

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

林李昌^{1,2}、葉茂生¹、蔣慕琰²、袁秋英^{2*}

¹國立中興大學農藝學系

²行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所公害防治組

摘要

本研究利用美洲假蓬(*Conyza bonariensis* (L.) Cron)對嘉磷塞(glyphosate)之劑量反應、shikimic acid 含量變化及 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)基因選殖，探討美洲假蓬對嘉磷塞之抗藥特性。由臺中縣採集美洲假蓬 39 個族群的種子，經播種、育苗至 6-8 葉齡，噴施 0.3 kg ai ha⁻¹ 嘉磷塞(41% 溶液)次致死劑量，初步篩選抗性(resistant; R)及感性(susceptible; S)美洲假蓬。再針對抗及感性美洲假蓬幼苗，進行 0.13-12.00 kg ai ha⁻¹ 嘉磷塞之劑量反應分析，施藥後 14 日以乾重為基礎的 ED₅₀ R/ED₅₀ S=14。美洲假蓬葉片 shikimic acid 含量之測定顯示，施藥 7 日後感性植株之 shikimic acid 含量為 38 μmol g⁻¹，是抗性植株之 5 倍以上。經由美洲假蓬 EPSPS 之基因選殖結果，抗及感性美洲假蓬皆有 3 個 EPSPS cDNA (EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3)，EPSPS1 開放讀碼區(open reading frame; ORF)為 1,341 bp，而 EPSPS2 及 EPSPS3 的 ORF 較 EPSPS1 短，皆為 1,338 bp，抗及感性美洲假蓬相對應的 EPSPS1、

EPSPS2 及 EPSPS3 蛋白質只有 1、0 及 1 個胺基酸的差異，然而抗及感性美洲假蓬 EPSPS1 分別與 EPSPS2 及 EPSPS3 比對，相同度(identity)為 85-86%，有多達 34-36 個胺基酸的差異；抗及感性美洲假蓬 EPSPS2 與 EPSPS3 則相同度較高，只有 6 個胺基酸的差異。抗性美洲假蓬經純化的 EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3 酵素活性，於嘉磷塞藥劑處理後，EPSPS1 於 4 mM 劑量幾乎完全喪失活性；EPSPS2 及 EPSPS3 於 0.5-2.0 mM 劑量，活性隨濃度增加而緩慢降低，EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3 活性的 I₅₀ 值分別為 0.23、1.42 及 1.36 mM，顯示 EPSPS2 及 EPSPS3 對嘉磷塞的親和性較 EPSPS1 低約 6 倍。推測美洲假蓬的高耐受性與 EPSPS2、EPSPS3 蛋白質含量的多寡有關，或是另有其他抗性機制。

關鍵詞：美洲假蓬、嘉磷塞、抗藥性、EPSP synthase。

Resistant Responses and Characteristics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase (EPSPS) in Hairy Fleabane (*Conyza bonariensis*) to Glyphosate

Lin Li-Chang^{1,2}, Mau-Shing Yeh¹, Mou-Yen Chiang² and Chiou-Ing Yuan^{2*}

¹ National Chung Hsing University, Department of Agronomy, Taichung 40227, Taiwan ROC

² Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien 41358, Taiwan ROC

* 通信作者, yci@tactri.gov.tw

投稿日期：2008 年 10 月 24 日

接受日期：2008 年 11 月 28 日

作物、環境與生物資訊 5:268-280 (2008)

Crop, Environment & Bioinformatics 5:268-280 (2008)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC

ABSTRACT

Glyphosate-resistant (R) and -susceptible (S) types of *hairy fleabane* (*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.) were obtained through preliminary screening on 39 populations from orchards in Taichung Hsien where suspected resistant varieties have been reported. *Hairy fleabane* seedlings at 6-8 leaf stage were foliar sprayed with glyphosate ranging from 0.13 to 12.00 kg ai ha⁻¹. Dose-response relationship was established based on dry weight of seedlings 14 days after spraying. The ED₅₀ estimated based on the log-logistic analysis model was 0.46 and 6.40 kg ai ha⁻¹ for S and R types, respectively. Susceptible *hairy fleabane* accumulated more shikimic acid than R type under 1 kg ai ha⁻¹ of glyphosate. At 7 days after spraying, shikimic acid of S *hairy fleabane* was 38 μmol g⁻¹, about 5 times higher than that of R type. We explored the molecular characteristics of target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) of *hairy fleabane* using RT-PCR, *E. coli* transformation and restriction enzymes to generate the related target enzyme. There are three EPSPS cDNAs for both R and S *hairy fleabane*. The length of open reading frame for EPSPS1, EPSPS2 and EPSPS3 of R and S types were 1,341, 1,338 and 1,338 bp, respectively. Amino acid sequence data revealed 85-86% identity and 34-36 amino acids differences between EPSPS1 to EPSPS2 and/or EPSPS3 for the R and S types, respectively. We used RT-PCR and *E. coli* propagation to prepare EPSPS of *hairy fleabane*. EPSPS activity assay showed that inhibition (I₅₀) of EPSPS2 and/or EPSPS3 were 6 times higher than that of EPSPS1 in R type. The contents of high tolerant EPSPS2 or EPSPS3 protein are one of the possible explanations for glyphosate-resistance.

Key words: *Conyza bonariensis*, Glyphosate, Resistance, EPSP synthase.

縮寫字: effective dosage causing 50% of plant deaths, ED₅₀; 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS; phosphoenolpyruvate, PEP; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR; open reading frame, ORF; National Center for Biotechnology Information, NCBI.

前言

嘉磷塞[glyphosate, (N-phosphomethyl) glycine]為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 年中期後此除草劑之使用已超過巴拉刈,為臺灣使用最多之藥劑(Chiang and Chiang 2006)。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分多年生雜草(Chiang and Chiang 2006, Fei and Wang 2007)。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 pre-protein 運移至葉綠體(Amrhein *et al.* 1980, Della-Cioppa and Kishore 1988),造成苯丙氨酸(phenylalanine)、酪氨酸(tyrosine)及色氨酸(tryptophan) 3 種芳香族胺基酸含量降低,影響蛋白質之生合成,進而抑制植物生長(Amrhein *et al.* 1980, Kishore and Shah 1988),產生防除雜草之效果。

至 2008 年全球已有 185 種雜草的 321 種生物型(biotype),分別對 17 種以上除草劑類別具抗性(Heap 2008)。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* Gaud.)、義大利黑麥草(*L. multiflorum* Lam.)、牛筋草(*Eleusine indica* (L.) Gaertn)、芒稷(*Echinochloa colona* (L.) Link)、強生草(*Sorghum halepense* (L.) Pers.)、馬唐屬植物(*Digitaria insularis* L.)及 *Urochloa panicoides* Beauv. 禾本科植物、加拿大蓬(*Conyza canadensis* L.)、美洲假蓬(*C. bonariensis* (L.) Cron)、車前草(*Plantago lanceolata* Hook)、豬草(*Ambrosia artemisiifolia* L.)、三裂葉豬草(*A. trifida* L.)、白苞猩猩草(*Euphorbia heterophylla* L.)及 2 種莧科植物(*Amaranthus palmeri* S. Watson)及(*Amaranthus rudis* L.)

等 15 種雜草生物型(Heap 2006, 2008)。臺灣中部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(Yuan *et al.* 2001, 2002)，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，其抗性機制主要為 EPSPS 基因發生變異(Yuan *et al.* 2005a, 2005b)。

美洲假蓬為菊科(Compositae)假蓬屬(*Conyza*)一年生草本植物，原產於南美洲(Peng *et al.* 1998)，主要分佈於臺灣低海拔地區的溝邊、路旁、休耕田及果園，美洲假蓬主要於暖季萌芽、生長及開花結果，單株結籽數量約為 3,000-5,000 粒種子，繁殖潛勢強。美洲假蓬的外觀形態與同屬的加拿大蓬及野苘蒿(*C. sumatrensis* (Retz.)Walker)極相似，三者常於田區形成優勢族群，成為作物栽培管理的困擾。由於經常於農田噴施相同作用的除草劑，易篩選出抗藥性的生物型，假蓬屬雜草抗除草劑的現象，自 1980 年代起即陸續於日本及臺灣出現抗巴拉刈及大刈(diquat)的野苘蒿族群(Chiang *et al.* 1994, Heap 2008)，之後因嘉磷塞的使用日漸普遍，臺灣的抗巴拉刈的野苘蒿才逐漸減少，近年於臺灣低海拔地區的農地、休耕田及路旁，普遍發生抗嘉磷塞的野苘蒿(Yuan *et al.* 2006)。此外，抗嘉磷塞的加拿大蓬自 2001 年起，也陸續出現於美國的抗嘉磷塞基改作物田，目前已散佈於 17 州的農田，面積多達 10 萬公頃以上(Heap 2008, Van Gessel 2001)，成為嚴重的抗藥性問題；巴西、西班牙及中國亦有抗嘉磷塞加拿大蓬的報導(Heap 2008)。美洲假蓬的抗藥性發生之時期較晚，2003 年於南非首度發現對嘉磷塞高耐受性的族群(Heap 2006)，2004-2007 年間分別於西班牙、巴西、哥倫比亞及美國加州等地也陸續有抗性現象的報導 (Heap 2008, Urbano *et al.* 2007)。

臺灣中部於 2006 年開始出現抗嘉磷塞的美洲假蓬族群，雖然目前抗性現象尚侷限於中部地區的非耕地，但由於美洲假蓬種子數

量多且具冠毛，易被風飄散而四處散播。為避免此抗性植物日後成為田區的優勢雜草，破壞生態系之平衡，因此本研究欲經由測試美洲假蓬對嘉磷塞的劑量反應、美洲假蓬葉片 shikimic acid 含量的變化、嘉磷塞標的基因 EPSPS 的選殖及序列比對，以及酵素活性等分析，以確證美洲假蓬抗性族群的發生，作為有效防除及抗性生物管理之參考依據。

材料和與方法

一、化學藥品及儀器

試驗用藥品、儀器及廠牌：嘉磷塞(嘉磷塞異丙胺鹽, 41% S, glyphosate-isopropyl-ammonium, 年年春, 億豐公司)、shikimic acid (Sigma)、SuperScript III RT-PCR kit (Invitrogen)、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (Sigma)、pGEM T-easy vector (Promega)、DNA ligase (Promega)、Gel extraction kit (GeneMark)、Plasmid miniprep purification kit (GeneMark)、*Bam*H I、*Bsr*G I、*Eco*RI、*Pvu* II、*Sac* I 及 *Sph* I 限制酶(MBI)、DIG DNA labeling kit 及 DIG Easy Hyb kit (Roche)、PCR thermal cycler (PTC-200, MJ)、DNA sequencer (ABI PRISM 377-96, Perkin- Elmer)、分光光度計 (Biowave II, WPA)。

二、美洲假蓬噴施嘉磷塞之劑量反應

自臺中縣霧峰鄉及清水鎮等 39 個不同地點，採集美洲假蓬種子，分別播種於直徑 15 cm 塑膠盆，於溫室培育至植株 6-8 葉齡，噴施次致死量(1 kg ai ha⁻¹)之嘉磷塞，初步篩選出感、抗性美洲假蓬，再噴施 0.125-12.0 kg ai ha⁻¹ 不同劑量嘉磷塞，各處理 6 株，3 重覆。施藥方式以二氧化碳加壓噴藥器(2.1 kg cm⁻²)噴施，噴嘴為 Teejet 8002 型號，移動速率為 0.5 m sec⁻¹。施藥後 14 日調查乾重，所得資料以 log-logistic 公式(Seefeldt *et al.* 1995)估算 ED₅₀ 值。

三、感及抗性美洲假蓬葉片 shikimic acid 含量之測定

以篩選之感及抗性美洲假蓬植株為材料，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(Singh and Shaner 1998)，取 3 g 葉片以液態氮磨碎，添加 15 mL 0.25 N HCl (1:3, w/v)反應 30 min，以 25,000 g 離心 20 min，取上層液 50 μL 添加 0.5 mL 1% 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 測定吸光值及估算 shikimic acid 含量。

四、感及抗性美洲假蓬 EPSPS 基因選殖、解序

抽取 0.5 g 抗及感性美洲假蓬幼葉總 RNA，參考 NCBI GenBank 資料庫之加拿大蓬 EPSPS cDNA 序列 (AY545666、AY545667、AY545668) (GenBank of National Center for Biotechnology Information, NCBI 2008)，及野苘蒿 EPSPS cDNA 序列 (AY834203、AY834205、AY834207) (Yuan *et al.* 2006, NCBI 2008)，設計 EPSPS-1F/EPSPS-1R 及 EPSPS-2F/EPSPS-2R 兩組引子 (Table 1)，利用 SuperScript RT-PCR kit，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)取約 0.5 μg 美洲假

蓬 mRNA，合成 cDNA 之反應為 50°C 30 min，94°C 2 min，後續 PCR 之條件為起始變性 94°C 4 min，之後以變性 94°C 30 sec，煉合 52°C 30 s，延展 72°C 30 s，循環 35 週期，最後延展 72°C 7 min。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 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析，時間約 25 min，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 RT-PCR 增幅的核酸條帶皆約 1,400 bp，利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出。取 3 μL PCR 之 DNA 產物，添加於 pGEM-T Easy Vector，於 16°C 反應 14-16 h 進行接合反應。10 μL 接合反應物轉殖於 200 μL 大腸桿菌(*Escherichia coli*) TG1 菌株，經塗抹於 LB plate (含 40 μL 100 mM IPTG、40 μL 4% X-gal 及 50 μg mL⁻¹ ampicillin)，培養 14-16 h，選取白色菌落，以細胞培養之後，抽取 plasmid DNA，其中之 inserted DNA 再經 *Sac* I 及 *Bsr* G I/*Sph* I 等限制酶反應的差異比較及電泳分析。針對 3 個 plasmid DNA 解序，再將解出核酸序列與 NCBI 基因庫中 EPSPS 基因序列比對。

五、美洲假蓬 EPSPS 蛋白質之大量表現、純化及活性分析

美洲假蓬 EPSPS 3 個 cDNA 的 PCR 產物，分別接合於 pET-28a (+)載體，再轉殖於大腸桿菌 BL21 (DE3)菌株，經由 0.1 mM

Table 1. DNA sequences of primers used in this study.

Primer	DNA sequence (5' ----> 3')
EPSPS-1F	AAACCGTCAACGGTGCCGAAATTG
EPSPS-1R	ATGCTTGGCAAATCTTTGAAGAAC
EPSPS-2F	TCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTG
EPSPS-2R	TTAATGCTTAGTGTATCTTTCAAG

IPTG 之誘導，於 20°C 培養 16 h，添加約 300 μL B-PER bacterial protein extraction reagent 於菌體，萃取 EPSPS 融合蛋白質。再以超音波破菌，經 Ni-NTA superflow 管柱純化，以 elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) 沖提，回收約 2 mg EPSPS 蛋白質。EPSPS 融合蛋白質以 Lowry 方法定量，小牛血清蛋白為標準品。

EPSPS 酵素活性之分析方法，參考前人研究 (Shyr *et al.* 1992, Westwood and Weller 1997) 並略經修飾。取 2-5 μL 純化之 EPSPS 融合蛋白質加反應緩衝液 (50 mM HEPES buffer, pH 7.0、1 mM PEP、1 mM S-3-P、0.2 mM ammonium molybdate、2 mM EDTA)，以及 0-300 μM 不同濃度之嘉磷塞，總體積為 400 μL 。於 25°C 反應 20 min，經離心去除沉澱物，取 200 μL 澄清液加 800 μL 分析緩衝液 [2 mM ADP、0.15 mM NADH、25 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、25 mM KCl、50 mM HEPES pH 7.4、10 μL pyruvate kinase (2.5U) 以及 10 μL lactate dehydrogenase (10U)]，比較反應前後於波長 340 nm 之吸光值，估算 PEP (EPSPS 之受質) 含量 ($\mu\text{mole min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) 之變化，重覆 3 次測定。

結果

一、美洲假蓬噴施嘉磷塞之劑量反應

臺中縣霧峰鄉及清水鎮等 39 個不同地點之美洲假蓬，經播種及育苗後，以嘉磷塞 0.3 kg ai ha⁻¹ 劑量噴施，施藥後 10-14 日，對藥劑敏感植株的外觀傷害徵狀為頂梢或側枝之新生葉黃化或褐化、葉形狹小，生長速率緩慢，由傷害程度可區別為對藥劑敏感度低、中及高者，分別有 7、21 及 11 個美洲假蓬族群 (資料未呈現)。針對藥劑敏感度最高及最低之美洲假蓬植株，再以 0.13-12.00 kg ai ha⁻¹ 劑量反應測定，結果顯示敏感植株於劑量 2.0 kg ai ha⁻¹ 即全株死亡，抗性植株藥劑劑量增為 16.0 kg ai ha⁻¹ 以上，美洲假蓬之生長才完

全被抑制 (Fig. 1)。以 log-logistic 公式估算乾重為基礎之 ED₅₀，感及抗性美洲假蓬的 ED₅₀ 值分別為 0.46 及 6.40 kg ai ha⁻¹，ED₅₀ R/ED₅₀ S 值為 14。

二、感及抗性美洲假蓬葉片 shikimic acid 之含量分析

嘉磷塞對美洲假蓬葉片 shikimic acid 含量之測定顯示，抗性植株於施藥後 2 日，幼葉及成熟葉 shikimic acid 含量皆略增加，但第 3 日後明顯下降，分別低於 10 及 1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ 。感性植株於施藥後 shikimic acid 含量則持續增加，施藥後 7 日，幼葉的 shikimic acid 大量累積至 38 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ，為抗性植株的 5 倍以上 (Fig. 2A)。感性植株成熟葉 shikimic acid 含量約為抗性植株的 5 倍，但較幼葉 shikimic acid 的累積大幅減少，含量低於 4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Fig. 2B)。

三、感及抗性美洲假蓬 EPSPS 基因選殖、序列比較

萃取抗及感性美洲假蓬之總 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 1,400 bp 的核酸片段，以抗性者呈現於 Fig. 3。增幅的 DNA 再經 *Sac* I 及 *Bsr*G I/*Sph* I 等 2 組限制酶反應，結果抗及感性美洲假蓬 EPSPS 皆可分別區分為 3 個 cDNA。抗及感性美洲假蓬以 EPSPS-1F/EPSPS-1R 引子增幅的核酸，不可被 *Sac* I 及 *Bsr*G I/*Sph* I 限制酶切割，將此質體 DNA 定為 EPSPS1；EPSPS-2F/EPSPS-2R 引子增幅的核酸，可分別被 *Sac* I 及 *Bsr*G I/*Sph* I 切割為約 1,200 bp 及 600 bp 兩類別，前者定為 EPSPS2，後者定為 EPSPS3 (Fig. 3)。

抗及感性美洲假蓬的 3 個 EPSPS cDNA，經解序及比對，結果顯示抗及感性美洲假蓬的 EPSPS1 開放讀碼區 (open reading frame; ORF) 長度為 1,341 bp，相同度為 99%，僅有 6 個鹼基不同。抗及感性美洲假蓬 EPSPS2 及 EPSPS3 的 ORF 較 EPSPS1

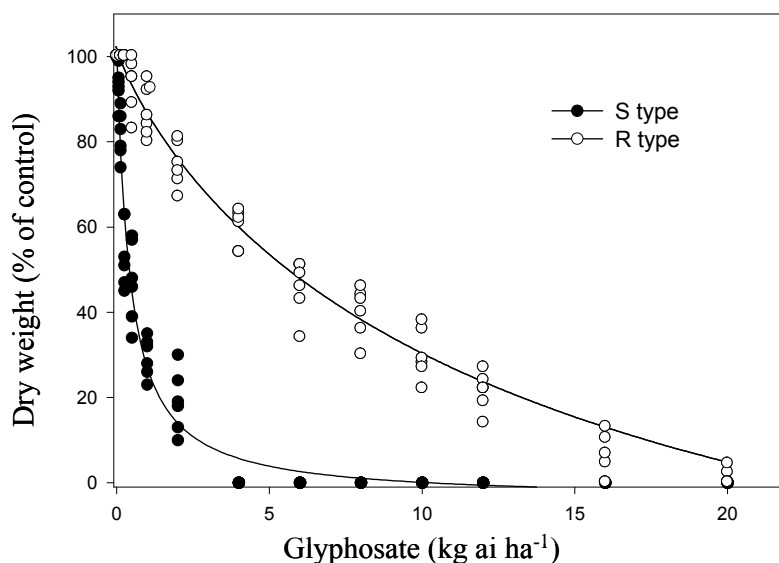


Fig. 1. Dose response of *Conyza bonariensis* seedlings against glyphosate. *C. bonariensis* from Taichung Hsien (central Taiwan) were planted in greenhouse and foliar treated with glyphosate at 6 to 8-leaf stage. Dry matter weight was measured at 14 days after treatment. Log-logistic equation was used for curve fitting. Estimated ED₅₀ of glyphosate-susceptible (S) and glyphosate-resistant (R) types were 0.46 and 6.40 kg ai ha⁻¹, respectively.

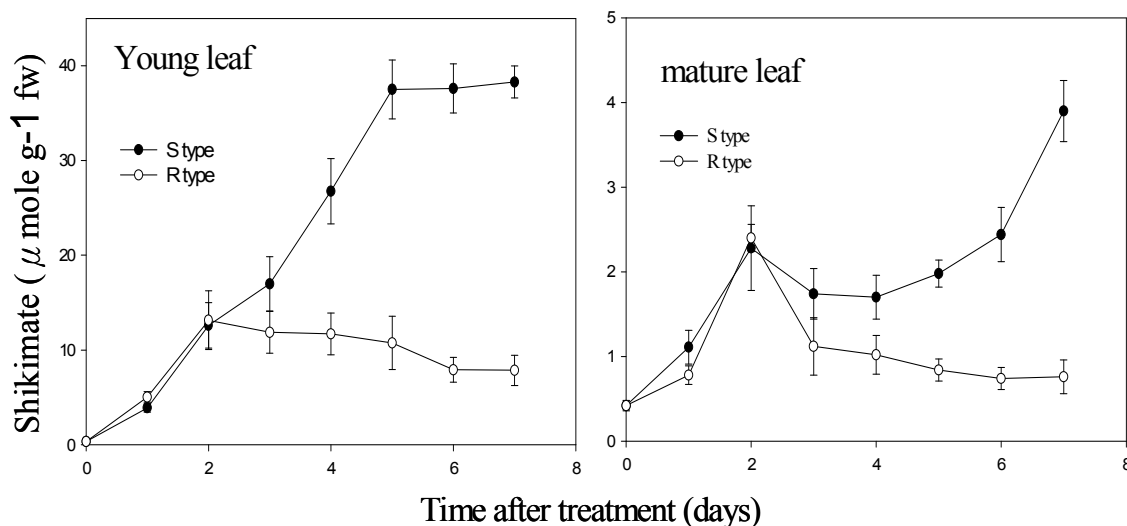


Fig. 2. Accumulation of shikimic acid in seedlings of glyphosate-resistant (R) and -susceptible (S) *Conyza bonariensis*. (A) Young leaves and (B) mature leaves for shikimate analysis were sampled from 6- to 8-leaf seedlings treated with glyphosate (1.0 kg ai ha⁻¹).

短，皆為 1,338 bp，抗及感性美洲假蓬的 EPSPS2 cDNA 序列完全相同，而 EPSPS3 也只有 4 個鹼基的差異。抗或感性美洲假蓬的 EPSPS1 分別與其 EPSPS2 或 EPSPS3 比對序列，相同度較低，介於 85-86%之間，序列鹼基有 180 個以上之差異。而抗或感性美洲假蓬 EPSPS2 與 EPSPS3 之間的相同度皆為 96%，僅有 43 個鹼基之差異(Table 2)。

EPSPS 核酸序列經轉譯後，抗及感性美洲假蓬 EPSPS1 序列只有 1 個胺基酸的差異，

asparagine (N) 441(感性)→ leucine(L) (抗性)的差異(Fig. 4，“▼”倒三角標示者)。抗及感性美洲假蓬 EPSPS2 胺基酸序列完全相同。而抗及感性美洲假蓬 EPSPS3 也只有於第 435 個胺基酸分別 aspartic acid (D)及 glutamic acid (E)的差異(Fig. 4，“▲”三角標示者)。不論抗或感性美洲假蓬以 EPSPS1 分別與其 EPSPS2 或是 EPSPS3 胺基酸序列比對，皆有多達 36 及 34 個胺基酸的差異；而 EPSPS2 與 EPSPS3 之間只有分別位於 62、71、123、

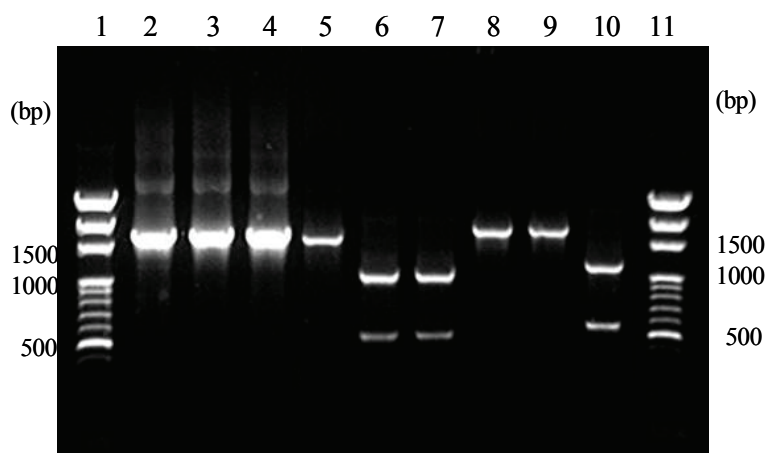


Fig. 3. DNA fragment obtained from glyphosate-resistant *Conyza bonariensis*. RT-PCR was used for amplification with total RNA extracted from the weed. Primers used were designed based on cDNA library of target enzyme (EPSPS) from NCBI GenBank. Lanes 1 and 11 were DNA marker; lane 2 was EPSPS1 cDNA be amplified with EPSPS-1F /EPSPS-1R primers; lane 3 and 4 were EPSPS2 and/or EPSPS3 cDNA be amplified DNA with EPSPS-2F /EPSPS-2R primers, respectively; lanes 5 to 7 were EPSPS1, EPSPS2 and EPSPS3 amplified DNA be digested by *Sac* I; lanes 8 to 10 were EPSPS1, EPSPS2 and EPSPS3 amplified DNA be digested by *BsrG* I and *Sph* I.

Table 2. Identity of gene sequences of EPSPS1, EPSPS2 and EPSPS3 between glyphosate-susceptible (S) and -resistant (R) type in *Conyza bonariensis*.

Primer	R type			S type		
	EPSPS1	EPSPS2	EPSPS3	EPSPS1	EPSPS2	EPSPS3
R EPSPS1	100					
EPSPS2	86	100				
EPSPS3	84	96	100			
S EPSPS1	99	85	86	100		
EPSPS2	85	100	96	85	100	
EPSPS3	86	96	99	86	97	100

CB S-EPSPS1	1	KPSTVPEIVLQPIKEISGTVNLPGSKLSNRILLLAALAEAGTTIVDNLNLSDDVHYMLGALRTLGLNVEEDVAIKRAIVEGCGVFPVKG	90
CB R-EPSPS1	1	-----	90
CS S-EPSPS1	1	-----	90
CS R-EPSPS1	1	-----	90
CC EPSPS-1	1	-----	90
CB S-EPSPS2	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CB R-EPSPS2	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CS S-EPSPS2	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CS R-EPSPS2	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CC EPSPS-2	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CB S-EPSPS3	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CB R-EPSPS3	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CS S-EPSPS3	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CS R-EPSPS3	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CC EPSPS-3	1	SKAPE--K-Q--H--S-V--V--NS--	89
CB S-EPSPS1	91	EAKDDIQFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNSVYFDGVRMRERPIGDVLTGLKQLGADVDCSLGTCNPPVRIVGGGLPGGKVLGSGSI	180
CB R-EPSPS1	91	-----L-----	180
CS S-EPSPS1	91	-----L-----	180
CS R-EPSPS1	91	-----L-----	180
CC EPSPS-1	91	-----L-----	180
CB S-EPSPS2	90	E-----IL-----N-----V-S-----	179
CB R-EPSPS2	90	E-----IL-----N-----V-S-----	179
CS S-EPSPS2	90	E-----IL-----N-----V-S-----	179
CS R-EPSPS2	90	E-----IL-----N-----V-S-----	179
CC EPSPS-2	90	E-----IL-----N-----V-S-----	179
CB S-EPSPS3	90	E-----L-----N-----V-S-----	179
CB R-EPSPS3	90	E-----L-----N-----V-S-----	179
CS S-EPSPS3	90	E-----S-----T-----I-----L-----V-----V-S-----R-----	179
CS R-EPSPS3	90	E-----S-----T-----I-----L-----V-----V-S-----R-----	179
CC EPSPS-3	90	E-----S-----T-----I-----L-----V-----V-S-----R-----	179
CB S-EPSPS1	181	SSQYLTMASPLALGDVEIEIDKLSIPIPVVMTLKLMEKRFVGSVEHSDSDWQFFIRGDQKYKSPGNAYVEGDASSAYFLAGAAITG	270
CB R-EPSPS1	181	-----	270
CS S-EPSPS1	181	-----	270
CS R-EPSPS1	181	-----	270
CC EPSPS-1	181	-----	270
CB S-EPSPS2	180	S--A--V--V--T--R--H--G--	269
CB R-EPSPS2	180	S--A--V--V--T--R--H--G--	269
CS S-EPSPS2	180	S--A--V--V--T--R--H--G--	269
CS R-EPSPS2	180	S--A--V--V--T--R--H--G--	269
CC EPSPS-2	180	S--A--V--V--T--R--H--G--	269
CB S-EPSPS3	180	S--A--V--V--T--R--YV--G--	269
CB R-EPSPS3	180	S--A--V--V--T--R--YV--G--	269
CS S-EPSPS3	180	S--A--V--V--T--R--YV--G--	269
CS R-EPSPS3	180	S--A--V--V--T--R--YV--G--	269
CC EPSPS-3	180	S--A--V--V--T--R--YV--G--	269
CB S-EPSPS1	271	GTITVEGCGTSSLQGDVQKFAEVLGQMGAEVTVTENSVTYKGPDRSSGRKHLRAVDNMMKMPDVAMTLAVVALYADGPTAIRDVASWRV	360
CB R-EPSPS1	271	-----	360
CS S-EPSPS1	271	-----	360
CS R-EPSPS1	271	-----	360
CC EPSPS-1	271	-----	360
CB S-EPSPS2	270	--V--N--G--P--	359
CB R-EPSPS2	270	--V--N--G--P--	359
CS S-EPSPS2	270	--V--N--G--P--	359
CS R-EPSPS2	270	--V--N--G--P--	359
CC EPSPS-2	270	--V--N--G--P--	359
CB S-EPSPS3	270	--V--N--G--CP--	359
CB R-EPSPS3	270	--V--N--G--CP--	359
CS S-EPSPS3	270	--V--N--G--CP--	359
CS R-EPSPS3	270	--V--N--G--CP--	359
CC EPSPS-3	270	--V--N--G--CP--	359
CB S-EPSPS1	361	KETERMIAICTELRKLGVTEEGPDYCVITPPEKLVNTAIDTYDHRMAMAFSLAACADVFTIKDPSCTRKTFPDYFEVNRFAKH	447
CB R-EPSPS1	361	-----L-----	447
CS S-EPSPS1	361	-----L-----	447
CS R-EPSPS1	361	-----L-----	447
CC EPSPS-1	361	-----L-----	447
CB S-EPSPS2	360	E--G--D--LE-YT--	446
CB R-EPSPS2	360	E--G--D--LE-YT--	446
CS S-EPSPS2	360	E--G--D--LE-YT--	446
CS R-EPSPS2	360	E--G--D--LE-YT--	446
CC EPSPS-2	360	E--G--D--LE-YT--	446
CB S-EPSPS3	360	E--G--D--LE-YT--	446
CB R-EPSPS3	360	E--G--D--LE-YT--	446
CS S-EPSPS3	360	E--G--D--LE-YT--	446
CS R-EPSPS3	360	E--G--D--LE-YT--	446
CC EPSPS-3	360	E--G--D--LE-YT--	446

Fig. 4. Comparison of predicted amino acid sequence of EPSPS among *Conyza bonariensis*, *C. sumatrensis* and *C. canadensis*. EPSPS sequences (S-EPSPS1, S-EPSPS2, and S-EPSPS3) of glyphosate-susceptible *C. bonariensis* and EPSPS sequences (R-EPSPS1, R-EPSPS2, and R-EPSPS3) of glyphosate-resistant *C. bonariensis* were elucidated in this study. Sequences of EPSPS in *C. sumatrensis* (S-EPSPS1, AY834203; S-EPSPS2, AY834205; S-EPSPS3, AY834207; R-EPSPS1, AY834204; R-EPSPS2, AY834206; R-EPSPS3, AY834208) and in *C. canadensis* (EPSPS-1, AY545666; EPSPS-2, AY545667; EPSPS-3, AY545668) are from NCBI's GenBank. The inverted triangle (▼) indicates position on EPSPS1 with different amino acids between EPSPS2 and EPSPS3, and the triangle (▲) indicates position on EPSPS3 with different amino acids between resistant and susceptible types in *C. bonariensis*. The differences between EPSPS2 and EPSPS3 occurred at position 62, 71, 123, 236, 237 and 322 of resistant and susceptible *C. bonariensis* as indicated by an asterisk (★). The empty asterisk (☆) represents the EPSPS2 and EPSPS3 of susceptible and resistant *C. bonariensis* difference among several plants from NCBI's GenBank.

236、237 及 322 的 6 個胺基酸的差異(Fig. 4, “★” 星號標示者)。

四、抗性美洲假蓬 EPSPS 之活性分析

抗性美洲假蓬經由含 *Not I* 及 *Xho I* 限制酶切位之 RT-PCR 反應，分別增幅 EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3 核酸片段，再將此 DNA 片段轉殖至大腸桿菌，經 IPTG 誘導 EPSPS 融合蛋白質大量表現及純化，可回收分子量為 47.0 KDa 之 EPSPS 蛋白質。抗性美洲假蓬 EPSPS 蛋白質經酵素活性反應測定，結果顯示嘉磷塞藥劑處理後，EPSPS1 蛋白質的活性於 1-2 mM 嘉磷塞藥劑處理後，即開始大幅降低，4 mM 劑量處理幾乎完全喪失酵素活性。0.5-2.0 mM 嘉磷塞藥劑處理後，EPSPS2 及 EPSPS3 蛋白質的活性隨濃度增加而緩慢降低，EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3 酵素活性的 I_{50} 值分別為 0.23、1.42 及 1.36 mM (Fig. 5)。

討論

經由美洲假蓬噴施嘉磷塞之劑量反應測

定，結果顯示美洲假蓬外觀傷害徵狀為頂梢或側枝之幼葉黃化或褐化、葉形狹小，生長速率緩慢，可區別為對藥劑之敏感度低、中及高者，分別有 7、21 及 11 個美洲假蓬族群，抗性植株下位葉片及芽體未死亡可再發育而存活。藥劑造成美洲假蓬乾重減少之影響大於對植株外觀之傷害，嘉磷塞對野苘蒿(Yuan *et al.* 2006)、牛筋草(Yuan *et al.* 2005a)、華九頭獅子草(Yuan *et al.* 2001)及黑麥草(Powles *et al.* 1998)亦有相似現象。嘉磷塞對 6-8 葉齡美洲假蓬以乾重為基礎之 ED_{50} 值，感及抗性美洲假蓬 ED_{50} 分別為 0.46 及 6.40 kg ai ha⁻¹，R/S 比值為 14，與牛筋草(R/S=2-4)、加拿大蓬(R/S=4) (VanGessel *et al.* 2001)、野苘蒿(R/S=8) (Yuan *et al.* 2006)以及澳洲地區的黑麥草(R/S=9.5) (Yu *et al.* 2007)比較，美洲假蓬的抗性程度較強，西班牙抗嘉磷塞美洲假蓬於 43 個族群中，測定典型抗與感性植株對藥劑的靈敏度相差約 10 倍，且各族群對嘉磷塞有多種不同程度的耐受性(Urbano *et al.* 2007)。植物對嘉磷塞之抗性，可由細胞培

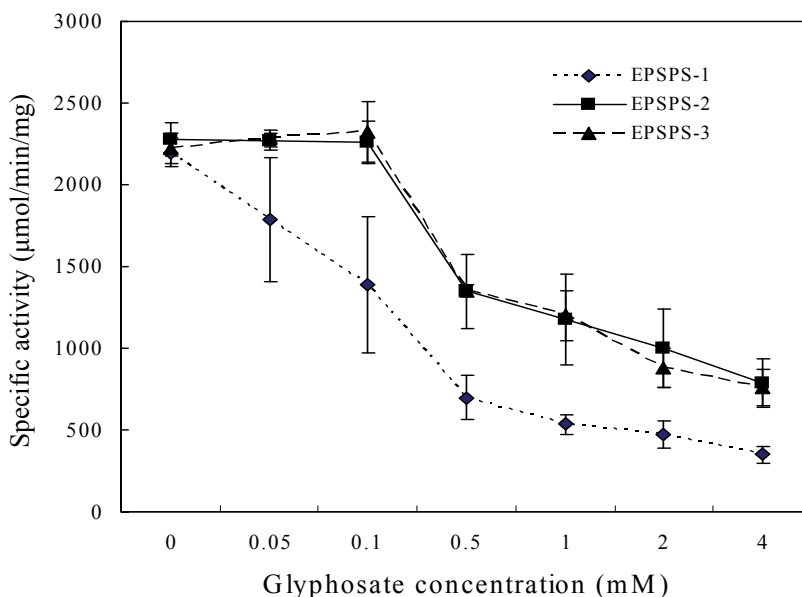


Fig. 5. EPSPS activity of EPSPS1, EPSPS2 and EPSPS3 in glyphosate-resistant *Conyza bonariensis*. EPSPS assays were conducted in the presence of glyphosate and specific activity was the change of substrate as determined by $\mu\text{moles of PEP min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$.

養時添加嘉磷塞而篩選產生抗性細胞株，如胡蘿蔔及菸草篩選的抗性細胞株， EC_{50} 值分別為 6.3 及 4 mM，為感性細胞之 50 及 10 倍 (Shyr *et al.* 1992, Singer and McDaniel 1985)，一旦藥劑壓力移除，抗藥性會逐代遞減 (Bradshaw *et al.* 1997)。

由於嘉磷塞之作用為抑制 EPSPS 的作用引起芳香族胺基酸的合成受阻，造成上游 shikimic acid 的累積 (Amrhein *et al.* 1980)，因此植株快速累積 shikimic acid 之現象，成為對嘉磷塞感性植物及嘉磷塞藥害的指標反應 (Singh and Shaner 1998)。例如馬齒莧、黃土香 (*Cyperus esculentus* L.)、及黑麥草等植物大量累積 shikimic acid 為未施藥植株的 60-180 倍，同時降低芳香族胺基酸合成，直接影響二次代謝物之合成 (John and Duke 1989)；對嘉磷塞敏感之大豆於施藥後 8 日累積 shikimic acid 為 $70 \mu\text{mol g}^{-1}$ ，具抗性之基因改造大豆則僅為 $0.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Singh and Shaner 1998)。本研究結果顯示，抗性美洲假蓬於施藥後 2 日，幼葉及成熟葉 shikimic acid 含量皆略增加，但第 3 日之後明顯下降，分別低於 10 及 $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ 。而感性美洲假蓬於施藥後 shikimic acid 含量則持續增加，施藥後 7 日，幼葉及成熟葉 shikimic acid 分別累積至 38 及 $4 \mu\text{mol g}^{-1}$ ，為抗性美洲假蓬的 5 倍以上 (Fig. 2)。美洲假蓬噴施嘉磷塞對 shikimic acid 的影響，與野苘蒿及加拿大蓬 shikimic acid 含量變化極相似，抗性野苘蒿及加拿大蓬幼葉 shikimic acid 於施藥後 2-3 日略上升，但隨施藥天數增加而逐漸降低 (Mueller *et al.* 2003, Yuan *et al.* 2006)；而感性美洲假蓬及加拿大蓬幼葉 shikimic acid 含量，施藥後 7 日分別持續累積為 $18 \mu\text{mol g}^{-1}$ 及 $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ 以上 (Mueller *et al.* 2003)。另有以加拿大蓬葉片的癒傷組織，進行添加 20-200 μM 嘉磷塞的反應測定，亦顯示抗性品系 shikimic acid 含量明顯低於感性品系 (Scheiber *et al.* 2006)。然而以 ^{14}C -嘉磷塞於抗性加拿大蓬植株的轉運分析，藥劑由施藥

葉片至非施藥葉片及根部的含量，皆明顯低於感性加拿大蓬者 (Feng *et al.* 2004)，此研究者認為加拿大蓬的抗性機制可能與嘉磷塞於組織內的分佈與韌皮部裝載 (phloem loading) 的差異有關。經由美洲假蓬 shikimic acid 含量的分析，顯示抗性美洲假蓬於噴施嘉磷塞之後 shikimic acid 含量未大量累積，其 EPSPS 酵素可能未完全被嘉磷塞鍵結。

目前全球發生的抗嘉磷塞雜草已有 15 種，最早發生抗性的黑麥草，初期被認為抗性的可能原因是 EPSPS 基因大量擴增，或是具有對藥劑不敏感的 EPSPS 酵素所造成 (Feng *et al.* 1999, Lorraine-Colwill *et al.* 1999, Lorraine-Colwill *et al.* 2001)，其抗性亦可能涉及嘉磷塞於細胞內的轉運與分佈 (Lorraine-Colwill *et al.* 2003)，經由遺傳分析及基因解序結果，黑麥草抗性與單一不完全顯性基因有關 (Lorraine-Colwill *et al.* 2001)；且於 EPSPS 第 106 個胺基酸由 proline 分別變異為 alanine (Yu *et al.* 2007)。牛筋草對嘉磷塞的抗性亦已被證實為 EPSPS 發生突變，臺灣與馬來西亞的抗性牛筋草皆於 EPSPS 的 $^{106}\text{proline}$ 分別變異為 alanine 及 serine (Baerson *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2005b)，根據沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 及大腸桿菌 *aroA* 的結構及活性分析，顯示此處胺基酸的變異，會顯著降低 EPSPS 對嘉磷塞的親和性 (Stalker *et al.* 1985, Priestman *et al.* 2005, Healy-Fried *et al.* 2007)，因此黑麥草及牛筋草對嘉磷塞產生抗性的主要原因 $^{106}\text{Proline}$ 的改變，降低 EPSPS 酵素與嘉磷塞親和性之故。義大利黑麥草的抗性則與藥劑的吸收及轉運無關聯性 (Petz and Kogan 2003)。其他例如芒稷、車前草、豬草、白苞猩猩草及 *Amaranthus palmeri* 等抗性草，目前尚無與抗性機制相關的報導。

本研究分析美洲假蓬 EPSPS 基因，抗與感性美洲假蓬 EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3 3 個 cDNA 的相同度分別為 99、96 及 96%，EPSPS 基因經轉譯後，抗與感性美洲假蓬

EPSPS1、EPSPS2 與 EPSPS3 分別只有 1、0 及 1 個胺基酸的差異；但是抗或感性美洲假蓬以 EPSPS1 與其 EPSPS2 或 EPSPS3 胺基酸序列比對，皆有多達 36 及 34 個胺基酸的差異，而 EPSPS2 與 EPSPS3 之間相同度高，只有 6 個胺基酸的差異。前人研究同屬植物加拿大蓬及野苘蒿的亦皆有 3 個 EPSPS cDNA (Sammons *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2006)，加拿大蓬 EPSPS1 及 EPSPS2 為對嘉磷塞敏感的酵素，而 EPSPS3 基因為不具功能性的偽基因(pseudogene) (NCBI 2008, Sammons *et al.* 2004)；抗性野苘蒿 R-EPSPS2 之 ⁶⁸Gly、¹⁹⁶Arg、⁴¹⁶Arg 及 ⁴²⁸Ser 4 處胺基酸的改變，可能與抗藥性具關聯性(Yuan *et al.* 2006)。美洲假蓬 EPSPS1、EPSPS2 及 EPSPS3 與加拿大蓬 (EPSPS-1, AY545666; EPSPS-2, AY545667; EPSPS-3, AY545668)，以及抗與感性野苘蒿的 EPSPS isoform (S-EPSPS1, AY834203; S-EPSPS2, AY834205; S-EPSPS3, AY834207; R-EPSPS1, AY834204; R-EPSPS2, AY834206; R-EPSPS3, AY834208)比對，以 EPSPS1 的相同度較高，分別僅有 4 及 3 個胺基酸的差異，但美洲假蓬 EPSPS2 及 EPSPS3 與加拿大蓬及野苘蒿者比對，則分別與此二植物有 11、26 及 21、25 個胺基酸的差異，其中以 ³⁸Ala→Ser、¹⁴⁸Asp→Asn、¹⁹¹Ser→Ala、²³³Gln→Arg、²⁷³Thr→Val、³¹⁴Ser→Asn 及 ³¹⁹His→Gly 之胺基酸的分子量及帶電荷等特性相差較大(Fig. 5，“☆”標示者)，此 7 處胺基酸之改變，目前尚無與嘉磷塞抗性有關之報導。此外，抗性美洲假蓬 EPSPS1、2 及 3 的胺基酸序列，無論與大腸桿菌 EPSPS 與嘉磷塞或 PEP 結合有關的 18 個胺基酸 (Schönbrunn *et al.* 2001)，或是與抗性牛筋草、黑麥草相對位置的胺基酸比較(Yu *et al.* 2007)，皆未發生變異現象。

經由抗性美洲假蓬 EPSPS 酵素活性分析，結果 EPSPS2 及 EPSPS3 對嘉磷塞的 I₅₀ 值為 EPSPS1 者的 6.1 及 5.9 倍(Fig. 5)，顯示美洲假蓬 3 個 EPSPS isozymes 中，EPSPS2

及 EPSPS3 對嘉磷塞的耐受性較 EPSPS1 者強，可能由於分別有 36 及 34 個胺基酸差異所造成，尤其前述之 7 處胺基酸(Fig. 4，“☆”標示者)，亦異於加拿大蓬及野苘蒿者，可推測為美洲假蓬 ED₅₀ R/S 值較高的可能原因。然而由於感性美洲假蓬 EPSPS2 與抗性者完全相同，且 EPSPS3 僅於序列 C 端相差 1 個胺基酸，酵素活性亦無明顯差異，因此目前無法僅由 EPSPS 序列及離體的酵素活性分析證明抗性機制。

美洲假蓬族群對嘉磷塞的反應，呈現多種不同程度的耐受性，並且由抗性美洲假蓬葉片 shikimic acid 含量，於施藥後 2-3 日略上升再下降的變化，推測美洲假蓬可能有嘉磷塞可誘導表現的 EPSPS isozyme，且為耐受性較高的 EPSPS2 或 EPSPS3，可能由於誘導其 RNA 或蛋白質表現量之差異，抗性株有較大表現可誘導的 EPSPS2 或 EPSPS3，感性株則否。後續將針對抗與感性美洲假蓬 EPSPS 的 3 個 isozymes，分別分析其酵素含量變化，並利用定點突變 (site-directed mutagenesis) 技術，測定 EPSPS2 及 EPSPS3 胺基酸差異處與嘉磷塞親和性之相關性抗性機制。此外亦或是另有藥劑吸收、傳導或代謝的其他抗性機制，仍有待進一步之探討

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會經費補助 [95 農科-13.2.3-藥-P2(4)] 計畫，謹致謝忱。

引用文獻

- 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.
- Baerson SR, DJ Rodriguez, M Tran, Y Feng, NA Biest, GM Dill (2002) Glyphosate-resistant broadleaf fleabane. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.* 129: 1265-1275.

- Bradshaw LD, SR Pagette, SL Kimball, BH Wells (1997) Perspectives on glyphosate resistance. **Weed Technol.** 11: 189-198.
- Chiang YJ, MY Chiang, TM Chu (1994) Paraquat-resistant biotype of *Erigeron sumatrensis* Retz. in Taiwan. **Weed Sci.** 15: 1-19.
- Chiang MY, YJ Chiang (2006) Handbook on herbicides and farmland weeds in Taiwan. p.1-259. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture Executive Yuan press, Taichung Hsien, Taiwan.
- Della-Cioppa G, GM Kishore (1988) Import of a precursor protein into chloroplast is inhibited by the herbicide glyphosate. **EMBO J.** 7: 1299-1305.
- Fei WQ, YQ Wang (2007) Plant protection manual. p.749-847. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture. Taichung Hsien, Taiwan.
- Feng PCC, JE Pratley, JA Bohn (1999) Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation, and metabolism. **Weed Sci.** 47: 412-415.
- Feng PCC, M Tran, T Chiu, RD Sammons, RD Sammons, GR Heck, CA Cajacob (2004) Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Sci.** 52: 498-505.
- Forlani G (2002) Differential expression of 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase isoforms in elicitor-treated, cultures maize cells. **Funct. Plant Biol.** 29: 1483-1490.
- GenBank of National Center for Biotechnology Information (2008) Online Internet. Oct. 12, 2008. Available at <http://www.ncbi.nih.gov/>
- Goldsbrough PB, EM Hatch, B Huang, WG Kosinski, WE Dyer, KM Hermann, SC Weller (1990) Gene amplification in glyphosate tolerant tobacco cells. **Plant Sci.** 72:53-62.
- Heap IM (2006) International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online Internet. Sep. 1, 2006. Available at www.weedscience.com.
- Heap IM (2008) International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online Internet. Oct. 12, 2008. Available at www.weedscience.com.
- Healy-Fried ML, TM Funke, A Priestman, H Han, E Schonbrunn (2007) Structural Basis of Glyphosate Tolerance Resulting from Mutations of Pro¹⁰¹ in *Escherichia coli* 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase. **J. Biol. Chem.** 282: 32949-32955.
- John L, SO Duke (1989) Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. **Pestic. Sci.** 25: 361-373.
- Kishore GM, DM Shah (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annu. Rev. Biochem.** 57: 627-663.
- Lorraine-Colwill DF, TR Hawkes, PH Williams, SAJ Warner, PB Sutton, SB Powles, C Preston (1999) Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. **Pestic. Sci.** 55: 489-491.
- Lorraine-Colwill DF, SB Powles, TR Hawkes, PH Hollinshead, SAL Warner, C Preston (2003) Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pestic. Biochem. Physiol.** 74: 62-72.
- 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.
- Mueller TC, JH Massey, RH Hayes, CL Main, CN Stewart (2003) Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **J. Agric. Food Chem.** 51: 680-684.
- Peng CI, KF Chung, HL Li (1998) Compositae. p.919. In: Flora of Taiwan, 2nd ed. Vol.4. Dept. of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Petez A, M Kogan (2003) Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchard. **Weed Res.** 43: 12-19.
- Powles SB, DF Lorraine-Colwill, JJ Dellow, C Preston (1998) Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. **Weed Sci.** 46: 604-607.
- Priestman MA, T Funke, IM Singh, SS Crupper, E Schonbrunn, (2005) 5-Enolpyruvylshikimate-3-

- phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. **FEBS Lett.** 579:728-732.
- Sammons RD, G Heck, P Feng, G Bunkers, M Tran, M Alibhai, Y Qi, S Flasiniski, M Malven, C Hubmeier (2004) Characterizing the mechanism of glyphosate resistance in Horseweed (*Conyza canadensis*). p.32. In: Annual Meeting Abstract. American Society of Plant Biologists. Lake Buena Vista, FL USA.
- Scheiber PA, M Tran, DR Duncan (2006) Tissue culture and transient transformation of Mareetail (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist). **Plant Cell Rep.** 25: 507-512.
- Schönbrunn E, S Eschenburg, WA Shuttleworth, JV Schloss, N Amrhein, JNS Evans, W Kabsch (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **PNAS** 98: 1376-1380.
- Seefeldt SS, JE Jensen, EP Fuerst (1995) Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technol.** 9: 218-227.
- Shyr YJ, AG Hepburn, JM Wildholm (1992) Glyphosate selected amplification of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in cultured carrot cells. **Mol. Gen. Genet.** 232: 377-382.
- Singh BK, DL Shaner (1998) Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technol.** 12: 527-530.
- Singer SR, CN McDaniel (1985) Selection of glyphosate-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants. **Plant Physiol.** 78: 411-416.
- Stalker DM, WR Hiatt, L Comai (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.
- Urbano JM, A Borrego, V Torres, JM Leon, C Jimenez, G Dineli, J Barnes (2007) Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. **Weed Technol.** 21: 396-401.
- VanGessel HJ (2001) Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. **Weed Sci.** 49: 703-705.
- Yu Q, A Cairns, S Powles (2007) Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta** 225: 499-513.
- Yuan, CI, YM Chen, MY Chiang (2001) Responses of *Dicliptera chinensis* to glyphosate. **Plant Prot. Bull.** 43: 29-38.
- Yuan CI, CM Chiang, MY Chiang (2002) Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. **Plant Sci.** 163: 543-554.
- Yuan CI, YC Hsieh, MY Chiang (2005a) Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan: dose-response and enzyme activity. **Plant Prot. Bull.** 47: 143-154.
- Yuan CI, YC Hsieh, MY Chiang (2005b) Glyphosate-resistant goosegrass in Taiwan: cloning of target enzyme (EPSPS) and molecular assay of field populations. **Plant Prot. Bull.** 47: 251-261.
- Yuan CI, YC Hsieh, LC Lin, MY Chiang (2006) Glyphosate-resistant broadleaf fleabane (*Conyza sumatrensis*): dose response and variation associated with target enzyme (EPSPS). **Plant Prot. Bull.** 48: 229-241.