCTGCTCCTCCACA
R   1  .....
S   81  TTCTTTAATTTTTGGATC AAGAGTTGTGGGAAGTTCAGAAAAATATTCATGGGTTTTGAATAAGTATTC AAATTTGACAT
R   81  .....G.....
S  161  TGAGTAGAGGCCCTTTTA AGGTTTTGGCTTCAATGACCACAGCCGAGAAACCTTCTACTTTGCCGGAGATTGTGCTGCAG
R  161  .....
S  241  CCCATTGAGGAGATCTCTGGGACAGTCAAATTGCTGGCTCGAAACCTCTTTCCAATCGTATTCTCCTGCTCGCTGCCCT
R  241  .....T.....C
S  321  CTCTGAGGGAACAACCTGTGTTGACAACCTATTGCAAGTGATGATATCCAT TACATGCTTGGTGCCTTGAGA ACTCTTG
R  321  .....
S  401  GTCTGAATGTAGAAGAGA ATAGAACAATACAGCA AGCCATTGTGGAGGCAGTGGTGGTCTGTTTCCTGTTGGTAAGGAA
R  401  .....A.....
S  481  TCTAAAGGTGAAATTCAA CTATTCCTTGAAAAATG CAGGAACAGCCATGCGGC CATTGACTGCTGCAGTTGTAGCTGCCGG
R  481  .....T.....T.....
S  561  TGGACATTCAAGCTATGTTCTTGATGGCGTTCCTAGAATGCGTGAGCGACCCATCGGTGATTTGGTCTCTGGGCTTAGCC
R  561  .....A...
S  641  AGCTTGGTTGTGATGTTG ATTGCTACCTTGGGAC AAATGCCCCCAGTTCG TGTCGTGGGAAAGGGAGGCCTTCCC GGG
R  641  .....
S  641  GGAAAGGTGAAGCTCTCTGGATCAGTCA GTAGTCA GTACCTTACTGCC TTGCTCATGGCAGCTCCCCTTGCTCGAGGAGA
R  641  .....A.....
S  721  TGTGGAGATTGAAATAGT TGATAAACTGATTTCTG TTCCTTATGTTGTGATG ACCCTGAAATTGATGGAACGCTTTGGGG
R  721  .....A.....C.....
S  801  TTTCTGTAGAACACTGCG ATAGCTGGGACAAGTTCTTGATACACGAGGTCAGAAA TACAAGTCTCCTGGTAAAGCTTAT
R  801  .....A.....
S  881  GTTGAAGGTGATGCATCA AGTGCTAGTTACTTCT TGGCTGGTGCAGCTGCA CCGGTGAACTATCACTGTTGAAGGTTG
R  881  .....
S  961  TGGAACAAGCAGTTTGCAGGGGGATGTCAAATTTGCTGAGGTTCTTGAGCAGATGGGTGCGAAAGTTTCTGGACAGAAA
R  961  .....
S 1041  ACAGTGTA ACTGTC ACTG GACCACCAAGGGAATCTTTTGGGAAGAAACACCTGCGAGCTATTGATGTCAACATGAACAAA
R 1041  .....
S 1121  ATGCCAGATGTTGCCATG ACTCTGGCCG TAGTTGCACTTTTTGCTGATGGTC CGACTGCCATTAGAGATGTGGCTAGCTG
R 1121  .....
S 1201  GAGAGTCAAGGAAACCGA GCGGATGATTGCTATA TGCACAGA ACTTAGAAAGCTAGGTGCAACG GTTGAGGAAGGGCCCG
R 1201  .....
S 1281  ACTACTGCATAATTACTC CACCAGAGAAAATTAACGTCACATCAATTGATACATACGATGATCAGAAATGGCCATGGCT
R 1281  .....
S 1361  TTCTCCCTTGCGCGTGTGCAGAAGTGCCAGTGA CATTAAAGGATCCCAGTTGTACACGTA AAAACCTTCCAGATTACTT
R 1361  .....
S 1441  CGATGTCCTTAAAAGGGTCTCAAAGCATTA
R 1441  .....

```

圖四、嘉磷塞抗或感性繖花龍吐珠的 EPSPS cDNA 序列，全長皆為 1,551 bp。抗性植株的 EPSPS (R-biotype) 標示於感性植株的 EPSPS (S-biotype) 的下方，共有 11 個鹼基的差異。
Fig. 4. Sequences of EPSPS cDNA for glyphosate-susceptible (S) and glyphosate-resistant (R) *Hedyotis corymbosa*. The complete sequence of EPSPS (S biotype) is shown, in which the open reading frame ends at nucleotide 1,551. The 11 bases which differ between S type and R type are indicated below the S type sequence. Homological regions are indicated by dots.

(A)

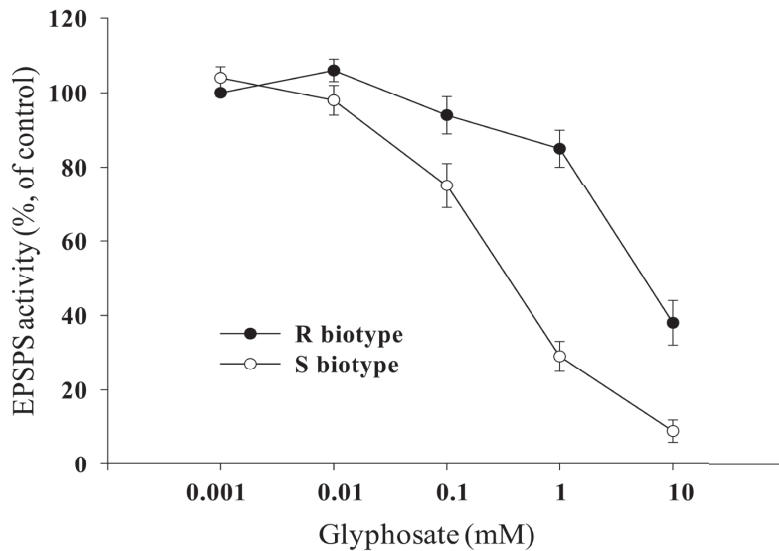
S	1	MAQAIQALQFTTPNLSKPKTLCSAPPHSLIFGSRVVGSSSEKYSWVLNKYSNLTLSRGPFK	
R	1	
S	61	VLASMTTAEKPEIQLPVEEISGTVKLPKPLSNRILLAAALSEGTTVVDNLLAS	
R	61S.....P.....	
S	121	DDIHYMLGALRTLGLNVEENRTIQQAIVEGSGGLFPVVGKESKGEIQLFLGNAGTAMRPLT	
R	121S..	
S	181	AAVVAAGGHSSVLDGVPRMRERPIGDLVSGLRQLGCDVDCYLGTCNPPVRVVGKGLPG	
R	181K.....	
S	241	GKVKLSGSVSSQYLTAALLVAAPLARGDVEIEIVDKLISVPYVVMTLKLMERFGVSVEHCD	
R	241M.....E.....S.	
S	301	SWDKFLIHGGQKYKSPGKAYVEGDASSASYFLAGAAVTGGTITVEGCGTSSLQGDVKFAE	
R	301	
S	361	VLEQMGAKVSWTENSVTVTGPPRESFGKKHLRAIDVNMNKMPDVAMTLAVVALFADGPTA	
R	361	
S	421	IRDVASWRVKETERMIAICTELRKLGATVEEGPDYCIITPPEKLNVTSDITYDDHRMAMA	
R	421	
S	481	FSLAACAEPVVTIKDPSCTRKTFFPDYFDVLKRVSKH	516
R	481	516

(B)

Species	biotype	resistance (-fold)	EPSPS (conserved region)
<i>Hedyotis corymbosa</i>	S	0	178 AGTARMPLTAAV
	R	10	S
<i>Eleusine indica</i>	S	0	106 AGTARMPLTAAV
	R	5	A
<i>Lolium rigidum</i>	S	0	P
	R1	20	T
	R2	14	S
<i>L. Multiforum</i>	S	0	P
	R1	5	S
	R2	5-10	A

圖五、抗及感性繖花龍吐珠 EPSPS 胺基酸序列之比較。(A) 抗性繖花龍吐珠之 EPSPS (R) 標示於感性繖花龍吐珠 (S) 之下方。(B) 比較抗及感性繖花龍吐珠 EPSPS 胺基酸高度保留區間的第 178 個脯氨酸變異為絲氨酸，相當於 3 種禾草於第 106 個脯氨酸變異為絲氨酸、丙氨酸或蘇氨酸。

Fig. 5. Amino acids present in the EPSPS of glyphosate-resistant (R) and glyphosate-susceptible (S) *Hedyotis corymbosa*. (A) The complete sequence of EPSPS-S is shown. Differences between the S type and R type are indicated below the S type sequence, and homological regions are indicated by dots. (B) Comparison of the Pro178Ser sequence of EPSPS in three grasses, showing conserved regions from *H. corymbosa* and Pro106Ser, Pro106Ala and/or Pro106Thr of 3 grasses.



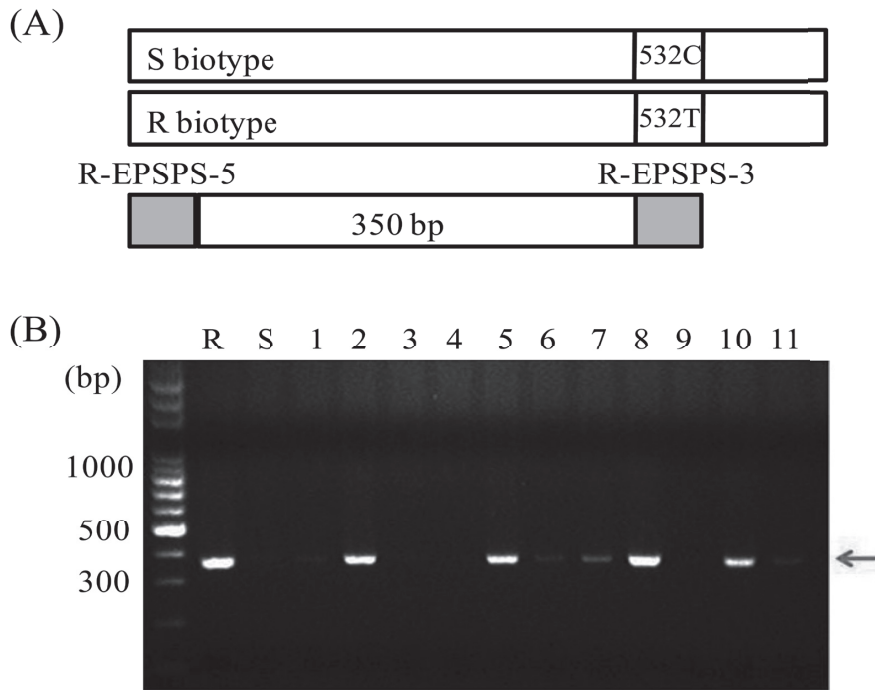
圖六、對嘉磷塞具抗性生物型 (R biotype) 及感性生物型 (S biotype) 繖花龍吐珠之 EPSPS 活性。EPSPS 之活性利用孔雀石綠法，以磷酸根的釋出量估算酵素的活性 (unit/mg)，並以不加嘉磷塞作為對照組，以百分率表示相對活性。

Fig. 6. EPSPS activity in glyphosate-resistant (R) and glyphosate-susceptible (S) *Hedyotis corymbosa* seedlings. EPSPS assays were conducted in the presence of glyphosate, and the activity of interest was the release of phosphate ions, which was determined using the Malachite green dye method by unit/mg protein.

討論

嘉磷塞自市售以來 20 年內不曾發生抗藥性雜草，部分學者推測可能因為嘉磷塞的目標酵素 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為 EPSPS 發生變異之故。本研究經由繖花龍吐珠噴施嘉磷塞之次致死劑量 (0.3 kg a.e./ha) 結果顯示繖花龍吐珠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，可明顯區別為對嘉磷塞

耐受性差異的植株。藥劑造成繖花龍吐珠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⁽²⁾及黑麥草亦有相似現象⁽³¹⁾。根據 12 ~ 15 葉齡繖花龍吐珠對嘉磷塞以乾重為基礎之劑量反應分析，感及抗性繖花龍吐珠 ED₅₀ 分別為 0.46 及 4.58 kg a.e./ha，R/S 比值為 10，與最早發生於澳洲地區的黑麥草，抗性為感性黑麥草之 9.5 倍⁽³¹⁾相似。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^(17, 38)，馬來西亞的牛筋草 ED₅₀ R/S 值為 2 ~ 4⁽³⁷⁾，各種雜草對嘉磷塞的耐受程度不同。



圖七、利用單核苷酸多型性技術鑑定 11 個臺灣南部繖花龍吐珠族群。(A) 利用 EPSPS-R5/EPSPS-R3 引子組增幅抗性植株 350 bp 之示意圖。(B) 第 2、5、8 及 10 欄為抗性繖花龍吐珠——高雄市鳳山市 (KH2)、燕巢區 (KH5)、屏東縣里港鄉 (PT1) 及春日鄉 (PT3) 樣品。

Fig. 7. Single nucleotide polymorphism identification of 11 field populations of *Hedyotis corymbosa* from southern Taiwan. (A) EPSPS-R5/EPSPS-R3 primers were used to amplify 350 bp fragments of glyphosate-resistant EPSPS. (B) Lines 2, 5, 8 and 10 were show amplified glyphosate-resistant EPSPS of *H. corymbosa* from KH2, KH5, PT1, and PT3, respectively.

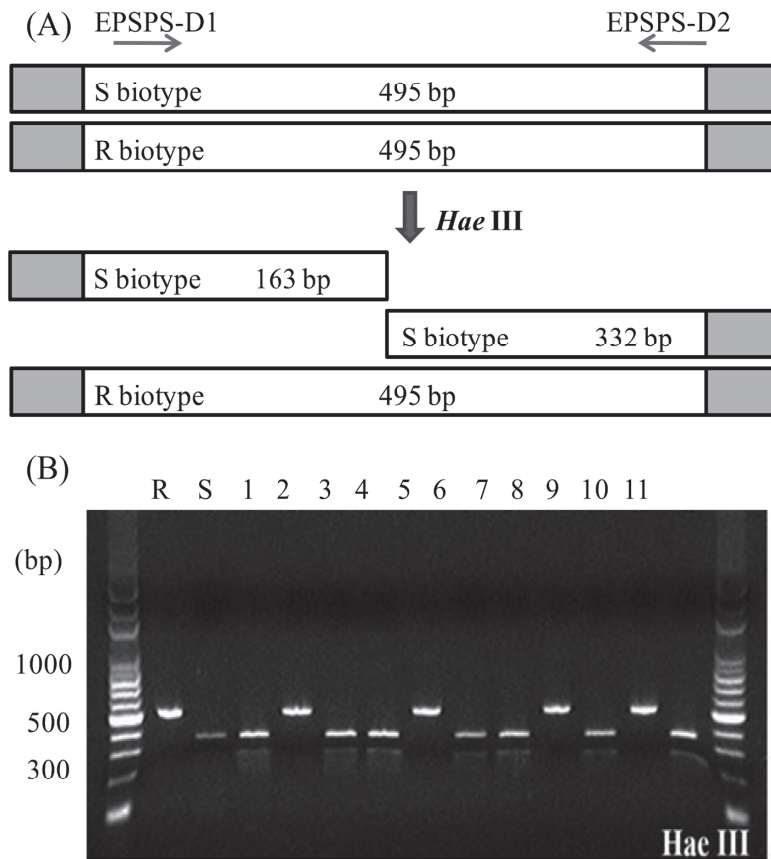
由於嘉磷塞之作用為抑制芳香族胺基酸的生成，造成莽草酸的累積⁽¹⁰⁾，因此植株快速累積莽草酸之現象，成為對嘉磷塞感性植物及嘉磷塞藥害的指標反應⁽³⁵⁾，例如馬齒莧、黃土香及黑麥草等植物大量累積莽草酸為未施藥植株的 60 ~ 180 倍，同時降低芳香族胺基酸生成，直接影響二次代謝物之合成，對嘉磷塞敏感之大豆於

施藥後 8 日累積莽草酸為 70 $\mu\text{mol/g}$ ，抗性植株則僅為 0.2 $\mu\text{mol/g}$ ⁽³⁵⁾。本研究繖花龍吐珠抗性植株幼葉莽草酸含量於施藥後 2 日略增加，而感性繖花龍吐珠之莽草酸含量於第 10 日為抗性植株的 36.5 倍 (圖二)，顯示抗性繖花龍吐珠的莽草酸路徑未受阻，可能其 EPSPS 酵素仍具活性。

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、EPSPS 基因增幅及 EPSPS 酵素含
量增加、EPSPS 轉錄速率增加有關^{(18, 19, 20,}

^{26, 27, 33, 34, 36)}。由於抗性繖花龍吐珠 EPSPS 活
性對嘉磷塞的耐受性結果，本研究再進一
步針對繖花龍吐珠 EPSPS 核酸序列進行解



圖八、利用 PCR-RFLP 技術鑑定 11 個臺灣南部繖花龍吐珠生物型。(A) 利用 EPSPS-D1/EPSPS-D2 引子組增幅抗性生物型 (R) 495 bp，經 *HaeIII* 限制酶反應，於感性生物型 (S) 可切割為 163 及 332 bp 二核酸片段。(B) 第 2、5、8 及 10 欄為抗性生物型——高雄市鳳山市 (KH2)、燕巢區 (KH5)、屏東縣里港鄉 (PT1) 及春日鄉 (PT3) 樣品。

Fig. 8. PCR-RFLP identification of 11 field populations of *Hedyotis corymbosa* from southern Taiwan. (A) EPSPS-D1/EPSPS-D2 primers were used to amplify 495 bp fragments of glyphosate-resistant (R) and glyphosate-susceptible (S) EPSPS, but only EPSPS from S biotypes showed the restriction-banding pattern that is characteristic of the amplified fragments with *HaeIII*. (B) Lines 2, 5, 8, and 10 show EPSPS from glyphosate-resistant biotypes KH2, KH5, PT1 and PT3, respectively.

序，結果於抗及感性植株皆可選殖出 1,551 bp 核酸片段，於 NCBI GeneBank 比對序列，抗及感性植株 EPSPS 只有 11 個鹼基的差異，轉譯後皆有 517 個胺基酸，抗及感性植株 EPSPS 胺基酸則有 7 處差異點，其中感性植株第 532 個鹼基胞嘧啶 (cytidine) 變異為胸腺嘧啶 (thymidine)，轉譯後為第 178 個胺基酸由脯氨酸 (proline) 改變為絲氨酸 (serine)。將繖花龍吐珠 EPSPS 與基因資料庫內其他植物比對，其一致性 (identity) 低於 85%，最相似者為野生種菸草 (*Nicotiana tabacum*, M61904)、番茄 (*Solanum lycopersicum*, m21071)、辣椒 (*Capsicum annuum cultivar Fogo*, JN160845) 等，一致性分別為 83%、81% 及 81%。

進一步與抗嘉磷塞牛筋草 (AY395699)、瑞士黑麥草 (DQ303405) 及多年生黑麥草 (DQ153168) EPSPS 胺基酸序列比對，結果顯示於 EPSPS 高度保留區間的 QLFLGNAG-TAMRPLTAAV 序列，其中脯氨酸 (proline) 在禾本科植物是位於 EPSPS 的第 106 個胺基酸^(22, 30, 31)，而雙子葉植物 EPSPS 序列長度不同，如野生種菸草、番茄、辣椒及繖花龍吐珠的脯氨酸則分別位於第 180、182、177 及 178 個胺基酸，抗嘉磷塞繖花龍吐珠的第 178 個脯氨酸變異為絲氨酸 (圖五 B)，此處的改變應為造成繖花龍吐珠的抗嘉磷塞的主要原因。近年報導相同為第 106 個胺基酸一脯氨酸變異為絲氨酸的雜草，包括美國密西西比州的莧科植物塊莖莧 (*Amaranthus tuberculatus*) 有 5 倍抗藥性⁽²⁷⁾；加州北部的芒稷 (*Echinochloa colona*) 抗性為感性生物型

的 6.6 倍⁽⁹⁾；澳洲南部瑞士黑麥草 (*Lolium rigidum*) 抗性為感性生物型的 6 ~ 11 倍⁽¹²⁾。

經分析繖花龍吐珠純化的 EPSPS 酵素活性，感性生物型 EPSPS 酵素於未處理嘉磷塞前，其活性即為抗性生物型 EPSPS 的 1.65 倍，然而隨嘉磷塞濃度增加至 0.1 mM 時，感性植株 EPSPS 活性明顯下降 30%，至嘉磷塞濃度增為 1 mM 時，抗性植株 EPSPS 酵素活性高於感性株的 3 倍。可能因抗嘉磷塞繖花龍吐珠的第 178 個脯氨酸變異為絲氨酸，此處的改變相當於抗嘉磷塞牛筋草第 106 個脯氨酸的改變，影響 EPSPS 與受質 PEP 的鍵結，以及降低嘉磷塞與 EPSPS 鍵結的親和力^(22, 28)，因此未施用嘉磷塞前，抗性植物 EPSPS 活性反而低於感性植株。自然發生抗嘉磷塞生物型中，抗嘉磷塞黑麥草之 EPSPS 活性亦較感性植株高 2 ~ 3 倍⁽¹¹⁾。經由人為增加嘉磷塞藥量，篩選的菸草抗性細胞，由於可誘導 EPSPS 基因的大量擴增，因此 EPSPS 活性較高，分別增加 20 倍⁽³⁴⁾。

由於雜草抗藥性的機制是其目標酵素的變異，即可依此核酸的差異處，運用分生技術進行抗性族群的快速檢驗。例如抗環己烯氧 (cyclohexanedione) 及芳烴氧苯氧羧酸 (aryloxyphenoxypropionate) 類除草劑之黑麥草，利用 PCR 檢測 ACCase 基因的點變異，並用於鑑定抗感性黑麥草⁽¹⁶⁾。馬來西亞的抗嘉磷塞牛筋草其 EPSPS 變異點具有 SphI 限制酶作用的差異，即可應用 PCR-RFLP 技術快速檢測及鑑別抗性牛筋草⁽²⁹⁾。本研究亦利用抗及感性繖花龍吐珠 EPSPS

於第 532 鹼基胞嘧啶 (cytosine) 及胸腺嘧啶 (thymine) 的差異，經由 PCR 增幅抗性繖花龍吐珠 350 bp 的核酸條帶；另亦可利用 PCR-RFLP 分子標誌，以 *Hae*III 酵素切位差異處區別抗及感性植株，測試結果高雄市鳳山市 (KH2)、燕巢區 (KH5) 及屏東縣里港鄉 (PT1) 及春日鄉 (PT3)，共 4 地區皆已出現抗性繖花龍吐珠，後續亦針對採集的植株噴施 2.5 kg/ha 嘉磷塞，植株的 14 日藥效反應與檢測結果完全相同 (資料未呈現)。本研究建立之分子鑑定方法，約於 4 小時之內即可完成單一樣品的檢測。此分子檢測方法針對現階段臺灣農地的繖花龍吐珠因目標酵素之變異，建立快速檢驗抗嘉磷塞的生物型，可應用於抗性生物型的分布與擴散之監測，亦做為調整用藥種類與管理方法之依據。

謝辭

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之 99 農科 -9.2.3- 藥 -P3 計畫經費支持，以及朝陽科技大學生化科技所張家彥同學協助部分相關研究，特致謝忱。

引用文獻

1. 林李昌、葉茂生、蔣慕琰、袁秋英。2008。美洲假蓬 (*Conyza bonariensis*) 對嘉磷塞之抗藥性與 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 基因研究。生物、環境與生物資訊 5: 268-280。
2. 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。
3. 袁秋英、謝玉貞、林李昌、蔣慕琰。2006。野苘蒿 (*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。
4. 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。
5. 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。
6. 費雯綺、王喻其、陳富翔、林曉民、李貽華。2012。植物保護手冊。行政院農委會農業藥物毒物試驗所。臺中。1079 頁。
7. 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。臺中。69 頁。
8. 蔣慕琰、蔣永正、袁秋英。2002。除草劑引起之草相變遷及抗藥性。除草劑在臺灣四十年回顧與展望研討會專刊，第 25-30 頁。蔣慕琰、蔣永正 編，中華民國雜草學會。臺中。
9. Alarcón-Reverte, R., García, A., Urzúa, J., and Fischer, A. J. 2013. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. Weed Sci. 61: 48-54.

10. Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P., and Steinrücken, H. C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *J. Plant Physiol.* 65: 830-834.
11. 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. 2002. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 50: 721-730.
12. Bostamam, Y., Malone, J. M., Dolman, F. C., Boutsalis, P., and Preston, C. 2012. Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in EPSPS and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. *Weed Sci.* 60: 474-479.
13. Conner, A. J., Glare, T. R., and Nap, J. P. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J.* 33: 19-46.
14. Culpepper, A. S., Grey, T. L., Vencill, W. K., Kichler, J. M., Webster, T. M., and Brown, S. M. 2006. Glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Sci.* 54: 620-626.
15. 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.
16. Delye, C., Matejcek, 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). *J. Pest Manag. Sci.* 58: 474-478.
17. Feng, P. C., Tran, C. M., Chui, T., 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.
18. Heap, I. 2015. The international survey of herbicide resistant weeds. Available at <http://www.weedscience.org>
19. 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.
20. Jensen, R. A. 1985. The shikimate/arogonate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *J. Physiol. Plant* 66: 164-168.
21. John, L., and Duke, S. O. 1989. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. *Pestic. Sci.* 25: 361-373.
22. Kaundun, S. S., Zelaya, I. A., Dale, R. P., Lycett, A. J., Carter, P., Sharples, K. R., and McIndoe, E. 2008. Importance of the

- P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Sci.* 56: 637-646.
23. Kishore, G. M., and Shah, D. M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
 24. 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.
 25. Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., and Candia, O. A. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 100: 95-97.
 26. 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.
 27. Nandula, V. K., Ray, J. D., Ribeiro, D. N., Pan, Z., and Reddy, K. N. 2013. Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. *Weed Sci.* 61: 374-383.
 28. Ng, C. H., Ratnam, W., Surifs, S., and Ismail, B. S. 2004. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Sci.* 52: 564-570.
 29. Ng, C. H., Wickneswari, R., Salmijah, S., Teng, Y. T., and Ismail, B. S. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.* 43: 108-115.
 30. Perez-Jones, A., Park, K. W., Polge, N., Colquhoun, J., and Mallory-Smith, C. A. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226: 395-404.
 31. 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.
 32. Seefeldt, S. S., Jensen, J. E., and Fuerst, E. P. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *J. Weed Technol.* 9: 218-227.
 33. 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.
 34. 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.
 35. Singh, B. K., and Shaner, D. L. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to

- plants and identification of glyphosate-resistant plants. *J. Weed Technol.* 12: 527-530.
36. Smith, C. M., Pratt, D., and Thompson, G. A. 1986. Increased 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase activity in a glyphosate-tolerant variant strain of tomato cells. *Plant Cell Rep.* 5: 298-301.
37. Teng, Y. T., and Teo, K. C. 1999. Weed control and management of resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Malaysia, pp. 753-758. *In: the Organization of the 17th Asian-Pacific Weed Science Society Conference* [ed.], Proceedings, 17th Asian-Pacific Weed Science Society Conference, November 22-27, 1999, The Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand.
38. VanGessel, M. J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci.* 49: 703-705.
39. 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*. *J. Plant Sci.* 163: 543-554.

A Molecular Characterization of Point-Mutations in the 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (EPSPS) Enzyme of Glyphosate-Resistant Biotypes of *Hedyotis corymbosa*

Li-Chang Lin¹, Jia-Yan Zhang², Chiou-Ing Yuan^{1*}

Abstract

Lin, C. L., Zhang, J. Y., and Yuan, C. I. 2016. A molecular characterization of point-mutations in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme of glyphosate-resistant biotypes of *Hedyotis corymbosa*. *Taiwan Pestic. Sci.* 1: 70-90.

Weed resistance to herbicides has become a major concern for crop production worldwide. We investigated the resistance of *Hedyotis corymbosa* to glyphosate in Taiwan, focusing on dose-response, shikimic acid level, and the production of target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). For this, *Hedyotis corymbosa* seedlings at the 12 ~ 15 leaf stage were foliar sprayed with 0.10 to 26.24 kg a.e./ha glyphosate. Dose-response was established based on the dry weight of seedlings 14 days after glyphosate treatment. ED₅₀ was estimated using a log-logistic equation, and was found to be 0.46 or 4.58 kg a.e./ha for susceptible and resistant biotypes, respectively. Susceptible *H. corymbosa* showed obvious accumulation of shikimic acid. Ten days following glyphosate treatment, shikimic acid content of susceptible *H. corymbosa* was 36.5 times higher than that of resistant *H. corymbosa*. Furthermore, after using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to prepare the related target enzyme EPSPS of *H. corymbosa* and treating plants with 1 mM glyphosate, an EPSPS activity assay showed that the EPSPS content of the resistant biotype was 3 times higher than that of the susceptible biotype. We also generated EPSPS cDNA by performing RT-PCR with specific primers designed according to sequence data from GenBank. In so doing, we determined that EPSPS cDNA was 1,551 bp for both resistant and susceptible *H. corymbosa*. However, sequence data revealed nucleotides differences in 11 bp between resistant and susceptible biotypes. For example, the resistant biotype had a

Accepted: September 13, 2016.

* Corresponding author, Email: yci@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung.

² Graduate Institute of Biochemical Sciences and Technology, Chaoyang University of technology, Taichung.

thymidine (T) at position 532, whereas the susceptible biotype had a cytosine (C) at that position. Moreover, the amino acid at position 178 is the major target site among glyphosate resistant grasses around the world, and transcribed sequence data revealed that amino acids at this position were serine178 and proline178 for resistant and susceptible biotypes, respectively. Finally, we designed two sets of primers with reference to 532 bases and *Hae*III specific to EPSPS nucleotides of resistant and susceptible *H. corymbosa*. These primers were used in single nucleotide polymorphism (SNP) and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assays for detecting of *H. corymbosa* collected from southern Taiwan. We found that 4 out of 11 *H. corymbosa* populations possessed resistant biotypes and were clearly distinguishable from the 7 populations with susceptible biotypes.

Key words: glyphosate, resistance, *Hedyotis corymbosa*, EPSP synthase activity, point mutation, molecular identification.