

專 題 討 論

植物對 Glyphosate 抵抗性的 自然發生與人工改造

指導老師：常玉強 老師

報告學生：李冠德

地點：農藝館 112

時間： 03/03/13 A.M. 10：10

植物對 Glyphosate 抵抗性的自然發生與人工改造

摘要

雜草管理是影響作物生產的重要因素，殺草劑的使用現今仍為有效且主流的方式，Glyphosate 為目前最普及的殺草劑，除了效力特出之外，尚有對動物及環境的毒性與傷害低的優點，主要的作用是抑制 shikimate pathway 中，催化反應的酵素 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)，使反應停滯，影響植物正常生長。Glyphosate 與 PEP 競爭對 EPSPS 的結合，本文從 Glyphosate 的作用機制與 EPSPS 序列特性，討論抗 Glyphosate 轉殖作物和自發抗性雜草稀少的可能原因。EPSPS 蛋白質序列上有一段共同序列，推測為 EPSPS 的活性區，發現在 *E. coli* 中的 G⁹⁶→A，以及 *S. typhimurium* 中的 P¹⁰¹→S，這兩個位置的改變均會對 Glyphosate 產生抗性，單一位置的改變雖然使抗性提高，但卻降低了 PEP 的親和力，影響酵素原本的活性。此外，尚有 18 個胺基酸與 Glyphosate · S3P · EPSPS 複合體的結合和 3 個胺基酸與 EPSPS 由 open state 轉為 close state 有關，這些胺基酸有高度的同一性。現今抗 Glyphosate 轉殖作物主要使用 CP4 EPSPS 與 *gox* 基因。因自發突變的機率極小，要產生具抗性且酵素活性不降低的雜草生物型，除了突變的位置使 Glyphosate 的親和力降低，尚需其他位置突變修飾，使 PEP 的親和力維持，故自發抗 Glyphosate 雜草極為稀少。

I. 前言

「民以食為天」，糧食生產自古便是人類維持生存的第一等大事，影響作物生產的諸般要素裡，雜草管理始終是栽培過程中無可避免的課題，儘管環保與生態意識日漸高漲，許多非化學的雜草防除方式方興未艾，殺草劑的使用仍然是有效且主流的方法。然而，殺草劑發揮效用的前提在於雜草對殺草劑的敏感性，但在 1970 年代綠色革命之後，廣泛應用殺草劑的結果，使得對殺草劑具抵抗性的雜草生物型快速增加。直到 2003 年 2 月為止，全球已經發現在 163 個種屬中，有 272 個雜草抗殺草劑的生物型 (biotype)，分別對 18 種不同類型的殺草劑具有抵抗力(<http://www.weedscience.org/>)。雜草對殺草劑具抵抗力生物型的產生，是環境選擇壓力下的結果，選擇壓力通常指在田間長期施用同一種作用模式或代謝途徑的殺草劑，殺草劑選擇了自發的突變或原有具抵抗性的族群，淘汰了敏感性的個體 (Bradshaw *et al*, 1997)。

Glyphosate 由美國孟山都 (Monsanto) 公司研發出品，上市至今已有 30 年左右的歷史，為一種葉面噴施、廣效、非選擇性的系統性殺草劑，對禾本科及闊葉類雜草有良好且特出的防除效果。Glyphosate 主要的作用是抑制植物體內的 shikimate pathway 的倒數第二個步驟中，負責催化反應的酵素 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)。

mate-3-phosphate synthase (EPSPS) (E.C. 2.5.1.19)，使 shikimate pathway 不能持續合成芳香族胺基酸，讓許多二次代謝物，諸如木質素、葉黃素類、生物鹼等，因缺少芳香族胺基酸而無法合成，進而影響植物正常生長，終致死亡 (Baerson *et al*, 2002)。因為 shikimate pathway 僅存在植物與微生物中，動物體內至今尚無發現紀錄，加上 Glyphosate 在土壤中對多數不同形式的土壤粒子，有高度的吸附能力，相較其他種類的殺草劑，對動物和環境的毒性與傷害能夠減到最低 (Cobb *et al*, 2000)。由於種種優越的特性，使得 Glyphosate 很快的被普及應用到各種有關雜草控制的工作中。Glyphosate 除了毒性低與藥效顯著外，對 Glyphosate 具抵抗性雜草只有寥寥數種，也是被廣泛運用的主要原因之一，雖然作為商品大規模施用已有相當長的時間，但是，直到 1996 年起，才陸續在黑麥草 (*Lolium rigidum*)、多花黑麥草 (*Lolium multiflorum*)、牛筋草 (*Eleusine indica*) 與加拿大蓬 (*Conyza canadensis*) 等雜草中，發現具抗性的生物型，以及抗 Glyphosate 的華九頭獅子草 (*Dicliptera chinensis*) (Yuan *et al*, 2002；<http://www.weedscience.org/>)。

本文將針對殺草劑 Glyphosate，分析其抑制 EPSPS 的作用機制與 EPSPS 蛋白質序列的特性，探討抗 Glyphosate 轉殖作物的發展與自然界中對 Glyphosate 自發抵抗性雜草生物型稀少的可能原因。

II. Glyphosate 的作用機制與代謝

累積的研究成果顯示，Glyphosate 抑制所有植物、菌類及大部分細菌的 EPSPS。在植物體中，Glyphosate 對 shikimate pathway 的抑制具專一性。EPSPS 在葉綠體裡表現，負責催化 shikimate pathway 中，shikimate 3-phosphate (S3P) 與 phosphoenolpyruvate (PEP) 反應產生 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) 這個階段的進行，Glyphosate 與 PEP 之間的關係為競爭性抑制 (圖一)，同時也抑制 pre-EPSPS 從細胞核輸送到葉綠體表現。Glyphosate 並非直接和自由的 EPSPS 結合，使其無法與 PEP 作用，而是 S3P 先和 EPSPS 結合為 EPSPS · S3P 複合體，之後 Glyphosate 再與 EPSPS · S3P 複合體形成不具備酵素活性的 EPSPS · S3P · Glyphosate 複合體。不過，這個作用模式稍後被修正為 EPSPS 以隨機的方式與受質、產物、抑制物結合。儘管如此，並不會改變 Glyphosate 與 EPSPS 最後以 EPSPS · S3P · Glyphosate 複合體的形式存在，從而使反應停滯，無法繼續進行 (Bradshaw *et al*, 1997)。

此外，亦有研究發現，自然界的土壤中，有多種微生物能夠將 Glyphosate 分解為 aminomethylphosphonic acid (AMPA) 和 glyoxylate (圖二)。一種 glyphosate oxidoreductase 的基因從細菌 *Achromoobacter* sp. strain LBAA 中被鑑別選殖出來，對於將 Glyphosate 的 C-N 鍵破壞，分解成 AMPA，有相當高的效力，這個基因被賦予代號 *gox*。實驗得知，將 *gox* 基因藉由遺傳工程的技術，轉殖進入植物體中，轉殖植物對 Glyphosate 的確表現了高度的抵抗性 (Bradshaw *et al*, 1997；Cobb *et al*, 2000)。

III. EPSPS 基因特性與植物對 Glyphosate 抵抗性

隨著科學成就的日進千里，現代生物技術的突破讓我們得以進入分子層次，探討基因表現的意義與功能，各種生物的基因序列陸續被解碼定序，因物種間親疏遠近的同源演化關係，經由比對不同生物相似功能的基因序列，找出那些基因序列值得相互參照，那些卻又互不符應，進而推測基因的功能與意義，也就成為極有效的方法。研究發現，倘若 *E. coli* 的 EPSPS 蛋白質序列上，以 alanine 取代原本的 glycine⁹⁶（即 EPSPS 序列上第 96 個胺基酸），或者是 *Slmonella typhimurium* 中，EPSPS 蛋白質序列的 proline¹⁰¹ 改變為 serine，都會影響 EPSPS 對 Glyphosate 的敏感性（Padgett *et al*, 1996；Yuan *et al*, 2002）。其中 *E. coli* 這個位置的改變，使 EPSPS 一半活性被抑制的 Glyphosate 需要量（IC₅₀）增加超過 500 倍，若將矮牽牛、蕃茄、阿拉伯芥、大豆、玉米在相對 *E. coli* 的同一位置進行 glycine→alanine 的變換，EPSPS 被 Glyphosate 抑制的 IC₅₀ 值均有顯著的升高（表一）（Padgett *et al*, 1991），證實這個位置的確與對 Glyphosate 的抗性有關。比較不同的 EPSPS 序列後發現，無論是 *E. coli* 的 glycine→alanine 或是 *Slmonella typhimurium* 的 proline→serine，改變的位置都是屬於 EPSPS 序列上的一段共同序列（consensus sequence）（表二）（Padgett *et al*, 1991），推測這一段序列應與 Glyphosate 的結合有重要關係。不過，在野生型的矮牽牛（*Petunia hybrida* L.）EPSPS 上，使 glycine¹⁰¹ 突變為 alanine，K_m〔PEP〕值由 5.0 μM 增加為 210 μM，表示 PEP 與 EPSPS 之間的親和力下降了 72 倍，這個結果顯示，PEP 與 EPSPS 的結合位置也在這段序列上（Padgett *et al*, 1996；Yuan *et al*, 2002）。因此，可以推知 PEP 與 Glyphosate 競爭同一作用位置。

如上所述，單獨改變 EPSPS 序列上保守區的關鍵胺基酸，固然能夠使 K_i〔Glyphosate〕值大幅提高，使抗 Glyphosate 的效果明顯增強，但相對的，K_m〔PEP〕值也同時提高（Padgett *et al*, 1996；Cobb *et al*, 2000），PEP 與 EPSPS 結合的能力減弱，酵素催化能力不足，使 shikimate pathway 進行滯緩，對植株生長產生不利的影響。於是，為了彌補單一位置突變使酵素活性降低的缺失，突變第二個位置的胺基酸，修飾 EPSPS 基因，使酵素活性的損失維持在可以接受的範圍，便成為必要的舉措，譬如 Thr¹⁰²→Ile 和 Gly¹⁰¹→Ala 或 Pro¹⁰⁶→Ser 配對突變（Cobb *et al*, 2000）。此外，實驗證明，使用矮牽牛的 EPSPS，突變 G101A，G144D；G101A，P167S；G101A，A192T 三組二個位置，然後進行酵素動力學分析，結果如表三，比起 G101A 這個對照實驗，K_m〔PEP〕值均有下降，雖然 K_i〔Glyphosate〕值也下降，但如果將兩個值衡諸於比值關係，K_i〔Glyphosate〕/K_m〔PEP〕，單一突變與二個位置突變所得的結果並無明顯差距。然而，控制 PEP 與 EPSPS 濃度的，在 200 μM PEP 和 500 μM Glyphosate 的條件下，G101A，G144D 這組突變株的 mRNA 預估需要過量表現 8 倍，才能維持與野生型相同的 EPSPS 產量，而 G101A 這組要達到相同的 EPSPS 產量，mRNA 需要過量表現 31 倍（Padgett *et al*, 1996），顯然，在有限的 PEP 下，只要 Glyphosate 的濃度不要太高，二個位置突變的 EPSPS 活性高過單一位置突變的活性。

但是，並非 EPSPS 序列保守區上的任一位置隨意突變，均能對 Glyphosate 產生抗性，在 *E. coli* 中表現矮牽牛的 EPSPS，將 Gly⁹⁶ 突變為 Ser，原本 EPSP Synthase 活性會消失，反倒產生 EPSP 水解酶 (EPSP hydrolase) 的活性，使 EPSP 分解為 S3P 和丙酮酸 (pyruvate)。然而，將矮牽牛 EPSPS 上，Pro¹⁰¹ 突變為 Ser，則 K_m [PEP] 值提高到 44 μ M， K_i [Glyphosate] 值也稍微上升至 3 μ M (Padgett *et al*, 1991)，顯然產生抵抗性所需改變的胺基酸並非一體適用，在不同物種間，仍有差異存在。

亦有研究指出，*E. coli* 的 EPSPS 與 Glyphosate、PEP、S3P 結合有關的胺基酸為 Lys²²、Ser²³、Arg²⁷、Asn⁹⁴、Gly⁹⁶、Arg¹²⁴、Ser¹⁶⁹、Ser¹⁷⁰、Gln¹⁷¹、Ser¹⁹⁷、Tyr²⁰⁰、Asp³¹³、Asn³³⁶、Lys³⁴⁰、Glu³⁴¹、Arg³⁴⁴、Arg³⁸⁶、Lys⁴¹¹ (圖三)，而 Arg¹⁰⁰、Asp²⁴²、Asp³⁸⁴ 則是 PEP 與 EPSPS 結合時，構型由 open satate 轉為 close satate 的關鍵，若將此三個位置突變為 R100A、D242A、D384A，EPSPS 的活性將會降低 (Schönbrunn *et al*, 2001；Yuan *et al*, 2002)。

IV. Glyphosate 與轉殖作物

1990 年代開始，利用基因工程技術發展的抗 Glyphosate 作物紛紛問世，抗 Glyphosate 作物的發展主要利用三種不同的抗性產生模式，1)使目標位置 EPSPS 過量表現；2)修改目標位置 EPSPS 序列，使蛋白質構型改變，降低與 Glyphosate 的親和力；3)轉殖分解 Glyphosate 的基因進入植物體內表現 (Bradshaw *et al*, 1997)。

擴增 EPSPS 基因的表現量發展對 Glyphosate 的抗藥性是可行的方法之一，但是，這類方式所表現的抵抗性卻僅止於組織培養的狀態，或是植株遭受 Glyphosate 選擇壓力的當下。許多報告指出，因 EPSPS 活性增加或 mRNA 產量擴增所帶來的抗性，往往時間短暫，且在 Glyphosate 壓力移除時隨之消失，雖然這種特性似乎可以遺傳給子代，但在田間栽培的環境，能否提供穩定充足的抵抗性，仍然沒有明確的定論 (Bradshaw *et al*, 1997；Cobb *et al*, 2000)。

相比之下，後兩種模式的可行性較高。修改目標酵素 EPSPS，減低其與 Glyphosate 之間的親和力，證明能使植株產生抵抗性，然而，Glyphosate 和 PEP 對 EPSPS 的結合是競爭性關係，經由突變一到二個胺基酸，雖然能產生抗性，實際應用到田間，卻不符合商業效益。現今最普遍且具經濟規模的抗 Glyphosate 轉殖作物，使用的 EPSPS 來自 *Agrobacterium* sp. strain CP4，一般稱為 CP4 基因， K_i [Glyphosate] 值為 2.7mM， K_m [PEP] 值為 12 μ M (表三)，CP4 基因是自然演化的結果，非人力強加改變，相對於在高等植物進行人工誘變所得的 EPSPS 基因，有高抗性的優點，而無酵素活性低的缺點。同時，CP4 EPSPS 與植物或其他微生物的 EPSPS 基因只有 49~59% 的相似度，而差異卻高達 23~41%，因此，一般雜草難以經由自發突變，發展出相似特性的 EPSPS，一般認為，Gly→Ala 是 CP4 基因高抗性的重要因素。CP4 基因現已轉植入大豆、玉米、油菜、棉花等作物中 (Bradshaw *et al*, 1997；Cobb *et al*, 2000)。

此外，在植物體內表現分解 Glyphosate 的基因，迅速將 Glyphosate 的毒性分解，也是抗 Glyphosate 作物的發展模式之一，這種方法的運用能夠使殺草劑達到雜草防除的目的，卻不損及作物本身的生長，由細菌 *Achromobacter* sp. strain LBAA 選殖出的 *gox* 基因，現已轉殖進入大豆、玉米、萵苣中。在商業應用上，通常將 *gox* 基因與 CP4 EPSPS 基因一同轉入作物中，以發揮最大的功效 (Cobb *et al*, 2000)。

V. 討論

將大豆、水稻、阿拉伯芥三種植物 EPSPS 的 DNA 序列，分別就 intron 和 exon 的數目進行比較 (圖四)，exon 的長度大致吻合，相差僅有數個鹼基對 (bp)，除了物種相異的影響，也可能是不同作者採取的定序策略不同所致，反觀 intron，在長度上呈現極大的紛雜，甚至相差 2000bp 以上，推測應是不同物種在演化方向上的不同產生的變異，但 intron 的變異對 EPSPS 表現的實質影響，仍有待進一步的釐清。

EPSPS 與 Glyphosate、S3P、PEP 結合相關的胺基酸有 18 個，和構型從 open state 轉為 close state 進行反應的關鍵胺基酸有 3 個，比較數種不同的 EPSPS 相關序列後 (圖五)，根據差異性可大致區別出植物與微生物兩群，以 *E. coli* 序列為計數基準，影響 EPSPS 開閉之 Arg¹⁰⁰、Asp²⁴²、Asp³⁸⁴ 和與受質結合關係較大的 Lys²²、Ser²³、Arg²⁷、Asn⁹⁴、Gly⁹⁶、Arg¹²⁴、Ser¹⁶⁹、Ser¹⁷⁰、Gln¹⁷¹、Ser¹⁹⁷、Tyr²⁰⁰、Asp³¹³、Asn³³⁶、Lys³⁴⁰、Glu³⁴¹、Arg³⁴⁴、Arg³⁸⁶、Lys⁴¹¹，均呈現了相當高度的同一性，推測這些位置是維持酵素活性的重要關鍵，種與種之間的差異應是與其他位置的不同有關。自發突變的抗 Glyphosate 牛筋草，比較敏感性和抵抗性二種生物型的序列後，有二個位置的胺基酸改變，其中 Pro¹⁰⁶→Ser 經由單點突變試驗得知，與抵抗性的產生密切相關，而此點位在受質結合區內，高度保守的序列，而 Pro³⁸¹→Leu 距離活性區遙遠，也非與受質結合關係重要的胺基酸，可能修飾前一位置的突變，使 EPSPS 與 PEP 的結合更為緊密 (Baerson *et al*, 2002)。華九頭獅子草是另一種抵抗性的雜草，比較序列後，有多處不同於它種 EPSPS，如 Glu⁵² 取代原本的 Asp、Lys⁷⁶ 取代 Arg、Val¹⁸³ 取代 Gly、Ile²³⁸ 取代 Val，以及 EPSPS-1 中 Cys³⁷⁴ 取代 Lys，這些胺基酸與被取代者，普遍具有相似性，可能不對 EPSPS 活性造成重大影響，卻增加了對 PEP 的親和力或降低了對 Glyphosate 的親和力 (Yuan *et al*, 2002)。目前最具實用價值的 CP4 基因，與其他物種的相似度甚低，其中 Ala¹⁰⁰ 被認為是高抵抗性的主要原因 (Bradshaw *et al*, 1997；Cobb *et al*, 2000)。

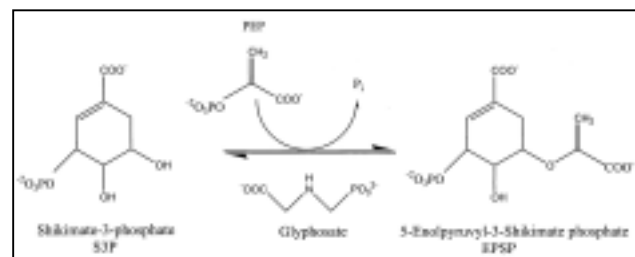
抗 Glyphosate 轉殖作物的發展主要是模仿自然狀態下，抵抗性發生的作用機制，如果只是改變胺基酸序列上的一到兩個胺基酸，抵抗性確實得到表現，但離田間應用尚有距離。除了 Glyphosate 的親和力降低外，同時也減弱 PEP 的親和力，使酵素活性不足以應付反應所需。第二個可能原因，酵素 EPSPS 在植物細胞的葉綠體內表現，然而，位在 *aroA* 序列上的 EPSPS 基因突變後，並不一定能

準確的將 EPSPS 輸送到葉綠體中。關於這點，將 *aroA* 序列上的 EPSPS 基因突變後接上矮牽牛的葉綠體輸送銑鈦（chloroplast transit peptide）後，選殖進入菸草中，由轉殖菸草對 Glyphosate 產生抵抗性得到證明（Cobb *et al*, 2000）。因此，抗 Glyphosate 轉殖作物目前仍以 *gox* 基因和 CP4 EPSPS 基因的運用為主要方式。

綜上所述，因自然界中自發突變的機率極低（ $10^{-6} \sim 10^{-8}$ ），若要產生對 Glyphosate 具抵抗性的雜草生物型，突變的位置必須恰巧在 EPSPS 與受質結合的關鍵位置，關鍵位置的改變卻同時必須面對 PEP 親和力降低的負面影響，若無其他位置隨之改變修飾更改後的基因，酵素活性降低必然影響植物體正常的生理功能，在生存上反而處於劣勢。因此，自發雜草的產生在選擇壓力的存在外，尚需要突變的基因相互配合，這也是抗 Glyphosate 雜草生物型不易發現的主要原因。

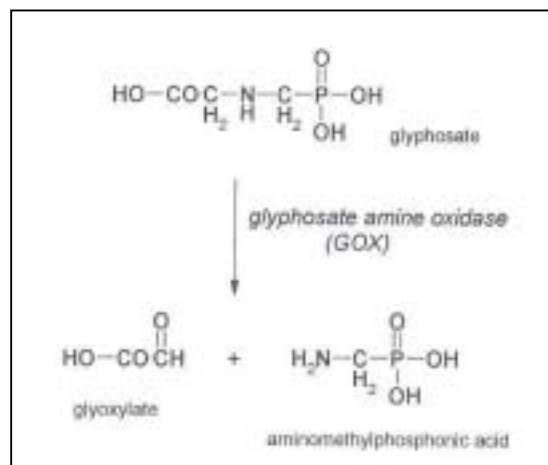
圖一：

Glyphosate 與 PEP 為競爭性抑制
（Schönbrunn *et al*, 2001）



圖二：

Glyphosate 的分解，藉由 *gox* 基因產生的 glyphosate oxidoreductase 催化反應（Cobb *et al*, 2000）



表一：

野生型與 Gly→Ala 突變之 EPSPS 的 酵素活性與 IC₅₀(glyphosate) (Padgett *et al*, 1991)

EPSPS	IC ₅₀ (Glyphosate)	
	Wild-type (mM)	G96A variant (mM)
Petunia	0.030	17
<i>E. coli</i>	0.032	76
Tomato	0.006	32
Arabidopsis	0.037	19
Soybean	0.025	18
Maize	0.014	9

表二：

EPSPS 序列中，與 *E. coli* 之 Gly⁹⁶ 相對應共同序列比較 (Padgett *et al*, 1991)

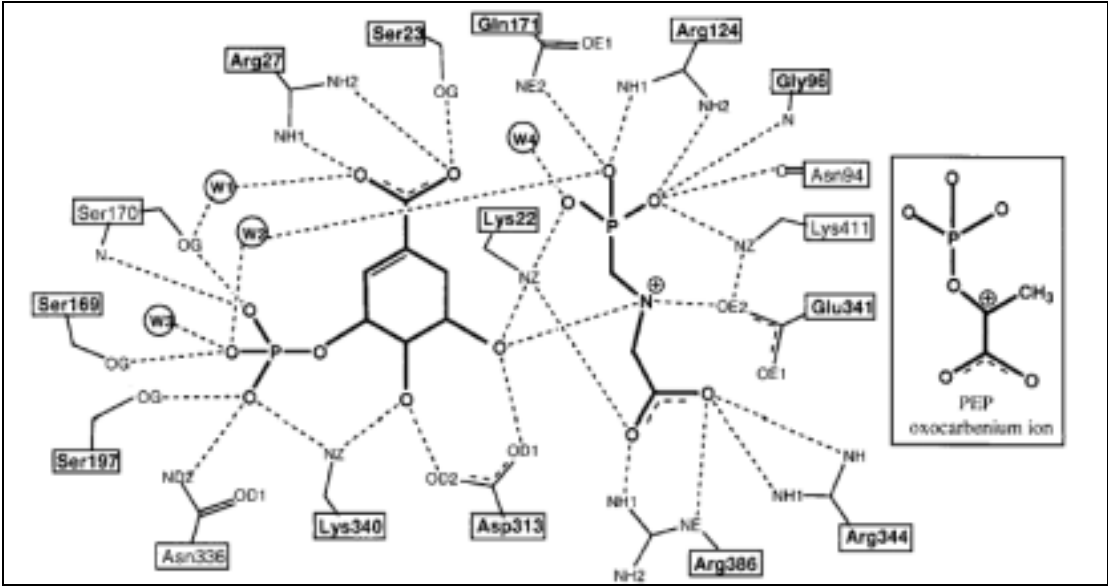
EPSPS source	Sequence		
<i>E. coli</i>	L ⁹⁰ F LGNAG ⁹⁶	TAMRP ¹⁰¹	L ¹⁰²
<i>S. typhimurium</i>	L ⁹⁰ F LGNAG ⁹⁶	TAMRP ¹⁰¹	L ¹⁰²
Petunia	L ⁹⁵ F LGNAG ¹⁰¹	TAMRP ¹⁰⁶	L ¹⁰⁷
Tomato	L ⁹⁵ F LGNAG ¹⁰¹	TAMRP ¹⁰⁶	L ¹⁰⁷
Arabidopsis	L ⁹⁶ Y LGNAG ¹⁰¹	TAMRP ¹⁰⁶	L ¹⁰⁷
<i>B. napus</i>	L ⁹⁶ Y LGNAG ¹⁰¹	TAMRP ¹⁰⁶	L ¹⁰⁷
Soybean	L ⁹⁸ F LGNAG ¹⁰⁴	TAMRP ¹⁰⁹	L ¹¹⁰
Maize ^a	L ⁹⁵ F LGNAG ¹⁰¹	TAMRP ¹⁰⁶	L ¹⁰⁷
<i>A. nidulans</i> ^b	L Y LGNAG	TASRF	L
<i>S. cerevisiae</i> ^b	L Y LGNAG	TASRF	L
<i>B. pertussis</i>	L ⁹⁰ F LGNAG ⁹⁶	TAFRP ¹⁰¹	L ¹⁰²
Consensus ^c	L X LGNAG	TAXRX	L

表三：

數種 EPSPS 之酵素動力學參數 (Padgett *et al*, 1991 , 1996 ; Barry *et al*, 1992)

EPSPS Source	K _m (PEP) (μ M)	K _i (glyphosate) (μ M)	K _i (glyphosate)/ K _m (PEP)
<i>E. coli</i>	8	0.16	0.02
Petunia	5	0.4	0.08
Petunia G101A	210	2000	9.5
Petunia G101A,G144D	47	330	7.0
Petunia G101A,P167S	35	238	6.8
Petunia G101A,A192T	54	670	12.4
Petunia P106S	44	3	0.07
CP4	12	2700	225

圖三：



EPSPS · S3P · Glyphosate 複合體概要圖，配體以粗線表示，虛線代表氫鍵和離子之間的聯繫，與複合體連結高度相關的胺基酸以方框框起，W1 到 W4 表示溶質分子，Tyr-200 未列圖上（Schönbrunn *et al*, 2001）。

圖四：

Exon	Intron								
		E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	I4
大豆		323	864	243	358	159	634	216	76
水稻		313	704	2448	1158	277	211	93	
阿拉伯芥		3398	7245	8515	4233	215	81		
		E5	I5	E6	I6	E7	I7	E8	
大豆		117	2268	210	1831	63	84	219	
水稻		1192	16210	237	62	111	219		
阿拉伯芥		1181	3921	175	62	86	219		

單位：bp

大豆、水稻、阿拉伯芥 EPSPS 之 exon 和 intron 數目比較（Warner *et al*, 2002；Klee *et al*, 1987；Wu *et al*, 2001）

圖五：

<i>E. coli</i>	(1)	-----MESLTLPFIARVDGTLPGSESVSNRALLAALAHKSTVLTNLLSDQVNRMLNALTALGVSYTLSDIRNCEIDGGPLHAG-----ALSL	100
<i>typhimurium</i>	(1)	-----A-----C-----S-----D-----T-----A-----K-----P-----	
<i>chinesis-1</i>	(1)	---KPPAVPEIV...KDIS...VE...L...V...SE...E...VE...S...E...HT...G...KT...LAVHEIKANNAVVE...CV...QFP...SESGDEIVQ	
<i>chinesis-2</i>	(1)	---KPPAVPEIV...KDIS...VE...L...V...SE...E...VE...S...E...HT...G...KT...LAVHEIKANNAVVE...CV...QFP...SESGDEIVQ	
<i>goosegrass-5</i>	(1)	---AGA...EVV...KEIS...VE...L...I...S...E...E...VD...N...E...HT...G...KT...L...VEAIKAAR...AVVV...C...EPPV...KDAKHEVQ	
<i>goosegrass-R</i>	(1)	---AGA...EVV...KEIS...VE...L...I...S...E...E...VD...N...E...HT...G...KT...L...VEAIKAAR...AVVV...C...EPPV...KDAKHEVQ	
<i>A. sp. CP4</i>	(1)	MSHGASSRPA...ARKSSGLS...VRL...D...I...SPMFG...S...E...RI...G...BGE...INTGX...MQ...M...ARIRKEG...TWIINGV...N...L...AP...AP-----	
Consensus	(1)	AMKEIVLQPIKIDISGTVLPGSESKSRRILLALLAALAGSTTVVNL SEDVHYMLGAETLGLSVH DKA KAVVAGCGG SPAREDADEIVQL	
<i>E. coli</i>	(91)	FLGNAGTANRFLAAALCLGSN---DIVLTGEPKRRHPDGHVDAIRLGGAKITTYLEQENTFPPLKLG---GFTGGWYVDGCVSSSQFLTALLNTAPLAPED	200
<i>typhimurium</i>	(91)	-----Q-----H-----S-----Q-----N-----D-----S-----DIE	
<i>chinesis-1</i>	(99)	...L...VVAAGGNATY...D...V...K...D...IG...KQL...DVICFLGTNC...V...V...EG...LP...E...KLS...Y...S...L...G	
<i>chinesis-2</i>	(99)	...L...VVAAGGNATY...D...V...K...D...IG...KQL...DVICFLGTNC...V...V...EG...LP...E...KLS...Y...S...L...G	
<i>goosegrass-5</i>	(97)	...L...VVAAGGNATY...D...V...K...D...IG...KQL...DVICFLGTNC...V...V...EG...LP...E...KLS...Y...S...L...G	
<i>goosegrass-R</i>	(97)	...L...VVAAGGNATY...D...V...K...D...IG...KQL...DVICFLGTNC...V...V...EG...LP...E...KLS...Y...S...L...G	
<i>A. sp. CP4</i>	(95)	DP...A...GC...LTNGLVGVTP---DSTPI...DASLTK...M...KVLNP...NNL...VQVSEHG---DGL...VILM---PKTPTPTITYVPMASAGVKSALL...G...NTNG	
Consensus	(101)	FLGNAGTANRFLTAAY AAGGA TVLDGVTPKRRHPDGLV GLKQLGADVDCFLGTNCPFPVVEG GGLPGKEVLLGCVSSSQFLTALLNSAPLALGD	
<i>E. coli</i>	(187)	TVIRKIGDLVSEPTIDITLMLNETPGVIRHN---QHTQQVYFEG---GQSTQSPGYLVEGNASSASYPLAAAAREGTVKVTGIGNNSNGDINFAVLE	300
<i>typhimurium</i>	(187)	...I...V...E...E...H...Q...H...E...G...K...E...	
<i>chinesis-1</i>	(199)	VE...E...VDK...I...V...VEN...E...ER...YV...HT...DWDVL...LIR...E...E...NAP...G...VI...T...E...C...TS...L...VE...E...	
<i>chinesis-2</i>	(199)	VE...E...VDK...I...V...VEN...E...ER...YV...HT...DWDVL...LIR...E...E...NAP...G...VI...T...E...C...TS...L...VE...E...	
<i>goosegrass-5</i>	(197)	VE...E...IDK...I...L...VEN...E...ER...KA...HS...DWDVL...YL...E...E...KNAY...G...T...T...E...C...TS...L...VE...E...	
<i>goosegrass-R</i>	(197)	VE...E...IDK...I...L...VEN...E...ER...KA...HS...DWDVL...YL...E...E...KNAY...G...T...T...E...C...TS...L...VE...E...	
<i>A. sp. CP4</i>	(190)	ITIV...EP...LNR...HTEKMLAGGAGLTV...TDAGVRIIRLEGK...KLT...VIDV...DPSSTAPPLV...ALLVPGSDVFTLM...LNRPTITGLITLQENAGDI	
Consensus	(201)	VEIRIIDGLISIPVENTLILMERPGV IEHS D WDFLIRG GQKTESPGNAPVEGNASSASYPLAARITGCTVTVBGCCTSSLQGVFAEYLE	
<i>E. coli</i>	(282)	EMGATICWDDYISCT-----HSELNADIDMNHIP---DAAMTATAALFARGDTTLNNTYNNVRETDRLFAMATELNKVGAEVHGHDYIRITP	400
<i>typhimurium</i>	(282)	-----L...F...A-----H-----L-----L-----	
<i>chinesis-1</i>	(295)	...VS...TENSIVV...GPPR...VPGKH...E...VM...EM...W...L...VV...D...P...AI...DVAS...E...ML...IC...CL...E...P...CI...	
<i>chinesis-2</i>	(295)	...VS...TENSIVV...GPPR...VPGKH...E...VM...EM...W...L...VV...D...P...AI...DVAS...E...ML...IC...CL...E...P...CI...	
<i>goosegrass-5</i>	(293)	M...KVL...TETSIVV...GPQREFFGKH...E...VM...EM...W...L...VV...D...P...AI...DVAS...E...MV...IR...T...L...S...P...CI...	
<i>goosegrass-R</i>	(293)	M...KVL...TETSIVV...GPQREFFGKH...E...VM...EM...W...L...VV...D...P...AI...DVAS...E...MV...IR...T...L...S...P...CI...	
<i>A. sp. CP4</i>	(290)	VIMPLAGGEDVADLR-----VRSST...KGVTVFEDRA...SMI...EYPL...V...E...A...VMDGLEH...S...S...V...NG...KLN...VQCD...HTSLVYRG	
Consensus	(301)	EMGAKVTWTE SVTVGP K GKHLEKADVMMNMP DVAMTANVALFADGPTAINDVASWVWHTERMLAI TELKELGASVHG DYCIIITP	
<i>E. coli</i>	(371)	P-----SELNFAETATYNDHMANCFSLVALS-DTPVTILDPCTARTFPDNYBGLARISQAA-----	472
<i>typhimurium</i>	(371)	-----A...QL...D...G-----M...TPA-----	
<i>chinesis-1</i>	(391)	...VTA...D...D...A...A...CA...V...E...G...E...N...DV...STY...NEI-----	
<i>chinesis-2</i>	(391)	...VTA...D...D...A...A...CA...V...E...G...E...N...DV...STY...NEI-----	
<i>goosegrass-5</i>	(390)	...VTA...D...D...A...A...CA...V...E...G...E...N...DV...STYVEN-----	
<i>goosegrass-R</i>	(390)	...VTA...D...D...A...A...CA...V...E...G...E...N...DV...STYVEN-----	
<i>A. sp. CP4</i>	(384)	PPDGGLGNAGG...AV...HL...I...S...LVNG...VSEN...VD...ATNLIAT...EFMDLMAGLGAKIELSDTKAA	
Consensus	(401)	P SELNVTATDYDIHMANAFSLAACA DWPVTIKIPCTARTFPDNYBGLSTPS	

數種 EPSPS 蛋白質序列比較，分別比較 *E. coli*、*S. typhimurium*、*D. chinesis-1*、*D. chinesis-2*、*E. indica-S*、*E. indica-R*、*A. sp. CP4* 的成熟 EPSPS 蛋白質序列 (Accession Nos.: P07638、P07637、AF371695、AF371696、AJ417033、AJ417034、Q9R4E4)，*表 18 個與 Glyphosate · S3P · EPSPS 複合體結合有關的胺基酸，+表有 EPSPS 由 open state 轉為 close state 有關的胺基酸。

【引用書目】

- Bradshaw LD, Padgett SR, Kimball SL, Wells BH** (1997) Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technol* **11**: 189–198
- Baerson SR, Rodriguez DJ, Tran M, Feng Y, Biest NA, Dill GM** (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol* 2002 Jul;129(3):1265-75
- Barry, GF, Kishore GM, Padgett SR** (1992) World Patent WO 9204449
- Cobb AH, Kirkwood RC** (2000) *Herbicides and their Mechanisms of Action*. CRC Press, Boca Raton, FL
- Klee HJ, Muskopf YM, Gasser CS** (1987) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* 210(3) : 437-442
- Padgett SR, Re DB, Barry GF, Eichholtz DE, Delannay X, Fuchs RL, Kishore GM, Fraley RT** (1996) New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. *In* S Duke, ed, *Herbicide Resistant Crops: Agricultural, Economic, Environmental, Regulatory, and Technological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp53–84
- Padgett SR, Re DB, Gasser CS, Eichholtz DA, Frazier RB, Hironaka CM, Levine EB, Shah DM, Fraley RT, Kishore GM** (1991) Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. *J Biol Chem* 266: 22364–22369
- Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JNS, Kabsch W** (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1376–1380
- Warner SA, Hawkes TR, Andrews CJ** (2002) Patent: WO 0226995-A 36 04-APR-2002
- Wu L, Nagano H, Yoshida K, Kawasaki S, Kishima Y, Sano Y** (2001) Mapping of the sequences expressed in the rice callus onto a BAC contig: identification of a genomic segment carrying closely linked genes encoding EPSP synthase and rps20. Unpublished
- Yuan CI, Chiang MY, Chen YM** (2002) Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. *Plant Sci* 163(3): 543-554