

國立中興大學農藝學系
Department of Agronomy
National Chung Hsing University
碩士學位論文
Master Thesis

台灣除草劑抗性雜草的蒐集與鑑定

Collection and identification of herbicide-resistant
weeds in Taiwan

National Chung Hsing University

指導教授：王慶裕博士 Ching-Yuh Wang

研究生：吳士顯 Shi-Xian Wu

中華民國一百零八年七月

July, 2019

國立中興大學 農藝 學研究所

碩士學位論文

題目：台灣 除草劑抗性雜草的蒐集與鑑定

姓名：吳士顯

學號：7106031212

經口試通過特此證明

論文指導教授

王廣裕

論文考試委員

蔣靜琪

黃年君

中華民國 108 年 7 月 26 日

誌謝

入學前耳聞老師即將退休，指導研究生意願不高，但與老師洽談後，仍舊於年近退休時收下學生，在此非常感謝老師，並且在入學後的報告與論文撰寫上，審慎地指出學生邏輯與書寫方面的錯誤。除此之外老師似乎害怕學生因研究所課業壓力而消瘦，因此常與學生分享零食與水果，使學生在研究所中，體重仍有上升的趨勢。也感謝於剛入學時榮耀學長與嘉雯學姊的熱情，使學弟我能更快的融入農藝系與實驗室的步調中，也感謝學長重光共同處理實驗室大小事務，且在有需要的時候伸出援手。

非本科系出身的我，初進入農藝系研究所就讀時，心中多少有些面對陌生環境的忐忑不安，但農藝系老師們與同學們的熱情，在各種活動上也都不吝於邀請我，讓我的擔心直接煙消雲散，因此碩士兩年時光中，過的非常多采多姿。

碩士短短兩年時間，雖然非常忙碌，卻也非常充實，但仍不免俗要特別感謝家人的支持，能讓我於求學過程中，沒有經濟上的壓力，專心完成學業，在壓力大時，也能回家喘息與休憩。最後再次感謝老師兩年來的教導。

摘要

使用除草劑為管理傳統作物田間雜草的重要方法，但重複施用相同除草劑，會使田間雜草演化出具有除草劑抗性的生物型(biotype)。台灣國內自 1963 年起，開始登記與使用除草劑，迄今已超過 50 年，長年以來，鮮有正式的調查論文資料，因此，為了及時發現台灣抗性雜草生物型，本研究擬建立一個完整的通報系統，以較有效的方式接受通報與鑑定抗性雜草生物型。本研究經農民聯繫通報後，約定現場勘查，並採樣取回經施藥後疑似抗性之雜草植株，於校內溫室中栽培，經移植後 30 天內觀察後，初步判定是否具有抗性之可能性，如有疑似抗性，則陸續收集種子，育苗進行幼苗之劑量反應分析。根據 2018 年 5 月結果顯示，目前五案例中，其中四個案例之雜草樣本可能具有抗性，且發現其中三案例之農地有長年施用相同除草劑之記錄。本論文主要以大村葡萄園農地為例，以疑似對於固殺草(glufosinate)與快伏草(quizalofop)具有抗性之牛筋草[goosegrass, *Eleusine indica* (L.) Gaertn.]為材料，說明該案例疑似固殺草、快伏草、嘉磷塞抗性牛筋草之觀察與抗性鑑定流程，結果顯示該葡萄園之牛筋草，普遍具有低程度固殺草抗性，部分具有高程度快伏草抗性，但對於嘉磷塞極敏感；三樣本(DC4、DC7、DC8)後代對於固殺草與快伏草具有多重抗性。

Abstract

Using herbicides is an important way to control weeds in traditional crop field, but repeating use of the same herbicide will enforce weeds to evolve herbicide resistance. Chemical herbicides have been registered and used in Taiwan since 1963, more than 50 years. However, there is little formal survey. In order to detect herbicide resistant weeds in time, this study focused on the establishment of a complete notification system to collect and identify resistant weeds more efficiently. After receiving notification from farmers, we will prepare to sample putative herbicide-resistant weeds. All weeds sampled were cultivated in greenhouse, and herbicide damage of these weeds were observed within 30 days after transplanting. If weed has a suspected herbicide resistance, its seeds will be collected and planting for subjecting to dose-response analysis.

According to the results of five cases, weed samples from four of them may be resistant to herbicides. And record of applying the same herbicide for many years have been found in three cases. This study mainly focused on the herbicide resistance in goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn] from DaCun vineyard, and to establish the standard of procedure for observation and identification of resistance to glufosinate, quizalofop-ethyl, and glyphosate. The results showed that the goosegrass from DaCun vineyard generally had low-level herbicide resistance to glufosinate, and some had high-level herbicide resistance to quizalofop-ethyl, whereas all goosegrass sampled was extremely sensitive to glyphosate. Three biotypes (DC4, DC7, DC8) also showed a multiple resistance to glufosinate and quizalofop-ethyl.

目次

	頁次
摘要	i
Abstract	ii
目次	iii
表目次	iv
圖目次	vii
附錄目次	x
第一章 緒言	1
第二章 前人研究	3
第三章 材料與方法	18
第四章 結果與討論	27
一、 案例觀察報告	27
二、 單一抗性鑑定	53
三、 交叉抗性	62
四、 多重抗性	63
第五章 結語	65
第六章 參考文獻	66
附錄	75

表目次

表 1. 屏東縣里港鄉出現疑似巴拉刈(paraquat)與固殺草(glufosinate)抗性牛筋草收集系之案例。調查時間：2017 年 9 月 17 日；調查結束時間：2017 年 10 月 15 日。註：第一案例為首次調查，觀察 28 天，而後案例預設觀察 30 天。	30
表 2. 彰化縣大村鄉出現疑似快伏草與固殺草抗性牛筋草、馬齒莧與水蜈蚣收集系之案例報告，調查時間：2017 年 9 月 30 日；調查結束時間 2017 年 10 月 30 日。	34
表 3. 屏東縣崁頂鄉出現疑似固殺草抗性香附子收集系之案例報告，發現時間：2017 年 10 月 21 日；調查結束時間 2017 年 11 月 20 日。	39
表 4. 台中縣大雅區出現疑似固殺草與 2,4-D 抗性收集系之小葉灰藿、野莧菜、與龍葵，調查時間：2018 年 1 月 17 日，調查結束時間 2018 年 2 月 21 日。因生長狀況持續變化，觀察時間延長至 35 天。	43
表 5. 彰化縣二林鎮西斗里出現疑似固殺草之抗性牛筋草收集系。調查時間：2018 年 4 月 23 日；調查結束時間 2018 年 5 月 23 日。...	48

表 6. 牛筋草抗感性生物型於固殺草施用後 20 天，依據傷害指數所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差) 54

表 7. 牛筋草抗感性生物型於固殺草施用後 20 天，依據存活率所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差) 55

表 8. 牛筋草抗感性生物型於快伏草施用後 45 天，依據傷害指數所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差) 57

表 9. 牛筋草抗感性生物型於快伏草施用後 45 天，依據存活率所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差) 58

表 10. 牛筋草抗感性生物型於嘉磷塞施用後 30 天，依據傷害指數所得到的抗性指數，S 為牛筋草針對固殺草之感性生物型，DC1-8 為彰

化大村牛筋草針對固殺草之抗性生物型後代，嘉磷塞抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ (ED₅₀ 為平均值±標準誤差) 60

表 11. 牛筋草抗感性生物型於嘉磷塞施用後 30 天，依據存活率所得到的抗性指數，S 為牛筋草針對固殺草之感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草針對固殺草之抗性生物型後代，嘉磷塞抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ (ED₅₀ 為平均值±標準誤差) 61



圖目次

- 圖 1. 牛筋草幼苗施用固殺草後之傷害指數。左上角數字為傷害指數 (0-5)。 23
- 圖 2. 牛筋草幼苗施用快伏草後之傷害指數。左上角數字為傷害指數 (0-5)。 24
- 圖 3. 牛筋草幼苗施用嘉磷塞後之傷害指數示意圖。左上角編號為傷害指數(0-5)。 25
- 圖 4. 牛筋草里港收集系 (Accession LG) 之疑似抗性收集系之傷害指數變化圖，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數 (0-5)；0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 31
- 圖 5. 牛筋草 (goosegrass, *Eleusine indica*) 疑似抗性之大村收集系 (Accession DC1-8) 傷害指數變化，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數 (0-5)；0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 35
- 圖 6. 馬齒莧 (common purslane, *Portulaca oleracea*) 疑似抗性之大村收集系 (Accession DC1-6) 傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為

傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 36

圖 7. 水蜈蚣(*green killinga, Ktylinga brevifolia*)疑似抗性之大村收集系 (Accession DC)傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 37

圖 8. 香附子(*purple nutsedge KD1-10*)疑似抗性之崁頂收集系傷害指數變化圖。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 40

圖 9. 小葉灰藿(*small goosefoot, Chenopodium serotinum*) 疑似固殺草與 2,4-D 抗性之大雅收集系 [small goosefoot TY (1-9)]傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 44

圖 10. 野苋菜(*green amaranth, Amaranthus viridis*) 疑似固殺草與 2,4-D 抗性之大雅收集系 [green amaranth TY (1-7)]傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 45

圖 11. 龍葵(black nightshade, *Solanum nigrum*)疑似固殺草與 2, 4-D 抗性之大雅收集系[black nightshade TY (1-2)]傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 …… 46

圖 12. 疑似抗性牛筋草(*goosegrass, Eleusine indica*)之西斗收集系(*goosegrass* XD A1-12)傷害指數變化，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數(0-5)。0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 … 49

圖 13. 疑似抗性牛筋草 (*goosegrass, Eleusine indica*) 之西斗收集系(*goosegrass* XD B1-9)傷害指數變化，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數 (0-5) 。0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。 … 50

National Chung Hsing University

附錄目次

- 附錄 1. 里港彩蕉園疑似抗性牛筋草之來源。於屏東三廊村彩蕉園內道路旁採集牛筋草 8 株(LG1-8)，經溫室觀察後，牛筋草植株(LG1-8)全數因除草劑藥害，生長情形逐漸惡化而死亡，因此判斷不具有抗性。行劑量反應分析。 75
- 附錄 2. 彰化大村葡萄園疑似抗性牛筋草之來源。採集牛筋草 8 株(DC1-8)，經溫室觀察後，牛筋草植株(DC1-8)全數存活恢復生長，收集種子育苗後，利用固殺草、快伏草與嘉磷塞進行劑量反應分析之結果與與庫存種子數量(千粒重約 0.33 g)。 76
- 附錄 3. 彰化大村葡萄園疑似抗性馬齒莧之來源。採集馬齒莧 6 株(DC1-6)，經溫室觀察後，馬齒莧植株(DC1-8)全數存活且生長良好，並且收集足夠之種子(千粒重約 0.05 g)。 77
- 附錄 4. 彰化大村葡萄園疑似抗性水蜈蚣之來源。採集水蜈蚣 3 株(DC1-3)，經溫室觀察後，水蜈蚣植株(DC1、3)二株存活且生長良好，並且蒐集足夠之種子(千粒重約 0.08 g)。 78
- 附錄 5. 屏東崁頂大豆田疑似抗性香附子之來源。採集香附子 27 株(KD1-27)，經溫室觀察後，香附子植株 10 株存，重新命名 KD1-10，於溫室持續生長。 79

附錄 6. 台中大雅區小麥田疑似抗性小葉灰藿之來源。採集小葉灰藿 9 株(DY1-9)，經溫室觀察後，小葉灰藿植株 5 株存活並蒐集種子，但因種子大小差異極大，難以估算數量。	80
附錄 7. 台中大雅區小麥田疑似抗性野苧菜之來源。採集野苧菜 7 株 (DY1-7)，經溫室觀察後，野苧菜植株 7 株存活，但僅有 6 株成收蒐集種子。	81
附錄 8. 台中大雅區小麥田疑似抗性龍葵之來源。採集龍葵 2 株(DY1、2)，經溫室觀察後，龍葵存活 2 株，並蒐集果實。	82
附錄 9. 彰化西斗葡萄園疑似抗性牛筋草 A 族群之來源。採集牛筋草 12 株(XDA1-12)，經溫室觀察後，牛筋草 A 族群全數存活，僅成功蒐集 11 株之種子。	83
附錄 10. 彰化西斗葡萄園疑似抗性牛筋草之來源。採集牛筋草 9 株 (XD B1-9，調查日兩週前施藥)，經溫室觀察後，牛筋草 A 族群全數存活，並蒐集種子。	84
附錄 11. 除草劑抗性生物型雜草通報獎金簽收單。於現場訪查後，如有疑似除草劑抗性雜草發生，即發放 1,000 元獎金，並請發現者留下基本資料。	85

附錄 12. 除草劑抗性生物型雜草現場調查記錄表。…………… 86



第一章、緒言

除草劑為傳統農業中控制田間雜草的重要方法，但長年使用相同除草劑，造成田間高度的選汰壓力，使各地陸續發現對除草劑具有抗性的雜草生物型(biotype)，根據美國雜草學會(Weed Science Society of America, WSSA)的國際除草劑抗性雜草調查(International survey of herbicide resistant weeds)，從 1968 年報導第一個對於三氮吡系化合物(triazines)具有抗性之歐洲千里光 (groundsel, *Senecio vulgaris* L.)，至 2019 年 5 月為止，除草劑抗性雜草已登錄 500 個案例，涵蓋 256 個物種(Heap, 2019)。

台灣國內普遍使用除草劑，之後陸續發現抗性雜草生物型，如 1980 年報導的對於巴拉刈(paraquat)具有抗性之野苧蒿[fleabane, *Conyza sumatrensis*(Retz.) E. Walker](WSSA)，近年也發現牛筋草[goosegrass, *Eleusine indica* (L.) Gaertn.]抗性雜草生物型(蔣等, 2006)。

台灣國內農藥銷售數量於 106 年高達 8,262 多公噸，其中除草劑佔約 4,471 公噸(行政院農委會農業 106 年統計資料)，可見農業上除草劑用量極大，但長久以來因缺乏一個有效的抗性雜草通報與鑑定系統，故抗性雜草發現案例仍然不多，因此本研究參考 WSSA 之抗性雜草定義與鑑定流程，構思標準作業流程(Standard Operating Procedures, SOP)，擬於國內建立完整之鑑定系統，使後續之相關人員按照步驟即可鑑定所取得之雜草是否對於特定除草劑具有抗性。

抗性雜草鑑定 SOP 主要分為三大階段，第一階段：抗性雜草現場鑑定與採樣後觀察流程。經民眾通報後，預先約定於施用除草劑 10-14 天後(待除草劑發揮作用後)前往現場，調查田園施用藥劑種類、頻度、施用方法與過往用藥經歷，並尋找施用藥劑後仍未死亡之雜草樣本，移植回中興大學校園內溫室觀察 30 天，並根據觀察期內植株生長變化初步判斷是否可能為抗性雜草，若不具存在抗性可能則直接結案。若判定該案例之雜草可能具有抗性，則收集樣本種子或無性繁殖器官後育苗，進入下一階段。第二階段是抗性程度鑑定流程。待雜草幼苗生長達到可以明顯觀察出除草劑傷害程度，依照田間施用之藥劑種類，進行單一抗性程度鑑定，於施用不同劑量後，分別記錄傷害指數與存活率，再利用對數邏輯(log-logistic)分析模式，根據傷害指數與存活率，分別計算傷害指數與存活率對應之 ED₅₀ 數值，透過與感性族群之 ED₅₀ 數值比值得知相對抗性程度，即抗性指數(resistance index; RI)，之後依其抗性程度與農民用藥經歷決定是否再進行交叉抗性(cross resistance)與多重抗性(multiple resistance)鑑定。第三階段則是建立抗性雜草資料庫。案例資料整理後建檔，包含現場收集訪問之資料與抗性程度鑑定結果，建立台灣除草劑抗性雜草資料庫(Database of the herbicide resistant weeds in Taiwan)。

第二章、前人研究

一、除草劑抗性雜草之定義

除草劑抗性雜草為近代農業管理上的難題，但對於抗性雜草之定義，在科學上與農業應用上並無一個明確的定義，通常透過相同物種 (species) 雜草感性族群與抗性族群對於特定除草劑之 ED₅₀ (effective dosage causing 50% inhibition, 引起抑制反應達 50% 之劑量) 與 GR₅₀ (dosage causing 50% growth reduction, 抑制半數生長之劑量) 數值高低，比較兩族群之抗性程度差異，具有較高數值之族群相對具有除草劑抗性；農業上則根據雜草能否被除草劑推薦劑量控制來判定。根據美國雜草學會 (Weed Science Society of America, WSSA) 彙整科學界之除草劑抗性定義為「當一種植物暴露在正常可殺死野生型的除草劑劑量下，仍能存活與繁殖後代，且此能力可遺傳下去。植物之除草劑抗性可自然發生、或者透過遺傳工程技術誘導、或是經由組培或誘變產生之變異體，再從中選拔 (The inherited ability of a “plant” to survive and reproduce following exposure to a dose of herbicide normally lethal to the wild type. In a plant, resistance may be naturally occurring or induced by such techniques as genetic engineering or selection of variants produced by tissue culture or mutagenesis)。」

二、全球除草劑抗性雜草現況

全球自第一個除草劑生長素類(auxin-type)除草劑於 1940 年代問世後，於農業中使用除草劑控制雜草已超過 65 年，使用除草劑之效率高且成本低，施用除草劑可取代人力、獸力、與機械除草，然而除草劑除了安全上與環境上的爭議，除草劑抗性雜草之發生也成為除草劑永續使用上的難題(Heap, 2014)。根據 WSSA 調查，除草劑抗性雜草案例從 1968 年發現第一個抗三氮吡系化合物(triazines)之歐洲千里光(groundsel, *Senecio vulgaris* L.)生物型案例後(Ryan, 1970)，至 2019 年 6 月已高達 500 個案例，涵蓋 256 個物種，可分類為 149 個雙子葉植物(dicots)與 107 個單子葉植物(monocots)(單一物種對相同除草劑之抗性僅計算一次)(Heap, 2019)。

以除草劑抗性執行委員會(Herbicide Resistance Action Committee ; HRAC)之除草劑分類表示，最多抗性雜草生物型之除草劑為類別 B，乙醯乳酸合成酶抑制劑(acetolactate synthase inhibitors, ALS inhibitors)，至今發現高達 161 種雜草對於 ALS 抑制劑具有抗性。ALS 酵素為植物合成支鏈胺基酸路徑中的第一個酵素，當 ALS 抑制劑抑制植物 ALS 酵素作用時，使植物無法合成支鏈胺基酸之纈胺酸(valine)、白胺酸(leucine)、與異白胺酸(isoleucine)(LaRossa and Schloss1, 1984)。

1970 年代發現第一個 ALS 抑制劑，相較於其他除草劑，該抑制劑在低劑量即可有效抑制雜草(Whitcomb, 1999)。澳洲於 1980 年代廣

泛使用 ALS 抑制劑 chlorsulfuron，主要於小麥田中控制硬直黑麥草 (*Lolium rigidum* Gaud.)與闊葉雜草(Powles and Bowran, 2000)。之後於 1982 年便出現硬直黑麥草抗 ALS 抑制劑生物型(Burnet, 1994)，並且在 2018 年將第 161 個案例登錄於 WSSA。由於部分 ALS 抑制劑於田間具有殘留時間較長且持續作用，這可能是導致植物快速產生抗性的原因(Whitcomb, 1999)。

目前對於 C1 類的光系統 II 抑制劑(Photosystem II inhibitors)：苯基胺基甲酸酯類(phenylcarbamates)、三氮吡系化合物(triazines)、與 pyridazinones，具有該類除草劑抗性之雜草共有 78 種。該類型除草劑主要透過與 PQ 競爭 Q_B 結合蛋白 (quinone-binding protein)上結合位置(Rensen, 1982)，阻斷葉綠體中光系統 II 的電子傳遞鏈(Pfister *et al.*, 1979)。前述於 1968 年發現之歐洲千里光，為第一個三氮吡系化合物抗性生物型案例(Ryan, 1970)。2017 年發現加拿大之塊莖莧 [*Amaranthus tuberculatus* (Moq.) J.D. Sauer]與澳洲之早熟禾(*Poa annua* L.)為最新登錄之抗性案例。具有抗性的雜草種類以藜(*Chenopodium album* L.)案例最多，高達 41 個案例，遍及美洲、歐洲、與非洲共計 17 個國家(Heap, 2019)。

對於 A 類乙醯輔酶 A 羧化酶(acetyl-coenzyme A carboxylase；ACCase)抑制劑(禾草類除草劑)具有抗性之雜草，迄 2017 年已發現 48 種。ACCase 抑制劑抑制脂肪酸合成路徑的第一個酵素 ACCase，使

植物無法將 acetyl-CoA 轉換成 malonyl-CoA (Smith and Cronan, 2011)。
最早於 1982 年同時於英國發現一個大穗看麥娘 (*Alopecurus myosuroides* Huds.) 抗性案例 (Moss *et al.*, 2003)、與在澳洲發現二個硬直黑麥草抗性案例 (Burnet 1994, Llewellyn *et al.*, 2001)；而最新案例則為 2017 年發生於塞爾維亞的石茅 [*Sorghum halepense* (L.) Pers.] 與巴西之牛筋草。此外，發現其此類除草劑之抗性野燕麥 (*Avena fatua* L.) 發現案例最多，共有 38 個案例遍美洲、亞洲、歐洲、澳洲、與非洲之 16 個國家。

G 類為 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶 (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase；EPSPS) 抑制劑，該類型除草劑僅有 glyphosate 與 glyphosate-trimesium。作用機制為抑制芳香族胺基酸 (aromatic amino acids) 合成路徑中的 EPSPS (Amrhein *et al.*, 1980)。對於嘉磷塞具有抗性之雜草迄 2019 年 6 月已發現 43 種。最早於 1996 年在澳洲發現黑麥草 (Powles *et al.*, 1998)，最新案例為 2019 年於土耳其發現野苧蒿。其中出現最多之案例為野苧蒿與長芒莧，各有 42 案例，野苧蒿案例分布於歐洲、亞洲、與北美洲，長芒莧案例則分布於美洲。

O 類為人工合成生長素類除草劑 (auxin-type herbicide)，具生長素類除草劑抗性之雜草，迄 2018 年已發現 39 種。生長素於低濃度時，會刺激植物生長與發育，但於高濃度時，生長會被擾亂並且對於植物

造成致命的影響，具有除草的效果，該類除草劑第一次大規模使用是在於 1961-1971 年的越戰，其中橙劑(Agent Orange)最廣為人知，為 50%—二、四地(2,4-dichlorophenoxyacetic acid ; 2,4-D)與 50%二、四、五—涕(2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid ; 2,4,5-T)混合藥劑(Stellman *et al.*, 2003)。最近於 2018 年發現新抗性案例，為位於美國之長芒莧。此類除草劑出現最多之抗性雜草案例為地膚[*Kochia scoparia* (L.) Schrad.]，共有 9 案例皆分布於北美洲之美國與加拿大。

D 類除草劑為光系統 I 抑制劑，該類型除草劑僅有巴拉刈(paraquat)與大刈(diquat)兩種，透過在光合系統 I 中接收電子，並且將電子轉移至氧分子，產生具有高活性與毒性的活性氧族(reactive oxygen species)，進而對植物產生毒性(Lehoczki *et al.*, 1992)。迄 2018 年，具光系統 I 抑制劑抗性之雜草有 32 種，最早於 1980 年同時發現三種雜草具有抗性，分別為台灣之野苧蒿[*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker]、日本之加拿大蓬[*Erigeron canadensis* (L.) Cronquist]、與春紫菀(*Erigeron philadelphicus* L.)，最新案例則於 2018 年在澳洲發現之野苧蒿。此類除草劑出現最多之案例為野苧蒿，共有 9 案例分布於澳洲、亞洲、與南美洲。

C2 類除草劑也為光系統 II 抑制劑，該分類主要為尿素類(ureas)與醯胺類(amides)之除草劑，作用機制與前述之 C1 相同。具有 C2 類除草劑抗性之雜草共有 29 種。最早於 1979 年於以色列發現之大穗看

麥娘，最新案例則於 2017 年在澳洲發現之早熟禾。此類除草劑出現最多之案例為大穗看麥娘與稗草 [*Echinochloa crus-galli*(L.) Beauv]，皆有 11 個案例，大穗看麥娘案例皆發生於歐洲與西亞，稗草案例則發生於美洲、歐洲、與南亞。

E 類除草劑為初卟啉原氧化酶 (protoporphyrinogen oxidase; PPO) 抑制劑，作用機制為抑制葉綠素合成路徑中的 PPO 氧化酶，使 PPO 氧化酶無法將 protoporphyrinogen-IX 轉換成 protoporphyrin IX，PPO 氧化酶存在於哺乳動物、植物、真菌、與細菌中，為高度保留 (highly conserved) 的氧化酶 (Hao *et al.*, 2011)。具有 E 類除草劑抗性之雜草共有 13 種。

K1 類除草劑為微管抑制劑 (microtubule inhibitors)，微管與維持細胞的形狀及功能有關，且在細胞分裂、生長與型態上為重要的一環，目前已證明該類型除草劑會破壞細胞分裂，使細胞分裂停滯於前中期 (pronetaphase) (Reade and Cobb, 2002)。具有 K1 類除草劑抗性之雜草共有 12 種。

N 類除草劑為脂質合成抑制劑 (lipid synthesis inhibitors，非 ACCase inhibitors)，如 S-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamat (EPTC) 與 triallate，會抑制植物脂肪酸轉換成長鏈脂肪酸 (long-chain fatty acids) (Reade and Cobb, 2002)。全球迄 2015 年為止，具有 N 類除草劑抗性之雜草共有 10 例。其餘分類之除草劑 (F1、F2、F3、F4、H、I、K2、

K3、L、M、P、Z)抗性雜草種類皆低於 10 種。

三、固殺草(glufosinate)抗性雜草生物型與抗性機制

於 1972 與 1973 年研究分別發現，鏈黴菌屬(*Streptomyces*)的 *S. hygroscopicu* 與 *S. hygroscopicus* 兩種菌株會生合成具有除草劑性質的三肽化學物質—bialaphos，又稱為 phosphinothricin (PTT)，而化合物在酵素作用下會分解成兩個丙胺酸(alanine)分子與一個 L-2-amino-4-hydroxymethylphosphinoyl butyric acid 分子(Schwartz *et al.*, 2004)，後者即俗稱為固殺草(glufosinate；phosphinothricin (PPT))的除草劑有效成分，會抑制細菌、藻類、與植物中的麩胺醯胺合成酶(GS, glutamine synthetase)作用(Wild *et al.*, 1987)。使其無法將 glutamic acid 與銨(NH₄⁺)於消耗 ATP 下，生成 glutamine，固殺草為非選擇性除草劑，常作為萌後除草劑使用，其作用機制係與 glutamate 競爭 GS 上之結合位，透過與 GS 結合後，經磷酸化(phosphorylation)形成過渡狀態(transition-state)，導致不可逆的結合，使酵素無法正常運作(John, 2016)。

固殺草作用位置明確，一般認為固殺草與 GS 結合後，無法同化植物吸收的銨，導致植物銨累積至對植物產生毒性，造成細胞的崩潰(Duke, 1990)。但 Wild *et al.* (1987)發現銨的累積並非抑制光合作用之主因，白芥(*Sinapis alba*)處理固殺草後，於正常含氧量(400 ppm CO₂, 21% O₂)下，光合作用效率在 90 分鐘後便趨近於 0%，而在低氧(1,000

ppm CO₂, 2% O₂)則降低至 85%，但累積量均高於正常值，因此推斷銨並非抑制光合作用之主因。植物在固殺草處理下，因 GS 被抑制，導致乙醛酸(glyoxylate)與乙醇酸(P-glycolate)濃度上升，而在該研究中，菠菜(*Spinacia oleracea*)外施低濃度乙醛酸與乙醇酸，會抑制光呼吸，因此推測施用固殺草抑制光呼吸的原因為累積乙醛酸與乙醇酸所致 (Wild and Wendler, 1993)。

對於固殺草具有抗性的雜草在 2009 年有兩案例被確認(Chuah *et al.*, 2010, Jalaludin *et al.*, 2010)，雜草種類皆為牛筋草[*Eleusine indica* (L.) Gaertn.]，其中一個案例為 Chuah *et al.* (2010)發現，地點為馬來西亞霹靂州(Perak)之苦瓜(bitter gourd, *Momordica charantia*)田(4° 11.409'N, 101° 8.675'E)，管理者每年施用 6 次巴拉刈(paraquat)與固殺草，當地巴拉刈推薦劑量為 0.75 kg·ha⁻¹；固殺草推薦劑量為 0.45 kg ha⁻¹，經劑量反應分析後，依據半數致死濃度(IC₅₀)，可知抗性族群對於巴拉刈抗性為感性族群之 3.69 倍(0.43 kg ha⁻¹)；對於固殺草抗性族群之抗性為感性族群 3.4 倍(0.17 kg ha⁻¹)，具有多重抗性(multiple resistance)。另一案例為 Jalaludin *et al.* (2010)發現，雜草同樣是位於馬來西亞之牛筋草，發現地點為彭亨州(Pahang)之油棕(oil palm, *Elaeis guineensis*)苗圃，依據中數致死劑量(ED₅₀)，抗性程度為感性族群之 7.63 倍(2.30 kg a.i. ha⁻¹)。經研究證實該族群也對嘉磷塞(glyphosate)、巴拉刈、與多種 ACCase 抑制劑(fluzifop-P-butyl, haloxyfop-P-methyl,

and butoxydim)具有抗性；顯示同時具有多重抗性與 ACCase 抑制劑之交叉抗性(cross resistance)(Jalaludin *et al.* (2014))。Jalaludin *et al.* (2017)對於前述之固殺草抗性牛筋草進行抗性機制研究，發現該抗性族群 GS 活性與感性族群一樣對固殺草皆敏感之外，其固殺草吸收、轉運、與代謝上也與感性族群無顯著差異，因此其他抗性機制(如：將固殺草運轉至液胞隔離(vacuole sequestration))仍待進一步檢測。

另有 Avila-Garcia and Mallory-Smith (2011)發現在美國俄勒岡(Oregon)州榛果園中的多花黑麥草(*Lolium perenne* L. ssp. multiflorum)，對於嘉磷塞具有抗性外，對於固殺草也具有抗性，抗性程度為感性族群的 2.2~2.7 倍，雖然發現經固殺草處理後，ammonia 累積為感性族群的一半，但其酵素活性之 IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) 與感性族群相比並無顯著差異，其他抗性機制仍待驗證。

同樣之多花黑麥草在美國之小麥田中之族群(MG)也被 Avila-Garcia *et al.* (2012)證實對於固殺草具有抗性，其 GR₅₀ 為感性族群 2.8 倍(0.45 vs. 0.18 kg a.i. ha⁻¹)，依據酵素之 I₅₀，相較於感性族群 C1 與 C2 之 30.9 與 136.9 mM，抗性族群需要 2432.4 mM 才能達到相同效果。氨的累積也顯著少於感性族群，除此之外更發現其 GS2 酵素的第 171 胺基酸對應的密碼子由 GAC 變異為 AAC，轉譯之胺基酸由 aspartic acid (Asp) 改變成 asparagine (Asn)，此為第一個確認目標位置突變(target-site mutation)之固殺草抗性生物型。

四、ACCase 抑制劑抗性雜草生物型與抗性機制

ACCase 抑制劑抑制脂肪酸合成路徑的第一個酵素 ACCase，使植物無法將 acetyl-CoA 轉換成 malonyl-CoA(Smith and Cronan, 2011)。該類除草劑又依結構不同區分為 aryloxyphenoxypropionates (AOPPs) 和 cyclohexanediones (CHDs) 二大類，AOPPs 字尾是-fop [例如伏寄普 (fluazifop-butyl)，快伏草(quizalofop-ethyl)]，而 CHDs 字尾是-dim [例如西殺草(sethoxydim)，剋草同(clethodim)](Devine, 1997)。ACCase 抑制劑因其可以選擇性殺死禾本科的植物，故經常使用在非禾本科作物田間。大部分的植物擁有兩種 ACCase，分別為位於細胞質(cytosol)與質體(plastid)中的 MF-ACCase (multifunctional-ACCase)及 MS-ACCase (multisubunit-ACCase)。但禾本科(Poaceae)植物在質體與細胞質中的 ACCase 皆為 MF-ACCase，易受 ACCase 抑制劑抑制其活性(Ohlrogge and Browse, 1995)。因此當禾本科植物 ACCase 被除草劑抑制後，即無法合成脂肪酸，最終使植物死亡。

對於 ACCase 抑制劑具有抗性之雜草，全球迄 2017 已發現 48 種。1989 年於馬來西亞蔬菜園發現牛筋草對於伏寄普具有極高程度之抗性，伏寄普(fluazifop-butyl)之 IC_{50} 大於 $500 \text{ g a.i. ha}^{-1}$ (Marshall *et al.*, 1994)，檢測後發現該牛筋草族群之 ACCase 活性相較於感性族群，對於伏寄普、芬殺草(fenoxaprop-ethy)、西沙草、與剋草同具抗性，推測可能由於 ACCase 發生改變，導致該族群牛筋草對於 ACCase 抑制劑

較不敏感(Leech *et al.*, 1995)。

Délye (2005)回顧過去對於 ACCase 具有抗性的雜草案例，將抗性機制分類為與目標酵素 ACCase 相關、與代謝除草劑謝相關之兩抗性機制種。與 ACCase 相關之抗性機制，目前已發現 5 個案例於 ACCase 之羧基轉移酶(carboxyltransferase ; CT) domain 發生胺基酸改變(Liu *et al.*, 2007)。澳洲之野燕麥、加拿大之狗尾草[*Setaria viridis* (L.) P. Beauv.]、與英國之大穗看麥娘，其 ACCase 經檢測後發現於第 1,781 個胺基酸，由異白胺酸(isoleucine)改變為白胺酸(leucine) (Christoffers *et al.* 2002, Délye *et al.* 2002, Moss *et al.* 2003)。法國之大穗看麥娘與黑麥草，ACCase 經檢測後發現於第 2,041 個胺基酸，由異白胺酸(isoleucine)改變為天冬胺酸(aspartate) (Délye, 2003)。法國之大穗看麥娘之 ACCase 經檢測後發現於第 2,027 個胺基酸，由色胺酸(tryptophan)改變為半胱胺酸(cysteine) (Délye, 2005)。法國之大穗看麥娘之 ACCase 經檢測後發現於第 2,096 個胺基酸，由甘胺酸(glycine)改變為丙胺酸(alanine) (Délye *et al.*, 2005)。巴西之牛筋草，其 ACCase 經過定序後發現於第 2,078 個胺基酸，由天冬胺酸(aspartate)改變為甘胺酸(glycine) (Osuna *et al.* 2012)。已發現目標酵素 ACCase 發生改變，皆位於 carboxyl transferase domain (CT domain) 的第 1,781、2,027、2,041、2,078、與 2,096 位置之胺基酸發生改變。

除草劑相關之抗性機制包括，避免除草劑之活性成分濃度累積足以對於目標酵素造成影響，或者除草劑造成傷害之後，植物本身具有彌補能力，植物也可能同時具有上述之兩種能力，其中要達成降低除草劑活性成分之濃度，需要透過植物本身的酵素完成解毒，如細胞色素 P450 單加氧酶(cytochromes P450 (CYPs) monooxygenase)、葡萄糖苷基轉移酶(glucosyltransferases ; GTs)、與谷胱甘肽 S-轉移酶(glutathione-S-transferase ; GST) (Délye *et al.* 2005)。

台灣藥試所植物公害防治組於 2003 分別於高雄果園與彰化蔬菜田採集疑似抗性之牛筋草，之後 Wang *et al.*(2017)利用 ABT (aminobenzotriazole, CYP 抑制劑，可偵測植株內 CYP 活性完全受抑制時，未代謝部分之比例)處理抗、感性牛筋草生物型 5 葉期幼苗 24 小時後，再施用含有 ^{14}C 之 0.1 mM 伏寄普於第五葉，並分析伏寄普代謝產生之含 ^{14}C 代謝物相對放射活性，以了解牛筋草之 CYP 代謝能力。感性生物型未施用 ABT 之處理組(處理 ^{14}C -fluazifop)於施藥 7 天後，代謝物相對放射活性為施用 ABT 抑制下之 45%，而抗性牛筋草則為 60%，顯示抗性生物型在 fluazifop 處理下，其 CYP450 具有較強的代謝能力；施用含有 ^{14}C 之 0.1 mM 伏寄普於抗、感性生物型 5 葉期幼苗後分析 GST 於 7 天內之活性變化，發現感性生物型 GST 活性於 3 天後約維持在 70%，抗性生物型 GST 活性則於第 3 天隨天數持續增加，第 7 天約為 400%，顯示抗性生物型之 GST 活性較強；深

入研究 GST 之酵素動力學 K_m 值、該值為酵素與反應基質親和力之指標， K_m 值越大則親和力越小，結果顯示感性生物型 GST 之 K_m 值為 1.2 mM，為抗性生物型 0.4 mM 的三倍，表示抗性生物型與反應基質有較高親和力。

五、嘉磷塞抗性雜草生物型與抗性機制

嘉磷塞(glyphosate)於 1950 年被瑞士化學家 Dr. Henri Martin 發現，但仍未知該化合物作用。直到 1970 年孟山都(Monsanto)公司的 Dr. John Franz 發現該化合物可以抑制植物生長(Franz *et al.* 1997)。於 1974 年此藥劑作為萌後(post-emergence)與非選擇性除草劑開始販售(Duke and Powles, 2008)。嘉磷塞作用機制為與莽草酸途徑(shikimate pathway)中的 phosphoenolpyruvate (PEP)競爭與 S-3-P 結合，形成「嘉磷塞-莽草酸-3-磷酸複合物(glyphosate-S-3-P complex)」，進而間接抑制 EPSPS 作用(Duke, 1988)。在 1996 年孟山都推出具有嘉磷塞抗性的 Roundup Ready 系列轉基因作物(大豆、玉米、棉花)後嘉磷塞使用量大增(Benbrook, 2016)。

全球迄 2019 年 6 月已發現 43 種雜草生物型具有嘉磷塞抗性。Powles and Preston (2006)將過去已發現之嘉磷塞抗性案例，依其抗性機制分為目標位置改變之抗性、與減少嘉磷塞轉運之抗性機制。目標位置改變之抗性機制為除草劑目標酵素編碼基因發生改變，使目標酵

素胺基酸隨之變異而不受除草劑影響。第一個嘉磷塞目標酵素 EPSPS 發生變異的案例是在馬來西亞果園發現之牛筋草，經檢測後發現其 EPSPS 上，第 106 個胺基酸由脯胺酸(proline)改變為絲胺酸(serine)，使得牛筋草對於嘉磷塞不敏感而具有抗性(Baerson *et al.* 2002)。中國於廣州市與成都市發現共三個對於嘉磷塞具有抗性之牛筋草(R1, R2, R3)，經萃取 EPSPS 之 RNA 定序後發現 R1 與 R2 抗性牛筋草之 EPSPS 對應基因發生改變，使轉錄出之胺基酸發生變化，R1 為雙重突變，於第 102 組密碼子由 ACT (蘇胺酸, threonine) 改變為 ATT (異白胺酸, isoleucine)、與第 106 組密碼子由 CCA (脯胺酸, proline) 改變為 TCA (絲氨酸, serine)，R2 僅於第 106 組密碼子由 CCA (脯胺酸, proline) 改變為 CTA (白胺酸, leucine)，值得注意的是 R1 之雙重變異造成之胺基酸改變，與抗嘉磷塞轉基因玉米(Roundup Ready, GA21)之 EPSPS 胺基酸相同(Chen *et al.* 2015)。

減少嘉磷塞轉運造成之抗性機制第一次被發現於澳洲果園中硬直黑麥草(rigid grass, *Lolium rigidum* Gaud.)，果園於連續 15 年施用嘉磷塞控制雜草後，已無法有效控制硬直黑麥草族群(NLR70)。雖然抗、感性族群於吸收嘉磷塞能力尚無明顯差異，但在嘉磷塞運轉上有明顯不同，發現將 ^{14}C 施於 2 葉期硬直黑麥草之第 1 葉後，抗性族群將嘉磷塞轉運至施藥位置以上之葉中累積，嘉磷塞運轉至施藥位置以下相對較少；感性族群轉運嘉磷塞則相反，將嘉磷塞運轉至施藥位置

以下之根中累積，作者推測其可能為改變嘉磷塞運轉，使硬直黑麥草具有抗性(Lorraine-Colwill *et al.* 2002)。

Chen *et al.* (2015)於中國成都市發現之牛筋草嘉磷塞抗性族群，雖未有上述兩類型之抗性機制，卻發現硬直黑麥草 R3 族群 EPSPS 基因複製數量(gene copy number)為 89.1，遠高於出感性族群的 1.9-2.4；此外，抗性牛筋草 EPSPS 之相對基因表現量(expression level relative to β -actin)為 1.1-3.7，也遠高於感性族群的 0.11-0.37。

國立中興大學



National Chung Hsing University

第二章、材料與方法

一、抗性雜草通報與鑑定流程

(一) 抗性雜草現場鑑定與採樣流程

本研究於接獲民眾通報後，約定於施用除草劑 10-14 天後前往現場，訪問田園管理者施用除草劑種類、頻度、施用方法、與過往用藥經歷，並尋找施用除草劑後仍未死亡之雜草植株，依現場狀況，擇圓鋤或移植鏟在距離植株位置 5 公分處土壤斜挖掘植株，以避免傷及根部，並同時取得植株根系生長之土塊，之後置於夾鏈袋內、保持通風不封緊開口，並視土壤乾溼情況給予補充水分，而後移植至中興大學溫室內盆栽觀察，於移植當天初次紀錄施用除草劑後生長情形後，每 5 天紀錄一次，共觀察 30 天，生長情形則依照除草劑傷害程度分為 0-5 六個等級：0 為未受到除草劑傷害、植株健康且正常生長；1 為植株輕微受到除草劑傷害，約 20%以下葉片黃化或有壞疽等傷害情形；2 為植株明顯受到除草劑傷害，約 20-50%葉片發生除草劑傷害；3 為植株超過半數受到除草劑傷害，約 50-80%葉片發生除草劑傷害；4 為植株大部分收到除草劑傷害，約 80%以上葉片發生除草劑傷害，且植株瀕臨死亡；5 為植株因藥害死亡。

根據觀察期間的變化，如果所有植株之生長情形因藥害惡化至死亡，則判定該雜草植株不具有除草劑抗性之可能性。若植株存活，則判定其可能具有抗性，之後栽培至恢復生長並結籽後，待收集足量種

子後進入下一階段之抗性鑑定。

(二) 抗性程度鑑定流程

蒐集足量種子後，依不同雜草種子之發芽特性令其在適合的環境下發芽(如牛筋草種子於光週期 12 小時與 30°C 恆溫生長箱中發芽)，並移植於 4x3 大小穴盤，每穴 1 株，放置於溫室中，待幼苗生長達一定程度(牛筋草為 3-5 葉)，於施用除草劑後，可以明顯觀察除草劑傷害情形，再進行劑量反應分析檢測抗性程度，該試驗施用不同劑量除草劑，並觀察性狀，如死亡率與除草劑傷害指數，透過對數邏輯模式(log-logistic model)運算後，得對應之數值一半數致死劑量與半數傷害劑量，並透過與感性族群數值之比值，如半數致死劑量(R)/半數致死劑量(S)，即可得抗性程度(抗性指數)，且根據 WSSA 抗性雜草定義，抗性指數大於 10 屬高程度(high-level)抗性，若小於 10 則為低程度(low-level)抗性(Heap, 2005)。

上述為單一抗性程度(或簡單抗性，simple resistance)檢測之流程，若案例之用藥經歷包含多種不同除草劑，則需每一除草劑分別進行單一抗性程度檢測，並根據檢測結果，判斷是否具有對於不同作用機制之除草劑同時具有抗性，此即為多重抗性(multiple resistance)；而對於相同作用機制但構造不同之除草劑同時具有抗性，即交叉抗性(cross resistance)，則需要進一步檢測。

(三) 建立抗性雜草資料庫

經第二階段確認具有抗性後，將各案例建檔，包含第一階段民眾所提供的田園基本資料與第二階段抗性程度檢測結果，並透過民眾提供之資料，評估抗性雜草發生原因。

二、材料來源

(一) 牛筋草來源

本試驗材料為彰化縣大村鄉過溝村葡萄園內之牛筋草[*Eleusine indica*. (L.) Gaertn]種子，園區內持續施用固殺草與快伏草 20 年以上。採樣之牛筋草(DC1-8)移植回溫室內，於植株自交後抽穗，待穗乾枯，輕觸會落粒後收集，置於室內通風處使外穎與包覆乾燥，並使用砂紙輕磨去除包覆，僅餘暗紅色或咖啡色之種子，並使用塑膠種子罐儲存，待實驗使用。

(二) 除草劑來源與作用機制

1. 固殺草 [ammonium-DL-homoalanin-d-yl(methyl)phosphinate ; glufosinate ; phosphinothricin]商品名為龍刈草(龍燈股份有限公司)，為藍色澄清具濃異味液體，含 13.5%重量百分濃度之固殺草成分。固殺作用機制係與 glutamate 競爭 GS 上之結合位，透過與 GS 結合後，經磷酸化(phosphorylation)形成過渡狀態(transition-state)，導致不可逆的結合，使酵素無法正常運作(John, 2016)

2. 快 伏 草 {ethyl(R)-2-[4-(6-chloroquinoxalin-2-yloxy)phenoxy] propionate, quizalofop-P-ethyl} 商品名為早草好(台聯實業股份有限公司), 為黃色澄清具異味乳劑, 含 5% 重量百分濃度之快伏草成分。快伏草屬 ACCase 抑制劑, 透過抑制脂肪酸合成路徑的第一個酵素 ACCase, 使植物無法將 acetyl-CoA 轉換成 malonyl-CoA (Smith and Cronan, 2011)。

3. 嘉磷塞異丙胺鹽(glyphosate-isopropyl ammonium), 商品名為興農春(興農股份有限公司), 為黃橙色澄清具輕微異味液體, 含 41% 重量百分濃度之嘉磷塞成分。嘉磷塞作用機制為與莽草酸途徑(shikimate pathway)中的 phosphoenolpyruvate (PEP) 競爭與莽草酸-3-磷酸複合物結合, 形成「嘉磷塞-莽草酸-3-磷酸複合物(glyphosate-S-3-P complex)」, 進而間接抑制 EPSPS 作用(Duke, 1988)

三、除草劑處理

牛筋草種子置於鋪有吸水紙的玻璃培養皿內, 並將培養皿, 置於光暗週期 12 小時與 30°C 之恆溫培養箱內, 發芽後移植溫室穴盤, 待幼苗達 3-5 葉期時, 進行藥劑處理, 施藥時透過空氣壓縮機、壓力輸出控制器與霧狀噴槍, 控制壓力為 60 psi (4.08 atm = 0.41 MPa), 使藥液形成霧狀均勻噴灑, 使附著在植株葉面上, 來回各一次。

(一) 固殺草(glufosinate): 施用推薦劑量的 8 個不同倍數濃度, 包括

0、 4.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-1} 、 2.0×10^{-1} 、1.0、5.0、 1.0×10^1 、 2.5×10^1 倍(相當於 0、23.6、59、118、590、2,950、5,900、14,750 g a.i. ha⁻¹ 田間用量；0、0.252、0.63、1.26、6.3、31.5、63、157.5 mM)。

(二) 快伏草(quizalofop)：施用推薦劑量的 8 個不同倍數濃度，包括 0、 4.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-1} 、 2.0×10^{-1} 、1.0、5.0、 1.0×10^1 、 2.5×10^1 倍(相當於 0、1.76、4.4、8.8、44、220、440、1,100 g a.i. ha⁻¹ 田間用量；0、0.0078、0.0195、0.0039、0.195、0.975、1.95、4.875 mM)。

(三) 嘉磷塞(glyphosate)：施用推薦劑量的 8 個不同倍數濃度，包括 0、 6.67×10^{-2} 、 1.0×10^{-1} 、 2.0×10^{-1} 、1.0、5.0、 1.0×10^1 、 1.5×10^1 倍(相當於 0、115、175、350、1,753、8,765、17,530、26,295 g a.i. ha⁻¹ 田間用量；0、5.7、8.6、17.3、86.6、433、866、1,299 mM)。

National Chung Hsing University

四、調查性狀

(一) 牛筋草 3-5 葉期幼苗之固殺草傷害指數

以牛筋草 3-5 葉期幼苗為材料，透過空氣壓縮機噴灑固殺草後 20 天，記錄傷害程度與存活率，透過觀察幼苗施藥後呈現之傷害，將其依傷害程度不同分為 6 個等級(如圖 1)：

0：植株健康不受到固殺草傷害

1：植株其中一葉片呈現 > 50% 黃化

2：植株超過二葉片呈現 > 50% 黃化，且葉片末端捲曲

3：植株多數葉片呈現 $>50\%$ 黃化，且葉片末端捲曲

4：植株瀕臨死亡，僅莖頂生長點仍未黃化

5：植株因藥害而死亡



圖 1. 牛筋草幼苗施用固殺草後之傷害指數。左上角數字為傷害指數(0-5)。

(二) 牛筋草 3-5 葉期幼苗之快伏草傷害指數

以牛筋草 3-5 葉期幼苗為材料，透過空氣壓縮機噴灑快伏草後 45 天，記錄傷害程度與存活率，透過觀察幼苗施藥後呈現之傷害，將其依傷害程度不同分為 6 個等級(如圖 2)：

0：植株健康不受到快伏草傷害

1：植株新葉有 50%黃化

2：植株新葉完全黃化，2 與 3 葉部份黃化

3：植株 1、2 與 3 葉完全黃化

4：植株瀕臨死亡，葉片全數黃化，部分捲曲

5：植株因藥害而死亡

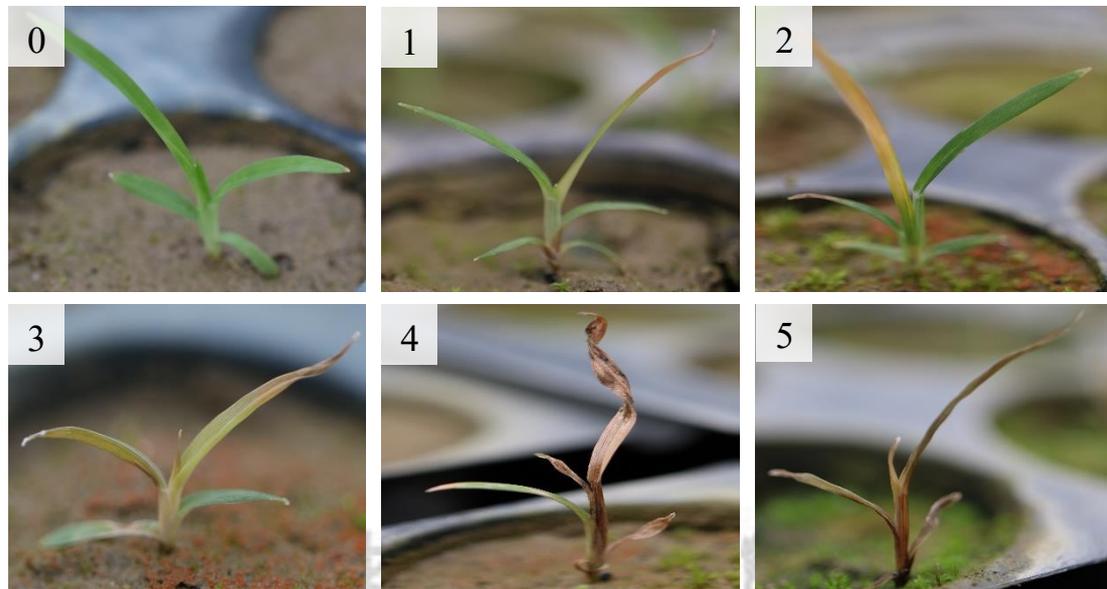


圖 2. 牛筋草幼苗施用快伏草後之傷害指數。左上角數字為傷害指數 (0-5)。

National Chung Hsing University

(三) 牛筋草 3-5 葉期幼苗嘉磷塞傷害指數

以牛筋草 3-5 葉期幼苗為材料，透過空氣壓縮機噴灑嘉磷塞後 15 天，記錄傷害程度與存活率，透過觀察幼苗施藥後呈現之傷害，將其依傷害程度不同分為 6 個等級(如圖 3)：

0：植株健康不受到嘉磷塞傷害

1：植株其中一葉有 50%黃化

2：植株一葉完全黃化，2 與 3 葉部份黃化

3：植株 1、2 與 3 葉完全黃化，4 與 5 葉部分黃化

4：植株瀕臨死亡，僅餘一葉葉鞘與莖感呈現綠色

5：植株因藥害而死亡

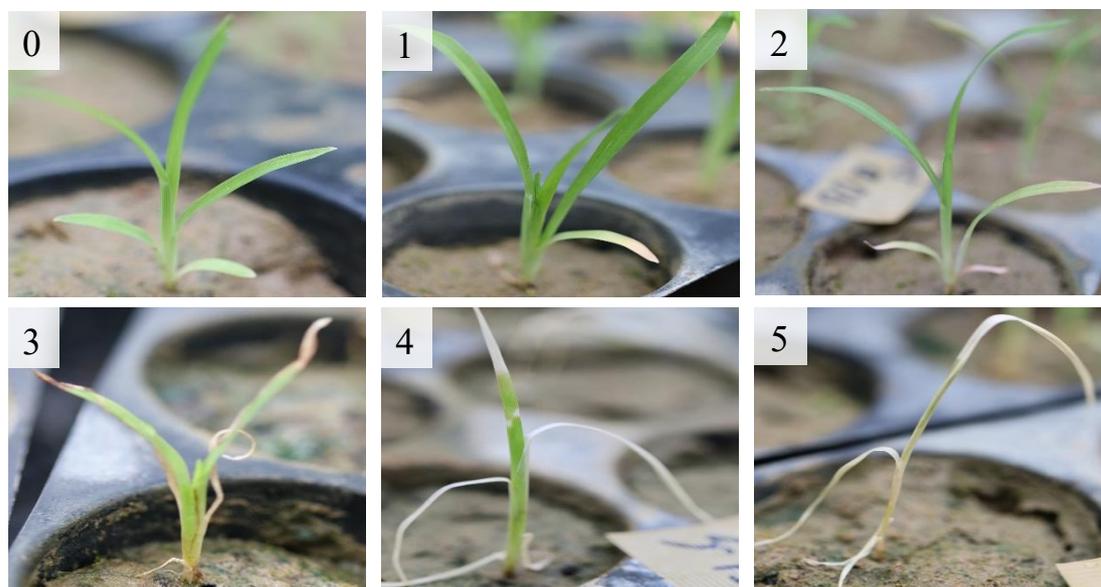


圖 3. 牛筋草幼苗施用嘉磷塞後之傷害指數示意圖。左上角編號為傷害指數(0-5)。

五、統計分析

本試驗採三次獨立試驗，試驗結果利用 Seefeldt *et al.* (1995) 提出非線性迴歸之對數邏輯模式(log-logistic model)分析固殺草、快伏草、與嘉磷塞抑制牛筋草幼苗生長或引起 50% 致死率之藥劑濃度 (effective dose causing 50% inhibition)，與造成牛筋草幼苗傷害達半數之藥劑濃度 (effective dose causing 50% injury)，數學公式如下所示

$$y = f(x) = C + \frac{D - C}{1 + \exp\{b[\log(x) - \log(I)]\}}$$

D 代表無施用除草劑之植株平均反應，為反應上限； C 代表極高劑量

下植株平均反應，為反應下限，反應下限不一定為 0； b 為劑量為 I 時的曲線斜率， b 越大代表斜率較陡峭； I 為植株特定性狀達某一程度之劑量。再將抗性與感性族群經模式計算出的半數傷害劑量與存活率之 ED_{50} 進行 ANOVA 分析，若有顯著差異 ($P < 0.05$)，再進行 Fisher's protected LSD 分析，比較抗性與感性族群間是否具存在除草劑敏感性之顯著差異，最後以 ED_{50} 平均值 \pm 標準誤差呈現。

國立中興大學



National Chung Hsing University

第四章、結果與討論

一、案例觀察報告

本論文研究主要目的為鑑定台灣國內耕地與非耕地可能存在之疑似除草劑抗性雜草，當接獲案例通報後，先與通報者聯繫確定下次施用除草劑日期，再前往現場訪談田間用藥種類、頻度、施用方法、與田園過往除草劑用藥經歷後，若田園中有疑似抗性雜草，則取樣施藥後仍存活之植株，移植回校內溫室，每 5 天紀錄一次傷害指數，持續 30 天，並依照溫室傷害指數紀錄結果，初步判定是否可能具有抗性。本研究第一案例於 2017 年 9 月 17 日調查，至最後一案例調查與觀察結束於 2018 年 5 月 23 日，通報系統運行滿一年為止，共計收集有五件案件，將分述如後：

(一) 彩蕉園道路旁

本案例發生地點為屏東縣里港鄉三廊村彩蕉園內道路旁，田園管理者自 2012 年起，長年依推薦劑量配製施用固殺草與巴拉刈溶液，並以 1:2 (v/v) 混合兩種藥劑，採樣時間為施藥兩週後，此時道路旁多數牛筋草均呈現枯黃死亡，少部分植株之除草劑藥害程度相對較低，葉片仍未完全枯黃，因此本研究移植 8 株存活植株回中興大學溫室內，觀察 28 天內除草劑之藥害持續變化。因觀察期內所有植株生長狀況持續惡化，最終全數死亡，故判定本案例之牛筋草對於固殺草或

巴拉刈不具抗性(表 1、圖 4)。

根據 WSSA 紀錄，最早在 1980 年於日本發現加拿大蓬[Canadian fleabane, *Conyza canadensis* (L.) Cronquist]之巴拉刈抗性生物型，同年台灣也發現野苧蒿[tall fleabane, *Conyza sumatrensis* (Retz.) Walk.] 巴拉刈抗性生物型，迄 2019 年 6 月為止，具有巴拉刈抗性之雜草涵蓋 32 個物種，共 71 個案例，其中也包含牛筋草，首個案例在 1990 年於馬來西亞發現，迄 2019 年 6 月共有八個案例，位於 5 個不同國家，其中一案例係於 1970 年開始使用巴拉刈之控制橡膠園內雜草，約於 2005 年轉作苦瓜園後同時施用固殺草與巴拉刈，每年分別施用至少 6 次，於 2009 年確認田園內之牛筋草，對於固殺草與巴拉刈具有抗性 (Chuah *et al.*, 2010)。中國廣州的木瓜(papaya, *Carica papaya* L.)與葡萄(grape vine, *Vitis vinifera* L.)園有 20 年以上施用巴拉刈經歷，於園區內均有發現牛筋草巴拉刈抗性生物型(Luo *et al.*, 2019)。此外，印度油棕園內，已有 26 年施用巴拉刈與嘉磷塞之紀錄，每年施用 3-4 次，園內發現之牛筋草對於嘉磷塞與巴拉刈具有多重抗性(Purba, 2013)。

對於固殺草具有抗性之雜草種類，目前僅涵蓋 4 個物種，包括牛筋草、黑麥草(*Lolium perenne* L.)、義大利黑麥草[*Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (Lam.) Husnot]、與硬直黑麥草(*Lolium rigidum* Gaud.)，共 7 個案例，其中 2 案例為牛筋草，一案例為對於巴拉刈與固殺草同時具有抗性之牛筋草(Chuah *et al.*, 2010)；另一案例也於馬來西亞之油棕

園發現，經研究確認後，證實對於固殺草、嘉磷塞、巴拉刈、與 ACCase 抑制劑具有多重抗性(multiple resistance)，其中更對多種 ACCase 抑制劑具有交叉抗性(cross resistance)，較可惜的是該案例之文獻，並無說明油棕園除草劑之使用經歷與頻度(Jalaludin *et al.*, 2010, 2014, 2017)。

根據前人所發現之案例，對於固殺草或巴拉刈具有抗性之牛筋草，發生地點皆有多年且定期施用固殺草或巴拉刈之用藥經歷，且巴拉刈通常有 20 年以上之用藥經歷。本研究在台灣國內彩蕉園路旁之案例僅有 5 年施用，雖每年施用 3-4 次，推測對於巴拉刈與固殺草仍無抗性之原因可能為園內用藥時間僅 5 年與用藥次數相對較低，時間尚不足以使該牛筋草族群完成抗性演化。此外，兩種除草劑的混用可能延緩雜草演化出抗性(Lagator *et al.*, 2013)，也會減少抗性雜草的發生機率(Diggle *et al.*, 2003)。

表 1. 屏東縣里港鄉出現疑似巴拉刈(paraquat)與固殺草(glufosinate)抗性牛筋草收集系之案例。調查時間：2017 年 9 月 17 日；調查結束時間：2017 年 10 月 15 日。註：第一案例為首次調查，觀察 28 天，而後案例預設觀察 30 天。

項目	內容
疑似抗性之雜草	牛筋草(goosegrass, <i>Eleusine indica</i>) 取樣後編號為里港收集系 (Accession LiGung ; LG)
地點 (GPS)	屏東縣里港鄉三廊村彩蕉園道路旁 (22.792804, 120.473579)
藥劑種類及用量	巴拉刈(paraquat)與固殺草(glufosinate)依推薦劑量配置後 1 : 2 (v/v)混合施用。
頻度與持續時間	自 2012 年起，一年約 3-4 次，至調查日約持續 5 年。
移植溫室中隔離 栽培	自里港取回之牛筋草移植於溫室盆栽中。每盆一株並編號 Accession LiGung (LG) 1-8，於移植後第 5、8、13、18、 23、28 天記錄全株傷害指數，共記錄 7 次，觀察樣本是否 具有除草劑抗性之可能性。
結果	所有樣本於觀察期內均死亡，顯然該收集系對巴拉刈與固 殺草均無抗性。

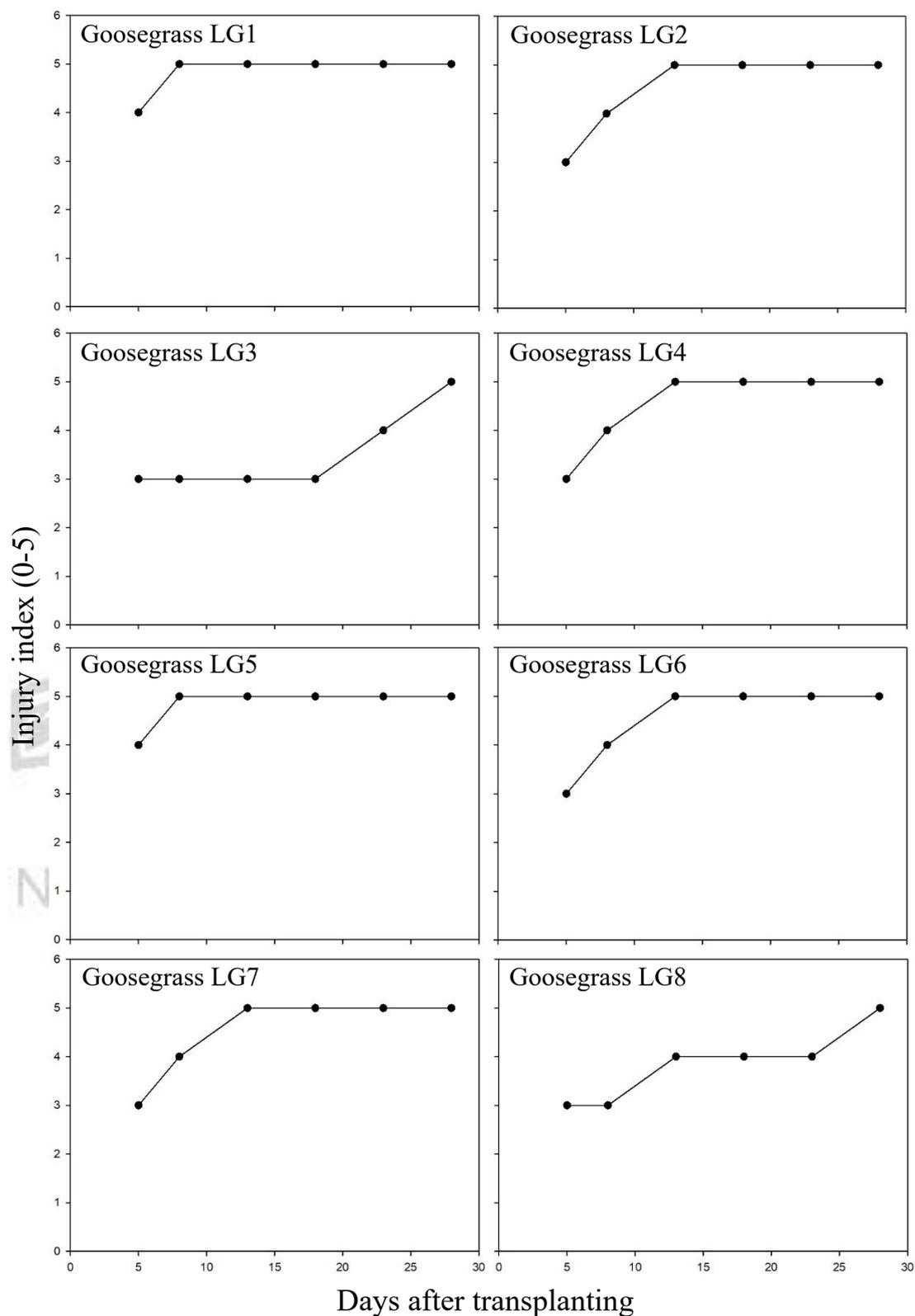


圖 4. 牛筋草里港收集系 (Accession LG) 之疑似抗性收集系之傷害指數變化圖，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數 (0-5)；0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

(二) 大村葡萄園農地

本研究之大村葡萄園農地案例通報地點為彰化縣大村鄉過溝村，其優勢雜草為葡萄園內之牛筋草、馬齒莧(*common purslane*, *Portulaca oleracea*)與短葉水蜈蚣(*green kyllinga*, *Kyllinga brevifolia*)。該園區長年施用之除草劑為快伏草(*quizalofop-ethyl*)與固殺草(*glufosinate*)，園內用藥經歷超過 20 年，採樣之目標為上述三種雜草經施藥後，仍然存活之植株，共採集牛筋草 8 株、馬齒莧 6 株、與水蜈蚣 3 株，移植回校內溫室觀察 30 天。觀察期間結束時，除水蜈蚣死亡一株外，其餘樣本均存活且逐漸恢復生長，因此判定三種雜草樣本皆有可能具有快伏草與固殺草之抗性(表 2、圖 5、6、7)。

牛筋草為田園常見之禾本科(*Poaceae*)雜草，並且於馬來西亞已發現兩個對於固殺草具有抗性生物型之案例(*Chuah et al.*, 2010, *Jalaludin et al.*, 2010, 2014, 2017)。對於 ACCase 抑制劑具有抗性之牛筋草共有 6 案例，分布於馬來西亞、巴西、與玻利維亞，最早於 1990 年在馬來西亞的蔬菜園中發現，園區已具有施用伏寄普(*fluazifop*) 4-5 年的經歷，每年施用 2-3 次，經檢測確認該田區之牛筋草具有伏寄普之抗性(*Tiw et al.*, 1997)。之後於巴西發現大豆田連續 20 年施用 *sethoxydim* (ACCcase inhibitor)，且每年至少施用一次，該田區出現之牛筋草，除了對於 *sethoxydim* 具有抗性外，也對於多種不同 ACCase 抑制劑 (*butroxydim*, *cyhalofop-butyl*, *clethodim*, *fluazifopP-butyl*, *haloxyfop-P-*

methyl)具有交叉抗性(Osuna *et al.*, 2012)。

美國喬治亞州草坪連續多年使用 sethoxydim 控制雜草，草坪中之牛筋草經檢測後，發現同時對於兩種 ACCase 抑制劑(diclofop-methyl、sethoxydim)具有抗性(未登錄於 WSSA 調查資料庫)(McCullough *et al.*, 2016)；另發現馬齒莧(common purslane, *Portulaca oleracea* L.)對於草脫淨(atrazine)與理有龍(linuron)具有抗性之案例，地點位在美國之密西根州之胡蘿蔔田，田區自 1965 年開始使用理有龍，並在 1991 年發現理有龍無法有效控制馬齒莧(Masabni *et al.*, 1999)；至於短葉水蜈蚣(green killina, *Kyllinga brevifolia* Rottb.)僅發現對於乙醯乳酸合成酶抑制劑(acetolactate synthase inhibitors; ALS inhibitors)(bensulfuron-methyl, flazasulfuron)具有抗性之案例(Okuno *et al.*, 2015)。

ACCase 抑制劑為選擇性除草劑，可以選擇性殺死禾本科草類，又稱為禾草類除草劑(graminicides)(Gronwald, 1991)，因此成為許多非禾本科作物田間常用除草劑，前述研究所發現之案例，田園通常有多年施用除草劑經歷。本研究之彰化大村葡萄園農地案例，自 1997 年開始，已有 20 年分別施用固殺草與快伏草(quizalofop-P-ethyl)之經歷，推測田區之牛筋草難以被固殺草與快伏草控制之原因，可能與其長年用藥有關。

表 2. 彰化縣大村鄉出現疑似快伏草與固殺草抗性牛筋草、馬齒莧與水蜈蚣收集系之案例報告，調查時間：2017 年 9 月 30 日；調查結束時間 2017 年 10 月 30 日。

項目	內容
疑似抗性之雜草	1. 牛筋草(<i>goosegrass</i> , <i>Eleusine indica</i>) 2. 馬齒莧(<i>common purslane</i> , <i>Portulaca oleracea</i>) 3. 短葉水蜈蚣(<i>green killinga</i> , <i>Kyllinga brevifolia</i>) 取樣後編號為大村收集系 (Accession Dacun ; DC)
地點 (GPS)	彰化縣大村鄉過溝村 3 巷 11 號鄰近葡萄園內 (23.940955, 120.549857)
藥劑種類及用量	1. 稀釋 600 倍之快伏草(<i>quizalofop-P- ethyl</i>) 2. 稀釋 200 倍之固殺草(<i>glufosinate</i>)
頻度與持續時間	自 1997 年，5 週一次，持續時間 20 年以上。
移植溫室中栽培	取回之雜草樣本移植於溫室盆栽中。每盆一株並編號 Accession Dacun (DC) + 數字編號，於移植記錄傷害指數後，每隔五天記錄一次，共 7 次，觀察樣本是否具有除草劑抗性之可能性(於 2017.10.30 結束調查)。
結果	馬齒莧 6 株皆存活 (<i>common purslane</i> DC1-6)；牛筋草 8 株皆存活 (<i>goosegrass</i> DC1-8)；水蜈蚣 2 株存活 (<i>green killinga</i> DC1-2)。三種雜草樣本皆具有除草劑抗性之可能，皆蒐集充足種子，待進行後續試驗。

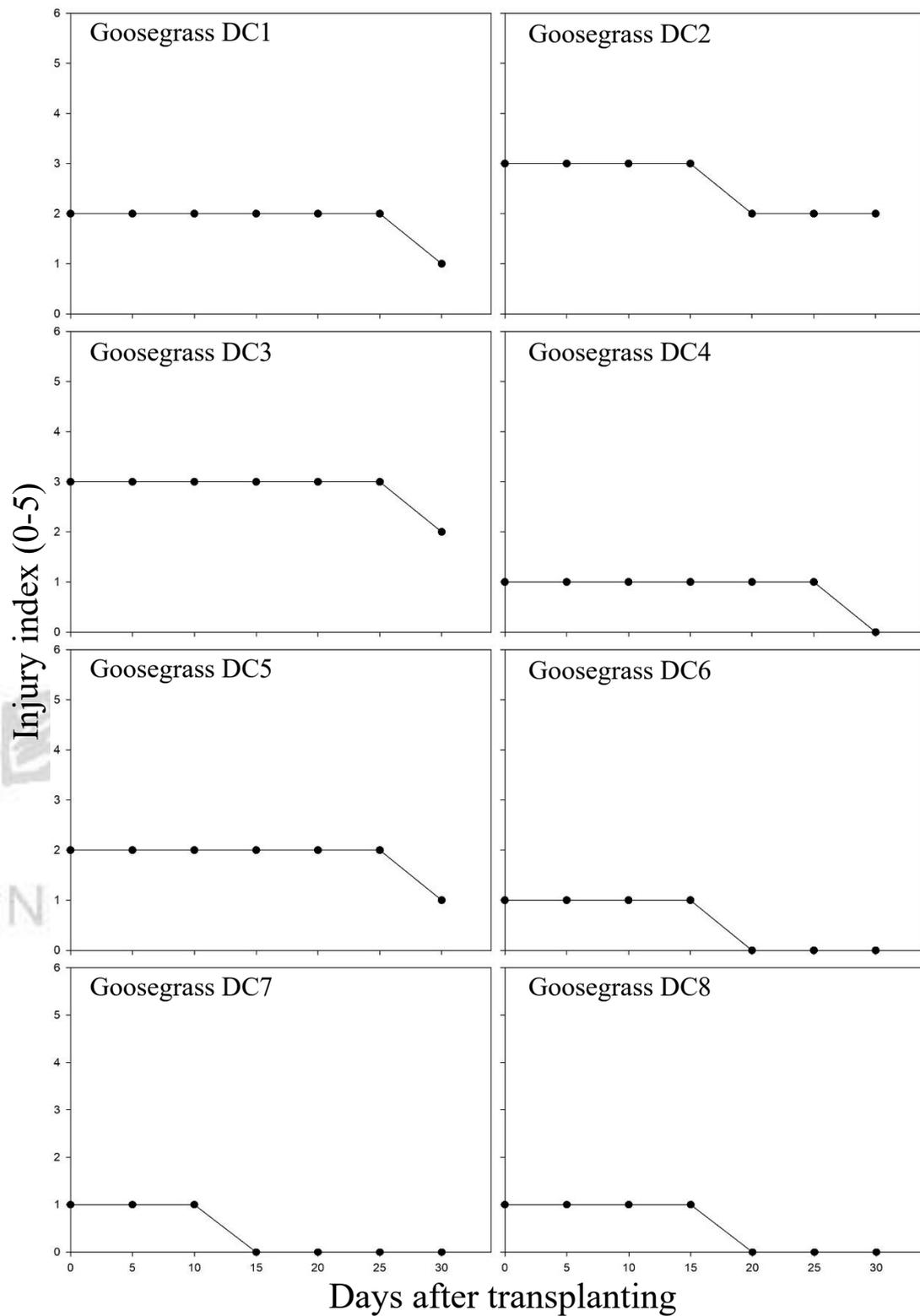


圖 5. 牛筋草(*goosegrass, Eleusine indica*)疑似抗性之大村收集系 (Accession DC1-8)傷害指數變化，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數 (0-5)；0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

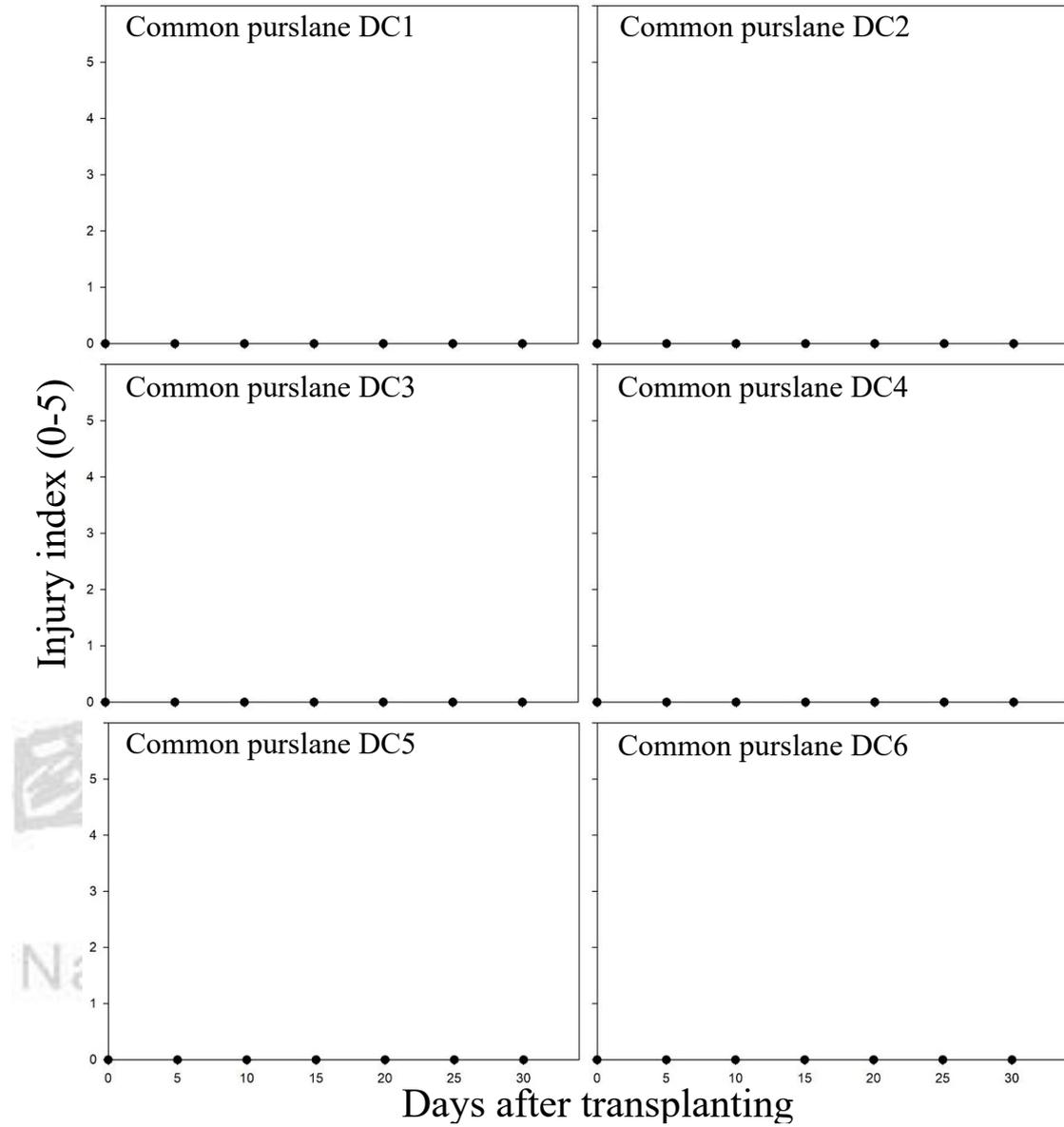


圖 6. 馬齒莧(*common purslane, Portulaca oleracea*) 疑似抗性之大村收集系 (Accession DC1-6) 傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

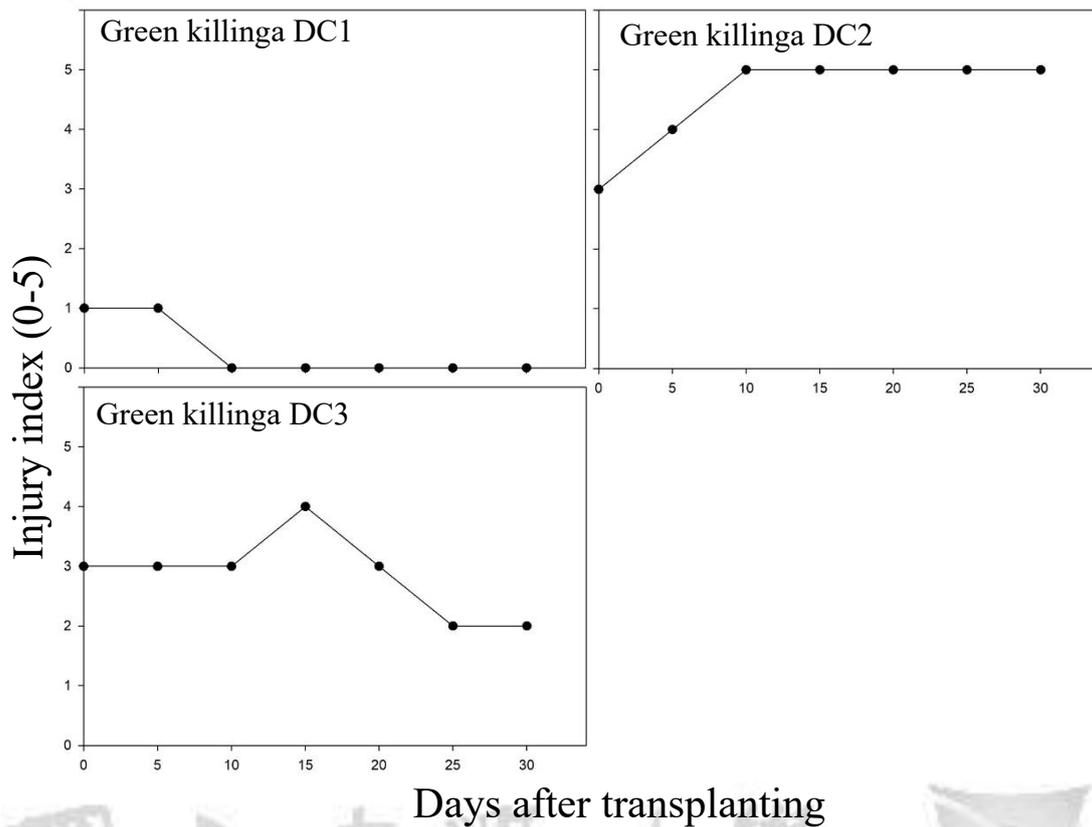


圖 7. 水蜈蚣(*green killingia*, *Ktylinga brevifolia*)疑似抗性之大村收集系 (Accession DC) 傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數 (0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

(三) 大豆田農地

本案例通報地點為屏東縣崁頂鄉之大豆田，疑似抗性雜草生物型為香附子(purple nutsedge, *Cyperus rotundus* L.)，該田區雜草主要透過固殺草防治，自 2013 年起每年施用 4 至 5 次，已施用多年。經施藥後的香附子，葉片末端呈現枯萎狀態，本研究疑似抗性雜草之採樣目標為呈現部分藥害但仍未死亡之植株，共移植 27 株回校園內溫室觀察 30 天，其中部分植株死亡，部分植株漸漸恢復生長，本研究將恢復生長之存活植株編號為收集系 KD 1-10 (表 3、圖 8)。

香附子俗稱土香，主要靠地下走莖(rhizome)與地下塊莖(tuber)行無性繁殖，為田間難以根除的惡性雜草，該案例田區主要使用固殺草防治，固殺草雖屬於接觸性除草劑(contact herbicide)，但仍具有部分系統性除草劑(systemic herbicide)效果(袁，1994)，惟對於主要依靠地下走莖與地下塊莖繁衍的香附子防治效果有限。此外，因固殺草屬於非選擇性除草劑(non-selective herbicides)，也會對於本案例之大豆植株產生影響，可能因此在施藥時為了避免傷及大豆植株而難以有效全面噴施。全球至 2019 年 6 月為止，尚未出現無香附子之抗性雜草生物型案例，因此本研究之大豆田農地之香附子案例，若經檢測具有抗性，具有相當程度之研究價值。

表 3. 屏東縣崁頂鄉出現疑似固殺草抗性香附子收集系之案例報告，
發現時間：2017 年 10 月 21 日；調查結束時間 2017 年 11 月 20 日。

項目	內容
疑似抗性之雜草	香附子(purple nutsedge, <i>Cyperus rotundus</i> L.) 取樣後編號為崁頂收集系(purple nutsedge KanDing; KD)
地點 (GPS)	屏東縣崁頂鄉南州路旁大豆田區 (22.498109, 120.509155)
藥劑種類及用量	推薦劑量之固殺草(590 g a.i. ha ⁻¹)
頻度與持續時間	自 2013 年，4-5 次/年，持續時間大於 5 年。
移植溫室中栽培	自崁頂取回之香附子移植於溫室盆栽中。每盆一株並編號 Purple nutsedge KanDing (KD) + 數字編號，移植當天紀錄傷害指數後，每隔五天紀錄一次，共 7 次，觀察樣本是否具有除草劑抗性之可能性。
結果	於 30 天觀察期內，10 株樣本已死亡；7 株生長停滯或受藥害導致植株生長情形惡化，使傷害指數提高；10 株逐漸回復生長，此 10 株編號為 purple nutsedge KD 1-10。

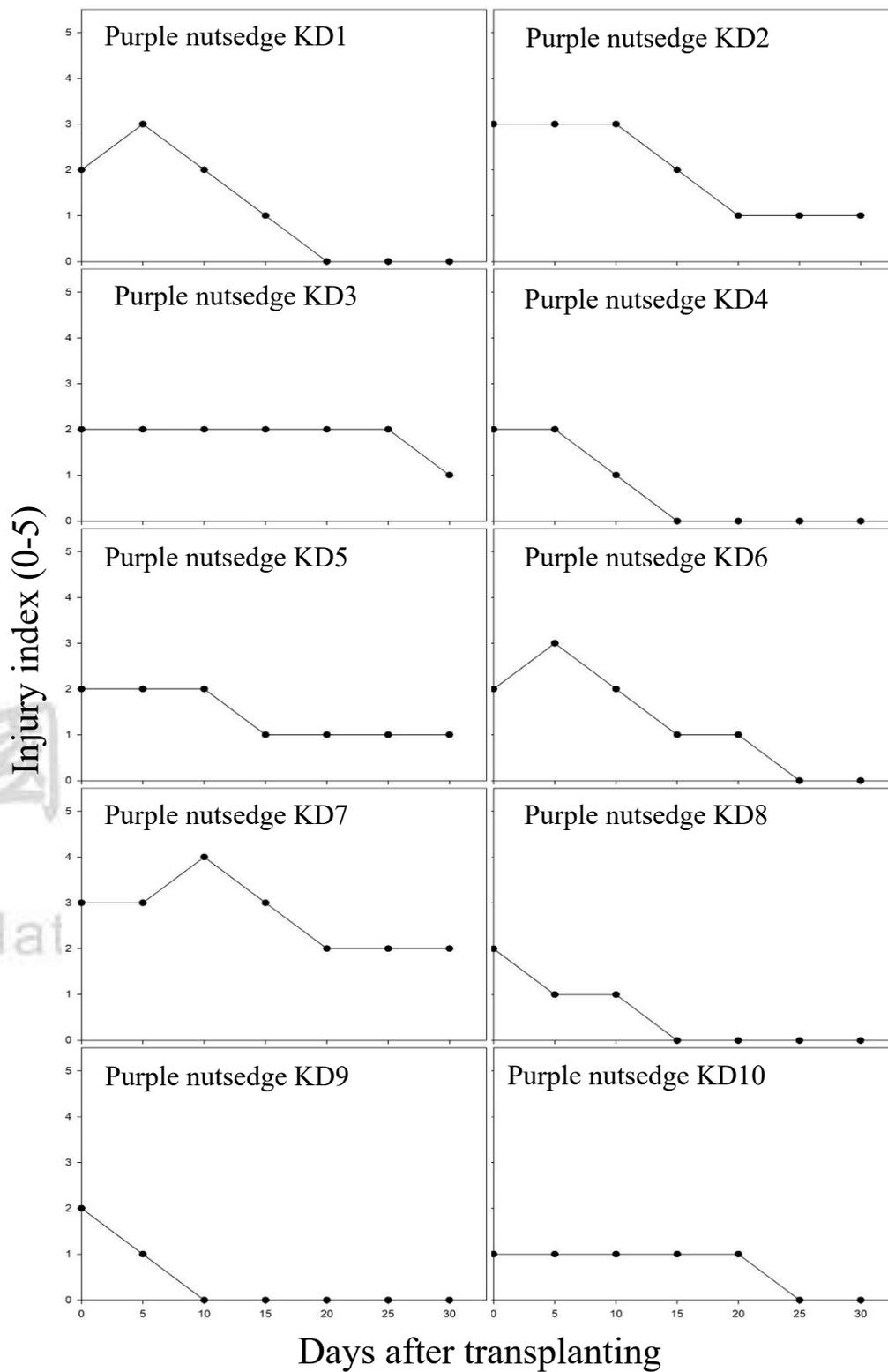


圖 8. 香附子(purple nutsedge KD1-10)疑似抗性之崁頂收集系傷害指數變化圖。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

(四) 小麥田農地

本案例調查地點為台中市大雅區員林里寶興宮鄰近之二區域小麥田，通報雜草為小葉灰藿(*small goosefoot, Chenopodium serotinum* L.)、野苋菜(*green amaranth, Amaranthus viridis* L.)與龍葵(*black nightshade, Solanum nigrum* L.)，施用之除草劑為固殺草(4.5 L ha^{-1} ，稀釋 600 倍)與二、四一地($2, 4\text{-D}, 1 \text{ kg ha}^{-1}$)，但皆低於推薦劑量(固殺草為 $13.5\% 5 \text{ L ha}^{-1}$ ，稀釋 600 倍；二、四一地為 $2\text{-}3 \text{ kg ha}^{-1}$ ，稀釋 200-300 倍)。本研究共採樣 9 株小葉灰藿、7 株野苋菜、與 2 株龍葵，移植回校園內溫室觀察，觀察期過後，野苋菜與龍葵全數存活，小葉灰藿存活 6 株，重新編號為 TY 1-6(表 4、圖 9、10、11)。

根據 WSSA 調查報告，至 2019 年 6 月仍未發現對固殺草與二、四一地之小葉灰藿、野苋菜、與龍葵抗性生物型。其中野苋菜亦未發現對於固殺草具有抗性之案例，僅在巴西發現對於草脫淨(*atrazine, photosystem II inhibitor*)、prometryne (*photosystem II inhibitor*)、與 trifloxysulfuron-sodium (*ALS inhibitor*)具有抗性之生物型(Francischini *et al.*, 2014)。龍葵則發現分別對於草脫淨與巴拉刈具有抗性之多個案例。小葉灰藿目前仍無發現除草劑抗性生物型。

雜草抗性為演化的過程，受到許多因素影響，包含遺傳、雜草種類、除草劑種類、與田園管理方式等(Powles and Yu, 2010)。本研究小麥田農地案例之田園管理方式方面，除草劑為第一次使用，施用之二、

四一地(1 kg ha^{-1})低於推薦劑量，根據訪查資料，該區域除草劑固殺草 (4.5 L ha^{-1} ，稀釋 600 倍)則於推薦範圍內($3\text{-}5 \text{ L ha}^{-1}$ ，稀釋至 600 L)，二、四一地推薦劑量為 $2\text{-}3 \text{ kg ha}^{-1}$ 粉劑稀釋 200-300 倍。田園除草劑選汰壓力為第一次出現，並且分別施用兩種不同作用機制除草劑，推測出現疑似抗性雜草生物型之可能原因為施用量低於推薦劑量，使三種雜草仍能存活。此外，於第一次施用除草劑後同時出現三種疑似抗性之雜草，此種機率相當低，故仍需進一步確認除草劑抗性存在與否。若該農地持續以低劑量除草劑管理雜草，仍有可形成除草劑壓力而產生除草劑抗性雜草生物型(Manalil *et al.*, 2011)。



表 4. 台中縣大雅區出現疑似固殺草與 2,4-D 抗性收集系之小葉灰藿、野苋菜、與龍葵，調查時間：2018 年 1 月 17 日，調查結束時間 2018 年 2 月 21 日。因生長狀況持續變化，觀察時間延長至 35 天。

項目	內容
疑似抗性之雜草	1. 小葉灰藿 (small goosefoot, <i>Chenopodium serotinum</i>) 2. 野苋菜 (green amaranth, <i>Amaranthus viridis</i>) 3. 龍葵 (black nightshade, <i>Solanum nigrum</i>) 取樣後編號為大雅收集系 (Accession TaYa, TY)
地點 (GPS)	台中市大雅區員林里寶興宮鄰近之二區域小麥田 (A : 24.238315, 120.652759 ; B : 24.230531, 120.653683)
藥劑種類及用量	分別施用 1. 固殺草 (4.5 L ha ⁻¹ ，稀釋 600 倍) 2. 2,4-D (1 kg ha ⁻¹) 低於推薦劑量。
頻度與持續時間	第一次使用
移植溫室中栽培	存活植株移植於溫室盆栽中。每盆一株並編號 Accession TaYa (TY) (小葉灰藿：1-9；野苋菜：1-7；龍葵：1-2)，於移植隔天記錄後，每 5 天記錄一次，共記錄 8 次 (觀察期將結束時植株有明顯恢復生長變化，特延長觀察 5 天)，觀察收集系是否具有除草劑抗性之可能性。
結果	小葉灰藿於 35 天觀察期內死亡 3 株，存活之收集系重新編號為 TYT 1-6 (T : tolerant)；野苋菜與龍葵收集系全數存活且生長良好。

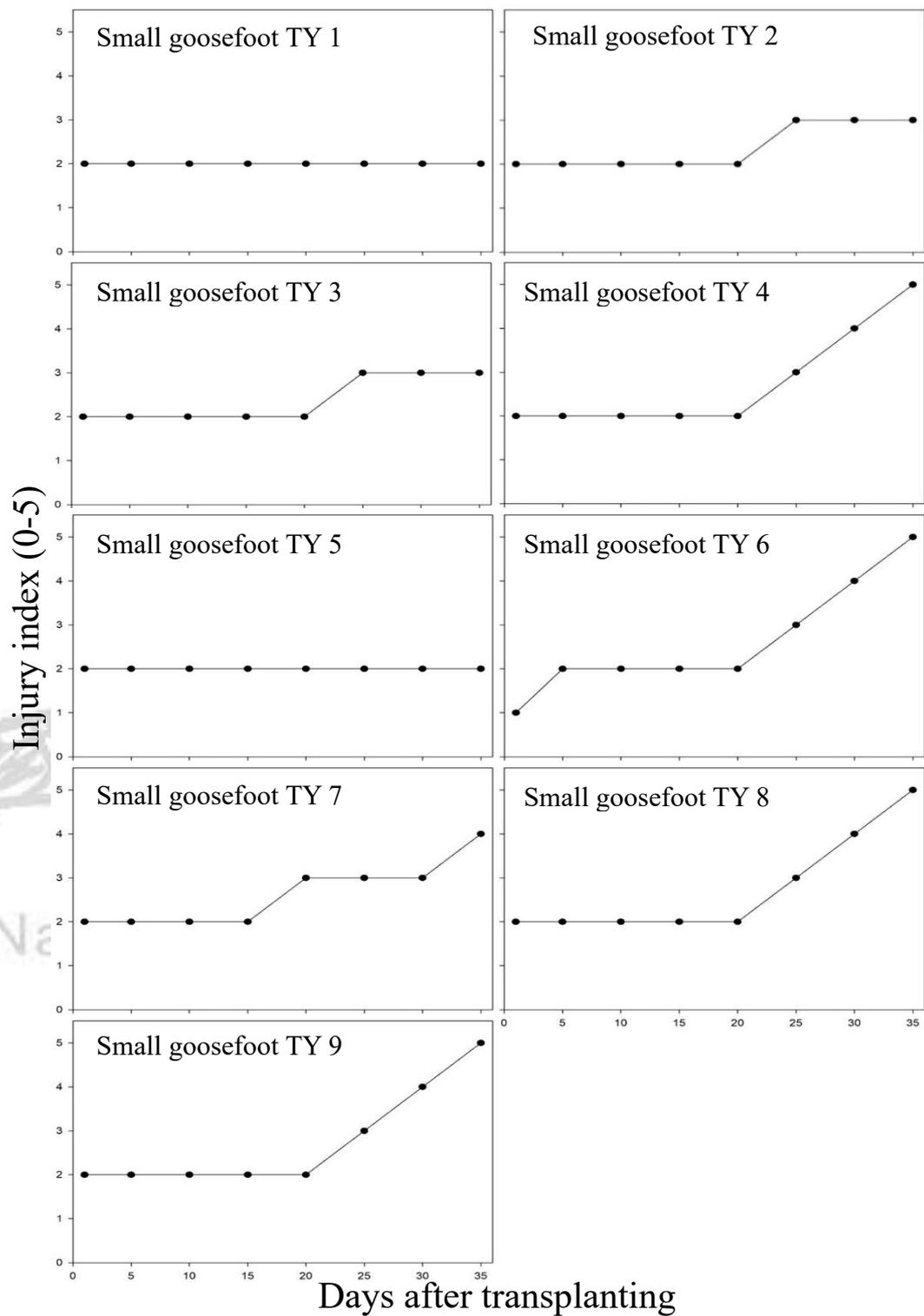


圖 9. 小葉灰藜 (small goosefoot, *Chenopodium serotinum*) 疑似固殺草與 2, 4-D 抗性之大雅收集系 [small goosefoot TY (1-9)] 傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

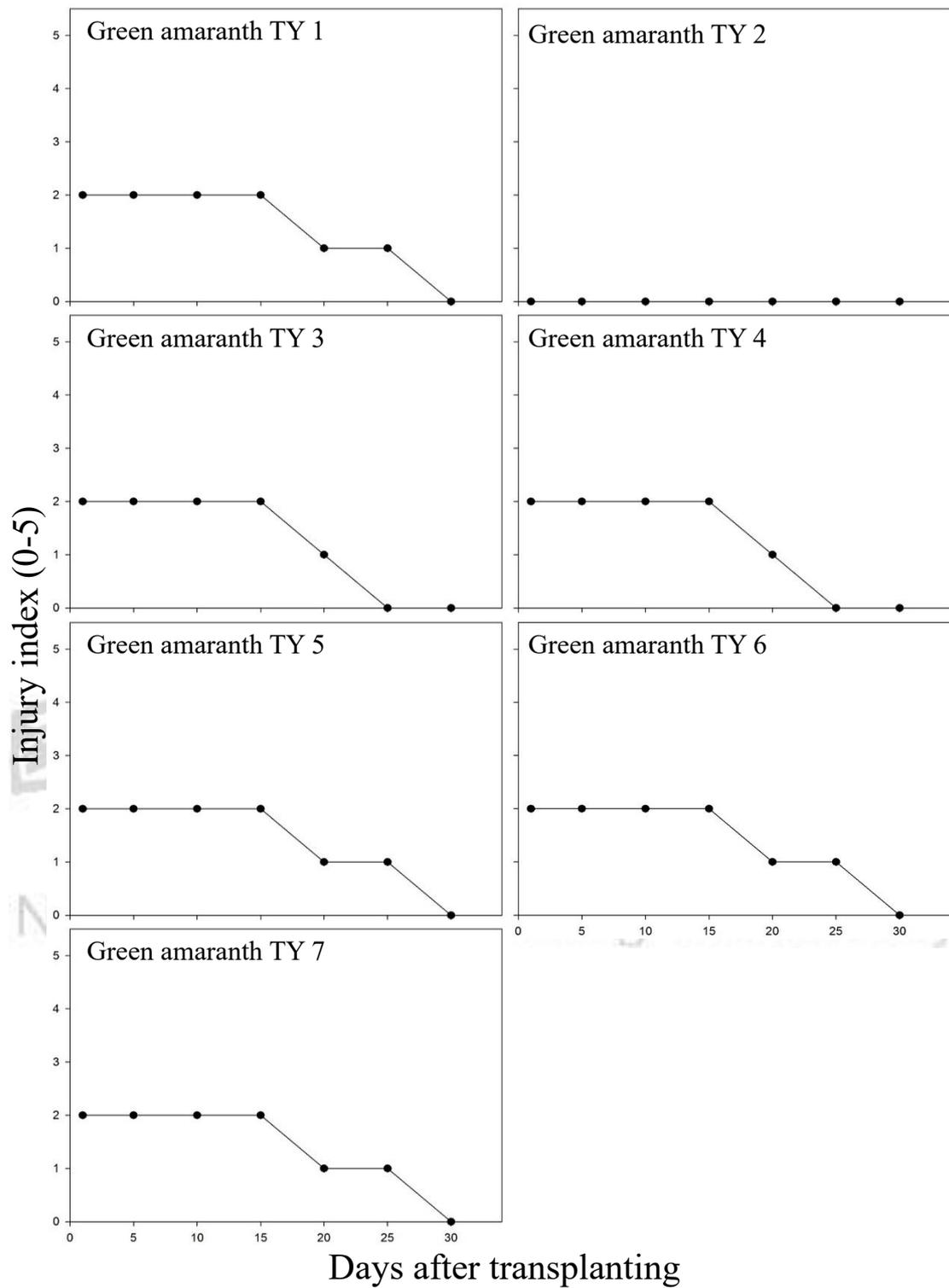


圖 10. 野苋菜(*green amaranth, Amaranthus viridis*) 疑似固殺草與 2, 4-D 抗性之大雅收集系[*green amaranth TY (1-7)*]傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

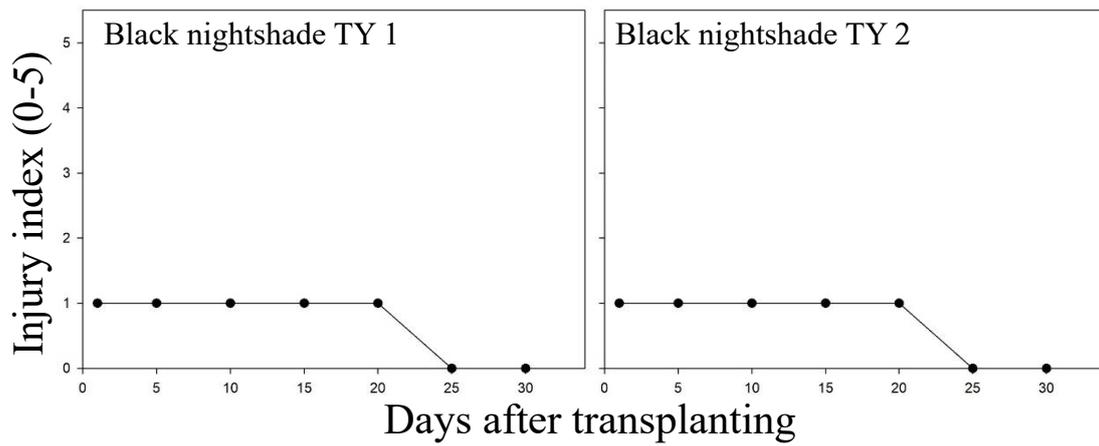


圖 11. 龍葵(black nightshade, *Solanum nigrum*)疑似固殺草與 2, 4-D 抗性之大雅收集系[black nightshade TY (1-2)]傷害指數變化。橫軸為移植後天數，縱軸為傷害指數(0-5)，0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

(五) 西斗葡萄園農地

本研究之西斗葡萄園農地案例調查與採樣地點為彰化縣二林鎮西斗里之葡萄園內，園區自 2012 年起，每年依推薦劑量施用固殺草 4 次，通報之疑似抗性雜草生物型為牛筋草，依農民施藥前後時間分兩族群，較早施藥為田園間之 A 族群，與較晚施藥之園區外圍 B 族群，兩族群共 21 株植株移植回溫室觀察 30 天後，所有植株存活且陸續恢復生長，並開始抽穗結實(表 5、圖 12、13)。

本研究之西斗葡萄園農地案例，根據農民所述，該田園早期並無牛筋草，因連年使用當地灌溉系統灌水後，牛筋草遂出現於葡萄園區成為難以控管之雜草，並在多年施用單一除草劑固殺草後，逐漸出現難以控管田間之牛筋草。該園區固殺草施用劑量依照推薦劑量施用 ($590 \text{ g a.i. ha}^{-1}$, 6.3 mM)，至採樣日 2018 年 4 月 23 日，已有五年多的固定用藥經歷，長期的固殺草選汰壓力下，增加除草劑抗性生物型之機率，導致發生牛筋草疑似固殺草抗性生物型。

表 5. 彰化縣二林鎮西斗里出現疑似固殺草之抗性牛筋草收集系。調查時間：2018 年 4 月 23 日；調查結束時間 2018 年 5 月 23 日。

項目	內容
疑似抗性雜草	牛筋草(<i>goosegrass, Eleusine indica</i>) 取樣後編號為西斗收集系(Goosegrass XiDou ; XD)
地點 (GPS)	彰化縣二林鎮西斗里八間路 180 巷 31 號 (23.894612, 120.409277)
藥劑種類及用量	依固殺草推薦劑量施用(590 g a.i. ha ⁻¹ , 6.3 mM)
頻度與持續時間	自 2012 年起，每年施用 4 次
移植溫室中栽培	自二林取回之植株樣本移植於溫室盆栽中。每盆一株並編號 Accession XiDou (XD) (牛筋草依施用除草劑時間不同分為 A 1-12 與 B 1-9 二群)，於移植隔天記錄後，於第 5、10、15、20、25、30 天記錄傷害指數，共記錄 7 次，觀察收集系是否具有除草劑抗性之可能性。
結果	所有牛筋草植株於觀察期結束時皆存活，漸漸恢復生長且抽穗，待收集成熟種子後，育苗進一步確認抗性。

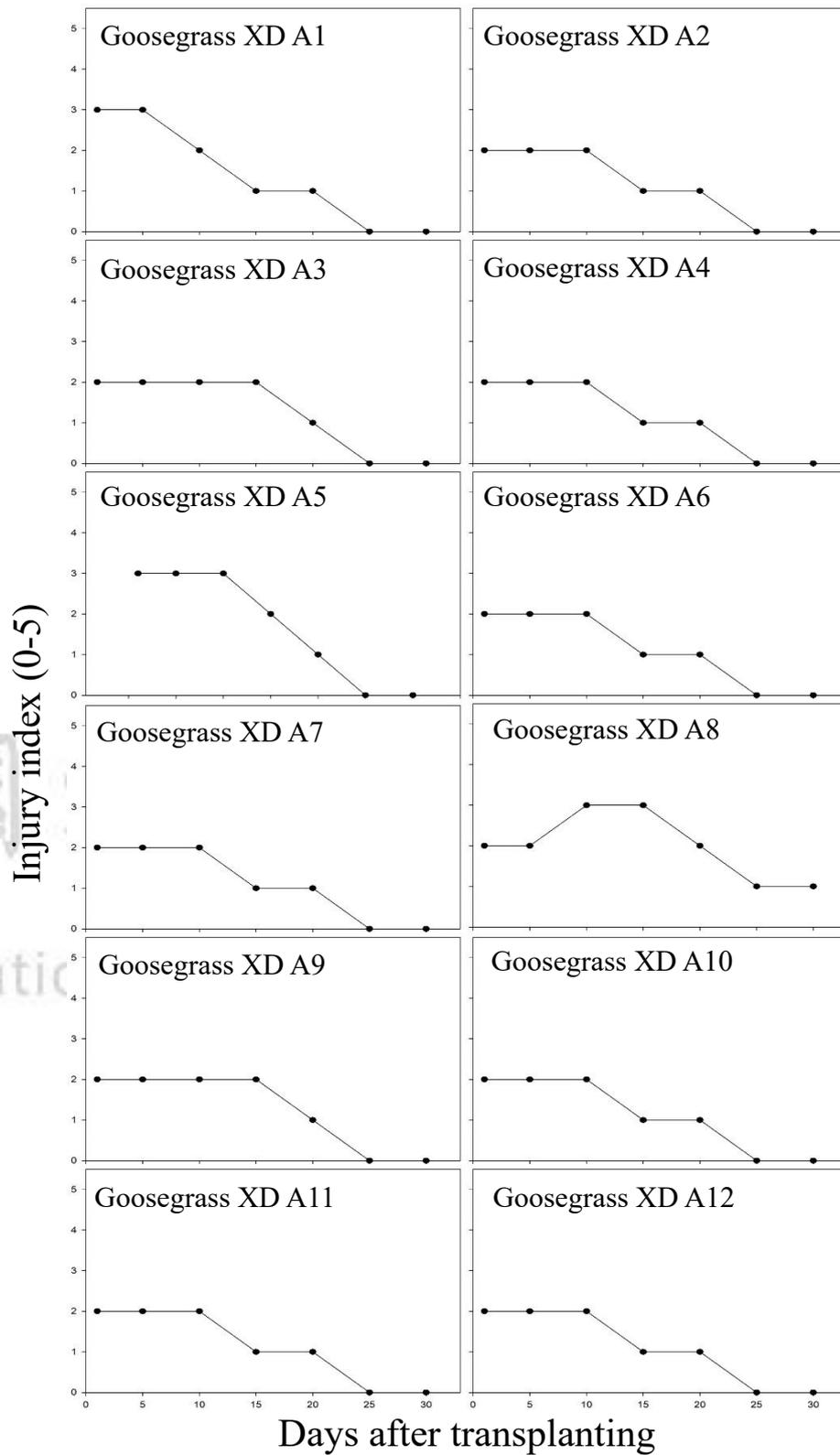


圖 12. 疑似抗性牛筋草 (goosegrass, *Eleusine indica*) 之西斗收集系 (goosegrass XD A1-12) 傷害指數變化，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數(0-5)。0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

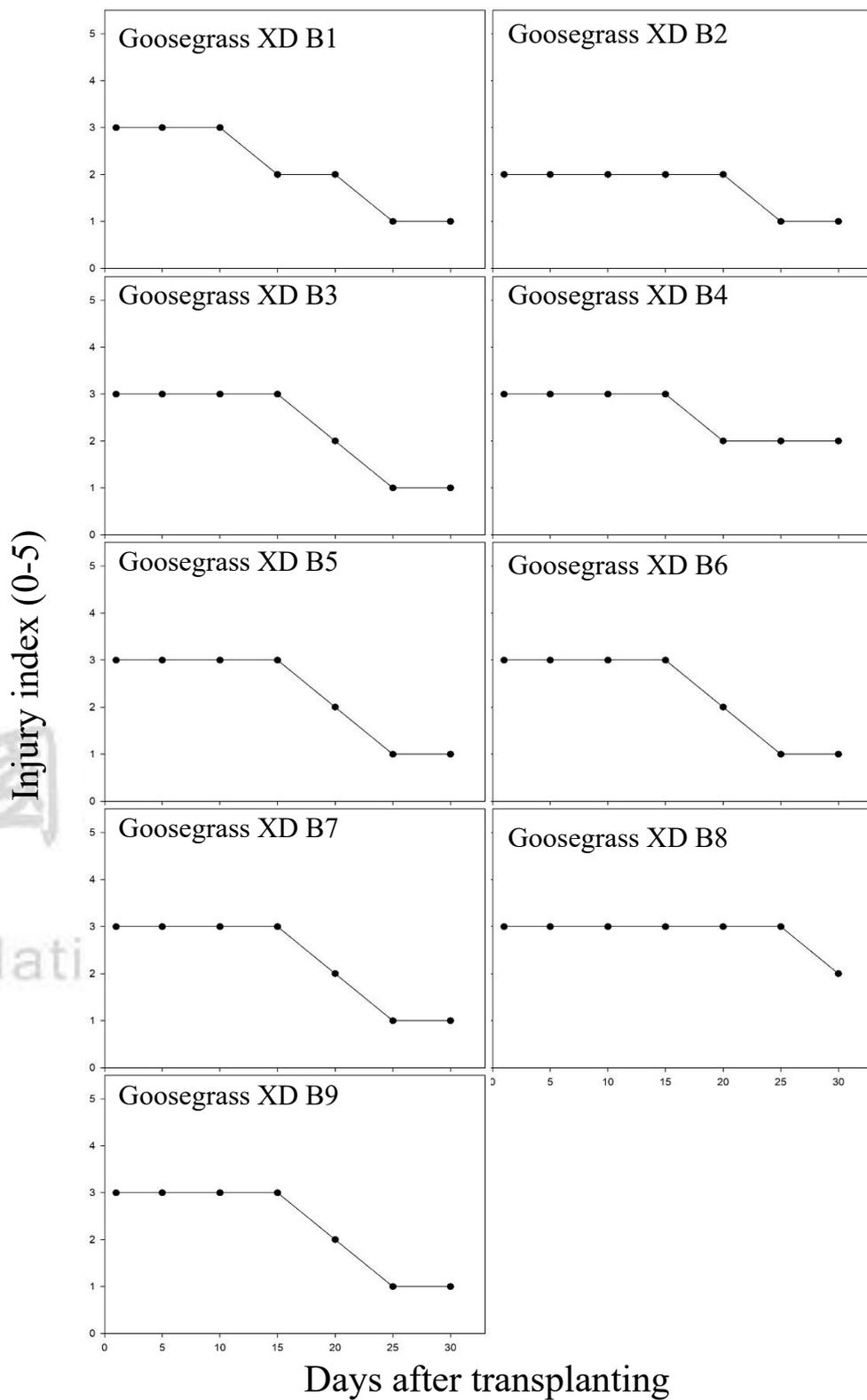


圖 13. 疑似抗性牛筋草 (*goosegrass, Eleusine indica*) 之西斗收集系 (goosegrass XD B1-9) 傷害指數變化，橫軸為移植後天數；縱軸為傷害指數 (0-5)。0 表示未發生藥害，5 表示因除草劑傷害而死亡。

雜草為造成農業損失的主要原因之一，於 1989 年粗估導致美國農業作物產值減少約 486 億美元(Pimentel *et al.*, 1993)，因此控制田間雜草為農業生產中重要的一環。管理雜草的方式包含人力、畜力、機械除草，或者透過種植覆蓋作物、敷蓋資材、與透過化學藥劑，都可以達到一定的控制成效；隨著時代的變化，高效率且低成本的除草劑成為雜草管理者之首選。但在長年高頻度的施用相同類型除草劑，造成的選汰壓力下，使雜草演化出抗性。雜草抗性演化的過程，受到許多因素影響，包括遺傳、雜草種類、除草劑種類、與田園管理方式等 (Powles and Yu, 2010)。

本研究所調查的五個案例皆透過施用除草劑控制田間雜草，較值得注意的是皆有施用固殺草，固殺草、巴拉刈、與嘉磷塞三種非選擇性為國內用量前三大的除草劑，在 2016 年固殺草佔農藥銷售總額 12%，市值突破 10 億(方麗萍，2017)，除案例一彩蕉園道路旁疑似固殺草與巴拉刈之抗性牛筋草，不具有除草劑抗性可能性外，其他四案例皆具有抗性可能性。案例二大村葡萄園施用之除草劑為固殺草與快伏草，固殺草施用濃度為 5 L ha⁻¹ 稀釋至 1,000 倍，快伏草與施用濃度為 1 L ha⁻¹ 稀釋至 600 倍，而根據農業藥物毒物試驗所之植物保護系統推薦劑量，固殺草於葡萄園推薦劑量為 5 L ha⁻¹ 稀釋至 600 倍施用，快伏草依據作物不同推薦劑量為 1 L ha⁻¹ 稀釋至 300-440 L(無葡萄園之推薦劑量)，本案例中葡萄園區固殺草與快伏草實際施用濃度

皆略低於推薦劑量。

案例三大豆田農地出現疑似固殺草抗性香附子，但國外尚無香附子抗性生物型之紀錄。案例四為第一次施用除草劑固殺草與二、四一地之小麥田農地，且施用之劑量均低於推薦用量，因此小葉灰藿、龍葵、與野苧菜具有抗性可能性相對較低。案例五牛筋草之採樣地點為長年施用固殺草控制雜草之葡萄園。案例二至五之疑似抗性雜草均待存活植株結籽後蒐集其種子，經育苗後進行劑量反應分析，以確認其抗性程度高低。

本研究五案例中，其中三案例均包含牛筋草，牛筋草為田間常見之雜草，廣泛分布於熱帶與亞熱帶，且其每株可產生高達 140,000 種子，種子埋入土壤大於 6 公分，發芽率便降至 4%(Chauhan and Johnson, 2008)。因此在牛筋草較為豐富的田園，可以透過改變整地或翻土深度來防止牛筋草發芽。本研究中除案例四外，皆有長年施用相同除草劑控制田間雜草的經歷，這也造成田間高度的選汰壓力，加速雜草演化出除草劑抗性。此外，所有案例皆有施用固殺草，固殺草屬於非選擇性除草劑，為田間常用之藥劑。由於抗性雜草發生的條件皆不盡相同，如作物的種類不同會使田間管理方式與除草劑的選擇不同，因此研究者根據早期提出之雜草綜合管理 (integrated weed management, IWM) 概念，同時利用生物性、化學性、與物理性的方法來控制雜草(Powles *et al.*, 1992)，其成功控制具有多種除草劑抗性之

硬直黑麥草(*Lolium rigidum* Gaud.) (Powles *et al.*, 1996)。

二、單一抗性鑑定

(一) 固殺草劑量反應分析

經前述觀察初步判定可能具有除草劑抗性後，本研究進一步透過對數邏輯模式(log-logistic model)(Seefeldt *et al.*, 1995)進行劑量反應分析，施用固殺草 8 個不同濃度於牛筋草疑似抗感性幼苗，並記錄存活率與傷害指數，透過對數邏輯模式進行分析，可得對應之 ED₅₀ 數值(半數致死劑量，半數傷害劑量)，將抗性與感性生物型之 ED₅₀ 數值相除後，即得抗性指數(resistance index)，並依該數值判斷抗性程度(resistance level)。根據 WSSA 抗性雜草定義，抗性指數大於 10 屬高程度(high-level)抗性，若小於 10 則為低程度(low-level)抗性(Heap, 2005)。

源自案例二大村葡萄園牛筋草樣本(DC 1-8)中，所有植株後代在固殺草推薦劑量施用下皆存活，但在推薦劑量 0.1 與 0.2 倍 (0.63 與 1.26 mM) 濃度時有輕微藥害發生，於推薦劑量下則部分植株存活；依據傷害指數計算之 ED₅₀，作為對照組之感性生物型為 1.08 mM (101 g a.i. ha⁻¹)，而供試之八個抗性植株後代則為 1.54~3.02 mM (144 ~ 283 g a.i. ha⁻¹)，其中具有顯著差異的 DC4 與 DC5 後代，抗性程度為感性族群的 2.9 倍；依據存活率計算之半數致死劑量，感性生物型為 1.55

mM (145 g a.i. ha⁻¹)，抗性植株後代除 DC2 外，皆顯著具有抗性，半數致死劑量為 5.67-9.99 mM (531-936 g a.i. ha⁻¹)，抗性程度為感性族群的 3.7-6.4 倍，表示 DC1 與 DC3-8 擁有低程度之固殺草抗性(表 6、7)。

Riemens *et al.* (2008)研究中，以固殺草 30 g a.i. ha⁻¹ 處理早熟禾 (*Poa annua*)、稗草(*Echinochloa crusgalli*)、藜(*Chenopodium album*)、龍葵(*Solanum nigrum*)、黍(*Panicum miliaceum*)、鵝觀草(*Elymus repens*)、矢車菊(*Centaurea cyanus*)、與繁縷(*Stellaria media*)，除早熟禾無明顯傷害外，鵝觀草、藜、龍葵與繁縷有黃斑狀壞疽發生；而黍、矢車菊、

表 6. 牛筋草抗感性生物型於固殺草施用後 20 天，依據傷害指數所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差)

Biotype	ED ₅₀ (injury index)(mM)	P-value	Resistance index
S	1.08 ± 0.09	-	-
DC 1	1.76 ± 0.13	0.329	-
DC 2	1.36 ± 0.11	0.691	-
DC 3	1.56 ± 0.10	0.489	-
DC 4	3.12 ± 0.13	0.007	2.9*
DC 5	3.10 ± 1.66	0.007	2.9*
DC 6	1.64 ± 0.23	0.419	-
DC 7	1.54 ± 0.32	0.503	-
DC 8	1.88 ± 0.45	0.252	-

*表示與牛筋草感性生物型(S)相較有顯著差異，P < 0.05。

與稗草除黃斑狀壞疽外，葉尖端呈現萎凋，在 60 g 與 300 g a.i. ha⁻¹ 固殺草處理下，所有物種都有壞疽與萎凋症狀發生，此結果與本研究相似，但大村葡萄園之牛筋草抗性生物型擁有低程度抗性，於推薦劑量 590 g a.i. ha⁻¹ 下仍有部分植株存活，但可見藥劑傷害症狀。

根據美國雜草學會(WSSA)的除草劑抗性雜草之國際調查(International Survey of Herbicide resistant weeds)，至 2019 年 3 月 24 日，對於固殺草具有抗性之雜草種類有牛筋草、黑麥草(*Lolium perenne*)、義大利黑麥草(*Lolium multiflorum*)、與硬直黑麥草(*Lolium rigidum*)，上述之牛筋草案例來自於馬來西亞，其對照感性生物型 ED₅₀(半數致死劑量)為 301 g a.i. ha⁻¹；抗性生物型 Kesang 與 Jerantut

表 7. 牛筋草抗感性生物型於固殺草施用後 20 天，依據存活率所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差)

Biotype	ED ₅₀ (survival rate)(mM)	P-value	Resistance index
S	1.55 ± 0.10	-	-
DC 1	5.67 ± 0.55	0.022	3.7*
DC 2	2.39 ± 0.21	0.619	-
DC 3	5.96 ± 0.17	0.015	3.8*
DC 4	9.00 ± 0.49	<0.001	5.8*
DC 5	9.99 ± 3.99	<0.001	6.4*
DC 6	7.47 ± 1.30	0.002	4.8*
DC 7	6.40 ± 0.49	0.008	4.1*
DC 8	6.56 ± 0.81	0.007	4.2*

*表示與牛筋草感性生物型相較有顯著差異，P < 0.05。

則為 593 與 2,297 g a.i. ha⁻¹ (Jalaludin *et al.*, 2010)，而本研究最高抗性之生物型 ED₅₀ 則為 936 g a.i. ha⁻¹，高於推薦劑量 590 g a.i. ha⁻¹，而農民使用之劑量 354 g a.i. ha⁻¹ 則低於推薦劑量，在長年施用下仍難以控制田間牛筋草族群。

(二) 快伏草劑量反應分析

經快伏草劑量反應分析後，從傷害指數之 ED₅₀ 來看，感性族群為 0.0282 mM (6.4 g a.i. ha⁻¹)，低於推薦劑量 0.195 mM (44 g a.i. ha⁻¹)，抗性族群相較之下顯著具有抗性的為 DC2、DC4、DC7 與 DC8，其 ED₅₀ 介於 0.0906-0.1366 mM (20.4-30.8 g a.i. ha⁻¹)，抗性指數為 3.2~4.8。若依存活率之 ED₅₀ 計算，感性族群為 0.0258 mM (5.8 g a.i. ha⁻¹)，顯著具有抗性的為 DC2、DC7、與 DC8，為 0.4372-0.6654 mM (99.9~150.0 g a.i. ha⁻¹)，抗性指數為 16.9~25.8，大於 10，相較於感性族群具有高程度抗性(表 8、9)。

根據 WSSA 調查資料，目前已知全球對於 ACCase inhibitor (acetyl CoA carboxylase inhibitor) 具有抗性的雜草有 48 種，其中牛筋草至今發現 6 案例，首次發現牛筋草對於 ACCase inhibitor 具有抗性的生物型是在馬來西亞，該抗性生物型可以在 0.25-16 kg a.i. ha⁻¹ (fluazifop) 以上的劑量下存活，且其 ACCase 酵素對於 fluazifop 極不敏感，IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) 大於 500 μM (Leach *et al.*, 1995)。

其後 Cha *et al.* (2014)發現馬來西亞來自三個不同州的牛筋草，其 GR₅₀ (減少鮮重生長達 50%之劑量)需 250-600 g a.i. ha⁻¹ 伏寄普。過往藥試所於高雄與彰化地發現對於 ACCase inhibitor 具有抗性之牛筋草，經試驗後證實對於伏寄普 (fluazifop-P-butyl) 具有抗性，其傷害指數之 ED₅₀ 為 0.668 mM (Lin *et al.*, 2016)，大於本試驗最高 DC 8 之 0.1366 mM。

表 8. 牛筋草抗感性生物型於快伏草施用後 45 天，依據傷害指數所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50}(R)/ED_{50}(S)$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差)

Biotype	ED ₅₀ (injury index)(mM)	P-value	Resistance index
S	0.0282 ± 0.0089	-	
DC 1	0.0050 ± 0.0028	0.442	
DC 2	0.0906 ± 0.0398	0.047	3.2*
DC 3	0.0122 ± 0.0036	0.596	
DC 4	0.1058 ± 0.0459	0.016	3.8*
DC 5	0.0071 ± 0.0009	0.484	
DC 6	0.0622 ± 0.0117	0.264	
DC 7	0.1054 ± 0.0355	0.016	3.7*
DC 8	0.1366 ± 0.0251	0.001	4.8*

*表示與牛筋草感性生物型相較有顯著差異，P < 0.05。

表 9. 牛筋草抗感性生物型於快伏草施用後 45 天，依據存活率所得到的抗性指數，S 為牛筋草感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草抗性生物型後代，抗性指數 $RI = ED_{50}(R)/ED_{50}(S)$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差)

Biotype	ED ₅₀ (survival rate)(mM)	P-value	Resistance index
S	0.0258 ± 0.0055	-	
DC 1	0.0121 ± 0.0011	0.923	
DC 2	0.4372 ± 0.2212	0.008	16.9*
DC 3	0.0143 ± 0.0036	0.935	
DC 4	0.3023 ± 0.0763	0.061	
DC 5	0.0158 ± 0.0040	0.943	
DC 6	0.2007 ± 0.0774	0.224	
DC 7	0.5012 ± 0.2658	0.003	19.4*
DC 8	0.6654 ± 0.0675	0.001	25.8*

*表示與牛筋草感性生物型相較有顯著差異， $P < 0.05$ 。

(三) 嘉磷塞劑量反應分析

大村葡萄園牛筋草 DC1-8 後代與對照組牛筋草經嘉磷塞處理後，DC1-8 後代對於嘉磷塞反應極為敏感，依傷害指數計算之半數傷害劑量為 3.1-24.7 mM，顯著低於對照組牛筋草之 192.7 mM，約為對照組 1.6-12.8%。而 DC1-8 牛筋草後代之半數致死劑量為 6.0-43.3 mM，同樣顯著低於對照組牛筋草之 325.7 mM，約為對照組 1.8-13.3%，結果顯示 DC1-8 牛筋草後代不但無嘉磷塞之抗性，且顯現出高度敏感性，此材料展現之嘉磷塞敏感性，值得進一步研究其基理機制(表 10、表 11)。

對嘉磷塞具抗性之牛筋草最早是在 1997 年於馬來西亞發現，果園區已經營 4 年，並持續使用嘉磷塞控制雜草，經檢測後該園區之牛筋草 Teluk Intan 族群對於嘉磷塞之 LC_{50} (50% lethal concentration) 為 $4,979 \text{ g a.e. ha}^{-1}$ ，對於嘉磷塞不敏感(Lee and Ngim, 2000)。馬來西亞也於另外 4 區域發現抗嘉磷塞之牛筋草，施用嘉磷塞經歷長約 5-15 年，4 抗性族群之 ED_{50} 為 $491-1,077 \text{ g a.e. ha}^{-1}$ ，顯著高於感性族群 ED_{50} $230-322 \text{ g a.e. ha}^{-1}$ (Ng *et al.*, 2004)。而於菲律賓非耕地發現嘉磷塞抗性牛筋草 Davao 族群，該非耕地有 5 年施用嘉磷塞經歷，每年施用四次，牛筋草 Davao 族群 GR_{50} 為 $227 \text{ g a.e. ha}^{-1}$ ，顯著高於感性族群 GR_{50} 之 $81 \text{ g a.e. ha}^{-1}$ (Kaundun *et al.*, 2008)。

過去發現抗嘉磷塞牛筋草，都具有多年嘉磷塞用藥經歷，而本研究之大村葡萄園案例並無施用嘉磷塞，故無嘉磷塞之選汰壓力，經劑量反應試驗後發現園區內之牛筋草對於嘉磷塞極敏感，反倒是對照組對於嘉磷塞為相對不敏感的，半數傷害劑量為 192.7 mM ($3,902 \text{ g a.i. ha}^{-1}$)與半數致死劑量為 325.7 mM ($6595 \text{ g a.i. ha}^{-1}$)，皆大於推薦劑量 86.6 mM ($1753 \text{ g a.i. ha}^{-1}$)。從另一方面，是否作為對照組之牛筋草生物型，其來源曾經歷嘉磷塞選汰壓力，值得追蹤探討。

表 10. 牛筋草抗感性生物型於嘉磷塞施用後 30 天，依據傷害指數所得到的抗性指數，S 為牛筋草針對固殺草之感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草針對固殺草之抗性生物型後代，嘉磷塞抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差)

Biotype	ED ₅₀ (injury index)(mM)	P-value	Resistance index
S	192.7 ± 89.6	-	-
DC 1	5.3 ± 1.2	0.022	<1*
DC 2	7.4 ± 2.2	0.023	<1*
DC 3	3.6 ± 0.9	0.021	<1*
DC 4	3.1 ± 1.0	0.021	<1*
DC 5	3.3 ± 0.3	0.022	<1*
DC 6	11.5 ± 1.8	0.026	<1*
DC 7	24.7 ± 4.7	0.038	<1*
DC 8	9.6 ± 1.6	0.025	<1*

*表示與牛筋草感性生物型相較有顯著差異， $P < 0.05$ 。

National Chung Hsing University

Zhou *et al.* (2006)將水稻(*Oryza sativa* L.)變異之 EPSPS 導入大腸桿菌(*Escherichia coli*)中進行研究，發現 EPSPS 第 106 個胺基酸由脯胺酸(proline)改變為白胺酸(leucine)，使大腸桿菌對於嘉磷塞抗性提高 3 倍，對於嘉磷塞之親和力減少 70 倍，並透過酵素動力學模型確認該 P106L 變異使 EPSPS 對於嘉磷塞具有抗性。Yu *et al.* (2015)發現之牛筋草具有 EPSPS 胺基酸雙重變異，分別為於第 102 個胺基酸由蘇胺酸(threonine)改變為異白胺酸(isoleucine)、與第 106 個胺基酸脯胺酸(proline)改變為絲氨酸(serine)，將 EPSPS 基因導入大腸桿菌研究，

大腸桿菌對嘉磷塞極不敏感，抗性程度為 2,647 倍。本研究之感性族群對照組對於固殺草與快伏草為敏感，但對於嘉磷塞為不敏感。

表 11. 牛筋草抗感性生物型於嘉磷塞施用後 30 天，依據存活率所得到的抗性指數，S 為牛筋草針對固殺草之感性生物型，DC1-8 為彰化大村牛筋草針對固殺草之抗性生物型後代，嘉磷塞抗性指數 $RI = ED_{50(R)}/ED_{50(S)}$ 。(ED₅₀ 為平均值±標準誤差)

Biotype	ED ₅₀ (survival rate) (mM)	P-value	Resistance index
S	325.7 ± 146.8	-	-
DC 1	5.6 ± 2.5	0.019	<1*
DC 2	14.2 ± 1.4	0.021	<1*
DC 3	6.0 ± 2.7	0.018	<1*
DC 4	6.6 ± 2.4	0.018	<1*
DC 5	6.6 ± 0.6	0.018	<1*
DC 6	23.2 ± 6.0	0.024	<1*
DC 7	43.3 ± 20.0	0.034	<1*
DC 8	15.6 ± 3.0	0.021	<1*

*表示與牛筋草感性生物型相較有顯著差異， $P < 0.05$ 。

三、交叉抗性

交叉抗性(cross resistance)為雜草對同一種作用機制之不同結構除草劑同時具有抗性。本研究之(二)大村葡萄園之牛筋草，經抗性檢測後 DC2、DC7、與 DC8 對於快伏草具有高程度之抗性，鑒於樣本種子數目不足，故尚未進行其他 ACCase 抑制劑之交叉抗性檢測，目前樣本植株仍於溫室中持續抽穗結實。後續將研究其對於其他 ACCase 抑制劑是否具有交叉抗性(表 9、表 10)。

以希臘之黑麥草為例，當地於 1970 年代中期開始廣泛使用 diclofop-methyl (ACCase inhibitor)控制黑麥草，而後於 1980 年代漸漸引入其他 ACCase 抑制劑，一果園內自 1985 年至 1996 年間，間斷的施用 diclofop-methyl 後，發現已無法有效控制黑麥草，並且該黑麥草族群除了對於 diclofop-methyl 具有高程度抗性之外，對於其他未於園區施用之 ACCase 抑制劑(clodinafop、fluazifop、tralkoxydim、sethoxydim)亦具有交叉抗性(Kotoula-Syka *et al.*, 2000)。法國之大穗看麥娘也發現對於多種 ACCase 抑制劑具有交叉抗性，由於其 ACCase 酵素發現三個胺基酸的改變，分別為第 1781 個胺基酸由異白胺酸(isoleucine)改變為白胺酸(leucine)、與第 2078 個胺基酸由天冬胺酸(aspartate)改變為甘胺酸(glycine)，使其對於 fenoxaprop、clodinafop、與 pinoxaden 具有交叉抗性(Petit *et al.*, 2009)。

上述之目標位置改變賦予植物交叉抗性最常被發現，而非目標位置改變之機制，如代謝除草劑能力加強與減少轉運除草劑至作用部位也可能使植物擁有交叉抗性，其中代謝除草劑能力加強，也可能使植物對不同作用機制之除草劑也具有代謝能力，進而獲得多重抗性，而減少轉運除草劑至作用部位通常針對同種作用機制之除草劑(Beckie and Tardif, 2012)。黑麥草 SLR31 族群本身對於 diclofop-methyl (ACCase inhibitor)具有抗性與多種硫醯尿素類(sulfonylureas)除草劑具有交叉抗性，利用含有 ^{14}C 的 chlorsulfuron 處理 SLR31、VLR6(僅對 diclofop-methyl 有抗性)與感性 VLR1 族群後，發現其代謝 chlorsulfuron 速度顯著高於對於 diclofop-methyl 有抗性之 VLR6、與感性 VLR 族群(Matthews *et al.*, 1990)。

四、多重抗性

本研究之大村葡萄園牛筋草 DC4、7、與 8，經抗性檢測後發先對於快伏草與固殺草具有多重抗性。至 2017 年，WSSA 已登錄 5 個多重抗性牛筋草族群，此案例或能成為第 6 個具有多重抗性之牛筋草族群。

多重抗性(multiple resistance)為雜草對於多種不同抗性機制除草劑具有之抗性。Jalaludin *et al* (2010, 2014, 2017)於馬來西亞之油棕園，發現該園區之牛筋草對於固殺草、嘉磷塞、與 ACCase 抑制劑

(fluazifop, haloxyfop, butoxydim)具有多重抗性。Chuah *et al*(2010)於馬來西亞之苦瓜園，發現園區內之牛筋草對於固殺草與巴拉刈具有多重抗性，該園區自 1970 年開始使用巴拉刈，於 2005 年開始同時施用固殺草。Purba (2013)也於印度尼西亞發現對於嘉磷塞與巴拉刈具有抗性之牛筋草，油棕園內已有 26 年施用嘉磷塞與巴拉刈經歷。由上述研究可得知多重抗性的發生，為多年同時施用不同作用機制除草劑，造成多重選汰壓力，演化出多重抗性。

多重抗性發生原因與通常與不同作用機制除草劑之目標位置無關，加強除草劑代謝能力為目前最常被發現得多重抗性原因。如將大穗看麥娘之谷胱甘肽 S-轉移酶(glutathione-S-transferase (GST))基因 (*AmGSTF1*)轉殖至阿拉伯芥中表現，阿拉伯芥獲得除草劑之多重抗性，並且如同大穗看麥娘多重抗性族群，對於除草劑代謝能力加強 (Cummins *et al.*, 2013)。澳洲之硬質黑麥草 VLR69 族群在 21 年內，透過施用多種不同除草劑控制，而後發現對於多種不同作用機制除草劑具有抗性，包含光系統 II 抑制劑 C2 類(chlorotoluron)、光系統 II 抑制劑 C1 類(atrazine、simazine、and ametryne)、ALS 抑制劑(chlorsulfuron、triasulfuron)、ACCase 抑制劑(diclofop、fluazifop、haloxyfop、tralkoxydim)(Burnet *et al.*, 1994)，發現硬質黑麥草 VLR69 族群之 CYP450 單加氧酶代謝除草劑能力加強，使其具有多重抗性，且該抗性可以被 CYP450 單加氧酶抑制劑抑制(Preston *et al.*, 1996)。

第五章、結語

牛筋草為田間常見之雜草，因其生長特性，難以在田間完全根除，除草劑抗性的發生使之更難防治。本研究之牛筋草感性生物型於固殺草及快伏草推薦劑量使用下，可以有效的控制，案例二來自彰化大村葡萄園之牛筋草 DC1-8 第一代種子，根據存活率之 ED_{50} ，DC1 與 DC3-8 確認具有低程度固殺草抗性(抗性程度， $RI < 10$)，可見該田區牛筋草族群普遍具有低程度固殺草抗性；而 DC4、DC7、與 DC8 具有高程度快伏草抗性($RI > 10$)；但 DC1-8 皆對嘉磷塞極為敏感。值得注意的是 DC4、DC7 與 DC8 具有對於固殺草與快伏草之雙重抗性。

國內農業興盛，根據農業委員會統計，農耕面積占約國土 21.9%，在如此大面積的田地中普遍施用除草劑管理雜草，抗性雜草通報案例卻相對甚少，與農民之輪用藥劑、機械與人工除草息息相關，本研究接獲通報的五案例中，根據初步觀察結果，案例一不具除草劑抗性之可能性，其餘四案例之雜草樣本可能為抗性雜草生物型。目前調查案例僅五案例，由於通報系統未能有效的宣傳予農民，若未來能繼續維持該通報系統，盼能與第一線接觸農民的農藥零售商進行合作宣傳，使通報案件數量增加，以對於國內除草劑抗性雜草生物型之發生有更全面的了解。

第六章、參考文獻

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。中華民國雜草學會印行
。25–30。

方麗萍。2017。農藥在台灣一甲子。92-158。苗栗縣：玉田地。

袁秋英。1994。雜草簡訊。第一卷。第一期。

Amrhein, N., J. Schab, and H.C. Steinrücken. 1980. The mode of action of the herbicide glyphosate. *Sci. Nat.* 67:356–357.

Avila-Garcia, W.V., E. Sanchez-Olguin, A.G. Hulting, and C. Mallory-Smith. 2012. Target-site mutation associated with glufosinate resistance in italian ryegrass (*Lolium perenne* L. ssp. multiflorum). *Pest Manag. Sci.* 68:1248–1254.

Avila-Garcia, W.V., and C. Mallory-Smith. 2011. Glyphosate-resistant italian ryegrass (*Lolium perenne*) populations also exhibit resistance to glufosinate. *Weed Sci.* 59:305–309.

Benbrook, C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28:3.

Beckie, H.J., and F.J. Tardif. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot.* 35:15–28.

Baerson, S.R., D.J. Rodriguez, M. Tran, Y. Feng, N.A. Biest, and G.M. Dill. 2002. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.* 129:1265–1275.

- Burnet, M.W.M., A.R. Barr, and S.B. Powles. 1994. Chloroacetamide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 42:153–157.
- Burnet, M.W.M., Q. Hart, J.A.M. Holtum, and S.B. Powles. 1994. Resistance to nine herbicide classes in a population of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 42:369–377.
- Chauhan, B.S., and D.E. Johnson. 2008. Germination ecology of goosegrass (*Eleusine indica*): an important grass weed of rainfed rice. *Weed Sci.* 56:699–706.
- Cha, T.S., M.G. Najihah, I.B. Sahid, and T.S. Chuah. 2014. Molecular basis for resistance to ACCase-inhibiting fluazifop in *Eleusine indica* from Malaysia. *Pest. Biochem. Physiol.* 111:7–13.
- Chen, J., H. Huang, C. Zhang, S. Wei, Z. Huang, J. Chen, and X. Wang. 2015. Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta* 242:859–868.
- Chuah T.A., V.L. Low, T.S. Cha, and B.S. Ismail. 2010. Initial report of glufosinate and paraquat multiple resistance that evolved in a biotype of goosegrass (*Eleusine indica*) in Malaysia. *Weed Biol. Manag.* 10: 229–233.
- Christoffers, M.J., M.L. Berg, and C.G. Messersmith. 2002. An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat. *Genome* 45:1049–1056.
- Cummins, I., D.J. Wortley, F. Sabbadin, Z. He, C.R. Coxon, H.E. Straker, J.D. Sellars, K. Knight, L. Edwards, D. Hughes, S.S. Kaundun, S.-J. Hutchings, P.G. Steel, and R. Edwards. 2013. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:5812–5817.
- Diggle, A.J., P.B. Neve, and F.P. Smith. 2003. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance in finite weed populations. *Weed Res.* 43:371–382.

- Devine, M.D. 1997. Mechanisms of resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors: a review. *Pestic. Sci.* 51:259–264.
- Délye, C., T. Wang, and H. Darmency. 2002. An isoleucine–leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta* 214:421–427.
- Délye, C. 2003. An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors. *Plant Physiol.* 132:1716–1723.
- Délye, C., X.-Q. Zhang, S. Michel, A. Matějček, and S. B. Powles. 2005. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiol.* 137:794–806.
- Délye, C., M. Jasieniuk, and V.L. Corre. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet.* 29:649–658.
- Duke, S.O. 1988. Glyphosate, in herbicides: chemistry, degradation, and mode of action. ed. by Kearney P.C. and Kaufman D.D. Marcel Dekker, New York. 1–70.
- Duke, S.O., and S.B. Powles. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64:319–325.
- Francischini, A., J. Constantin, R.O. Jr., G. Santos, G. Braz, and H. Dan. 2014. First report of *Amaranthus viridis* resistance to herbicides. *Planta Daninha* 32:571–578.
- Franz J.E., M.K. Mao, and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate, a unique global herbicide. *Weed Technol.* 12:564–565.
- Gronwald, J.W. 1991. Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Sci.* 39:435–449.
- Hao, G.-F., Y. Zuo, S.-G. Yang, and G.-F. Yang. 2011. Protoporphyrinogen oxidase inhibitor: an ideal target for herbicide discovery. *Chimia.* 65:961–969.

- Heap, I., and H. LeBaron. 2001. Herbicide resistance and world grains - introduction and overview of resistance. 12-33.
- Heap, I. 2014. Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Manag. Sci.* 70:1306–1315.
- Jalaludin, A., J. Ngim, B.H. Bakar, and Z. Alias. 2010. Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate-ammonium in Malaysia. *Weed Biol. Manag.* 10:256–260.
- Jalaludin, A., Q. Yu, and S.B. Powles. 2014. Multiple resistance across glufosinate, glyphosate, paraquat and ACCase-inhibiting herbicides in an *Eleusine indica* population. *Weed Res.* 55:82–89.
- Jalaludin, A., Q. Yu, P. Zoellner, R. Beffa, and S.B. Powles. 2017. Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Manag. Sci.* 73:1091–1100.
- Lagator, M., T. Vogwill, A. Mead, N. Colegrave, and P. Neve. 2013. Herbicide mixtures at high doses slow the evolution of resistance in experimentally evolving populations of *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol.* 198:938–945.
- LaRossa, R.A. and J.V. Schloss. 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 259: 8753–8757.
- Leach, G.E., M.D. Devine, R.C. Kirkwood, and G. Marshall. 1995. Target enzyme-based resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in *Eleusine indica*. *Pest. Biochem. Physiol.* 51:129–136.
- Lee, L.J., and J. Ngim. 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn.) in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56:336–339.
- Lehoczki, E., G. Laskay, I. Gaal, and Z. Szigeti. 1992. Mode of action of paraquat in leaves of paraquat-resistant *Coryza canadensis* (L.) Cronq.

Plant Cell Environ. 15:531–539.

- Lin, W.T., Y.J. Chiang, C.S. Wang, and C.Y. Wang. 2016. Non-target site mechanisms of resistance to fluazifop-butyl of goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.] in Taiwan: uptake, translocation and metabolism. J. Agricult. Forestry (Taiwan) 64:125–136.
- Liu, W., D.K. Harrison, D. Chalupska, P. Gornicki, C.C. Odonnell, S.W. Adkins, R. Haselkorn, and R.R. Williams. 2007. Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:3627–3632.
- Llewellyn, R.S., and S.B. Powles. 2001. High levels of herbicide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in the wheat belt of western Australia. Weed Technol. 15:242–248
- Lorraine-Colwill, D.F., S.B. Powles, T.R. Hawkes, P.H. Hollinshead, S.A.J. Warner, and C. Preston. 2002. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pestic. Biochem. Physiol. 74:62–72.
- Luo, Q.Y., J.P. Wei, Z.X. Dong, X.F. Shen, and Y. Chen. 2019. Differences of endogenous polyamines and putative genes associated with paraquat resistance in goosegrass (*Eleusine indica* L.). BioRxiv. 618074.
- Kaundun, S.S., I.A. Zelaya, R.P. Dale, A.J. Lycett, P. Carter, K.R. Sharples, and E. McIndoe. 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.
- Kotoula-Syka, E., A. Tal, and B. Rubin. 2000. Diclofop-resistant *Lolium rigidum* from northern Greece with cross-resistance to ACCase inhibitors and multiple resistance to chlorsulfuron. Pest Manag. Sci. 56:1054–1058.
- Whitcomb, C. 1999. An introduction to ALS-inhibiting herbicides. Toxicol. Ind. Health 15:231–239.

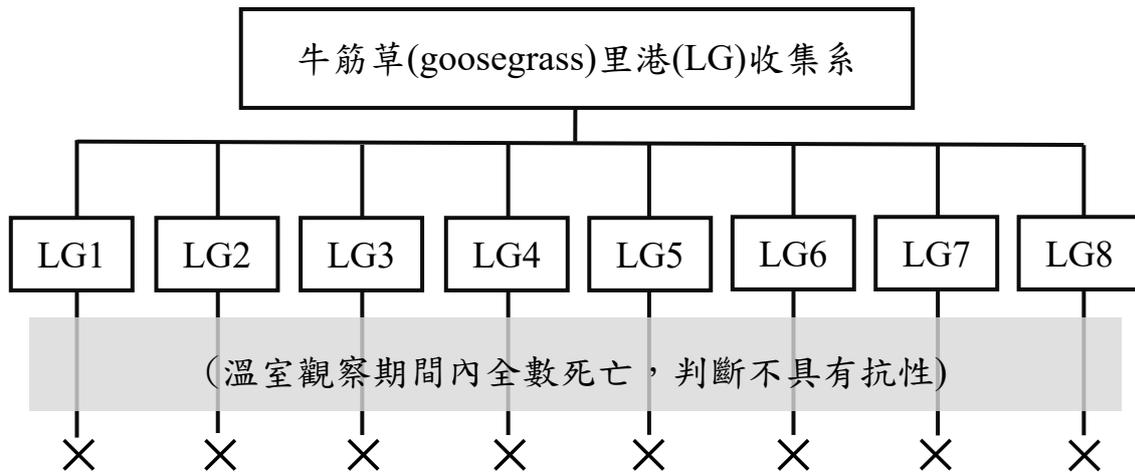
- Marshall, G., R.C. Kirkwood, and G.E. Leach. 1994. Comparative studies on graminicide-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica*. *Weed Res.* 34:177–185.
- Manalil, S., R. Busi, M. Renton, and S.B. Powles. 2011. Rapid evolution of herbicide resistance by low herbicide dosages. *Weed Sci.* 59:210–217.
- Matthews, J.M., J.A.M. Holtum, D.R. Liljegren, B. Furness, and S.B. Powles. 1990. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Plant Physiol.* 94:1180–1186.
- Masabni, J.G., and B.H. Zandstra. 1999. Discovery of a common purslane (*Portulaca oleracea*) biotype resistant to linuron. *Weed Technol.* 13:599–605.
- Mccullough, P.E., J. Yu, P.L. Raymer, and Z. Chen. 2016. First report of ACCase-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in the United States. *Weed Sci.* 64:399–408.
- Moss, S.R., K.M. Cocker, A.C. Brown, L. Hall, and L.M. Field. 2003. Characterisation of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pest Manag. Sci.* 59:190–201.
- Ng, C.H., R. Wickneswary, S. Salmijah, Y.T. Teng, and B.S. Ismail. 2004. Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L.) Gaertn. from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Aust. J. Agric. Res.* 55:407–414.
- Okuno, J., S. Iwakami, A. Uchino, K. Tsuchida and M. Yokoyama. 2015. Response to halosulfuron-methyl and flazasulfuron and mutation of acetolactate synthase gene of *Cyperus brevifolius* survived in turf grass on golf course. *Journal Japan Society Turfgrass Sci.* 43:159-162.
- Ohlrogge, J. and J. Browse. 1995. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7:957–970.

- Osuna, M., I. Goulart, R. Vidal, A. Kalsing, J.R. Santaella, and R.D. Prado. 2012. Resistance to ACCase inhibitors in *Eleusine indica* from Brazil involves a target site mutation. *Planta Daninha* 30:675–681.
- Petit, C., G. Bay, F. Pernin, and C. Délye. 2009. Prevalence of cross- or multiple resistance to the acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France. *Pest Manag. Sci.* 66:168-177
- Pfister, K., and C.J. Arntzen. 1979. The mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes. *Z. Naturforsch.* 34:996–1009.
- Pimentel, D., L. Mclaughlin, A. Zepp, B. Lakitan, T. Kraus, P. Kleinman, F. Vancini, W.J. Roach, E. Graap, W.S. Keeton, and G. Selig. 1993. Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.* 46:273–288.
- Powles, S.B., and J.M. Matthews. 1992. Achievements and developments in combating pesticide resistance – multiple herbicide resistance in annual ryegrass (*Lolium rigidum*): a driving force for the adoption of integrated weed management. 75–87.
- Powles, S.B., C. Preston, I.B. Bryan, and A.R. Jutsum. 1996. Herbicide resistance: impact and management. *Adv. Agron.* 58:57–93.
- Powles, S.B., D.F. Lorraine-Colwill, J.J. Dellow, and C. Preston. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Sci.* 46:604–607.
- Powles, S. B. and D. G. Bowran. 2000. Crop weed management systems. In B. M. Sindel, ed. by R. G. and F J. Richardson. 287–306
- Powles, S.B., and C. Preston. 2006. Evolved Glyphosate Resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technol.* 20: 282–289.
- Powles, S.B., and Q. Yu. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:317–347.

- Preston, C., F.J. Tardif, J.T. Christopher, and S.B. Powles. 1996. Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. *Pest. Biochem. Physiol.* 54:123–134.
- Purba, E. 2013. Proceeding of 24th Asian-pacific weed science society conference: a population of goosegrass (*Eleusine inidca*) from oil palm field resistant to glyphosate and paraquat. 266–270.
- Rensen, J.J.S. 1982. Molecular mechanisms of herbicide action near photosystem II. *Physiol. Plant.* 54:515–521.
- Reade, J.P.H., and A.H. Cobb. 2002. Herbicides: modes of action and metabolism. *Weed Manag. Handbook* 134–170.
- Riemens, M.M., T. Dueck, and C. Kempenaar. 2008. Predicting sublethal effects of herbicides on terrestrial non-crop plant species in the field from greenhouse data. *Environ. Pollut.* 155:141–149.
- Ryan, G.F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.* 18:614–616.
- Seefeldt, S.S., J.E. Jensen, and E.P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol.* 9:218–227.
- Smith, A.C., and J.E. Cronan. 2011. Dimerization of the bacterial biotin carboxylase subunit is required for acetyl coenzyme A carboxylase activity in vivo. *J. Bacteriol.* 194:72–78.
- Tiw, K.P., K.F. Kon, F.W. Lim and D. Comes. 1997. A biotype of goosegrass cross-resistant to the ‘fops’ and ‘dims’ and its management. *Proc. 16th APWSS Conference.* 225-228.
- Wang, C.-S., W.-T. Lin, Y.-J. Chiang, and C.-Y. Wang. 2017. Metabolism of fluazifop-P-butyl in resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan. *Weed Sci.* 65: 228–238.

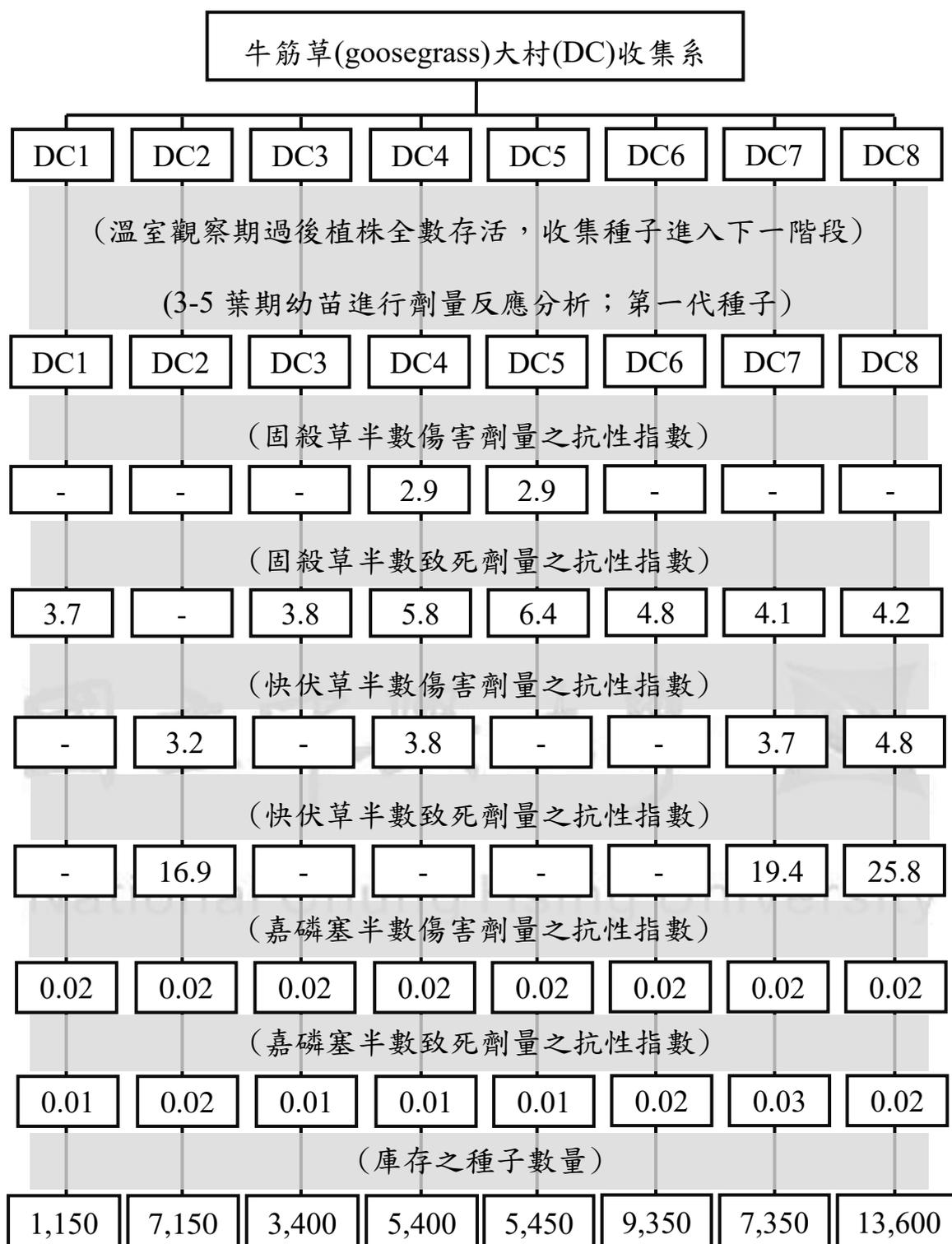
- Yu, Q., A. Jalaludin, H. Han, M. Chen, R.D. Sammons, and S.B. Powles. 2015. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiol.* 167:1440–1447.
- Zhou, M., H. Xu, X. Wei, Z. Ye, L. Wei, W. Gong, Y. Wang, and Z. Zhu. 2006. Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. *Plant Physiol.* 140:184–195.
- Heap, I. 2005. Criteria for confirmation of herbicide-resistant weeds - with specific emphasis on confirming low level resistance. Retrieved from <http://www.weedscience.org/Documents/ResistanceCriterion.pdf>. Accessed April 14, 2019.
- Heap, I. The international survey of herbicide resistant weeds. Retrieved from <http://weedscience.com/default.aspx> Accessed June 11, 2019
- Pittman, K., M. Flessner, C. Rubione, and V. Ackroyd. 2019. What is integrated weed management? Retrieved from <http://integratedweedmanagement.org/index.php/iwm-toolbox/what-is-integrated-weed-management/> Accessed June 15, 2019.

附錄

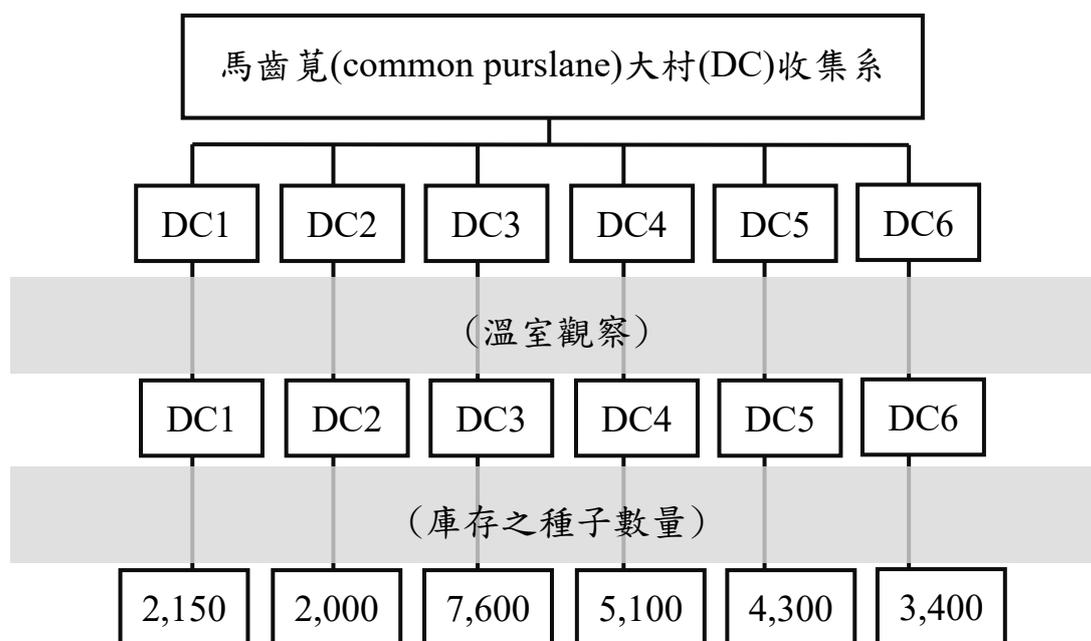


附錄 1. 里港彩蕉園疑似抗性牛筋草之來源。於屏東三廊村彩蕉園內道路旁採集牛筋草 8 株(LG1-8)，經溫室觀察後，牛筋草植株(LG1-8)全數因除草劑藥害，生長情形逐漸惡化而死亡，因此判斷不具有抗性。

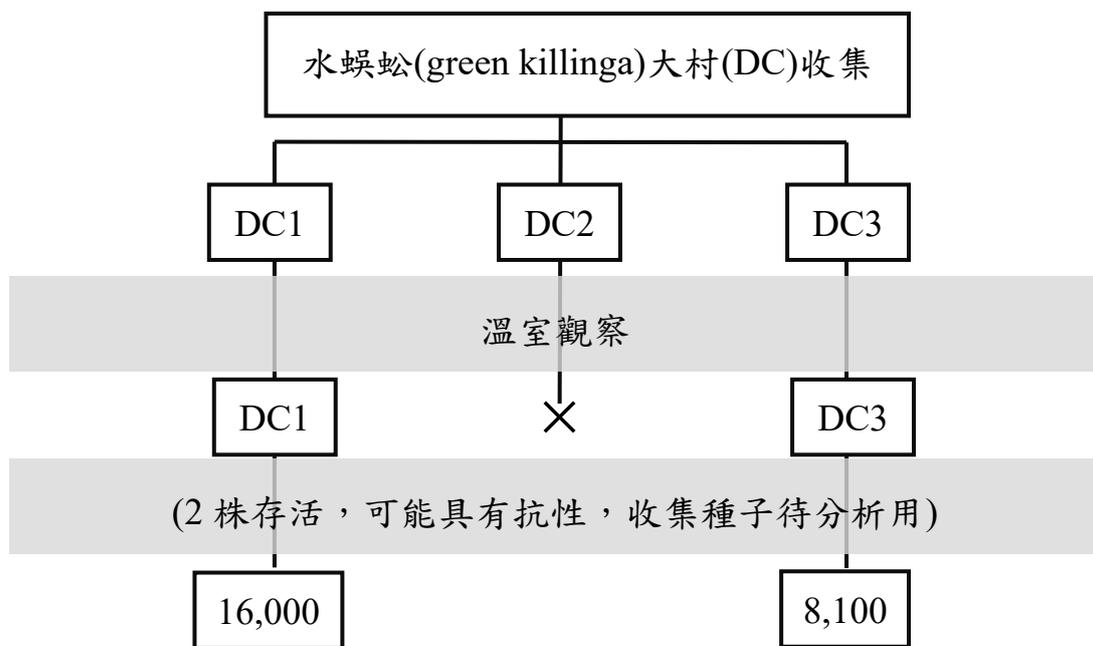
National Chung Hsing University



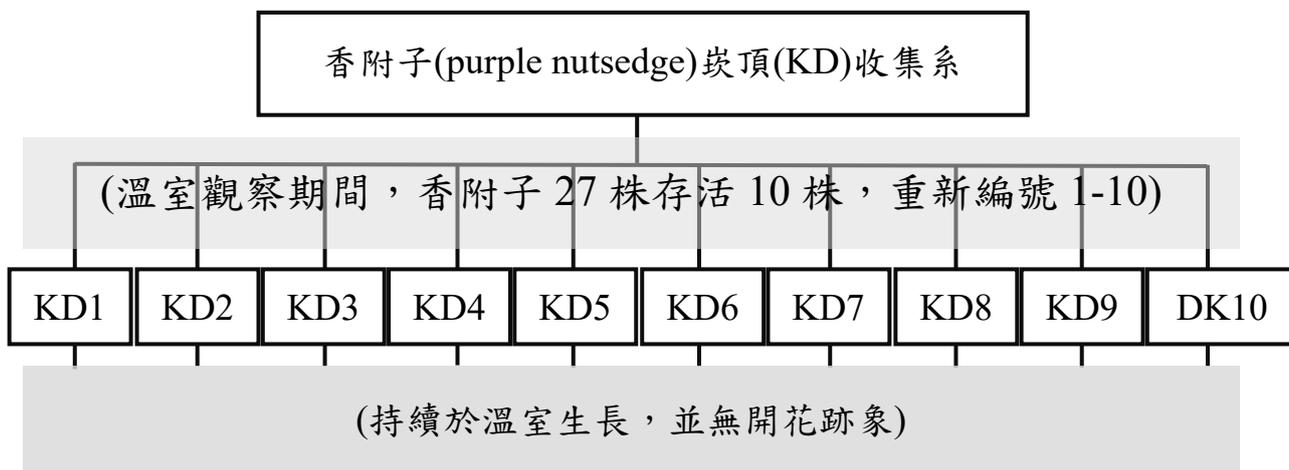
附錄 2. 彰化大村葡萄園疑似抗性牛筋草之來源。採集牛筋草 8 株 (DC1-8)，經溫室觀察後，牛筋草植株(DC1-8)全數存活恢復生長，收集種子育苗後，利用固殺草、快伏草與嘉磷塞進行劑量反應分析之結果與與庫存種子數量(千粒重約 0.33 g)。



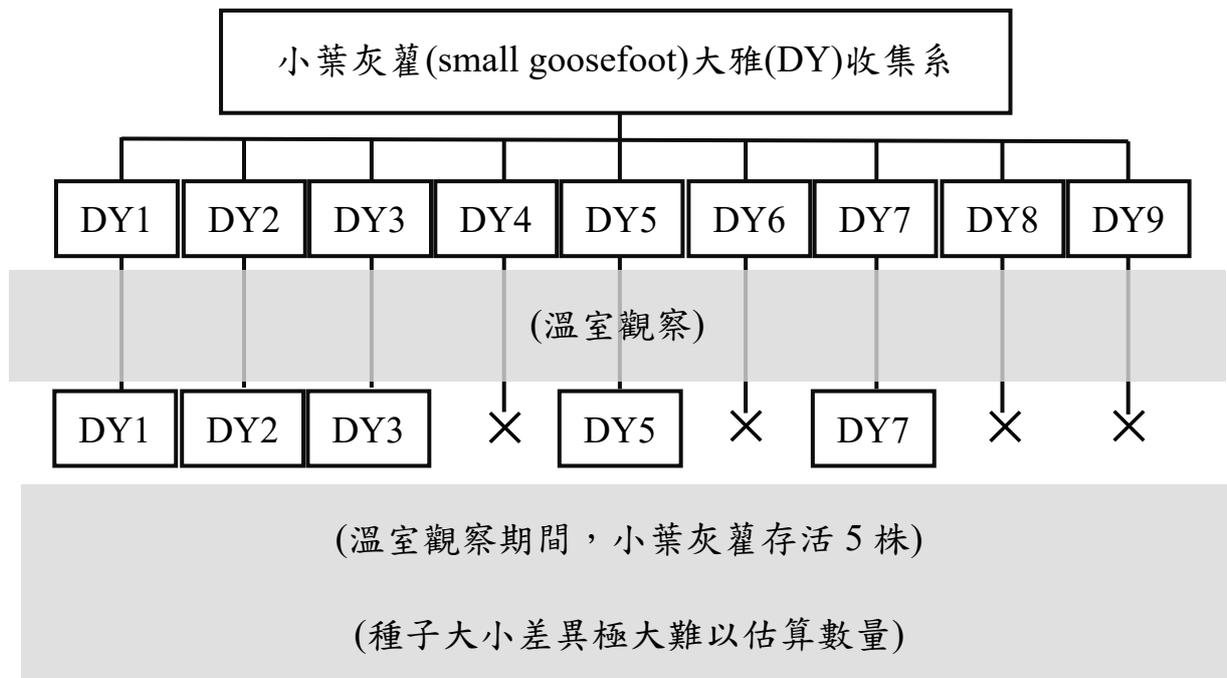
附錄 3. 彰化大村葡萄園疑似抗性馬齒莧之來源。採集馬齒莧 6 株 (DC1-6)，經溫室觀察後，馬齒莧植株(DC1-8)全數存活且生長良好，並且收集足夠之種子(千粒重約 0.05 g)。



附錄 4. 彰化大村葡萄園疑似抗性水蜈蚣之來源。採集水蜈蚣 3 株 (DC1-3)，經溫室觀察後，水蜈蚣植株(DC1、3)二株存活且生長良好，並且蒐集足夠之種子(千粒重約 0.08 g)。

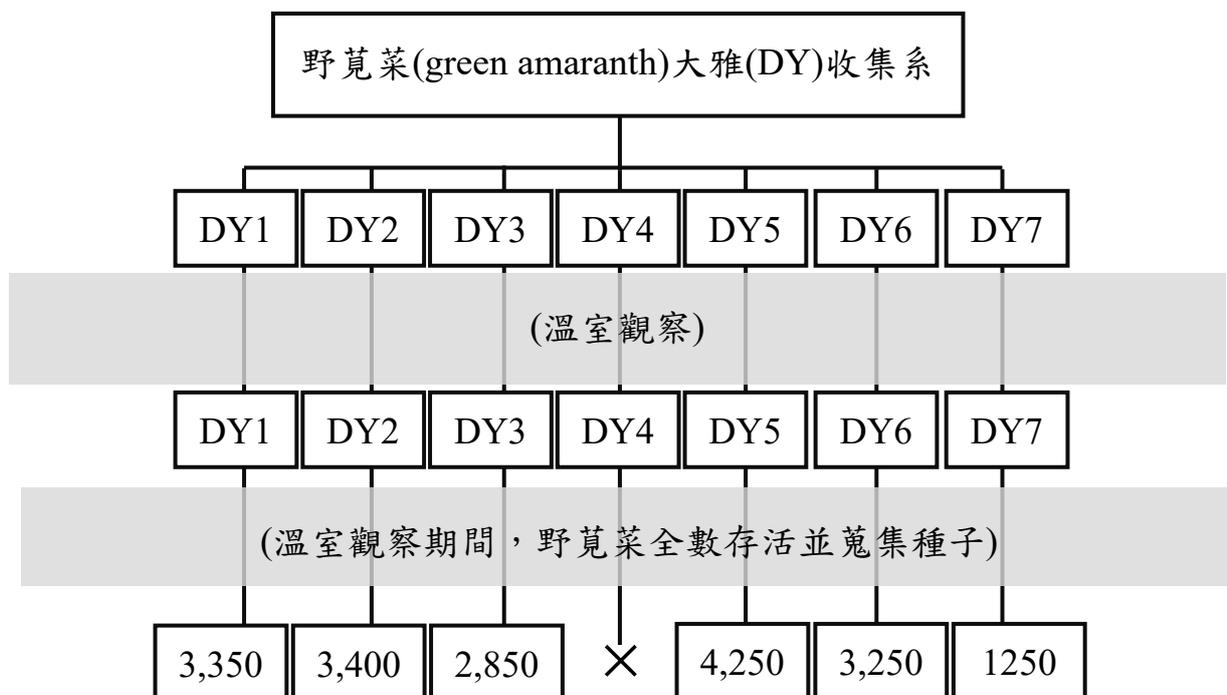


附錄 5. 屏東崁頂大豆田疑似抗性香附子之來源。採集香附子 27 株，經溫室觀察後，香附子植株 10 株存，重新命名 KD1-10，於溫室持續生長。

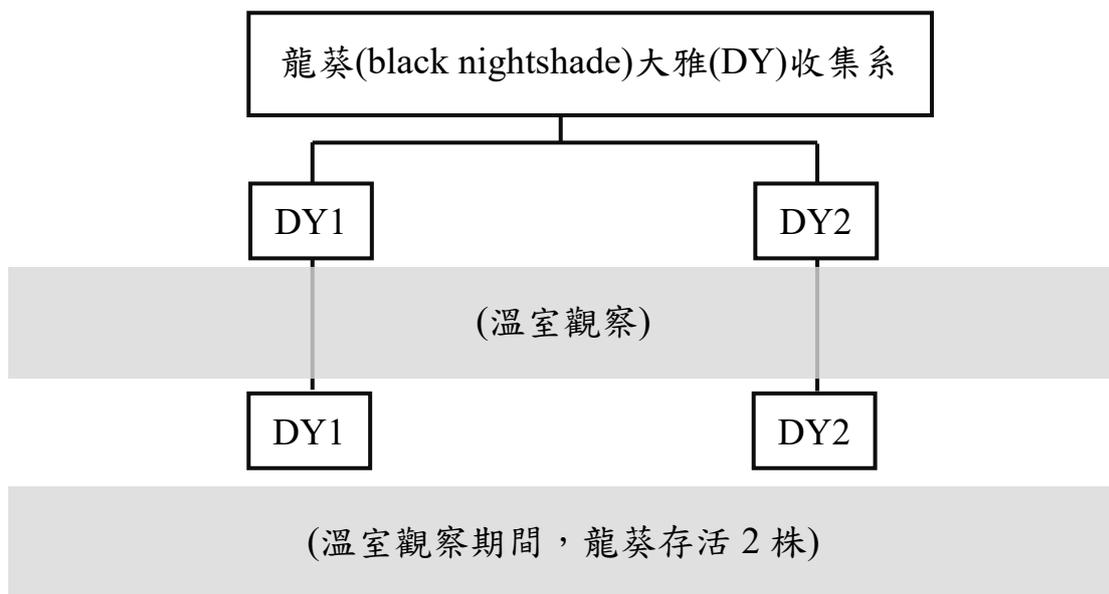


附錄 6. 台中大雅區小麥田疑似抗性小葉灰藿之來源。採集小葉灰藿 9 株 (DY1-9)，經溫室觀察後，小葉灰藿植株 5 株存活並蒐集種子，但因種子大小差異極大，難以估算數量。

National Chung Hsing University



附錄 7. 台中大雅區小麥田疑似抗性野莧菜之來源。採集野莧菜 7 株 (DY1-7)，經溫室觀察後，野莧菜植株 7 株存活，但僅有 6 株成收蒐集種子。

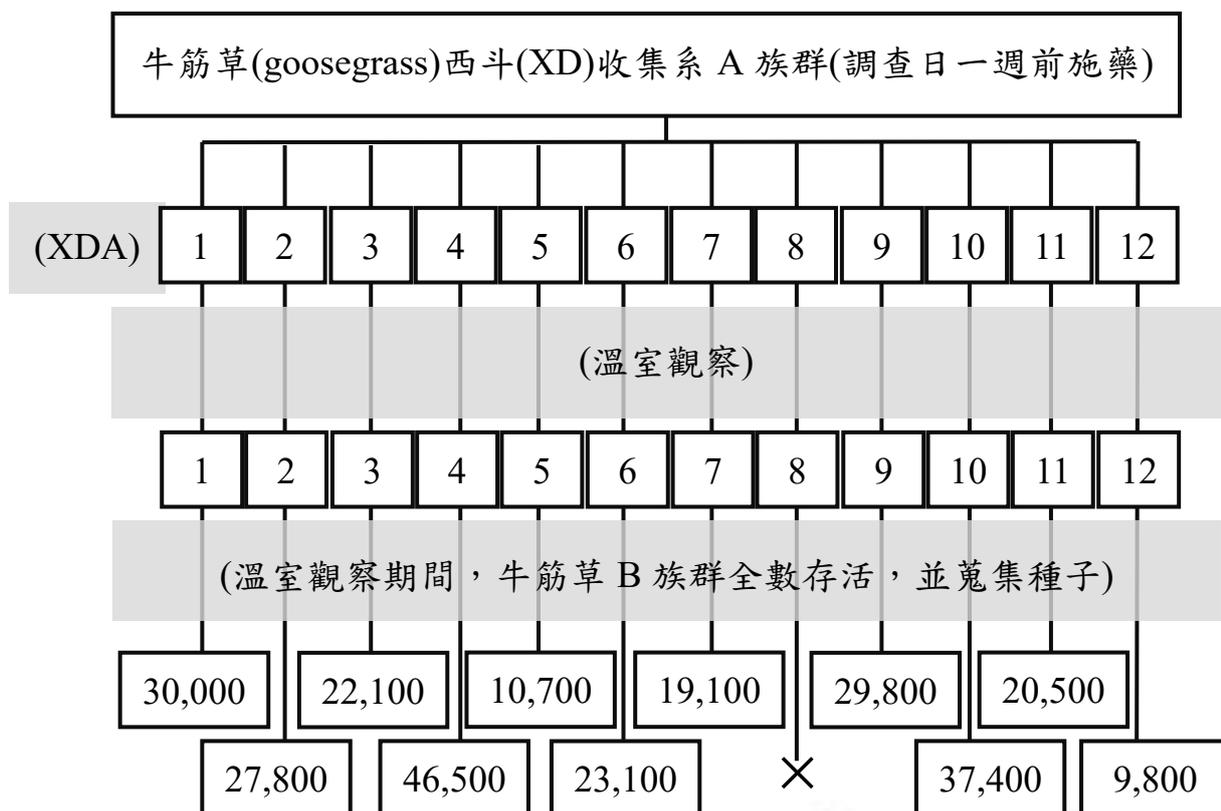


附錄8. 台中大雅區小麥田疑似抗性龍葵之來源。採集龍葵2株(DY1、2)，經溫室觀察後，龍葵存活2株，並蒐集果實。

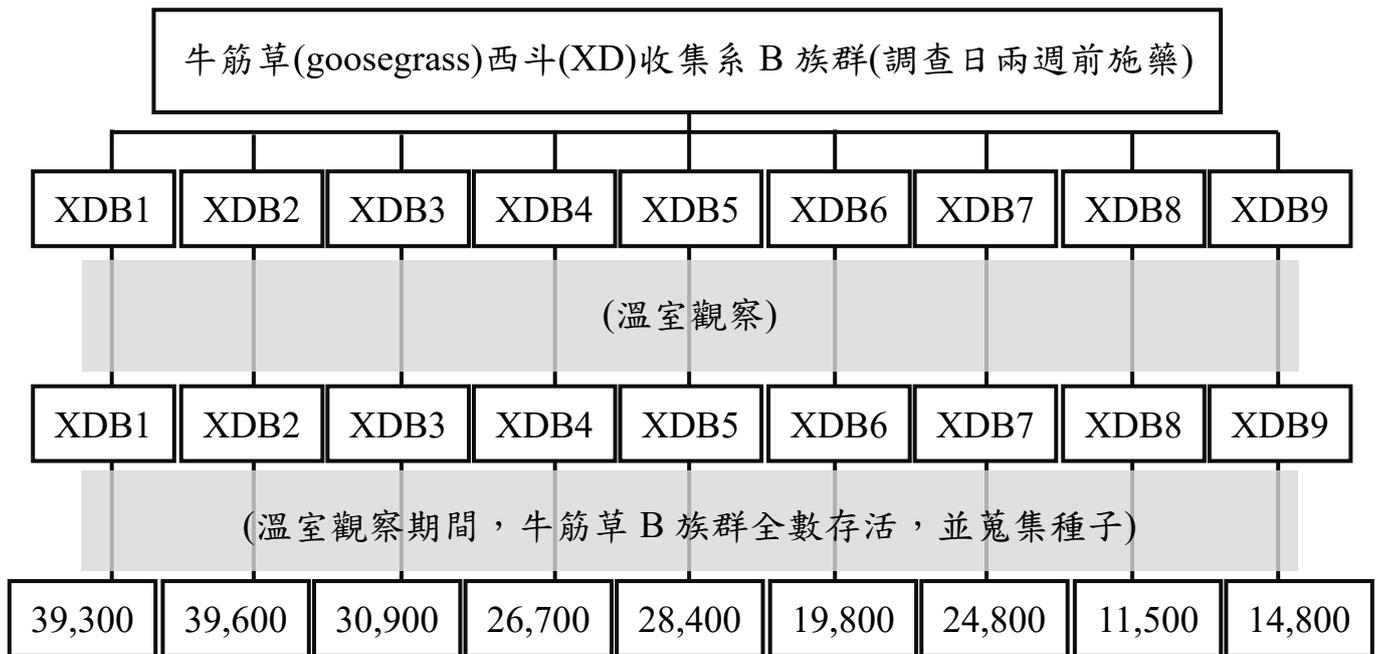
國立中興大學



National Chung Hsing University



附錄 9. 彰化西斗葡萄園疑似抗性牛筋草 A 族群之來源。採集牛筋草 12 株(XDA1-12)，經溫室觀察後，牛筋草 A 族群全數存活，僅成功蒐集 11 株之種子。



附錄 10. 彰化西斗葡萄園疑似抗性牛筋草之來源。採集牛筋草 9 株 (XD B1-9，調查日兩週前施藥)，經溫室觀察後，牛筋草 A 族群全數存活，並蒐集種子。

National Chung Hsing University

附錄 11. 除草劑抗性生物型雜草通報獎金簽收單。於現場訪查後，如有疑似除草劑抗性雜草發生，即發放 1,000 元獎金，並請發現者填寫基本資料。

記錄時間：	記錄者：	
發現者：		
連絡電話：	手機：	
地址：		
Email：		
簽收同意項目如下：		
<p>1. 本人同意完成通報及基本背景資料說明。</p> <p>2. 本人同意於現場會勘當日，經興大農藝系王慶裕教授研究團隊初步認定疑似除草劑抗性雜草時，即領取通報費用新台幣 1,000 元整，之後經興大農藝系團隊攜回材料繁殖進行除草劑抗性確認後(預計半年)，再行補領新台幣 2,000 元整。</p> <p>(本獎金實領 3,000 元，免扣所得稅)</p> <p>3. 本人同意對於所發現之雜草物種不具所有權，雜草經取回試驗後之所有權歸屬中興大學農藝系與正瀚生技公司，但通報者仍列名為文獻紀錄中。</p>		
第一次簽收通報金 1,000 元	簽名：	日期：
第二次簽收通報金 2,000 元	簽名：	日期：
通報金發放單位：中興大學農藝系教授 王慶裕 04-22840777#509, 505		
備註：		

附錄 12. 除草劑抗性生物型雜草現場調查記錄表。

記錄時間：		發現者：	
記錄者：		連絡電話：	
		地址：	
		Email：	
現場地點：			
<input type="checkbox"/> 非耕地 <input type="checkbox"/> 耕地 <input type="checkbox"/> 水田 <input type="checkbox"/> 旱地 作物種類：			
	名稱	緯度	經度
抗性雜草名稱與地點：			
	名稱	緯度	經度
附近之感性雜草地點：			
1. 初步之通報重點描述			
a.	是否施用除草劑之後抗性雜草仍然存活， 而相同雜草物種其他植株藥害嚴重或死亡？	<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否
b.	是否有除草劑施用無效之狀況？ 除草劑名稱：	<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否
c.	現場訪談除草劑用藥經歷及農地(現場)狀況：		
	除草劑使 用經歷	除草劑種 類： 1.	使用狀況： 施用頻度：(多久施用一次)

		2. 3. 4.	持續時間：(月、年)(連續或間歇使用) 用法：(植前、萌前、萌後)(噴濕、土壤、田水) 用量：(推薦用量、濃度、施用量)
現場狀況 描述	作物： 名稱： 1. 正常 <input type="checkbox"/> 2. 受傷 <input type="checkbox"/> 3. 死亡 <input type="checkbox"/>	雜草相、抗性雜草物種覆蓋比例 1.禾本科 % 2.莎草科 % 3.闊葉草 % 4.抗性雜草物種 % (佔上述其中一類之比例) 5.疑似抗雜草採樣株數：	
d.	初步判斷是否為疑似抗性雜草？	<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否
e.	是否同意發放第一階段通報獎金？	<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否
備註：			
發現者簽名：		記錄者簽名：	日期：