

牛筋草(*Eleusine indica*)對 ACCase 抑制型 除草劑抗性之探討

蔣永正^{1*} 侯秉賦² 王智屏¹ 蔣慕琰¹

- 1.臺中縣霧峰鄉 農委會農業藥物毒物試驗所 公害防治組
- 2.金門縣 動植物防疫檢疫局 高雄分局 金門檢疫站

(接受日期：2007 年 12 月 31 日)

摘 要

蔣永正*、侯秉賦、王智屏、蔣慕琰 2007 牛筋草 (*Eleusine indica*) 對 ACCase 抑制型除草劑抗性之探討 植保會刊 49 : 311 – 324

自臺灣中部蔬菜田及南部果園內，採集對 acetyl-CoA carboxylase (ACCase) 抑制型除草劑具抗、感性之牛筋草 (*Eleusine indica*) 種子，進行不同生育期植株之劑量反應測試，並比較抗、感植株在藥劑處理後之膜系滲漏反應與酵素活性差異，以確立臺灣農田內發生之牛筋草已產生對 ACCase 抑制型除草劑具交互抗性之生物型。分別以系列不同劑量之伏寄普 (fluazifop-p-butyl)、甲基合氯氟 (haloxyfop)、快伏草 (quizalofop-ethyl)、環殺草 (cycloxydim) 及西殺草 (sethoxydim) 處理牛筋草抗、感種子，胚根伸長之半數抑制劑量抗感比介於 4-7 倍，其中以伏寄普的 7 倍為最高。另以系列不同劑量之測試藥劑，噴施 3-4 葉齡及 9-10 葉齡之抗、感牛筋草植株。除快伏草外，抗性株對其餘藥劑之傷害反應較感性者明顯為低。由施藥後 21 日之鮮重變化，估算伏寄普、甲基合氯氟、快伏草、西殺草及環殺草達 50% 抑制之劑量，發現對伏寄普之抗感比值達 15.7-31.8 倍，次為甲基合氯氟在 15.3-22.3 倍間，環殺草及西殺草介於 3.6-11.5 倍，快伏草則為 1.6-5.8 倍。不同葉齡植株對藥劑之忍受程度差異約為 2-3 倍。另以不同濃度藥劑浸泡葉圓片之處理方式，測定抗、感葉片內 malondialdehyde (MDA) 含量之變化。感性葉片之 MDA 生成量，會隨伏寄普、甲基合氯氟、環殺草及西殺草之濃度提高而增加，抗性葉片在 100 μM 以下之處理濃度下，未發現明顯之劑量反應差異。快伏草對抗、感 MDA 含量之影響趨勢相近，均隨處理濃度提高而略為上升。比較測試藥劑對 ACCase 活性抑制之抗、感濃度比，其中伏寄普之抗性表現最為明顯 (9.9 倍)，次為甲基合氯氟、環殺草及西殺草，快伏草之抗性表現較不明顯，抗、感濃度比為 1.8 倍。本研究結果顯示臺灣田區之牛筋草確已發生抗性生物型植株，且對作用機制相似之不同化學構造之除草劑已產生不同程度之

* 通訊作者。E-mail: cyj@tactri.gov.tw

交互抗性。比較抗、感植株在株高等農藝性狀及發芽率等繁殖潛力之表現，顯示感性植株均較抗性者略為優勢，應為臺灣農田普遍發生之野生型植株。

(關鍵詞：牛筋草、ACCase 抑制型除草劑、抗藥性、交互抗性)

緒 言

芳 烴 氧 苯 氧 羧 酸 類 (aryloxyphenoxy-carboxylic acids; APPs) 及環己烯氧類 (cyclohexanedione; CHDs) 化合物，為萌後施用之 ACCase 抑制型除草劑，可用於闊葉作物田之禾本科雜草防除。目前在臺灣登記之 APPs 包括伏寄普、甲基合氯氟、快伏草、普拔草 (propaquizafop)、丁基賽扶草 (cyhalofop-butyl) 及芬殺草 (fenoxaprop-P-ethyl)；CHDs 則為亞汰草 (alloxydim)、環殺草、西殺草、得殺草 (tepraloxym) 及剋草同 (clethodim)⁽²⁾。一般均為乳劑劑型，田間推薦用量介於 50-200 mL ha⁻¹，登記作物種類有大豆、落花生、洋蔥、甘藍、蕃茄等蔬菜田、鳳梨園及茶園⁽²⁾。此類除草劑之作用機制為影響 ACCase 酵素生成 malonyl-CoA 的活性，而抑制脂肪酸合成，破壞細胞膜之完整性⁽¹⁵⁾。APPs 及 CHDs 類型藥劑被葉片吸收後，可移行至植株其他部位，並積聚在生長點，導致幼芽生長停頓、幼葉黃化與花青素累積之紅紫現象，嚴重時則褐化枯死⁽³⁾。在闊葉與禾本科植物間之選擇性，可能與前者所含之目標酵素 ACCase 對藥劑的不敏感^(4,7)、或對藥劑具有較高之代謝解毒能力^(7,12)、或限制藥劑在植體內的轉移⁽¹⁷⁾有關。

本類型藥劑於 1970 年代末期開始使用，80 年代初期在歐美地區即開始出現禾本科抗性雜草，從 1982 到 2007 年全球登錄之抗性雜草種類由 9 種增加至 35 種，發生在 26 個國家，面積估計為超過 3 百萬公頃⁽²¹⁾。目前在抗性禾本科雜草的研究發現，抗性機制主要與細胞內所含之 ACCase I isoform (230 kD 左右) 的構造發生改變，

造成 ACCase 對藥劑之親和力降低有關^(13,14,29)。APPs 及 CHDs 兩類型藥劑間亦發現有不同程度之交互抗性發生，目前有 10 種禾本科雜草同時對此二類型藥劑產生具交互抗性之生物型⁽²¹⁾。

牛筋草 (*Eleusine indica*) 為臺灣蔬菜田、果園等旱地發生極為普遍之一年生禾本科雜草，在高溫季節生長旺盛危害潛力高。農委會農業藥物毒物試驗所於 2003 年進行之農田草相調查，首次發現伏寄普以田間推薦量無法有效控制之牛筋草生物型植株。根據除草劑抗性行動委員會 (HRAC) 進行之全球抗性草調查，最早於 1990 年在馬來西亞發現牛筋草對伏寄普及普拔草之抗性植株，2003 年在巴西亦發現對丁基賽扶草、芬殺草及西殺草發生交互抗性之牛筋草^(21,26)。本研究主要目的為確立臺灣農地分布之牛筋草，已發生對 APPs 類之伏寄普、快伏草、甲基合氯氟，及 CHDs 類之環殺草、西殺草產生抗性之生物型，同時比較抗、感植株在藥劑處理後，細胞膜系受損程度及目標酵素 ACCase 活性的變化，以及兩者在生長速率與繁殖潛力的差異，作為雜草抗性機制及交互抗性進一步探討之參考及田區抗性植株偵測之依據。

材料與方法

供試植材及藥劑

本研究將 2003 年至高雄地區牛筋草發生密度較高之果園，及彰化地區之蔬菜田所採集之牛筋草種子，分別播種於裝有消毒土 1.5 公斤之直徑 15 公分，高度 12 公分之栽植盆內，放置於臺中縣霧峰鄉農業藥物毒物試驗所溫室內繁殖，待植株抽穗後

收集成熟種子，用為對不同藥劑之劑量反應測試材料。

牛筋草種子胚根伸長及植株生長抑制檢測之成品測試藥劑，為 17.5% 伏寄普乳劑 (省農化廠)、10.6% 甲基合氯氟乳劑 (臺灣道禮)、5% 快伏草乳劑 (臺灣巴斯夫)、10.9% 環殺草乳劑 (臺灣日產) 及 20% 西殺草乳劑 (日本曹達)。細胞膜滲漏及酵素活性分析使用之測試藥劑，為純度 >99.9% 之化學藥劑 (Sigma-Aldrich)。

劑量反應測試

(一) 胚根伸長測定

主要參考 Sunderland et al.⁽³⁵⁾ 胚根伸長對除草劑劑量反應測試方法。分別選取充實飽滿之牛筋草種子 10 粒，包覆於 30 cm × 20 cm (長×寬) 之濾紙內，置於裝有 300 mL 系列不同劑量測試藥液之燒杯中，並將燒杯分別置放在溫度 25°C、光強度 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光週期 12 小時之生長箱內，於處理後 7 日調查胚根長度。各處理均為 5 重複，每重複 10 粒種子，資料以回歸分析方法，估算各測試藥劑對不同來源牛筋草種子之 50% 抑制劑量。

(二) 植株不同生長期之生育調查

2005 年五月至十月進行溫室盆栽試驗。牛筋草種子播種萌芽後，待第一片真葉完全展開時，每盆間苗成一株。於植株生長至 3-4 及 9-10 葉齡期，以安裝型號 TeeJet 8002E 噴嘴之噴藥及人工雨水自動噴霧機 (SB6, R&D Sprayers, INC.)，在壓力 30 psi、行走速度 2 m sec⁻¹ 及噴幅 50 cm 條件下，將不同劑量之測試藥液，分別均勻噴施於植株上。處理後 14 日，根據藥斑發生面積及葉片數，以百分率量化指標評級藥劑傷害程度 (0 為無傷害，100 為全株乾枯)⁽³⁰⁾，並記錄傷害發生之徵狀。再於施藥後 21 日調查植株鮮重，每處理 3 重複，每重複兩盆。資料以回歸分析方法，估算測試藥劑對牛筋草植株之 50% 抑制劑量。

膜滲漏性分析

於 9-10 葉齡之牛筋草植株摘取第 5-10 之上位葉片，取直徑 0.6 cm 之葉圓片十片，分別浸置於不同濃度之測試藥液中，於 25°C 之 300 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光強度下照光兩小時後，取出葉圓片以純水清洗後，測定 MDA 含量。測試藥劑之不同濃度處理均為 3 重複，MDA 含量之測定值以 mean ± SE 表示。

MDA 含量為參考 Heath and Packer⁽²²⁾ 及 Velikova⁽³⁸⁾ 方法，以 2-thiobarbituric acid (TBA) 反應測定作為脂質過氧化作用之指標。將處理過藥液之葉圓片加入適量溶於 20% trichloroacetic acid (TCA) 之 0.5% TBA 及 PVP-40 一起研磨後，將萃取液置於 95°C 水浴中加熱 25 分鐘，再於 3,000 x g 下離心 5 分鐘，取出上清液於 532 nm 波長下測定吸光值，扣除在 600 nm 下之非專一濁度 (non-specific turbidity) 吸光值，並以 1,1,3,3-tetraethoxypropane 製作之標準線估算 MDA 含量。

ACCase 酵素活性分析

於 9-10 葉齡之牛筋草植株摘取第 5-10 之上位葉片，取直徑 0.6 cm 之葉圓片十片，分別浸置於不同濃度之測試藥液中，於 25°C 之 300 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光強度下照光兩小時後，取出葉圓片以純水清洗後，分析 ACCase 酵素活性。每處理 3 重複，資料經回歸分析後，估算測試藥劑對酵素活性之 50% 抑制劑量。

ACCase 酵素萃取及活性測定參考 Gerhard⁽³²⁾ 之 HPLC 分析方法。將藥劑處理過之葉圓片，分別以 1:4 比例加入 100 mM Tris/HCl 緩衝液 (內含：20% glycerol；14 mM mercaptoethanol；15 mM NaHCO₃；2 mM EDTA；和 0.4 mM PMSF；pH 8) 研磨後，於 30,000 x g 下離心 30 分鐘，取上清液加入適量 (NH₄)₂SO₄ 至最終濃度為 40%，再於 20,000 x g 下離心 20 分鐘，保

留沉澱部分。酵素分析前再以 100 mM Tris/HCl 緩衝液(內含 20% glycerol; 和 0.4 mM PMSF; pH 8.0) 溶解後, 經 Sephadex G25 column (Pharmacia) 沖提脫鹽, 即得酵素萃取液。

酵素活性分析為將萃取液加入 100 mM Tris/HCl 緩衝液(內含: 1 mM ATP; 2.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 15 mM NaHCO₃; 和 50 μg acetyl-CoA; pH 8.0), 於 33°C 下反應 20 分鐘後, 再加入 50 μl 之 9% perchloric acid 終止反應, 於 16,000 x g 下離心 10 分鐘, 取上清液 200 μl 加入 60 μl KOH/K₂HPO₄ 混合液中中和, 離心後保留上清液進行 HPLC 分析。

使用具固定流速操作之二元沖提梯度 (binary gradient) HPLC 系統 (Gold Nouveau system with 166 detector module, Beckman) 分析; 溶劑 A 為 92% 100 mM KH₂PO₄, pH 5.0 及 8% methanol; 溶劑 B 為 50% 100 mM KH₂PO₄, pH 5.0 及 50% methanol, column 為 LiChrospher 100, RP-18 (5 μm, 250 x 4 mm), 流速為 1.0 mL min⁻¹, malonyl-CoA 及 acetyl-CoA 之 retention time 依序為 9.5 及 22.5 分鐘, 記錄在波長 254 nm 之吸光值。以未加 acetyl-CoA 之讀值為背景值, 各處理於扣除背景值後, 由 malonyl-CoA 之標準線求出其含量, 計算出單位時間內之酵素活性。

抗、感植株生育性狀調查

選擇經由植株生育、膜滲漏性分析及 ACCase 酵素活性劑量反應結果所篩選之抗、感牛筋草植株, 分別播種及培育於溫室栽植盆內, 萌芽後定期量測株高及分蘗數等農藝性狀, 並於播種後 60 日, 調查鮮重、葉面積、種子數及空穎率。另以抗、感種子進行發芽試驗, 將放有 100 粒種子之發芽皿置放於 25°C 左右之培養箱中, 於種後 7、14 及 21 日調查發芽率。種子發芽

以胚根突破種皮約 0.2 mm 為認定標準。每處理 3 重複, 每重複 2 盆。各項調查結果以 mean ± SE 表示。

結果與討論

牛筋草抗性生物型之篩選

(一) 胚根伸長之劑量反應

利用種子胚根或芽鞘 (coleoptile) 伸長之劑量反應測定, 為 APP 類除草劑抗、感生物型快速檢測之有效方法⁽²⁷⁾。將伏寄普、甲基合氯氟、快伏草、環殺草及西殺草分別配置成 0-1 ppm 及 0-10 ppm 系列稀釋之兩組藥液。分別將採集自果園及蔬菜田之牛筋草種子包覆於濾紙內, 依序浸潤在 0-10 ppm 及 0-1 ppm 之測試藥液中, 置放於生長箱內 7 日後, 調查不同處理之胚根長度。來自果園及蔬菜田之牛筋草種子, 在未經藥劑處理時之胚根長度依序為 1.96±0.4 及 2.18±0.29 cm。分析處理劑量與胚根長度之相關關係, 估算達到 50% 長度抑制之劑量值, 同時計算在相同藥劑作用下, 兩採集處之牛筋草 50% 抑制劑量比值 (表一)。果園區種子對五種測試藥劑之 50% 抑制劑量為蔬菜田區之 4-7 倍, 其中以伏寄普的 7 倍為最高, 次為快伏草、環殺草及西殺草的 5 倍, 甲基合氯氟為 4 倍 (表一)。結果顯示高雄地區果園採集之牛筋草種子較彰化地區蔬菜田者, 對測試之 ACCase 抑制劑具較高之忍受性。後續試驗之植材, 則以來自果園者為耐性生物型, 蔬菜田者為感性生物型。

(二) 植株生長之劑量反應

將生育期為 3-4 葉齡及 9-10 葉齡之牛筋草耐、感生物型植株, 分別噴施系列不同劑量之伏寄普、快伏草、甲基合氯氟、環殺草及西殺草除草劑, 施藥後 14 日調查植株受害程度, 21 日後量測鮮重變化, 並估算各處理之劑量反應趨勢。

不同劑量之測試藥劑噴施後, 明顯抑

表一、ACCCase 抑制型除草劑對不同生物型牛筋草種子胚根伸長之影響¹⁾Table 1. GR₅₀ values for the radicle elongation of susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Eleusine indica* treated with ACCase-inhibiting herbicides¹⁾

Herbicide	GR ₅₀ for radicle length (ppb) ²⁾		R/S ³⁾
	Resistant (R)	Susceptible (S)	
Fluazifop-p-butyl	1172	168	7
Haloxifop	273	72	4
Quizalofop-ethyl	742	151	5
Cycloxydim	2344	496	5
Sethoxydim	703	129	5

¹⁾ Seeds of *Eleusine indica*, selected on the basis of suspected resistance to fluazifop-p-butyl, were collected from orchards of Kaohsiung in 2003. The susceptible biotype was collected from vegetable fields of Changhua in 2003.

²⁾ GR₅₀ was the concentration of tested herbicide that reduced 50% radicle length.

³⁾ R/S was the GR₅₀ ratio of resistant to susceptible biotypes.

制感性植株生長，嚴重受害者約在兩星期內即死亡。植株新葉黃褐化無法自葉鞘中正常抽出，成熟葉黃化或紫化，嚴重時自分蘖節處斷裂等均為此類型藥劑之典型徵狀³⁾。植株藥斑出現之比例及株高抑制程度，均隨噴施劑量的提高而增加，甚至引起植株死亡。以 50 ppm 劑量之伏寄普、甲基合氯氟及快伏草處理 14 日後，引起 3-4 葉齡之感性牛筋草傷害指數高達 98%，西殺草及環殺草則介於 47-54% 間（表二）。耐性牛筋草之反應，以快伏草之傷害指數（61%）最高，次為環殺草（37%），其餘測試藥劑均在 20% 以下（表二）。以 100 ppm 劑量之測試藥劑處理 9-10 葉齡期之感性植株，引起之傷害指數亦高達 74-98% 間（表三），耐性植株之反應，除快伏草之傷害指數為 46% 外，其餘測試藥劑之影響均有降低之趨勢（表三）。

施藥後 21 日由鮮重之劑量反應變化，估算伏寄普、甲基合氯氟、快伏草、西殺草及環殺草達 50% 抑制之劑量；幼株之抗、感比值（R/S ratio）依序分別為 15.7、15.3、1.6、4.5 及 3.6；成株則為 31.8、22.3、5.8、8.3 及 11.5（表二、表三）。耐、感植株對伏寄普之劑量反應差異達

15.7-31.8 倍，次為甲基合氯氟在 15.3-22.3 倍間，環殺草及西殺草介於 3.6-11.5 倍，快伏草則為 1.6-5.8 倍（表二、表三）。由鮮重估算之藥劑忍受性，測試牛筋草植株在不同生育期之反應差異約為 2-3 倍。Hassan et al.⁽²⁰⁾ 以芬殺草（fenoxaprop）噴施不同生育期之耐、感義大利黑麥草（Italian ryegrass）植株，亦發現藥劑對部分品系之鮮重抑制率會隨株齡的增加呈明顯的變化。

由胚根伸長及不同生育期植株生長抑制之劑量反應結果，發現來自果園之測試植材較之蔬菜田者，對伏寄普的抗性表現最高，甲基合氯氟、環殺草及西殺草居次，快伏草較不明顯。顯示臺灣地區牛筋草確已出現對 ACCase 抑制型除草劑具抗性之生物型植株，且在作用機制相似化學結構不同的 APPs 及 CHDs 兩類型除草劑間，發生不同程度之交互抗性。

ACCCase 抑制型除草劑對抗、感牛筋草膜滲漏性影響

芳烴氧苯氧羧酸系除草劑一般製劑為酯類形式，使藥劑易於進入植物細胞中，再於細胞內水解成為酸式，通常微量之酸

表二、ACCCase 抑制型除草劑對 3-4 葉齡抗、感牛筋草植株生長之影響

Table 2. Effects of ACCCase-inhibiting herbicides applied at the 3-4 leaf stage on the growth of fluazifop-resistant (R) and -susceptible (S) biotypes of *Eleusine indica*

Herbicide	Phytotoxicity (%) ¹⁾		GR ₅₀ for fresh weight (ppm) ²⁾		
	Resistant (R)	Susceptible (S)	Resistant (R)	Susceptible (S)	R/S ³⁾
Fluazifop-p-butyl	16±1	98±6	157	10	15.7
Haloxypop	37±2	99±5	61	4	15.3
Quizalofop-ethyl	61±3	98±7	41	25	1.6
Cycloxydim	19±3	54±9	264	59	4.5
Sethoxydim	17±1	47±9	251	70	3.6

¹⁾ Herbicides were applied at 50 ppm to tested plants at 3-4 leaf stage, and evaluating time was 14 days after herbicide application.

²⁾ Evaluating time was 21 days after herbicide application, and GR₅₀ was the concentration of tested herbicide that reduced 50% fresh weight.

³⁾ R/S was the GR₅₀ ratio of resistant to susceptible biotypes.

表三、ACCCase 抑制型除草劑對 9-10 葉齡之抗、感牛筋草植株生長之影響

Table 3. Effect of ACCCase-inhibiting herbicides applied at the 9-10 leaf stage on the growth of fluazifop-resistant (R) and -susceptible (S) biotypes of *Eleusine indica*

Herbicide	Phytotoxicity (%) ¹⁾		GR ₅₀ for fresh weight (ppm) ²⁾		
	Resistant (R)	Susceptible (S)	Resistant (R)	Susceptible (S)	R/S ³⁾
Fluazifop-p-butyl	6±1	96±6	859	27	31.8
Haloxypop	14±2	98±8	357	16	22.3
Quizalofop-ethyl	46±3	95±5	141	24	5.8
Cycloxydim	11±1	74±3	466	56	8.3
Sethoxydim	10±1	81±4	472	41	11.5

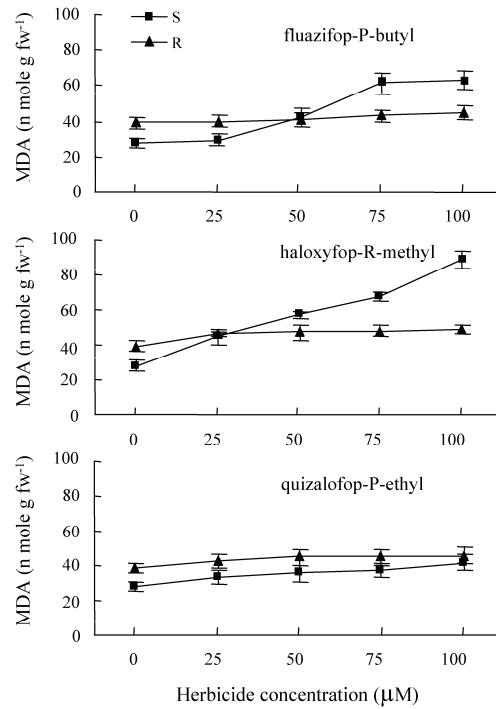
¹⁾ Herbicides were applied at 100 ppm to tested plants at 9-10 leaf stage, and evaluating time was 14 days after herbicide application.

²⁾ Evaluating time was 21 days after herbicide application, and GR₅₀ was the concentration of tested herbicide that reduced 50% fresh weight.

³⁾ R/S was the GR₅₀ ratio of resistant to susceptible biotypes.

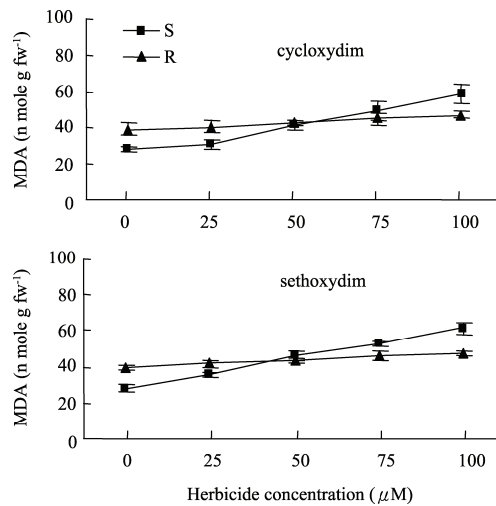
式形態即可導致細胞膜極性的大幅降低，引起膜通透性的破壞⁽¹⁵⁾。在氧氣持續存在下，細胞膜上的不飽和脂肪酸會發生脂質過氧化作用，由脂質過氧化物裂解形成小分子之乙烷及 MDA，因此可以乙烷或 MDA 的生成量來研判細胞膜的傷害程度^(1, 28)。以葉圓片浸泡方式處理 9-10 葉齡之抗、感牛筋草，測定不同濃度之伏寄普、甲基合氯氟、快伏草、環殺草及西殺草對 MDA 含量之影響。伏寄普及甲基合氯氟在

低於 50 μM 濃度處理下，並未引起抗、感葉片之 MDA 含量有明顯差異，但以 75 及 100 μM 處理時，感性葉片之生成量較抗性多出約 40-80% (圖一)。快伏草葉圓片之 MDA 反應，在測試濃度範圍內均未顯示抗、感間之明顯差異 (圖一)。環殺草及西殺草在 75 及 100 μM 之較高濃度處理下，會引起感性葉片之 MDA 含量較抗性者多出約 10-30% (圖二)。



圖一、APP 類型除草劑處理後之抗、感牛筋草葉圓片內 MDA 含量變化。

Fig. 1. Changes of MDA in leaf discs of both susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Eleusine indica* after aryloxyphenoxyacetic acids (APPs) herbicides treatment. Vertical bars represent means \pm SE (n=3).



圖二、CHD 類型除草劑處理後之抗、感牛筋草葉圓片內 MDA 含量變化。

Fig. 2. Changes of MDA in leaf discs of both susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Eleusine indica* after cyclohexanediones (CHDs) herbicides treatment. Vertical bars represent means \pm SE (n=3).

ACCase 抑制型除草劑在細胞中產生有毒過氧化物破壞膜系完整性，已經證實為干擾脂肪酸正常合成之次級結果⁽¹¹⁾。玉米幼苗施用過伏寄普後，葉片葉綠素含量下降，游離胺基酸及 MDA 含量顯著增加，顯示細胞膜發生脂質過氧化作用，伴隨產生之自由基導致膜透性增加及電導度值大幅提高⁽¹⁾。Luo et al.⁽²⁸⁾以伏寄普處理菊科植物 *bristly starbur*，發現葉片內乙烷及 MDA 含量亦明顯增加，但在外施 *vitamine E* 或 *ethoxyquin* 兩種抗氧化劑後，累積現象即有消除之趨勢，顯示伏寄普會促使過氧化物 (ROSs) 及/或自由基產生，引起膜脂過氧化之毒性作用。以西殺草噴施大豆造成嫩葉壞疽，分析葉片全脂量減少約 45%，脂肪酸的組成亦發生改變，飽和脂肪酸如棕櫚酸之比例明顯增加，多元不飽和脂肪酸比例則減低，對葉綠體膜系構造的影響尤其顯著⁽⁵⁾。

由 MDA 生成量之結果顯示，感性牛筋草葉片之細胞膜系滲漏程度，會隨伏寄普、甲基合氯氟、環殺草及西殺草之濃度提高而增加，抗性葉片在 100 μM 以下之處理濃度下，則未發現明顯之劑量反應差異 (圖一、二)。快伏草對抗、感牛筋草 MDA 含量之影響頗為相似，均隨處理濃度提高而略為上升 (圖一)。

ACCase 酵素活性差異

由抗、感葉片粗萃取液測得之 ACCase 活性沒有明顯差異，依序為 7.2 與 7.6 $\text{nmol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$ ，推測 total ACCase 活性的提高非為抗性發生的主要原因。以不同濃度之伏寄普、甲基合氯氟、快伏草、環殺草及西殺草處理 9-10 葉齡之抗、感植株，分析葉片內 ACCase 活性的反應差異。比較抗、感植株之 ACCase 活性抑制達 50% 之藥劑濃度比，依序為 9.9、4.9、1.8、2.8 及 3.6 (表四)。其中伏寄普之抗性表現最為明顯，次為甲基合氯氟，環殺草及西殺草。

快伏草在抗、感植株間僅相差約 80%，抗性表現較不明顯。

於馬來西亞發現之抗性牛筋草植株對伏寄普、芬殺草及西殺草之吸收、傳導及代謝上的表現與感性株並無明顯差異，但兩者之 ACCase 活性抑制濃度比值，依序為 >90、24.5 及 20.4，因此田間伏寄普用量高達 4000 g ha^{-1} (臺灣農田登記量低於 300 g ha^{-1}) 的防治率只有 50%⁽²⁶⁾。比較 *Lolium multiflorum* 之抗、感植株，亦發現對 diclofop-methyl 之吸收及傳導無明顯差異，同時兩者都會快速將 diclofop-methyl 代謝成 diclofop acid，形成不具毒性之極性共軛體⁽¹³⁾。以西殺草處理 *Rottboellia cochinchinensis* 抗、感植株，在吸收及傳導上的表現亦無明顯差異，兩者也都會很快將西殺草代謝成不具極性之穩定代謝物⁽⁴⁾。根據抗性草對 APPs 及 CHDs 兩類除草劑在吸收、傳導、代謝及 ACCase 的分析結果，推測抗性的發生與目標酵素對藥劑的敏感性降低有關⁽²⁵⁾，至於交互抗性的產生，可能與控制 ACCase 的基因發生點突變，導致藥劑與酵素結合位置的胺基酸序列改變有關⁽⁴⁾。

抗、感牛筋草植株之農藝性狀比較

將抗、感生物型之牛筋草種子播種後，在相同生育環境下，連續兩個月調查株高、分蘗數、鮮重、葉面積等與生長勢有關之性狀，及種子產生量、空穎率等會影響植株繁殖之因子。兩者在株高及分蘗數的表現以感性株略為優勢 (表五)。播種後 21 日調查之鮮重亦顯示感性株之單株重略高，葉面積亦較大 (表五)。比較抗、感株形之外觀差異，後者通常較為高大及分蘗較為旺盛。種子產生量及空穎率亦以抗性株之數值較低，顯示感性植株之生育確較抗性者為佳 (表五)。抗性種子在種後不同時間調查之發芽率，各重複間之變異範圍介於 34-42%，感性者為 21-33%，顯示

表四、ACCCase 抑制型除草劑對抗、感牛筋草植株酵素活性之抑制

Table 4. I_{50} values for inhibition of ACCase from susceptible (S) and resistant (R) *Eleusine indica* biotypes by tested ACCase-inhibiting herbicides

Herbicide	ACCCase activity (I_{50} ; μM) ¹⁾		R/S ²⁾
	Resistant (R)	Susceptible (S)	
Fluazifop-p-butyl	45.7	4.6	9.9
Haloxifop	11.3	2.3	4.9
Quizalofop-ethyl	2.3	1.3	1.8
Cycloxydim	7.5	2.7	2.8
Sethoxydim	8.3	2.3	3.6

¹⁾ I_{50} was the concentration of tested herbicide that reduced 50% ACCCase activity.

²⁾ R/S was the I_{50} ratio of resistant to susceptible biotypes.

表五、抗、感牛筋草植株之生育性狀¹⁾Table 5. Plant characteristics of susceptible (S) and resistant (R) *Eleusine indica* biotypes to ACCCase-inhibiting herbicides

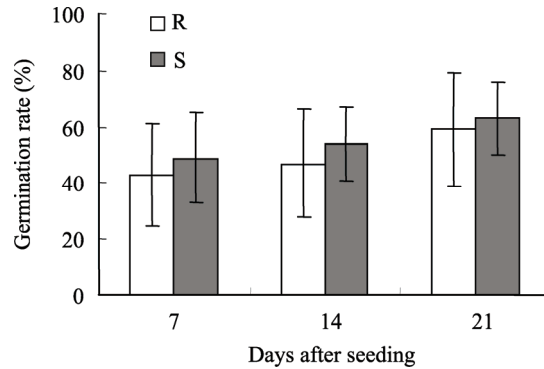
Biotype	Plant height (cm)	Tiller number (no. plant ⁻¹)	Fresh weight (g plant ⁻¹)	Leaf area (cm ² plant ⁻¹)	Seed number (no. panicle ⁻¹)	Sterility (%)
Susceptible(S)	93±0.2	26±1	165±18	1185±117	1998±184	49±11
Resistant(R)	74±2.7	22±4	142±16	965±193	1781±322	48±17

¹⁾ Observed 60 days after seeding.

感性種子之發芽整齊度較抗性者為高。比較抗、感種子在播種後 7 日之發芽率依序為 43±18% 及 49±16%，21 日後分別為 59±20% 及 63±13% (圖三)，兩者發芽率之差異並不顯著。綜合株高等農藝性狀及發芽率等繁殖潛力之測試結果，感性植株均較抗性者略具優勢，應為臺灣農田普遍發生之野生型植株。

ACCCase 為催化 acetyl CoA 轉變為 malonyl-CoA 之耗能反應，以合成脂肪酸的關鍵酵素。在細胞質體 (plastids) 內需要大量的 malonyl-CoA 來進行脂肪酸的合成，在細胞質 (cytosol) 中也需要 malonyl-CoA 來進行如類黃酮、花青素的合成、脂肪酸鏈的加長及胺基酸的各種相關反應^(15, 19)。因為 malonyl-CoA 無法穿透細胞膜系，因此至少有兩種 ACCCase isoforms 分別存在植物的質體及細胞質中，其中質體內的 ACCCase isoform 佔葉片 ACCCase 總活性的

80-95%^(13, 15)。存在於質體中之異質型 ACCCase 為一多酶複合體 (multi-enzyme complex, 32-79 kDa)，由四個次單元組成，在活性狀態下，BC 和 BCCP 次單元呈同型二聚體， α -CT 及 β -CT 次單元呈異型二聚體。除 α -CT 次單元由質體控制外，其餘之次單元均由核基因所編碼^(15, 31, 34)。同質型 ACCCase 存在於大多數植物之細胞質中，為一條多功能蛋白 (multifunctional protein, 220-240 kDa)，由排列其上之次單元 BC、BCCP、 α -CT、 β -CT (其中 α -CT 及 β -CT 為一功能區) 形成三個功能區。在活性狀態下，同質型 ACCCase 呈同型二聚體，由核基因編碼^(15, 31, 34)。但在油菜 (*Brassica napus*) 葉綠體中可能同時含兩種型式之 ACCCase，禾本科植物由於缺失編碼 β -CT 次單元的 *accD* 基因，因而質體與細胞質中所含的 ACCCase 則均為屬同質型^(15, 18, 31, 34)。Herbert⁽²³⁾亦證實雙子葉植物如豌豆葉



圖三、抗、感牛筋草種子發芽率之比較。

Fig. 3. Comparison of germination rate between susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Eleusine indica*. Vertical bars represent means \pm SE (n=3).

綠體中具有異質型 ACCase，禾本科單子葉植物如玉米則只有一種同質型 ACCase。一般植物對 APPs 及 CHDs 兩類型藥劑的敏感與否，實由同質型 ACCase 之 CT 功能區來決定，異質型 ACCase 對藥劑是不敏感的^(10, 15, 31, 40)。禾本科質體的 ACCase 成爲此類型除草劑作用之目標位置，CHDs 之環己二酮結構與 APPs 之芳氧苯氧基結構與 ACCase 的作用，均發生在 β 折疊之疏水區內，因爲兩者會互相競爭受質 acetyl coenzyme A，因此推斷其在 ACCase 之 CT 功能區上的結合位置有部分重疊的⁽⁹⁾。

De Prado et al.⁽¹⁴⁾分離及純化抗、感狗尾草內的多功能 ACCase 的兩個 isoforms (ACCcase I 及 ACCcase II)，發現 diclofop-methyl 對抗性細胞內 ACCcase I 之 I₅₀ 爲感性之 30.8 倍，但在 ACCcase II 上無明顯差異，推測狗尾草對 diclofop 發生抗性與 ACCcase I isoform 的改變有關。De Prado et al.⁽¹³⁾分析多花黑麥草 (*Lolium multiflorum*) 對 diclofop-methyl 具抗、感性之 ACCcase 萃取液，兩者之 ACCcase II isoform 對禾草藥劑均有極高之忍受性，但在 ACCcase I isoform 之抗感比爲 19 倍。在 *Alopecurus myosuroides* 中亦發現，經 diclofop-methyl 處理後，ACCcase I isoform 之抗感比有顯著的差異⁽²⁹⁾。

Zagnitko et al.⁽³⁹⁾研究禾本科植物，發現感性玉米質體 ACCase 之 CT 功能區上的特定位置胺基酸— isoleucine (Ile)，在抗性植株中被 leucine (Leu) 取代，在小麥抗、感植株中亦發現相似的現象，因此推測此特定位置之胺基酸是 ACCase 抑制型除草劑作用的目標位置。Delye⁽¹⁵⁾將質體 ACCase 已發生突變之植物略分爲三大類，第一類爲僅對西殺草具高抗性。已確立之大穗看麥娘 (*Alopecurus myosuroides*)、野燕麥 (*Avena fatua*)、*Lolium rigidum* 及狗尾草 *Setaria viridis* 四種禾本科草，均發生 Ile 被 Leu₁₇₈₁ 取代⁽⁸⁾。第二類爲僅對 APPs 所屬之藥劑發生交互抗性，包括 tryptophan (Trp) 被 cysteine (Cys₂₀₂₇) 取代，Ile 被 asparagine (Asn₂₀₄₁) 取代，或 glycine (Gly) 被 alanine (Ala₂₀₉₆) 取代。第三類爲對 APPs 及 CHDs 發生之交互抗性，主要是在抗性大穗看麥娘中出現 aspartic acid (Asp) 被 Gly₂₀₇₈ 取代。在 *Lolium rigidum* 對芬殺草抗性之遺傳研究，發現 ACCase 的改變是由單一共顯性之核基因所控制⁽³⁶⁾。

有關植物對此二類型藥劑產生交互抗性之相關研究頗多。對芬殺草具抗性之 *Avena sterilis* 七個品系植株，分別對其他 APPs 或 CHDs 類具不同程度之抗感性⁽³⁷⁾。黑麥草 (ryegrass) 對 diclofop、芬殺草及

西殺草之抗性，在品系間亦有顯著的差異⁽²⁴⁾。在玉米不同細胞品系 (cell line) 中，因為同一個基因座 (locus) 上的不同等位基因發生突變，導致族群間在目標位置的抗性程度有明顯差異⁽³³⁾。Bourgeois et al.⁽⁶⁾ 研究 82 個野燕麥 (*Avena fatua*) 品系對 ACCase 抑制劑之交互抗性，發現 APPs 的殺草活性對於 ACCase 的結構改變比 CHDs 更為敏感。至於 APPs 或 CHDs 類引起細胞膜系電位去極化的另一個作用⁽¹⁶⁾，雖然發現在除草劑溶液移除後，抗性的 *L. rigidum* 根尖及胚軸細胞的膜潛勢會再恢復極性，但在其他抗性植物則未發現有此現象。有關膜潛勢的再極化及其在抗性發生所扮演的角色，尚缺乏相關的直接證據⁽³³⁾。

本研究結果顯示臺灣田區之牛筋草確已發生抗性生物型植株，且對作用機制相似之不同類型除草劑已產生不同程度之交互抗性，針對 APP 及 CHD 之抗性表現在種間造成之差異，可能與目標酵素上不同位置的點突變有關，此點尚待進一步之探討及證實。

引用文獻

1. 黃文達、張新軒、蔡文福。1992。伏寄普 (Fluazifop-butyl) 對玉米之藥害與缺水及保護劑處理之關係。中華農藝 2: 57-67。台中縣。
2. 費雯綺、王喻其。2004。植物保護手冊。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所編印。732-785 頁。台中縣。
3. 蔣永正、蔣慕琰。2006。農田雜草與除草劑要覽。農委會農業藥物毒物試驗所。40-95 頁。
4. Avila, W., Bolanos, A., and Valverde, B. E. 2007. Characterization of the cross-resistance mechanism to herbicides inhibiting acetyl coenzyme-A carboxylase in itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) biotypes from Bolivia. Crop Prot. 26: 342-348.
5. Belkebir, A., De Paepe, R., Tremolieres, A., Aid F., and Benhassaine-Kesri, G. 2006. Sethoxydim affects lipid synthesis and acetyl-CoA carboxylase activity in soybean. J. Exp. Bot. 57: 3553-3562.
6. Bourgeois, L. N., C. Kenkel, and I. N. Morrison. 1997. Characterization of cross-resistance patterns in acetyl-CoA carboxylase inhibitor resistant wild oat (*Avena fatua*). Weed Sci. 45: 750-755.
7. Bradley, K. W., Wu, J., Hatzios, K. K., and Hagood, Jr. E. S. 2001. The mechanism of resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in a johnsongrass biotype. Weed Sci. 49: 477-484.
8. Brown, A. C., Moss, S. R., Wilson, Z. A., and Field, L. M. 2002. An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) is associated with resistance to the herbicide sethoxydim. Pest. Biochem. Physiol. 72: 160-168.
9. Burton, J. D., Gronwald, J. W., Keith, R. A., Somers, D. A., Gegenbach, B. G., and Wyse, D. L. 1991. Kinetics inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by sethoxydim and haloxyfop. Pest. Biochem. Physiol. 39: 100-109.
10. Christopher, J. T., and Holtum, J. A. M. 2000. Dicotyledons lacking the multisubunit form of the herbicide-target enzyme acetyl coenzyme A carboxylase may be restricted to the family Geraniaceae. Aust. J. Plant Physiol. 27: 845-850.
11. Cummins, I., Cole, D. J., and Edwards, R. 1999. A role of glutathione transferase

- functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18: 285-292.
12. Cummins, I., Moss, S., Cole, D. J., and Edwards, R. 1997. Glutathione transferase in herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Pestic. Sci.* 51: 244-250.
 13. De Prado, R., Gonzalez-Gutierrez, J., Menendez, J., Gasquez, J., Gronwald, J. W., and Gimenez-Espinosa, R. 2000. Resistance to acetyl CoA carboxylase-inhibiting herbicides in *Lolium multiflorum*. *Weed Sci.* 48: 311-318.
 14. De Prado, R., Osuna, M. D., and Fischer, A. J. 2004. Resistance to ACCase inhibitor herbicides in a green foxtail (*Setaria viridis*) biotype in Europe. *Weed Sci.* 52: 506-512.
 15. Delye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Sci.* 53: 728-746.
 16. Di Tomaso, J. M. 1994. Evidence against a direct membrane effect in the mechanism of action of graminicides. *Weed Sci.* 42: 302-309.
 17. Dinelli, G., Bonetti, A., Marotti, I., Minelli, M., and Catizone, P. 2005. Possible involvement of herbicide sequestration in the resistance to diclofop-methyl in Italian biotypes of *Lolium* spp. *Pest. Biochem. Physiol.* 81: 1-12.
 18. Focke, M., Gieringer, E., Schwan, S., Jansch, L., Binder, S., and Braun, H.-P. 2003. Fatty acid biosynthesis in mitochondria of grasses: malonyl-coenzyme A is generated by mitochondrial-localized acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.* 133: 875-884.
 19. Harwood, J. L. 1988. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39: 101-138.
 20. Hassan, G., Muell-Warrant, G., and Griffith, S. 2002. Differential sensitivity of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars to fenoxaprop. *Weed Sci.* 50: 567-575.
 21. Heap I. 2007. The International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. Herbicide Resistance Action Committee (HRAC). <http://www.weedscience.com/>.
 22. Heath, R. L., and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.
 23. Herbert, D., Cole, D. J., Pallett, K. E., and Harwood, J. L. 1996. Susceptibilities of different test system from *Zea mays*, *Poa annua*, and *Festuca rubra* to herbicides that inhibit the enzyme acetyl-coenzyme A carboxylase. *Pest. Biochem. Physiol.* 55: 129-139.
 24. Kuk, Y.-I., Burgos, N. R., and Talbert, R. E. 2000. Cross- and multiple resistance of diclofop-resistance *Lolium* spp. *Weed Sci.* 48: 412-419.
 25. Kuk, Y.I., Wu, J., Derr, J. F., and Hatzios, K. K. 1999. Mechanism of fenoxaprop resistance in an accession of smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 64: 112-123.
 26. Leach, G. M., Devine, M. D., Kirkwood, R. C. and Marshall, G. 1995. Target enzyme-based resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in

- Eleusine indica*. Pestic. Biochem. Physiol. 51: 129-136.
27. Letouze, A., and Gasquez, J. 1999. A rapid reliable test for screening aryloxyphenoxy-propionic acid resistance within *Alopecurus myosuroids* and *Lolium* spp. populations. Weed Res. 39: 37-48.
28. Luo, X.-Y., Sunohara, Y., and Matsumoto, H. 2004. Fluzifop-butyl causes membrane peroxidation in the herbicide-susceptible broad leaf weed bristly starbur (*Acanthospermum hispidum*). Pest. Biochem. Physiol. 78: 93-102.
29. Menendez, J., and De Prado, R. 1999. Characterization of two acetyl-CoA carboxylase isoforms in diclofop-methyl-resistant and susceptible biotypes of *Alopecurus myosuroides*. Pestic. Biochem. Physiol. 65: 82-89.
30. Monaco, T. J., Bonanno, A. R., and Baron, J. J. 1986. Herbicide injury: diagnosis, causes, prevention and remedial action. pp. 399-428. In N. D. Camper [ed.] Research Methods in Weed Science. Southern Weed Science Society, USA.
31. Nikolau, B. J., Ohlrogge, J. B., and Wurrele, E. S. 2003. Plant biotin-containing carboxylases. Arch. Biochem. Biophys. 414: 211-222.
32. Paul, G. 1993. Activity and inhibition of acetyl-CoA carboxylase determined by HPLC. pp. 161-166. In: Boger, P. and Sandmann, G. [eds.], Target Assays for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds. Lewis Publishers. USA.
33. Powles, S. B., and Preston, C. 2005. Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants. HRAC Articles. [http://www.hracglobal.com/Publications/Herbicide Cross Resistance and Multiple Resistance/tabid/224/Default.aspx](http://www.hracglobal.com/Publications/Herbicide%20Cross%20Resistance%20and%20Multiple%20Resistance/tabid/224/Default.aspx)
34. Sasaki, Y., and Nagano, Y. 2004. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 1175-1184.
35. Sunderland, S. L., Santelmann, P. W., and Baughman, T. D. 1991. A rapid, sensitive soil bioassay for sulfonylurea herbicides. Weed Sci. 39: 296-298.
36. Tal, A., and Rubin, B. 2004. Molecular characterization and inheritance of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. Pest Manag. Sci. 60: 1013-1018.
37. Uludag, A., Nemli, Y., Tal, A., and Rubin, B. 2007. Fenoxaprop resistance in sterile wild oat (*Avena sterilis*) in wheat fields in Turkey. Crop Prot. 26: 930-935.
38. Velikoa, V., Yordanov, I., and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants, protective role of exogenous polyamines, Plant Sci. 151: 59-66.
39. Zagnitko, O., Jelenska, J., Tevzadze, G., Haselkorn, R., and Gornicki, P. 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6617-6622.
40. Zhang, H., Yang, Z., Shen, Y., and Tong, L. 2003. Crystal structure of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase. Science 299: 2064-2067.

ABSTRACT

Chiang, Y. J.^{1*}, Hou, P. F.², Wang, C. P.¹, and Chiang M. Y.¹ 2007. Resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibitors in goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan. Plant Prot. Bull. 49: 311-324. (¹Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan; ²Kinmen Inspection Station, Kaohsiung Branch, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Kinmen 89346, Taiwan (ROC))

Acetyl-CoA carboxylase (ACCase) inhibitors, including aryloxyphenoxypropionates (APPs) and cyclohexanediones (CHDs), are used widely to control grass weeds in broadleaf crops. A putative resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) biotype to fluzifop-p-butyl was found in orchard of Kaohsiung. Two goosegrass populations collected from fruit and vegetable fields in 2003 were tested for the resistance to fluzifop-p-butyl, haloxyfop and quizalofop-ethyl (APPs) and cycloxydim and sethoxydim (CHDs), in both seed and whole-plant responses. GR₅₀ ratios (R/S) (herbicide dosage required to inhibit 50% radicle elongation) of resistant to susceptible biotypes ranged from 4 to 7. Under greenhouse condition, based on plant fresh weight evaluated at 21 days after herbicide application, R/S ratios of the GR₅₀ values of resistant to susceptible plants were 15.7-31.8 (fluzifop-p-butyl), 15.3-22.3 (haloxyfop), 1.6-5.8 (quizalofop-ethyl), 4.5-8.3 (cycloxydim), and 3.6-11.5 (sethoxydim) at the 3-4 and 9-10 leaf stages. malondialdehyde, an indicator of lipid peroxidation, increased significantly by herbicides except quizalofop-ethyl which caused the increase only in S biotype. Graminicide concentrations required to inhibit 50% ACCase activity were determined for resistant and susceptible biotypes. ACCase from S biotype was sensitive to treated herbicides, with I₅₀ values ranging from 1.3 to 4.6 μM. In contrast, ACCase from the R biotype was much less sensitive to fluzifop-p-butyl, haloxyfop, cycloxydim and sethoxydim, with I₅₀ values of 45.7, 11.3, 7.5 and 8.3 μM, respectively. ACCase from the R biotype showed only a low level of resistance to quizalofop-ethyl, with an I₅₀ of 2.3 μM. The S biotype appeared to have better growth rate and seed vigor than the R biotype. Results suggest that the biotype of *Eleusine indica* resistant to fluzifop-p-butyl has occurred in the fields of Taiwan, and showed different levels of cross-resistance to other ACCase inhibiting-herbicides.

(Key words: *Eleusine indica*, herbicide resistance, ACCase inhibitors, cross resistance)

*Corresponding author. E-mail: cyj@tactri.gov.tw