

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物醫學碩士學位學程

碩士論文

Master Program for Plant Medicine

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

應用幾丁寡醣防治草莓病害之研究

Studies on application of chitosan oligosaccharide to
control diseases of strawberry

羅筱君

Hsiao-Chun Lo

指導教授：林乃君 博士

Advisor: Nai-Chun Lin, Ph.D.

中華民國 110 年 6 月

June, 2021





誌謝



兩年匆匆，準備步入社會的期待與緊張交織著。對於未知，一向不安的我，竟逐漸適應甚至夾帶興奮感。驀然回首，才發覺，是這兩年帶給我的成長。

碩士生涯的酸甜苦辣用另一種方式寫進了論文裡。能順利完成，必須謝謝我的口委老師昭瑩老師、挺軒老師、嘉綾老師及國譚老師的建議，使我的論文可以更加完善。當然還有我的指導老師乃君老師，老師總是不辭辛勞，一次又一次審閱並給予我方向。謝謝老師是一個非常認真又細心的老師，從字裡行間與日常觀察裡，我得到的不只有知識，還有研究者該有的邏輯及態度。因為有老師，我總能在被實驗苦海淹沒前，得到強而有力的救贖。好慶幸，兩年前的決定，進到老師實驗室，絲毫沒有後悔。我也要謝謝實驗室的夥伴。感謝涵丹、明珠、立綱、耕樵、佳翰、培真、雅竹、雅文、建宏、芥芥、婕伶、佳容、柔涵、修毅、詰聿及其他夥伴的陪伴與幫助，可以一起認真、一起嬉鬧，使得研究生活不至於太苦。

而一路上，每個實驗瓶頸背後，都有助我突破的貴人們。慶幸有苗改場的學長姐，謝謝珮哲學姐、紘毅學長、東憲學長、巧娟學姐、季芸姐和智仁哥，即便實習結束，仍願意為我解惑、給予幫助。謝謝種苗場的怡文學姐以及格園種苗的林先生，總是親切的回覆訂苗訊息。還要感謝週四吃飯團每週的實驗交流以及植醫可愛的同學及老師們。最後，我要謝謝我的家人以及維昭在心靈及物質上的大力支持，使我能專心致志、無後顧之憂的完成學業。

這兩年完成的不只是學業，還有初步社會的心態建立。對於研究的未知，我必須不斷實驗、逢人便問，而過程中我會遇到許多善良的人以及有趣的事。未知的雲霧會漸漸明朗，不安的情緒也會轉為動力。而對於人生的未知，我會用兩年來習得的技巧，勇於面對並享受探索。接著，我會期待一路上的種種未知境遇。

摘要

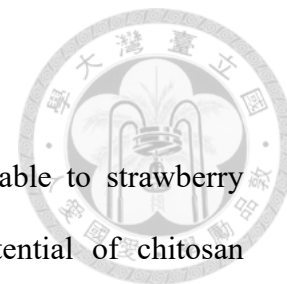


本研究由尋求可用於臺灣草莓產業的天然安全資材切入，探討幾丁寡醣解決草莓病害問題的潛力。草莓是臺灣重要的經濟作物，由於原產於溫帶，在臺灣高溫高濕的氣候中不易越夏，須每年更新植株。於此氣候下，草莓容易受到炭疽病 (*Colletotrichum* spp.) 感染而冠腐死亡，使農民需大量補植而成本提高。此外，近年來因品種更迭，造成兩大新興病害—葉枯病 (*Neopestalotiopsis rosae*) 與細菌性角斑病 (*Xanthomonas fragariae*) 的出現，而目前臺灣種植最多的香水品種對葉枯病極為感病，造成農民嚴重損失，使草莓產業急需解決的病害問題加重。長期以來，化學防治被視為病害管理之主流方式，但隨著環境保護與食品安全意識抬頭，多加利用高安全性資材以降低化學藥劑使用量是一大趨勢。研究發現，天然生物資材—幾丁寡醣具有抑菌功效，且可以作為 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) 誘導宿主產生抗性，具有開發價值。因此，本研究針對幾丁寡醣對草莓病害的防治效果進行探討，並初步了解其可能的作用機制。首先，藉由測試幾丁寡醣對目前草莓主要病害致病菌之抑菌能力，並觀察其對炭疽病、葉枯病及細菌性角斑病病害嚴重度的影響，評估其應用於防治草莓病害之效果；最後，利用測定防禦相關酵素以及利用 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 染色法，初步探討幾丁寡醣可能參與的抗病機制。結果顯示，幾丁寡醣可以抑制炭疽病菌壓器形成以及葉枯病菌孢子發芽，但無法抑制細菌性角斑病菌生長。每週以 5000 mg/L 幾丁寡醣施於草莓植株防治效果佳，可以顯著降低炭疽病及葉枯病發病嚴重程度，但對於細菌性角斑病的防治沒有效果；以此防治炭疽病的效果至少可持續兩週，但兩週後便失去對葉枯病的防治效果。此外，預處理幾丁寡醣的草莓植株，在接種炭疽病菌 48 和 72 小時後，過氧化氫酶 (Catalase, CAT) 活性明顯被誘導，而苯丙胺酸裂解酶

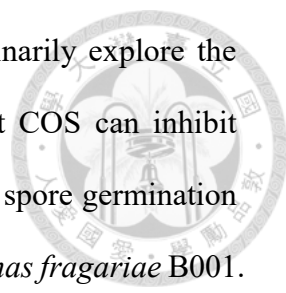
(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 活性可維持穩定，且在接種 72 小時後比對照組高。而 CAT 活性與 DAB 染色結果可相互印證，即 CAT 活性增加伴隨觀察到 H_2O_2 累積的下降。本研究提供了幾丁寡糖應用於草莓炭疽病及葉枯病防治潛力之成果，以及合適的施用頻率及濃度。希望未來將幾丁寡糖導入田間草莓有害生物整合管理 (Integrated pest management, IPM) 的策略中，以達到減少化學藥劑施用量與頻率的目標。

關鍵詞：炭疽病、葉枯病、細菌性角斑病、幾丁寡糖、有害生物整合管理

Abstract



Searching for natural products for disease control applicable to strawberry industry in Taiwan, this study aimed to investigate the potential of chitosan oligosaccharides in solving strawberry disease problems. Strawberry is an important cash crop in Taiwan. As strawberry is a temperate plant, which cannot tolerate hot and humid summer in Taiwan, it is vulnerable to anthracnose (*Colletotrichum* spp.) infection, resulting in more cost due to higher replanting rate. In addition, two diseases, leaf blight caused by *Neopestalotiopsis rosae* and bacterial angular leaf spot caused by *Xanthomonas fragariae*, emerge in recent years, and the most cultivated strawberry variety Xiang-Shui is extremely susceptible to leaf blight. Such scenario makes farmers suffer from enormous loss and the disease problem aggravate in the strawberry industry. For a long time, chemical control is regarded as the mainstream for disease management. However, with the rising awareness of environmental protection and food security, it is trending to replace chemical agents with natural materials of higher safety. Previous studies have revealed that one of the natural biological materials, chitosan oligosaccharides (COS), has antibacterial effects, and can serve as a pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) to induce plant defense response. Therefore, this study focused on the control effects of COS on strawberry diseases, and preliminary understanding of its possible mechanism. First, by testing the antimicrobial ability of COS on the major pathogens of strawberry diseases, and observing its influence on the severity of anthracnose, leaf blight and bacterial angular leaf spot, the control effects of COS on strawberry diseases were evaluated. Finally, the activities of defense-related enzymes and the 3, 3'-



diaminobenzidine (DAB) staining method were used to preliminarily explore the possible defense mechanisms of COS. The results showed that COS can inhibit appressorium formation of *Colletotrichum siamense* ML133 and spore germination of *Neopestalotiopsis rosae* ML2411, but not growth of *Xanthomonas fragariae* B001. Weekly application of 5000 mg/L COS to strawberry plants is recommended for a better control effect. It can significantly reduce the severity of anthracnose and leaf blight, but is not effective on bacterial angular leaf spot disease. The control effect can last for two weeks for anthracnose, but diminished for leaf blight in two weeks. After pretreatment of COS, inoculation of anthracnose induced catalase (CAT) activity at 48 and 72 hours post inoculation (hpi), and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity maintained stable, and higher than that in control plants at 72 hpi. CAT activity was correlated with DAB staining results as reduction of H₂O₂ accumulation was observed when CAT activity increased. This study provides data for the potential of COS application on control of strawberry anthracnose and leaf blight, as well as the appropriate application frequency and concentration. We hope that COS can be introduced into the strawberry Integrated Pest Management (IPM) program in the future to achieve the goal of reducing the amount and frequency of chemical applications.

Keywords: Anthracnose, Leaf blight, Bacterial angular leaf spot, Chitosan oligosaccharides (COS), Integrated pest management (IPM)

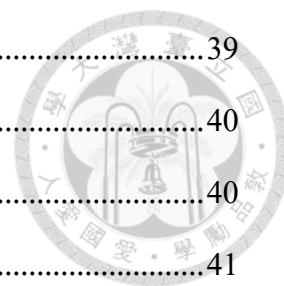
目錄



誌謝	I
摘要	II
Abstract	IV
目錄	VI
表目錄	IX
圖目錄	X
壹、 前人研究.....	1
一、 臺灣草莓栽培概況.....	1
二、 臺灣草莓重要病害.....	4
(一)、 草莓炭疽病 (Anthracnose).....	4
(二)、 草莓萎凋病 (Fusarium wilt).....	5
(三)、 草莓白粉病 (Powdery mildew).....	6
(四)、 草莓灰黴病 (Gray mold).....	7
(五)、 草莓青枯病 (Bacterial wilt).....	7
(六)、 草莓葉枯病 (Leaf blight).....	8
(七)、 草莓細菌性角斑病 (Bacterial angular leaf spot).....	9
三、 草莓炭疽病、葉枯病和細菌性角斑病之防治.....	10
(一)、 草莓炭疽病之防治.....	10
(二)、 草莓葉枯病之防治.....	11
(三)、 草莓細菌性角斑病之防治.....	13
四、 臺灣草莓病害常用之非化學農藥植物保護資材.....	13
五、 幾丁寡糖於植物病害防治上之應用.....	16

(一)、 幾丁質、幾丁聚醣與幾丁寡醣.....	16
(二)、 幾丁聚醣與幾丁寡醣具防治病害潛力.....	17
(三)、 幾丁寡醣具抑菌效果.....	18
六、 幾丁寡醣可誘導植物防禦系統.....	19
貳、 研究動機.....	22
參、 材料方法.....	24
一、 供試植物及栽培條件.....	24
二、 草莓炭疽病菌與葉枯病菌之製備.....	24
三、 草莓細菌性角斑病菌之製備.....	25
四、 幾丁寡醣對草莓炭疽病菌及葉枯病菌孢子發芽抑制效果.....	25
五、 幾丁寡醣對草莓炭疽病菌及葉枯病菌菌絲生長抑制效果.....	26
六、 幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌抑制效果.....	26
七、 幾丁寡醣於草莓炭疽病、葉枯病及細菌性角斑病之抗病效果測試....	27
八、 防禦相關酵素活性測定.....	28
九、 以 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 進行過氧化氫 (H ₂ O ₂) 染色.....	33
十、 統計分析.....	34
肆、 結果.....	35
一、 幾丁寡醣對草莓炭疽病菌之抑菌試驗.....	35
二、 幾丁寡醣防治草莓炭疽病之效果評估.....	35
(一)、 幾丁寡醣防治草莓炭疽病之效果評估 (草莓組織培養苗).....	36
(二)、 幾丁寡醣防治草莓炭疽病之效果評估 (草莓走莖苗).....	37
(三)、 幾丁寡醣防治草莓炭疽病之效期評估.....	38
(四)、 幾丁寡醣治療草莓炭疽病之效果評估.....	38
三、 幾丁寡醣對草莓葉枯病菌之抑菌試驗.....	38

四、 幾丁寡醣防治草莓葉枯病之效果評估.....	39
五、 幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌之抑菌試驗.....	40
六、 幾丁寡醣防治草莓細菌性角斑病之效果評估.....	40
七、 防禦相關抗氧化酵素活性測定.....	41
八、 幾丁寡醣誘導活性氧化物質 H ₂ O ₂ 累積之影響	42
伍、 討論.....	44
陸、 結論.....	52
柒、 參考文獻.....	53
捌、 圖表集.....	65
玖、 附錄.....	86



表目錄

表一、 草莓苗之炭疽病病害嚴重度分級表.....	65
表二、 草莓苗之葉枯病病害嚴重度分級表.....	66
表三、 草莓苗之細菌性角斑病病害嚴重度分級表.....	67



圖目錄



圖一、 不同濃度幾丁寡醣對草莓炭疽病菌孢子發芽與壓器產生之影響.....	68
圖二、 不同濃度幾丁寡醣對草莓炭疽病菌菌絲生長之影響.....	69
圖三、 草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓炭疽病抗性之影響....	70
圖四、 草莓走莖苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓炭疽病抗性之影響.....	71
圖五、 草莓組織培養苗與草莓走莖苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓炭疽病抗性之效期評估.....	72
圖六、 幾丁寡醣對炭疽病治療效果評估.....	73
圖七、 不同濃度幾丁寡醣對草莓葉枯病菌孢子發芽之影響.....	74
圖八、 不同濃度幾丁寡醣對草莓葉枯病菌菌絲生長之影響.....	75
圖九、 草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓葉枯病抗性之影響....	76
圖十、 草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓葉枯病抗性之效期評估.....	77
圖十一、 不同濃度幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌生長之影響.....	78
圖十二、 組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病抗性之影響.....	79
圖十三、 組織培養苗預處理幾丁寡醣後接種炭疽病菌對草莓抗氧化酵素過氧化氫酶活性之影響.....	80
圖十四、 組織培養苗預處理幾丁寡醣後接種炭疽病菌對草莓抗氧化酵素超氧化物歧化酶活性之影響.....	81
圖十五、 組織培養苗預處理幾丁寡醣後接種炭疽病菌對草莓抗氧化酵素過氧化氫酶活性之影響.....	82

圖十六、 組織培養苗預處理幾丁寡糖後接種炭疽病菌對草莓防禦性酵素苯丙胺 酸裂解酶活性之影響.....	83
圖十七、 幾丁寡糖可降低炭疽病菌在草莓葉片中誘導的 H_2O_2 累積.....	85



壹、前人研究



施用幾丁寡醣是未來解決草莓病害問題可行的策略之一，而臺灣草莓產業和天然安全資材等相關議題，對本研究來說，頗具參考價值。因此，以下將分為六節，依序討論：一、臺灣草莓栽培概況；二、臺灣草莓重要病害；三、草莓炭疽病、葉枯病和細菌性角斑病之防治；四、臺灣草莓病害常用之非化學農藥植物保護資材；五、應用幾丁寡醣於防治植物病害；六、幾丁寡醣誘導植物之防禦相關酵素。討論內容包括該議題目前的發展，以及在這些領域的研究成果中，對於應用幾丁寡醣防治草莓病害研究有所幫助之層面。

一、臺灣草莓栽培概況

目前的草莓栽培種 *Fragaria* × *ananassa* Duchesne 為原產於北美洲的野生種維吉尼亞草莓 (*F. virginiana*) 和原產於南美洲的智利草莓 (*F. chiloensis*) 之雜交後代，是薔薇科 (Rosaceae) 草莓屬 (*Fragaria*) 之多年生草本植物 (Hancock *et al.*, 2010)。根據 2019 年農業統計年報，臺灣草莓種植面積約 489 公頃，年產量達 8,743 公噸，但此產量無法滿足國內市場需求，一年仍需進口約 3,000 公噸的草莓。根據財政部關務署 2019 年統計資料顯示，由國外進口的草莓中有 734 公噸新鮮草莓、1,967 公噸冷凍草莓以及 245 公噸其他加工調製草莓產品等，臺灣草莓總進口量約為 2,946 公噸 (簡等，2021)。

在臺灣，草莓是花果菜類單位面積產值最高之作物，以苗栗縣為草莓主要生產縣市。因其交通便利、水源優異且暖濕合宜，生產面積占全臺栽種面積九成，其中又以苗栗縣的大湖鄉和獅潭鄉為主要栽培區域 (劉，1998)。

草莓最適生長溫度為 18 到 24°C 之間，低於 10°C 會發生寒害，高於 24°C 則不易開花。草莓是需要充足陽光的短日照作物，需種在給水充足且排水良好的微酸性土壤介質中，pH 值在 5.7 至 6.5 之間為佳 (鐘和潘，2018)。

早期因為豐香 (桃園一號) 香氣濃郁、含糖量高，風味深受消費者喜愛，為臺灣主要栽培品種。其株型較為塌平不通風，且隨著夏季氣溫逐年升高，加上頻繁降雨，豐香種苗因不耐熱以及病害嚴重發生，使得種苗繁殖遇到困境，在定植開始時，便出現種苗供應不足的問題。2016 年缺株達到高峰，當年豐香種苗缺株 400 萬株以上 (吳，2018)，因此開始有農民放棄「豐香」而轉種「香水」及其它品種。香水的風味雖較豐香品種淡，但其株型較為直立、通風性佳，且較為耐病；再加上開花期較豐香早、結果量較豐香多，且果實硬度較高而便於運輸，是近幾年來農民普遍栽種的品種。內湖一號，又稱天來或是蘋果草莓，口感較脆、果形大，帶有微酸風味；然而其掛果期長、轉色慢，市場占有率較低。至於戀香 (苗栗一號)，是豐香和適應產區氣候的種原「MLSBL」的雜交種，具備豐香與香水兩品種的優點，風味更佳、果實更大，但其果期較晚且耐病性仍未可知，目前正開放品種授權與技術轉移 (吳，2021)。

栽培管理方面，農民約在九月進行整地、調整土壤 pH 值、施基肥和做畦，十月施追肥、蓋塑膠布並定植；十一月長出第一期花和走莖，但為了防止養分流失必須除去走莖。約十二月第一期果成熟，此時果實大、產量少，所以價格較高；一月出現第二期花，而二月的第二期果是主產期，產量大、價格相對較低。三、四月會結第三和第四期果，當結到第四期果時，因為植株已經衰老、生長勢不再，加上天氣變熱，病蟲害防治不易，有些農民會選擇廢耕清園。草莓雖屬多年生草本作物，但由於難以克服臺灣夏季氣候，須以每年更新植株的方式栽培。四到七月是減少田中病蟲害的重要時期，可藉由進行休耕、綠肥或

是輪作，降低土壤中病原菌密度。最後進行浸水與排水，完成一期的草莓栽種(盧，2004；羅，2012)。

四到七月同時也是育苗業者開始育苗的時期，育苗實屬草莓栽培管理中最艱難的階段。正值夏季的臺灣，平地高溫多溼，不適合草莓生長，因此農民多至冷涼的高山進行育苗。一般臺灣經濟栽培的草莓園多是由農民自行挑選田間健康且性狀良好之草莓植株，作為當季草莓苗母株，進行走莖的繁殖。育苗時會將走莖假植於穴盤、穴植管或軟鉢中，根系長出後，即可剪斷走莖繁殖苗與母株間的連結走莖，待走莖繁殖苗茁壯便可作為日後定植於本田之種苗。然而，由於草莓育苗期長達六個月以上，且橫跨高溫多濕的夏季，植株生長勢弱且病害好發，造成種苗數量不夠或有潛伏感染情形，因而使得缺苗成為臺灣草莓產業嚴重的問題之一(盧，2004；鐘和潘，2018)。

近年來，具有潛伏感染特性的炭疽病和葉枯病與具有系統性傳播能力的萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 等草莓病害猖獗，在母株受感染的情況下，培育出之種苗有極大風險帶有病原菌，當定植於本田時若環境適合發病，便會出現冠腐死亡或生長不良的情形，造成農民嚴重損失(鐘，2016)。為了減少損失與缺株問題，應可從提高草莓品質並防止病害藉由種苗傳播等方向著手，因此政府致力於推動草莓種苗三級繁殖制度，並透過草莓種苗病害驗證作業，將無帶病原菌之健康草莓植株進行組織培養。培育出健康無毒的組織培養苗(G0)經馴化後便可作為原原種(G1)，用以繁殖原種(G2)及最後可用於本田定植的採種苗(G3)(曾和陳，2021)。其中，草莓病害驗證作業須知之檢定標的包括萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)、炭疽病菌(*Collectotricum* spp.)、根腐線蟲(*Pratylenchus* spp.)及草莓輕型黃邊病毒(Strawberry mild yellow edge virus, SMYEV)，以預防其後代在本田持續傳播潛

伏性或系統性病害。此外，行政院農業委員會苗栗區農業改良場更提供農民植株病害篩檢的服務，使農民得以使用健康母株育苗，降低育苗時期病害發生機率，在育苗期掌控田間病害發生狀況，即時汰除已被病原菌侵入之植株，減少人力成本支出（鐘，2016；曾和陳，2021）。

二、臺灣草莓重要病害

（一）、草莓炭疽病 (Anthracnose)

炭疽病是草莓重要的真菌性病害之一，其病原菌為炭疽刺盤孢菌屬 (*Colletotrichum*) 之真菌。根據植物保護資訊系統，草莓炭疽病可以由 *C. gloeosporioides*、*C. dematium*、*C. fragariae* 和 *C. acutatum* 所引起 (Chung *et al.*, 2019)。但透過對 2010-2018 年主要草莓產區採集到的菌株進一步探討其病原性、型態及多基因序列分析結果後，發現造成臺灣草莓炭疽病冠腐病徵最主要的病原菌是屬於 *C. gloeosporioides* species complex 中的 *C. siamense* (75%)，少部分可能由同屬於 *C. gloeosporioides* species complex 中的 *C. fructicola* (11%)、*C. karstii* (6%) 和 *C. boninense* (2%) 所造成 (Chung *et al.*, 2019；Chung *et al.*, 2020)。

炭疽病菌可以感染草莓植株的各個部位，草莓植株被炭疽病菌感染後，於葉部會形成黑色壞疽斑，葉柄及走莖在感染初期會形成黑色環斑，後期黑色斑點會擴大且略為凹陷，並產生粉橘色的分生孢子堆。當根冠部受到感染會形成冠腐，導致植株養分及水分吸收受阻，使得地上部逐漸黃化萎凋，整株植株終將會萎凋死亡。將冠腐植株根冠部切開可見剖面有褐化現象，是炭疽病菌所造成病徵中危害最嚴重的（吳等，2018；Chung *et al.*, 2020）。



炭疽病好發於高溫多濕的環境中，因此育苗期後期或是本田期初期，皆容易受到炭疽病菌的危害 (Howard *et al.*, 1992)。炭疽病菌可於葉片、果實、走莖或冠部等組織殘存，其分生孢子可藉雨水及風力傳播，亦可由帶病幼苗進行遠距離傳播 (鐘等，2012)。分生孢子會產生壓器 (Appressoria)，在植物組織表面潛伏感染 (latent infection)。潛伏感染時，宿主雖然不會出現病徵，需待環境適合或是宿主組織成熟時才會出現病徵，但此時仍然可以產生分生孢子，從而增加田間病原菌的密度 (吳等，2018；鐘和吳，2018a)。由於炭疽病菌會潛伏於種苗，再隨種苗傳播至本田，因此檢測炭疽病菌是否潛伏感染於植株中，可有效降低病原菌傳播。檢測的方法包括使用除草劑 (Paraquat) 或冷凍法殺死植物組織，以加速植物體內炭疽病菌生長，進而產生粉橘色分生孢子堆，以利判斷植株是否受炭疽病菌感染 (Mertely and Legard, 2004)。亦可藉由酒精將植株表面消毒，經 10-14 天觀察潛伏感染之炭疽病的分生孢子堆產生情形 (Ishikawa, 2004)。然而，更快速的偵測方法是透過臺灣草莓炭疽病菌的序列進行引子設計，開發巢式聚合酶連鎖反應技術 (Nested PCR)，除了具有高專一性與高靈敏度，整個檢測流程可在 1-2 天之內完成，符合快速檢測所需 (鐘等，2020)。

根據 Chung 等人自 2010 至 2016 年的調查，臺灣草莓在育苗期因炭疽病菌感染，造成 30-40% 的幼苗因冠腐死亡；定植到本田後，則有 20% 的植株因冠腐而死亡，農民因而需大量補植，使得種植成本隨之升高 (Chung *et al.*, 2019)。

(二)、草莓萎凋病 (*Fusarium wilt*)

根據安氏等人 (2012) 的報導，臺灣苗栗縣大湖和獅潭鄉及其他草莓栽種地區，於 2010 年起陸續發現萎凋病之危害。本病害由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 所引起，具寄主專一性。鐮孢菌 (*Fusarium* spp.) 是廣泛存在於自然界的真菌，其中以 *Fusarium oxysporum* 引起的病害最為嚴重，可以感染上百種植物 (Smith, 2007)。

草莓萎凋病屬於土壤傳播性病害，田間的病原菌也可利用厚膜孢子在土壤及植物殘體中殘存多年，作為 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 的初級感染源，待草莓植株種植後，可從根尖或傷口侵入植物組織並經由維管束進行系統性感染 (陳等，2017)。若農民不慎以罹病母株繁殖走莖苗，萎凋病菌可經由走莖傳播並感染子代。萎凋病於植株罹病初期病徵不明顯，其外觀與健康植株無異，但遇高溫時病徵便慢慢顯現。因此在育苗後期至定植初期，感病植株會因導管被定植的菌絲、小分生孢子和植物防禦物質 (如：tyloses 和 gels) 堵塞，出現水分運輸不良的情況 (Garces-Fiallos *et al.*, 2017)，之後新葉出現半側萎凋，一片葉的三片複葉大小不一致，因而被農民稱之為「大小葉」或「歪耳朵」。而隨病勢逐漸嚴重，會發生植株矮化和下位葉黃化，甚至全株萎凋枯死。由於此病害病程發展緩慢，直到第一期花才出現枯萎，早已錯過最佳補植時機。以 2015 年為例，若發生萎凋病比例達 70%，則每公頃單是補植的損失即達 45 萬元，對農民來說是一大生產成本負擔 (姚，2014；陳等，2017；鐘和吳，2018b)。

(三)、草莓白粉病 (Powdery mildew)

草莓白粉病是由 *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae* 所引起，為絕對寄生菌，是全球草莓栽培地區普遍發生的病害。臺灣於 1985 年首次在苗栗縣大湖鄉發現白粉病的危害，隔年有擴大、蔓延且更為嚴重的趨勢 (彭等，2013)。

白粉病好發於低溫低濕的環境中，在臺灣低海拔地區夏季氣溫高，白粉病菌無法越夏，但高海拔區長期低溫，則一年四季皆可發病。其分生孢子透過風、氣流進行傳播，於 15-25°C 下均可發芽，而 20°C 為最佳發芽溫度 (Paulus, 1990)。白粉病可危害草莓葉片、花萼、花瓣以及各時期的果實 (Nelson, 1996)。葉片初期出現圓形病斑，後期會於病斑處出現白色粉狀物。當花器受感染時，無法正常結果，幼果受感染會硬化且無法順利轉色，成熟果受感染則會腐爛，嚴重影響收成及商品價值 (鐘等，2012)。

(四)、 草莓灰黴病 (Gray mold)

草莓灰黴病由 *Botrytis cinerea* 所引起，由於此病原菌寄主範圍廣，且腐生能力強，可以在多種植物殘體上存活，待環境適合，短時間內便能產生大量分生孢子。草莓灰黴病好發於低溫高濕的季節，可藉由風與雨水傳播，降雨日數越多，灰黴病越發嚴重。在臺灣，此病多發生在 12 月至隔年 2-3 月的下雨天，高海拔區發病則可以持續到 4-5 月 (鐘等，2012)。

草莓灰黴病可危害植株葉、莖、花器及果實，其中，果實及果柄受危害對農民造成經濟損失較大。果實受感染時，先出現水浸狀淡褐色病斑，之後逐漸轉為暗褐色，感染後期使組織軟腐、香味盡失，嚴重影響產量與商品價值。若種植環境濕度較高，感染部位則容易產生灰色的黴狀物，為灰黴病菌之分生孢子，將成為二次感染源，藉由風雨再次傳播，危害作物 (李，2005)。

(五)、 草莓青枯病 (Bacterial wilt)

由 *Ralstonia solanacearum* race 1 所引起的青枯病，又稱細菌性萎凋病。臺灣在 1983 年首次於苗栗縣大湖鄉發現青枯病之蹤跡，當時草莓植株在幼苗

期時大規模受感染而死亡。經研究後發現，農民將已感染青枯病之植株作為繁殖母株，病原菌透過母株的維管束經由走莖垂直感染子代，帶病走莖苗定植於田間後遇高溫高濕的環境，便開始出現失水萎凋的現象，最終全株枯萎死亡，造成農民的補植成本增加（許，1984）。

與萎凋病相同，青枯病亦是土壤傳播性病害，除了可藉由走莖苗進行長距離的傳播外，亦可透過灌溉水散佈到其他田區。病原菌由根部傷口侵入植物，繼而進入維管束，並在其中生長造成維管束阻塞。由於水分運輸受阻，首先由下位葉開始萎凋，葉柄下垂，數日後整株枯死，若切開病株之根冠部可發現內部組織褐化，泡入水中則有乳白色的菌泥流出（鐘等，2012）。

所幸，國內發展出利用走莖檢測草莓青枯病菌的方法，藉由 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 選擇性培養基篩檢走莖，供農民在於育苗前先行篩選，盡早移除帶病親株，減少田間的帶病走莖苗數，也大幅降低田中的病原菌密度，而使青枯病之發生機率逐年下降，甚至至今已不見蹤跡（彭，2002）。

(六)、 草莓葉枯病 (Leaf blight)

近 2-3 年草莓產業的栽培品種由對炭疽病感病的豐香品種轉為較為耐病的香水品種，此品種育苗容易且產量高，目前在苗栗等重要草莓栽種區佔 90% 以上。但近年發現香水品種對於真菌性病原菌 *Neopestalotiopsis rosae* 相當感病（鐘和吳，2020；Wu *et al.*, 2021b），而豐香則屬於抗病品種（徐等，2020）。

N. rosae 可危害草莓植株的葉片、葉柄、走蔓、冠部、根系及果實，葉片受感染初期為圓形褐色壞疽病斑並隨水蔓延造成葉枯徵狀，葉片病斑後期出現黑色環狀柄子殼。走莖受感染而出現的褐色病斑會略顯凹陷。若感染冠部則會

使之褐化；新葉生長不良且老葉葉色轉紫至紫紅色，後期葉片出現焦枯現象。此外，幼果及成熟果受到感染都會出現褐色壞死狀 (鐘和吳，2020；Wu *et al.*, 2021b)。

此病原菌與炭疽病菌之傳播方式類似，可以藉由風雨傳播。經行政院農業委員會苗栗區農業改良場以酒精法測試，有一定的比例可以發現此病原菌，由此推測草莓葉枯病有可能也具有潛伏感染特性，並可藉由種苗帶菌傳播 (鐘和吳，2020)。

(七)、草莓細菌性角斑病 (Bacterial angular leaf spot)

草莓細菌性角斑病是由 *Xanthomonas fragariae* 所引起的細菌性病害，與 *N. rosae* 造成的葉枯病均是這幾年因品種更換才出現的新興病害。自 2017 年起，在豐香及香水品種的草莓植株上均可觀察到此病害，顯示此病對於品種無偏好性 (Wu *et al.*, 2021a)。

初期受細菌性角斑病感染的植株，植株葉背可見被葉脈局限而呈角狀且透化的水浸病斑，後期於葉表出現紅褐色不規則且融合的病斑。在潮濕的環境下，則可見葉片病斑處滲出具有黏性的細菌滲出液 (Wu *et al.*, 2021a)。

細菌性角斑病初次感染源可以藉由受污染的器具、材料、動物、人類的衣物、植株及水源傳播，再透過雨水噴濺進行二次感染，亦有研究指出可能會藉由 aerosolized inoculum 傳播 (van der Wolf *et al.*, 2018)。此病最常在冬季至初春之際並以噴灌系統澆水的草莓園中發現，尤其以迎風側及河邊等濕度高處更為嚴重 (van der Wolf *et al.*, 2018；Wu *et al.*, 2021a)。細菌性角斑病菌亦可進入維管束導致系統性感染，並經由走莖傳播給子代 (Bestfleisch *et al.*, 2015)。

三、草莓炭疽病、葉枯病和細菌性角斑病之防治



(一)、草莓炭疽病之防治

無論是育苗期或是本田期，炭疽病都是近 10 年來草莓的頭號殺手，尤其在高溫高濕的夏季，炭疽病容易造成植株整株枯萎死亡，更是使農民措手不及 (鐘和吳，2018a)。美國的佛羅里達州，炭疽病可以造成育苗圃 80% 的幼苗死亡，田間產量的損失更是可以高達 50% (Howard *et al.*, 1992)；在臺灣，有 50% 以上的草莓植株有典型炭疽病冠腐的徵狀，育苗期約有 30-40% 的植株因為冠腐死亡，而移植到本田後又有約 20% 的植株因炭疽病損失 (Chung *et al.*, 2020)。

根據農業試驗單位所整合的草莓炭疽病有害生物整合管理 (Integrated pest management, IPM) 策略中，在耕作防治方面，首先可選擇耐病之品種 (如：香水) 種植，並使用組織培養苗或健康無病徵的植株作為母株進行種苗繁殖。避免炭疽病菌透過雨水噴濺或走莖垂直感染子代，造成育苗期時遭遇夏季高溫而冠腐死亡。也可透過篩檢技術，提早汰換帶病植株，及早進行補植並減少其傳播的可能性。由於炭疽病菌產生之分生孢子可以藉由風雨傳播，給水方式由傳統噴灌改為滴灌，可以降低 50-86% 的植株損失 (鐘和吳，2018a)。在肥培管理方面，有文獻指出炭疽病的發生與氮肥的過度施用有正相關，因此不應偏用氮肥 (鐘等，2013)。此外，也需要避免過度密植，保持通風，再搭配即時清除罹病葉，保持田間衛生，便可以從栽培管理上大幅減少此病害的發生。

在物理防治方面，若為戶外種植，在植株上方加設黑色遮陽布，除了遮蔭有助於降溫外，亦會避免雨水造成的孢子噴濺 (鐘和吳，2020)。另外，有研究指出澆灌枯草桿菌或木黴菌有助於增加草莓果實重量、可溶性固形物含量及糖

酸比，對於草莓炭疽病也有防治效果，可提供有機栽培之草莓園作為生物防治施用（張等，2014）。

化學防治法仍是目前被廣泛認為能速效的主流防治方法，但施用時機會影響藥劑之效果。一般建議在發現田間有炭疽病病斑出現時，需盡快去除罹病組織，並在 24 小時內噴施化學藥劑，以降低病原菌侵入摘除病葉時所造成之傷口的可能性。根據行政院農業委員會動植物防疫檢疫局所管理之農藥資訊服務網（2021）上的資訊，在病害發生初期，即葉片出現病斑時進行施藥，可施以稀釋 3,000 倍的 23.6% 百克敏水懸劑、稀釋 3,000 倍的 24.9% 待克利水懸劑、稀釋 2,000 倍的 25% 普克利乳劑或稀釋 3,000 倍的 43.7% 三氟敏水懸劑等藥劑，依推薦施用方式使用，必要時隔 7 天施用一次。

（二）、草莓葉枯病之防治

近 10 年來，*Neopestalotiopsis* spp. 對草莓造成葉枯、冠腐、根腐及果腐等徵狀，已經在墨西哥 (Rebollar-Alviter, 2020)、中國 (Wen, 2019；Sun *et al.*, 2021)、伊朗 (Ayoubi, 2016)、印度 (Amrutha, 2018)、阿根廷 (Obregón, 2018) 及美國 (Wyenandt, 2020) 等國揭露。舉例而言，根據 Rebollar-Alviter 等人 2020 年的報導，墨西哥在 2017 年因為 *Neopestalotiopsis rosae* 造成草莓冠腐，使當地草莓栽培區有 50% 的損失；2020 年秋天美國紐澤西州的草莓栽培區也因此病造成高達 50% 的植株死亡 (Wyenandt, 2020)；臺灣在 2018 年開始在苗栗、南投、新竹、桃園、台北及嘉義等地發現疑似葉枯病的病徵，在 2019 至 2020 年時，此病害又更趨嚴重，植株移植到本田後，更是造成高達 30% 的植株損失 (Wu *et al.*, 2021b)。

N. rosae 具有潛伏感染特性，栽種時使用健康種苗，避免將病原菌帶入本田中，也可以種植較為抗病的品種（如：豐香品種）取代感病的香水品種（徐等，2020；鐘和吳，2020）。由於其分生孢子可以藉由風雨傳播，學者建議可以加設遮雨棚，避免雨水使病害散播更遠。當溫度低於 25°C，連續下雨且相對濕度高於 80%，將會使葉枯病造成的果腐及葉片病徵更為嚴重（Embaby, 2007）。雖然臺灣尚未有在草莓葉枯病上的推薦用藥，但徐等（2020）指出，以培養基添加藥劑測定葉枯病菌菌絲生長抑制防治效果的試驗中，稀釋 3,000 倍的 25% 撲克拉乳劑、稀釋 1,500 倍的 25.9% 得克利水基乳劑、稀釋 1,000 倍的 75 g/L 依普座乳劑、稀釋 1,500 倍的 39.5% 扶吉胺水懸劑、稀釋 400 倍的 80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑及稀釋 1,500 倍的 62.5% 賽普護汰寧水分散性粒劑等在推薦稀釋倍數下，有較佳的抑制效果，抑制率均達 90% 以上。其中，賽普護汰寧為草莓灰黴病之推薦藥劑，或許未來可作為草莓葉枯病之防治推薦用藥參考。此外，根據行政院農業委員會苗栗區農業改良場以草莓炭疽病推薦藥劑進行草莓葉枯病菌菌絲的抑制試驗效果發現，有些草莓炭疽病的推薦藥劑（如：腐絕快得寧、待克利、百克敏等）及草莓灰黴病的推薦藥劑（如：賽普護汰寧和依普同）可以抑制葉枯病菌菌絲生長，因此使用炭疽病及灰黴病推薦用藥防治炭疽病與灰黴病的同時，可能可以兼防葉枯病（吳等，2021）。而就在 2021 年 6 月 17 日行政院農業委員會公告草莓葉枯病的緊急防治用藥，在病害發生初期，即葉片出現病斑時進行施藥，可施以稀釋 1,200 倍的 53% 腐絕快得寧可溼性粉劑、稀釋 3,000 倍的 24.9% 待克利水懸劑、稀釋 3,000 倍的 23.6% 百克敏水懸劑、稀釋 2,000 倍的 25% 普克利乳劑或稀釋 2,000 倍的 62.5% 賽普護汰寧水分散性粒劑等藥劑，依建議施用方式使用，必要時隔 7 天施用一次。

(三)、 草莓細菌性角斑病之防治

在臺灣，雖然草莓細菌性角斑病所造成的產量損失尚無統計資料，但根據文獻，此病可以造成 8-80% 的產量損失 (Epstein, 1966 ; Roberts *et al.*, 1997)。此病原菌 (*X. fragariae*) 可進入維管束造成系統性感染，可能會以無病徵的病苗傳播，因此，使用無帶病之種苗是主要的管理方法 (Roberts *et al.*, 1996 ; Gillings *et al.*, 1998)。在歐洲，此病原菌屬於 A2 級檢疫病原菌，因此會在海關檢疫時遭到攔截，以避免病株移入境內 (Schmitz *et al.*, 1992)。

若病株已進到田中，小範圍尚可根除，但若範圍擴大便難以防治。細菌性病害雖然可以使用銅劑或抗生素進行防治，但在草莓細菌性角斑病防治上並沒有推薦藥劑可以使用。再者，以銅劑或抗生素防治都有其缺點，銅劑與酸性藥劑混合時容易發生藥害 (黃, 2008)；抗生素或誘導植物產生系統性抗性的物質 (如水楊酸類似物)，雖然經實驗證明對於細菌性角斑病有防治效果，但目前未廣泛被登記為可用資材 (Roberts *et al.*, 1997 ; Braun and Hildebrand, 2013)。而若以 56°C 熱水處理苗株 15 分鐘，或以 52°C 熱水處理 60 分鐘，雖然都可以達到完全滅菌，但此兩種處理方法的時間和溫度卻也會對植株造成傷害 (Turechek and Peres, 2009)。有研究發現，乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 對於草莓細菌性角斑病具抑制效果，可作為生物製劑施用 (Daranas *et al.*, 2019)。不過，就目前臺灣而言，尚無任何化學或生物製劑可用於防治細菌性角斑病，只能盡量減少將病株帶入田區及即時拔除病葉，以降低病害發生機率 (van der Wolf *et al.*, 2018)。

四、 臺灣草莓病害常用之非化學農藥植物保護資材

雖然針對不同的草莓病害已建立可行的 IPM 策略，但農民仍主要依賴化學藥劑進行病害管理。根據美國環境工作組織 (Environmental Working Group) 於 2021 年最新報告，草莓連續 5 年拿下「Dirty Dozen」蔬果的冠軍，化學農藥殘留問題層出不窮。因應消費者食品安全意識抬頭與對環境保護議題的重視，開發更多友善人體及環境的策略以減少化學農藥使用日趨重要，其中非化學農藥植物保護資材的使用便提供給農民另一個安全且有效的選擇。

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 (2018) 公告的非化學農藥植物保護資材是指已登記之化學合成農藥以外的植物保護資材，包括免登記植物保護資材、有機農業商品化資材等其他資材。其中，銅劑、石灰硫磺合劑、碳酸氫鉀、礦物油與拮抗微生物等常用於草莓栽培中，以下將進一步介紹。

(一)、銅劑

由硫酸銅、生石灰及水混合而成的波爾多液，藉由緩慢釋放的銅離子進入病原菌體內。當銅離子與酵素上的氫硫基 (-SH) 作用，將凝固菌絲細胞膜的蛋白質和破壞胞內酵素活性，導致蛋白質及酵素變性，使病原菌死亡，發揮廣效性的殺菌作用。銅劑屬於非專一性蛋白質變性劑，病原菌不易產生抗藥性，可以防治草莓白粉病、炭疽病、灰黴病及果腐病等。不過，波爾多液殘效性長、黏性極強，附著在植物體上不易被雨水沖刷，對於觀光草莓園來說可能影響其賣相 (朱和鐘，2013；莊，2019)。而同屬銅劑、推薦使用於防治草莓果腐病的鹼性氯氧化銅，其作用機制與波爾多液相同，須避免與石灰硫磺、礦物油及有機砷混合使用 (李，2009)。

(二)、石灰硫磺合劑

石灰硫磺合劑早在 1800 年代就被人類用於防治葡萄白粉病，由生石灰、硫磺及水依比例煮製而成，主要成分為多硫化鈣 (CaS)，呈鹼性 (王，2010)。施用石灰硫磺合劑會在植株表面留下多硫化鈣，和氧氣及二氧化碳作用形成硫磺顆粒，其氣化產生的硫蒸氣 (H₂S)，為毒性氣體，可以作為 decoupler 抑制粒線體電子傳遞鏈中 cytochrome oxidase 的作用，干擾病原菌或害蟲呼吸作用，而引起毒殺作用 (Andreazza *et al.*, 2018)，防治對象除了草莓白粉病和炭疽病之外，對二點葉蟎和薊馬等害蟲亦有效。須避開高溫時施用，且由於製劑為鹼性，若使用濃度不當，容易造成幼嫩組織被燒傷或藥害情形發生 (朱和鐘，2013；Robinson, 1924)。

(三)、碳酸氫鉀

對人體無害且對環境衝擊小的碳酸氫鉀，屬於接觸性資材，被推薦使用在多種作物的白粉病防治上，具有去除葉面上的白粉病病斑之效果。作用機制是藉由抑制真菌病原菌分泌酵素、或直接毒害細胞質的方式，毒殺病原菌孢子。在烈日下使用碳酸氫鉀，或稀釋劑量不當都容易使葉片出現藥害的灼燒斑。每 7 天施用一次，連續使用 3 次預防病害之成效較為穩定，輔以使用展著劑或礦物油可以提升效果 (林等，2004；Wenneker and Kanne, 2010)。

(四)、礦物油

礦物油可用於防治草莓白粉病，作用機制除了藉由噴施後在植物表面產生物理屏障，干擾病原菌附著於植物體上，也可以防止真菌孢子的發芽及入侵。此外，礦物油也是一種窒息劑，透過抑制真菌的呼吸作用，造成病原真菌死亡；也會阻塞昆蟲的氣孔，阻礙其氧氣吸收，進而達到防治害蟲的功效。當礦物油滲入植物體後，有可能會影響植物的光合作用、呼吸作用及蒸散作用，因此夏

季時不宜施用，容易有藥害產生，長時間施用甚至會有嫩芽萎凋，甚至延遲生長情形發生（莊和吳，2005；Wojdyla, 2012）。



(五)、拮抗微生物

所謂拮抗微生物係指能藉由產生抗生素、競爭營養、空間或感染點、超寄生病原菌菌絲或分泌細胞壁分解酵素等機制以抑制病原菌生長的微生物。因此施用拮抗微生物有抑制病害的功效，可減少草莓植株的罹病率。有研究指出枯草桿菌、木黴菌對於草莓炭疽病有防治效果（朱和鐘，2013；張等，2014）。根據農藥資訊服務網（2021），液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1、液化澱粉芽孢桿菌 CL3 和貝萊斯芽孢桿菌 BF 可用來防治灰黴病，蓋棘木黴菌 ICC080/012 則可用來防治草莓疫病。

五、幾丁寡糖於植物病害防治上之應用

(一)、幾丁質、幾丁聚糖與幾丁寡糖

幾丁質 (Chitin) 是自然界中含量僅次於纖維素的天然生物聚合物，主要存在於甲殼類外殼、節肢動物的外骨骼、軟體動物的外殼和內骨骼（如：烏賊的軟骨），以及真菌的細胞壁中（陳，2003；吳和黃，2010）。商業用途的幾丁質主要由漁業廢棄物中的甲殼類外殼所提煉，以幾丁質去乙酰基酶 (Chitin deacetylase) 降解，經過 70% 以上的 N 端去乙酰化作用後，會生成幾丁質衍生物，即為以 β -1,4-linked D-glucosamine 組成的幾丁聚糖 (Chitosan) 與少部分以 N-acetyl-D-glucosamine 組成的 chitin oligosaccharides。高分子的幾丁聚糖再經幾丁聚糖酶 (Chitosanase) 降解後，會得到以 D-glucosamine 為單位且分子較小（分子量少於 5000 Dalton）的幾丁寡糖 (Chitosan oligosaccharide,

COS；又稱為 Chitooligosaccharide) (Kim and Rajapakse, 2005；Jung and Park, 2014)。不同於幾丁聚醣需要酸性溶液助溶，幾丁寡醣可以直接均勻分散於水溶液中，而溶液 pH 值呈中性 (Guo *et al.*, 2018；Bakshi *et al.*, 2020)。

幾丁寡醣的理化特性與幾丁聚醣和幾丁質十分相似，除了無毒特性外 (Hernández-Téllez *et al.*, 2016)，更以其生物相容性、生物降解性和生物活性著稱 (Naveed *et al.*, 2019)。在醫學上，幾丁聚醣被用作錠劑中活性成分的穩定劑，並在減肥食品中廣受歡迎 (Romanazzi *et al.*, 2018)；此外，相較於幾丁聚醣，幾丁寡醣可以提供藥物以更高的效率進入腸壁及細胞間移轉 (Naveed *et al.*, 2019)。農業上，由於幾丁聚醣毒性低，是第一種歐盟批准可用於有機農業和有害生物綜合管理的植物保護資材 (Romanazzi *et al.*, 2018)。幾丁聚醣可以用來延緩果實成熟 (Ali *et al.*, 2010)、在果實表面形成半透膜來延長儲架壽命 (Chong *et al.*, 2015) 及利用其抗真菌活性以抑制真菌造成的果實腐爛 (Meng *et al.*, 2010) 等。因為幾丁寡醣在溶液中的分散性較幾丁聚醣更佳，更容易完全溶解於中性溶液中，所以生理生化活性較為明顯 (Lin *et al.*, 2005)。根據 Lin 等人 (2005) 的研究發現，低分子量的幾丁寡醣對於抵抗病原菌入侵的效果比高分子量的幾丁聚醣佳。草莓由苗期開始，以幾丁寡醣處理，其果實硬度、維生素 C、總含糖量、總可溶性固形物和可滴定的酸度含量增加，果實品質提升 (He *et al.*, 2018)。農民在使用幾丁寡醣時不需要以酸性溶液助溶，使用上更為方便。

(二)、幾丁聚醣與幾丁寡醣具防治病害潛力

根據前人的文獻，幾丁聚醣對木瓜、芒果和柑橘的炭疽病有防治效果，其抑菌作用有助於延長這些果實的儲藏時間 (Bautista-Baños *et al.*, 2003；Zhu *et*

al., 2008 ; Zhou *et al.*, 2016)。在接種白粉病菌後第 9 天，即有 30% 的植株有 90% 的葉面被白粉病覆蓋，而噴施幾丁聚醣的處理組則在接種後第 30 天才達到此病害嚴重程度 (Lowe *et al.*, 2012)，顯示幾丁聚醣具有防治草莓白粉病的潛力。

由於幾丁寡醣可誘導作物提高防禦酵素之活性，施用於水稻葉片上可有效預防水稻白葉枯病嚴重發病 (Ma *et al.*, 2019)，也可以提高水稻對南方水稻黑條矮縮病毒 (Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) 的抗性 (Yang *et al.*, 2017)，對於油菜的菌核病和黃瓜的灰黴病亦有顯著的抑菌和誘導抗性效果 (Ben-Shalom *et al.*, 2003 ; Yin *et al.*, 2013)。由此可見，幾丁寡醣具有防治作物病害的潛力。

(三)、幾丁寡醣具抑菌效果

在結構上，相較於 N 端乙醯基葡萄糖胺聚合物的幾丁質，幾丁聚醣及幾丁寡醣因其 N 端去乙醯化程度高，具有更多可被質子化的胺基。在溶於水後， $-NH_2$ 轉化為質子化形式 $-NH_3^+$ ，使幾丁聚醣與幾丁寡醣表面帶正電荷 (Xing *et al.*, 2015 ; Naveed *et al.*, 2019)。由於革蘭氏陽性菌的細胞壁含有厚肽聚醣層，其中的磷脂質基團帶有負電荷，革蘭氏陰性菌的脂多醣也會使其表面帶負電荷，而真菌的細胞膜和病毒的外套膜亦具有帶負電荷的蛋白質或醣蛋白。因此，當帶正電荷的幾丁聚醣或幾丁寡醣分子與病原菌表面接觸時，便會產生靜電交互作用，使病原菌細胞表面發生變化，細胞膜通透性增加，導致細胞內物質滲漏，最後造成細胞死亡 (Xing *et al.*, 2015 ; Chandrasekaran *et al.*, 2020)。此外，也有文獻證明，低分子量的幾丁寡醣可以進到病原菌的細胞中，與其 DNA 結合，

同時抑制其複製、mRNA 合成，進而達到抑菌效果 (Goy *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2017)。



六、幾丁寡糖可誘導植物防禦系統

長期以來，植物演化出不同的防禦機制，抵禦病原菌入侵或昆蟲取食等逆境，以減少外在環境帶來的傷害。植物藉由先天的 constitutive (continuous) defenses 形成物理防禦屏障，如：細胞壁、蠟質層和木質化表皮等，不僅可以減少外來物的入侵，亦可增加植物的韌性。除了預先形成的屏障外，幾乎所有活的植物細胞都可以感測病原菌入侵，並引起 inducible defenses，誘導植物產生毒化物、病原菌水解酶和細胞程序性死亡 (Freeman and Beattie, 2008)。植物細胞表面上的模式識別受體 (Pattern recognition receptor, PRRs) 為感測病原相關分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的蛋白質，當 PPRs 識別到細菌之鞭毛、肽聚糖、真菌細胞壁的成分或病毒核酸等 PAMPs 時，會刺激絲裂原活化蛋白激酶路徑 (Mitogen-activated protein kinase cascade, MAPK cascade)，將信號由細胞表面傳遞至細胞內部，接著啟動抗病反應，如：活性氧物質在植體內的累積、植物激素的生合成、防禦相關基因及酵素表現增加等，幫助植物抵抗病原菌 (Pitzschk *et al.*, 2009 ; Cheong and Kim, 2010)。

幾丁質是真菌性病原菌細胞壁的組成成分，早在 1995 年時已證實其可作為 general elicitor，誘發植物的免疫反應 (Boller, 1995)。受到病原性真菌感染時，植物細胞會誘導幾丁質降解酵素累積於感染點，藉由降解病原真菌細胞壁抑制其生長。降解過程中釋放的幾丁質降解產物，包括幾丁聚糖與幾丁寡糖 (合稱幾丁糖類 Chitooligosaccharides)，也可以觸發植物防禦反應，使植物產生大量防禦相關酵素及抗菌物質，如幾丁酵素 (Chitinase)、 β -1,3 葡萄聚糖水解

酵素 (β -1,3-glucanase)、豌豆素 (Pisatin)、幾丁聚醣酵素、蛋白酵素 (Proteinase)、酚類化合物 (phenolic compounds)、木質素類物質 (lignin-like material) 及植物防禦素 (phytoalexins) 等，從而提高植物抗病性 (葉，2010；朱，2018；Zeng *et al.*, 2010)。幾丁醣類誘導的植物防禦系統是透過 NO 和 H_2O_2 訊息途徑所觸發，且依幾丁醣類基本構造、濃度、植物種類和植物生長階段的不同，而有所不同 (Lin *et al.*, 2005；Pichyangkura *et al.*, 2015)。

誘導植物產生抗性是有效控制病害的非化學策略之一，藉由防禦反應基因所編碼的病程相關 (Pathogenesis-related, PR) 蛋白，加以誘導出防禦相關酵素，進而啟動防禦機制 (Prasannath, 2017)。苯丙胺酸裂解酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是常見之防禦相關酵素，為植物體內 phenylpropanoid 代謝路徑中的第一個反應酵素。可以催化苯丙胺酸 (phenylalanine)，使其行脫氨反應成肉桂酸 (trans-cinnamic acid) 和氨，以促使植物二級代謝產物及大量 phenylpropanoids 衍生物合成，包括可增強植物細胞壁の木質素 (lignin)、黃酮素 (flavonoid)、植物荷爾蒙與植物防禦素等，進而提升植物抗性 (Xing *et al.*, 2015)。

植物受到生物或非生物逆境時，會代謝出活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS)，主要的種類包含：單一態氧 1O_2 (Singlet oxygen)、超氧化自由基 $O_2^- \cdot$ (Superoxide anion radical)、過氧化氫 H_2O_2 (Hydrogen peroxide) 與氫氧自由基 $\cdot OH$ (Hydroxyl radical) 等，其活性極強且極易破壞細胞組織。當 ROS 產生過多時，此氧化壓力會啟動植物的抗氧化系統，植物會誘導抗氧化酶活性增加以減少活性氧化物累積，避免植物受到過度傷害 (Huang *et al.*, 2019)。過氧化酶 (Peroxidase, POD) 是常見之抗氧化酵素之一，廣泛存在於高等植物中，與植物代謝及抗逆境反應有關 (王等，2010；蔣，2011)。POD 以 H_2O_2 作為

電子受體，還原成 H_2O ，進而氧化其他酚類物質 (Bindoli and Rigobello, 2013)。超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 使 O_2^- 和 H^+ 催化為 H_2O_2 和 O_2 ，過氧化氫酶 (Catalase, CAT) 則催化 H_2O_2 為 H_2O 和 O_2 。有研究顯示，當幾丁寡糖施用於茶樹上時，超氧化物歧化酶和過氧化氫酶的活性都會顯著增加 (Chandra *et al.*, 2015)。先前的研究發現炭疽病菌 *C. fragaria* 感染草莓後，會造成 PAL 以及 SOD、POD、CAT 等抗氧化酵素活性的上升，可能是與草莓抗炭疽病的能力有關 (Fang *et al.*, 2012)。

幾丁寡糖可以作為外源性激發子 (Exogenous elicitor) 誘發植物產生抗病反應。水稻施用幾丁寡糖並接種上 *Fusarium oxysporum* 後，與未施幾丁寡糖對照組相比，防禦相關酵素 PAL 和抗氧化酵素 POD、SOD 與 CAT 之活性顯著增加 (Ma *et al.*, 2019)。亦有研究發現於水稻上施用幾丁寡糖可以誘導抗氧化酵素 POD、SOD 與 CAT 的活性，以提高水稻抗南方水稻黑條矮縮病毒之能力 (Yang *et al.*, 2017)。另外，收集噴施幾丁聚糖奈米顆粒或幾丁聚糖且接種 *Rhizoctonia solani* 0、24、48 和 72 小時後的水稻葉片，不論是施用幾丁聚糖奈米顆粒或幾丁聚糖，兩處理的 POD 和 PAL 在接種後 72 小時，活性都有明顯的增加 (Divya *et al.*, 2020)。Jogaiah 等人 (2020) 比較了噴施幾丁聚糖於胡瓜並接種白粉病前後的酵素活性，PAL 和 POD 在 0-72 小時之間所增加的活性明顯比多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 和聚葡萄糖酶 (Glucanase, GLU) 高。此外，接種後的酵素活性又比接種前增加要多。番茄施用幾丁聚糖或幾丁聚糖奈米顆粒，再接種 *Fusarium andiyazi* 後，兩處理的抗氧化酶 SOD 和 CAT 的基因皆在 48 小時有明顯上調 (Chun *et al.*, 2019)。總而言之，PAL、POD、SOD 和 CAT 是參與幾丁寡糖誘導植物防禦反應的重要酵素。

貳、研究動機



草莓為薔薇科、草莓屬之多年生草本植物，是臺灣花果菜類單位面積產值最高之作物。無論是鮮果運銷，抑或是觀光草莓園，所帶來的經濟效益皆不可小覷，年產值超過 18 億元，苗栗縣為草莓主要生產縣市。臺灣農民種植的草莓品種有香水、豐香和天來等，其中以產量高、結果期早且育苗較為容易的香水為近兩三年農民廣為種植的品種，種植面積高達 7 成以上。

草莓雖屬多年生溫帶草本植物，但臺灣夏季高溫多濕的氣候使草莓植株不易越夏，農民遂多採每年更換新株的方式栽培，因此每年均有至少 2400 萬株種苗的需求。近年來由於全球暖化，再加上不當的肥料施用，使得草莓炭疽病嚴重危害育苗時期，即便是種植較為耐炭疽病的香水品種，仍不敵好發於高溫高濕的炭疽病。炭疽病除了可以危害草莓葉片、走莖、果實及根冠外，其分生孢子可以作為二次感染源，隨風雨散播感染田間其他健康植株。此外，炭疽病具有潛伏感染的特性，帶病植株移入本田後，若氣候環境合適，亦會顯現病徵，最終造成植株枯萎死亡而增加了農民的補植成本。

除了炭疽病的危害外，近年來草莓產業出現了棘手的新興病害——草莓細菌性角斑病及草莓葉枯病。細菌性角斑病並沒有品種的偏好性，造成植株葉背角狀且透化的水浸病斑，後期會出現紅褐色不規則且融合的病斑。葉枯病會造成植株葉枯、冠腐、根腐及果腐等徵狀。葉枯病除了感染幼苗，移入本田則有更為嚴重的狀況，可以造成高達 30% 的損失，甚至有年復一年日趨嚴重的趨勢，是現今草莓產業急需解決的病害問題。目前農民種植最多的香水品種即是葉枯病的感病品種，而過去非常受歡迎的豐香品種則抗葉枯病。

目前普遍認為解決病害問題快速且主流的方式是施用化學藥劑，但長期施用殺菌劑除了會使病原菌產生抗藥性，造成殺菌劑失去效用的疑慮，可能因此徒增農民種植成本外，若施用不當亦會對生態環境及食品安全問題（例如：農藥殘留問題）造成威脅。隨著消費者對環境保護與食安問題日趨重視，化學農藥減量已然成為大眾普遍關注的議題。

即便針對草莓炭疽病有推薦藥劑可以使用，且有些藥劑（如：待克力、百克敏和腐絕快得寧）可兼防葉枯病，但有機可用、安全性較佳的防治資材至今仍頗為欠缺。經由文獻搜索發現，雖然有關幾丁質與幾丁聚醣的研究資料較多，但同樣對環境及人體無害的幾丁寡醣，相較於幾丁質與幾丁聚醣，其生理活性更佳且使用上更為便利。幾丁寡醣亦能用於防治作物病害，或許對於目前影響草莓產業的幾個重要病害也有防治的效果。因此，本研究的目的即欲探討施用幾丁寡醣是否能有效提升香水品種草莓對抗炭疽病、葉枯病與細菌性角斑病之能力，並評估幾丁寡醣防治病害的最低有效濃度及有效誘導抗性之時間。另外，利用測定抗氧化酵素與相關防禦酵素，初步探討其可能的抗病機制。希望未來能將幾丁寡醣應用於田間草莓栽培管理上，提供農民更多友善環境與人體健康的病害防治資材得以選擇。

參、材料方法



一、供試植物及栽培條件

本研究使用的草莓品種為香水，相較於桃園一號（豐香）對炭疽病 (*Colletotrichum* spp.) 較為耐病，但對葉枯病 (*Neopestalotiopsis rosae*) 較為感病。栽培介質為泥炭土和根基旺以 9:1 比例混合均勻而成。草莓苗依生長來源分為組織培養苗及走莖苗，組織培養苗由行政院農業委員會種苗改良繁殖場提供以及購自格園社會企業有限公司，出瓶後種植於 25°C 光照 16 小時、黑暗 8 小時的恆溫生長箱中，待其成長 5 週，即可進行試驗。而 3 吋圓盆的走莖繁殖苗則購自山頂果園農場，並種植於國立臺灣大學農業化學系網室中，以 BBCH-scale code 約為 19 (有 9 片以上展開葉) 的草莓植株作為材料供於試驗 (Meier, 2001)。

二、草莓炭疽病菌與葉枯病菌之製備

草莓炭疽病菌 (*Colletotrichum siamense* ML133) 和草莓葉枯病菌 (*Neopestalotiopsis rosae* ML2411) 皆由行政院農業委員會苗栗區農業改良場鐘珮哲副研究員提供。炭疽病菌培養於 1/4 馬鈴薯葡萄糖瓊脂固態培養基 (Potato dextrose agar, PDA)，置於 28°C 培養箱中培養 7 天，待其分生孢子長滿後每皿加入 10 mL 無菌水，並用三角玻棒將粉紅色之孢子輕輕刮下。將孢子懸浮液以滅菌過之 Miracloth (Merck Millipore, MA, USA) 過濾菌絲或其他雜質後，收集於 50 mL 離心管中。於孢子懸浮液中添加甘油至甘油濃度為 25%，置於 -80°C 冰箱保存備用。或是利用血球計數器計算炭疽病菌孢子數量並將孢子懸浮液濃度調整至 1×10^6 spores/mL 後備用。

葉枯病菌也是培養於 1/4 PDA 中，置於 25°C 光週期設為 16 小時光照、8 小時黑暗的培養箱培養 14 天。與製備炭疽病菌孢子懸浮液相同的方式，以三角玻棒刮破黑色柄子殼後，以滅菌過之 Miracloth 過濾，保存於含 25% 甘油及 5% lactose 的無菌水中，置於 -80°C 冰箱內備用。或是以血球計數器計算孢子數後，將孢子懸浮液濃度調整為 1×10^6 spores/mL 後備用。

三、草莓細菌性角斑病菌之製備

草莓細菌性角斑病菌 (*Xanthomonas fragariae* B001) 由行政院農業委員會苗栗區農業改良場賴巧娟助理研究員提供，細菌性角斑病菌培養於蔗糖蛋白胨瓊脂固態培養基 (Sucrose peptone agar, SPA) 上，置於 20°C 培養箱中培養 5 天，待其菌落長出後用接種環將菌落刮下並保存於 30% 甘油中，置於 -80°C 冰箱內備用。或是將菌落刮下放入無菌水中，製備成細菌懸浮液，並測量其 OD₆₀₀ 的吸光值，將細菌懸浮液濃度調整為 OD₆₀₀ = 1 (菌數約為 1×10^9 CFU/mL) 後備用。

四、幾丁寡糖對草莓炭疽病菌及葉枯病菌孢子發芽抑制效果

幾丁寡糖購自誠麗實業股份有限公司，分子式為 C₅₆H₁₀₃N₉O₃₉ 的純物質粉末，脫乙酰 (Deacetylation) 程度為 87.3%，數均分子量為 1310 Dalton。幾丁寡糖可以溶於水，使用前將其溶於無菌水中，配製成 2 g/mL 幾丁寡糖溶液，再以無菌水將幾丁寡糖稀釋至所需濃度後進行後續各項測試。

為了測試幾丁寡糖是否有抑制病原真菌孢子發芽的能力，將幾丁寡糖水溶液分別稀釋成 200 mg/L、2000 mg/L、10000 mg/L 以及 20000 mg/L，各滴 5 μ L 在玻片上並以無菌去離子水作為對照組。以上述方式分別收集草莓炭疽病

菌及葉枯病菌孢子，並調整濃度至 1×10^5 spores/mL 後，再將 5 μ L 之孢子懸浮液混合滴於玻片上各濃度之幾丁寡醣水溶液中，使得各處理組幾丁寡醣最後的濃度為 100 mg/L、1000 mg/L、5000 mg/L 以及 10000 mg/L。炭疽病菌試驗組置於 28°C 生長箱中，保持濕度與在黑暗下 24 小時後，以複式顯微鏡觀察其發芽率，隨機計算 200 顆孢子，當孢子之發芽管長度大於孢子寬度，即視為發芽；葉枯病菌試驗組則置於 25°C 生長箱中，保持濕度與在黑暗下 24 小時後，計算其發芽率。此為一獨立試驗，每一試驗均重複 3 次獨立試驗。

五、幾丁寡醣對草莓炭疽病菌及葉枯病菌菌絲生長抑制效果

為了測試幾丁寡醣是否具有抑制病原真菌菌絲生長的能力，利用 PDA 培養基活化草莓炭疽病菌或葉枯病菌，再以直徑 0.75 cm 打洞器在菌落周圍菌絲上打洞，將菌絲塊放置於含有 0 mg/L、100 mg/L、1000 mg/L、5000 mg/L 以及 10000 mg/L 等濃度幾丁寡醣的 PDA 培養基中央，分別置於 28°C 和 25°C 生長箱中黑暗培養，每處理 4 重複，每兩天記錄一次菌落直徑，第 6 天作為最後一次紀錄。此為一次獨立試驗，每個試驗均重複 3 次獨立試驗。

六、幾丁寡醣對細菌性角斑病菌抑制效果

幾丁寡醣對細菌性角斑病菌生長影響的測試，則是將 1×10^4 CFU/mL 的細菌懸浮液分別與濃度為 200 mg/L、2000 mg/L、10000 mg/L 以及 20000 mg/L 的幾丁寡醣水溶液以 1:1 混合，使處理組中幾丁寡醣最後濃度為 100 mg/L、1000 mg/L、5000 mg/L 以及 10000 mg/L，並以混合水的細菌懸浮液作為對照組。每處理取 10 μ L 滴至 SPA 培養基中，置於 20°C 生長箱中培養，於第五天記錄其菌數。此為一獨立試驗，此試驗共重複 3 次獨立試驗。

七、幾丁寡醣於草莓炭疽病、葉枯病及細菌性角斑病之抗病效果測試



以手壓式噴瓶用噴灑的方式將不同濃度之幾丁寡醣水溶液均勻施用於草莓苗之葉表與葉背上，每株噴施約 10 mL 幾丁寡醣水溶液後，待其風乾，並以噴灑無菌水的植株作為對照組，每處理 5 株草莓植株。

進行五種試驗，分別為：一、於馴化五週大的植株上噴施一次幾丁寡醣，一小時後接種炭疽病菌 (1, 1H)；二、於馴化兩週大的植株上連續三周，每週噴施幾丁寡醣一次，再間隔一週後接種炭疽病菌 (3, 1W)；三、於馴化四週大的植株上噴施幾丁寡醣一次，再間隔一週後接種病原菌 (1, 1W)；四、於馴化一週大的植株上連續三周，每週噴施幾丁寡醣一次，再間隔兩週後接種炭疽病菌，評估幾丁寡醣之效期 (3, 2W)；五、為了確認幾丁寡醣是否具有治療草莓炭疽病的效果，接種炭疽病菌後，待第三天葉部病徵開始出現，便噴施不同濃度之幾丁寡醣水溶液。以 20 psi 定壓的空氣壓力機接種病原菌，持續噴施至菌液由葉緣滴落。接種之炭疽病菌或葉枯病菌孢子懸浮液濃度為 1×10^6 spores/mL，且過程中需避免孢子懸浮液噴到根冠部，或順著植物葉柄流到根冠部而造成植株冠腐而快速死亡；細菌性角斑病菌同樣是以空壓機噴霧接種方式，接種 1×10^9 CFU/mL 的細菌懸浮液。待其風乾，將植株放入塑膠盒中，並在盒子底部貼上濕擦手紙保濕，製造出相對濕度 100% 的發病環境，接種炭疽病菌之試驗組植株置於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 及光週期設為 16 小時光照、8 小時黑暗的生長箱中，於 6 天後記錄罹病指數；而接種葉枯病菌及細菌性角斑病菌之試驗組植株則置於 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 及光週期設為 16 小時光照、8 小時黑暗的生長箱中，於 14 天後記錄罹病指數。此為一獨立試驗，各試驗均重複 3 次獨立試

驗。另外，治療效果評估，則是先接種病原菌，待植株出現病徵後，再噴施水溶液或幾丁寡醣水溶液，記錄其對病程發展之影響。

病害嚴重度的分級方式為依植株葉部的病斑面積，定義不同的罹病指數，每個病害均分為 6 級：無病徵為 0 級；輕微 (植株葉片病斑面積 <10%) 為 1 級；輕度 (植株葉片病斑面積占 10-25%) 為 2 級；中度病徵 (病斑面積占 26~50%) 為 3 級；重度病徵 (病斑面積占 50-75%) 為 4 級；嚴重病徵 (病斑面積占 75% 以上、死亡植株) 為 5 級 (表一~表三)。紀錄每株草莓苗中每片展開葉之罹病等級，再將其平均，為該株罹病指數，並配合以下公式計算該處理的病害嚴重度。將每處理組病害嚴重度分級換算成百分比之數值，有利於與其他依照不同分級表的研究結果一同比較。

嚴重度 (%) = 該處理罹病指數總和 / (最高罹病指數 × 總調查株數) × 100。

八、防禦相關酵素活性測定

為了更進一步探討幾丁寡醣誘導草莓產生防禦反應可能機制，分別測定抗氧化酵素及苯丙胺酸裂解酶之活性。以施用後均能有效降低草莓炭疽病病害嚴重度的 5000 mg/L 幾丁寡醣進行試驗，並以噴施去離子水的植株作為對照組 (CK)；而施用頻率則是採用連續三週、每週施用一次幾丁寡醣的方式。於最後一次施用幾丁寡醣隔一週後接種炭疽病菌 *C. siamense* ML133，並於接種前 (Before inoculation, BI)、接種後 0 小時 (0 Hour post inoculation, 0 hpi)、接種後 24 小時 (24 hpi)、接種後 48 小時 (48 hpi) 與接種後 72 小時 (72 hpi) 收集葉片，測定其內 CAT、SOD、POD 與 PAL 等酵素活性。每一處理組 4 株植株，以直徑 1 公分的打洞器在每株植株第二片展開葉，取下約 10 片大小相等之葉圓片，每一葉圓片約 0.01 克重，再隨機取 5 個葉圓片進行酵素活性

試驗。4 株植株之酵素活性平均值為一獨立試驗之結果，每一試驗均重複 3 次獨立試驗。



1. 蛋白質含量測定

將五個葉圓片 (約 0.05 g) 放入 5 mL 微量離心管中，每管放入 5 顆直徑 4 mm 鋁珠後，以高通量組織均質機 (LAWSON DHF-24) 研磨 1.5 分鐘後成為細粉末。加入含有 0.8 μ L Na₂EDTA (0.5 M)、2 μ L 苯甲基磺醯氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride (0.1 M) 之 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0)，於冰浴下再次以均質機研磨 2 分鐘將葉片磨成均質。在 4°C 下以 12,000 $\times$ g 離心 20 分鐘，其上清液即為酵素粗萃取液。酵素粗萃取液之蛋白質含量測定是取上述上清液依 Bradford (1976) 方法進行蛋白質測定。以 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) 配製最終濃度為 0、20、40、60、80 和 100 μ g/mL 之牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 標準溶液。於 96 孔微量多孔盤中加入 80 μ L 各濃度 BSA 標準溶液或粗萃取液，對照組則以 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) 取代粗萃取液進行反應，再加入 20 μ L Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate 染劑，混合均勻後，在室溫下靜置反應 10 分鐘，以分光光度計 (SpectraMax®iD3 Multi-Mode Microplate Readers) 測定波長 595 nm 吸光值。繪製定量蛋白質的標準曲線，以 BSA 標準溶液的讀值繪製定量蛋白質的標準曲線後，以內差法計算出定粗萃取液中的總蛋白質含量。

2. 過氧化氫酶

CAT 之活性測定參考 Kato 和 Shimizu (1987) 及 Ma 等人 (2019) 的方法。H₂O₂ 對波長 240 nm 的紫外光吸收作用強，CAT 能催化 H₂O₂，使之分

解成 H_2O 和 O_2 。因此，有 CAT 活性出現時， H_2O_2 的吸光度 (A_{240}) 會隨反應時間而降低，因此可以根據 A_{240} 的變化速率計算出 CAT 的活性。

取 0.2 mL 酵素粗萃取液，加入 2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) 及 0.1 mL H_2O_2 (1 M)，空白對照組以 sodium phosphate buffer 代替粗萃取液。於 96 孔可透 UV 平底盤中加入 200 μL 處理組與對照組分別，以分光光度計 (SpectraMax®iD3 Multi-Mode Microplate Readers) 每隔 30 秒讀取一次波長 240 nm 之吸光值，共測定 20 分鐘。

每單位 CAT 酵素活性 (Unit, U) 定義為每分鐘 A_{240} 降低 0.1，其公式如下：CAT 活性 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$) 為 $\Delta A_{240} \times V_t / (0.1 \times V_s \times t \times \text{PW})$ 。其中， ΔA_{240} 為第 0 分鐘至第 20 分鐘結束之對照組與樣本吸光值的差值； V_t 為粗萃取液總體積 (mL)； V_s 為測定時所取的粗萃取液體積 (mL)； t 為測定時間；PW 為新鮮材料中蛋白質含量 (mg)，即 $\Delta A_{240t=20 \text{ mins}} \times 2 / [0.1 \times (0.2 \times 0.2 / 3) \times 20 \times \text{PW}]$ 。

3. 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶的活性測定參考 Beauchamp 和 Fridovich (1971) 及陳等人 (2008) 的方法。SOD 會清除植體中的超氧陰離子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)，轉換為 H_2O_2 及 O_2 。測定方法利用 SOD 抑制硝基藍四氮唑 (Nitroblue tetrazolium, NBT) 在照光環境下的還原作用，確認酶的活性。在有氧化物質存在時，對光敏感的核黃素 (Riboflavin) 可以被光還原，被還原的核黃素在有氧條件下極易再氧化而產生超氧陰離子自由基，超氧陰離子自由基可將硝基藍四氮唑還原為藍色的 Formazan 化合物，在波長 560 nm 處有最大吸收峰。若有 SOD 活性存在，則可清除超氧陰離子自由基，進而抑制藍色 Formazan 化合物的形成。

因此，光還原反應後，反應液藍色愈深，代表酵素活性愈低；反之，酵素活性愈高。

將 0.025 mL 蒸餾水、0.25 mL sodium phosphate buffer (150 mM, pH 7.0)、0.075 mL methionine (130 mM)、0.075 mL EDTA (1 mM)、0.075 mL Nitro blue tetrazolium (NBT, 0.63 mM) 和 0.15 mL riboflavin (7.5 μ M) 混合後，再加入 0.1 mL 酵素粗萃取液或是加入 sodium phosphate buffer 作為空白對照組。於日光燈下反應 15 分鐘後，以黑布覆蓋終止反應。分別迅速將 200 μ L 處理組與對照組反應液加入 96 孔微量多孔盤中，以分光光度計 (SpectraMax®iD3 Multi-Mode Microplate Readers) 測定波長 560 nm 之吸光值。

每一單位 SOD 酵素活性 (Unit, U) 定義為每小時 SOD 抑制 50% NBT 還原速率表示，其計算公式如下：SOD 活性 ($U \cdot mg^{-1}$ Protein) 為 $(A_0 - A_s) \times V_t \times 60$ (分鐘) / $(0.5 \times A_0 \times V_s \times t \times PW)$ 。其中， A_0 為空白對照組吸光值； A_s 為樣本吸光值； V_t 為粗萃取液總體積 (mL)； V_s 為測定時所取的粗萃取液體積 (mL)；PW 為新鮮材料中蛋白質含量 (mg)，即 $\Delta A_{560t=1h} \times 2 \times 60 / [0.5 \times A_0 \times (0.2 \times 0.1 / 0.75) \times 15 \times PW]$ 。

4. 過氧化酶

POD 活性參考 Hammerschmidt 等人 (1982) 和張等人 (2007) 的方法。POD 可在 H_2O_2 或 O_2 存在於植體時，將多酚類芳香族物質或其他電子提供者氧化 (Pandey *et al.*, 2017)，基於此活性反應，學者利用在有 H_2O_2 時，創癭木酚 (guaiacol) 會被 POD 氧化產生在波長 470 nm 處有強吸收峰的 3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylquinone。因此當反應液 A_{470} 吸光值越高，代表產物的濃度高，即 POD 活性高，可以間接推估出 POD 的活性。

在試管加入 1 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0)、1 mL 創癒木酚 guaiacol (21.6 mM) 及 0.9 mL H₂O₂ (39 mM)，混合後加入 0.1 mL 的酵素粗萃取液或是加入 sodium phosphate buffer 作為空白對照組。迅速將反應液混合均勻後，取 200 μ L 處理組與對照組的反應液加入 96 孔微量多孔盤中，以分光光度計 (SpectraMax®iD3 Multi-Mode Microplate Readers) 測定波長 470 nm 吸光值，偵測時間為 1 分鐘。

每單位 POD 酵素活性 (Unit, U) 定義為每分鐘 A₄₇₀ 數值增加 0.01，其公式如下：PAL 活性 ($U \cdot mg^{-1}$ Protein) = $\Delta A_{470} \times V_t / (0.01 \times V_s \times t \times PW)$ 。其中， ΔA_{470} 為對照組與樣本吸光值的差值； V_t 為粗萃取液總體積 (mL)； V_s 為測定時所取的粗萃取液體積 (mL)； t 為測定時間 (min)； PW 為新鮮材料中蛋白質含量 (mg)，即 $\Delta A_{470t=1 \text{ min}} \times 2 / [0.01 \times (0.2 \times 0.1 / 3) \times 1 \times PW]$ 。

5. 苯丙胺酸裂解酶

PAL 活性測定參考 Hyodo 與 Fujinami (1989) 的方法。PAL 可以催化苯丙胺酸 (phenylalanine)，使其脫氨後成反式肉桂酸，此為植物 phenylpropanoids 衍生物生合成途徑的第一步驟。反式肉桂酸在波長 290 nm 有強吸收峰，因此，可透過測定反應液 A₂₉₀ 值的變化加以計算 PAL 之活性。

首先取 0.05 克之草莓葉圓片於高通量組織均質機 (LAWSON DHF-24) 研磨 1.5 分鐘，加入 2 mL N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-3-propanesulfonic acid (EPPS) buffer (50 mM, pH 8.5) 於冰浴下再次將葉片研磨成均質。在 4°C 下以 12,000 $\times g$ 離心 20 分鐘，其上清液即為酵素粗萃取液。取 0.5 mL 酵素粗萃取液至玻璃試管中並加入 0.5 mL EPPS buffer (100 mM, pH 8.5) 及 0.5 mL L-Phenylalanine (30 mM)，之後置於 40°C 之水浴槽中加熱 60 分鐘。空白

對照組以 0.5 mL EPPS buffer 代替酵素粗萃取液。將 200 μ L 處理組與對照組反應液加入 96 孔微量多孔盤中，以分光光度計 (SpectraMax®iD3 Multi-Mode Microplate Readers) 測定波長 290 nm 吸光值。

每單位 PAL 酵素活性 (Unit, U) 定義為每小時 A_{290} 增加 0.01，其公式如下：PAL 活性 ($U \cdot mg^{-1}$ Protein) 為 $\Delta A_{290} \times V_t / (0.01 \times V_s \times t \times PW)$ 。其中， ΔA_{290} 為對照組與樣本吸光值的差值； V_t 為粗萃取液總體積 (mL)； V_s 為測定時所取的粗萃取液體積 (mL)； t 為測定時間 (h)； PW 為新鮮材料中蛋白質含量 (mg)，即 $\Delta A_{290t=1h} \times 2 / [(0.01 \times (0.2 \times 0.5 / 1.5) \times 1 \times PW)$ 。

九、以 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 進行過氧化氫 (H_2O_2) 染色

為了檢測經炭疽病菌感染後，是否會在葉片中累積過氧化氫，以及經過幾丁寡糖處理後之影響，進行二氨基聯苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 染色法。草莓苗連續 3 週每週施用 5000 mg/L 的幾丁寡糖水溶液或無菌水 (對照組)，一週後接種炭疽病菌，於未接種 (BI) 或接種後 0、24、48 和 72 小時收集草莓葉片進行 DAB 染色，觀察葉片上過氧化氫的累積，每時間點收集 4 棵植株葉片。DAB 染色法參考 Thordal-Christensen 等人 (1997)、張等人 (2009) 和邵玲 (2010) 的步驟，以 HCl 調整 pH 值為 3.8 使 DAB 溶解，配製濃度為 0.5 mg/mL 的 DAB 溶液。在不同時間點下，將第三片展開之草莓葉片剪下，於避光環境中，浸泡至 DAB 溶液中，再移至真空抽氣裝置內進行抽氣，保持負壓 30 分鐘。接著打開排氣口，恢復真空裝置之氣壓，利用壓力差使 DAB 染劑充分進入細胞間隙中，持續避光浸泡 DAB 溶液 8 至 16 小時。隨後，吸去染液，再將葉片浸泡於 95% 酒精，置於 80°C 水浴槽中進行脫色，處理後的葉部組織可儲存於 95% 酒精或 5% 的甘油中。DAB 與 H_2O_2

反應後會產生棕褐色沉澱物，因此染色完成後若出現棕褐色斑點則表示有 H_2O_2 的存在。此為一獨立試驗，本試驗重複 3 次獨立試驗。



十、統計分析

將以上試驗所得的數據資料於 Microsoft Excel 進行記錄與整理後，以 GraphPad Prism 8 軟體製圖。利用 SAS 9.4 檢定變方分析之前提，再進行單向變異數分析 (One-way Analysis of variance, ANOVA)。若分析結果顯示各組間具有差異，則以 Tukey's studentized range test (Honestly significant difference, HSD) 進行統計分析，檢驗各處理組與對照組間差異的顯著性。當 $P < 0.05$ 以 * 表示其具有顯著差異， $P < 0.01$ 則以 ** 表示其具有極顯著差異。

肆、結果



一、幾丁寡醣對草莓炭疽病菌之抑菌試驗：

為了了解幾丁寡醣對草莓炭疽病菌的抑菌效果，分別測試幾丁寡醣對炭疽病菌孢子發芽及菌絲生長之影響。

首先，孢子發芽率之結果顯示，各處理組間未發芽的孢子數，並沒有顯著差異；但發芽的孢子中，是否有產生壓器的發芽孢子數量，各處理間卻有顯著差異 ($P < 0.05$)。炭疽病孢子懸浮液經過 1000、5000 和 10000 mg/L 的幾丁寡醣處理後，發芽但未產生壓器的孢子數量 (Hyphae only) 與其他處理組間有顯著差異；而發芽且產生壓器的孢子數量 (Appressorium)，各濃度的幾丁寡醣處理組皆與對照組 (0 mg/L) 間具有極顯著水準的差異 ($P < 0.01$) [圖一 (A)]。此外，由百分比堆疊長條圖可以清楚看出各處理組間，未發芽 (No germination)、發芽但未產壓器 (Hyphae only) 以及發芽後成功產生壓器 (Appressorium) 之孢子的占比。未經處理的對照組，孢子能正常發芽並產生壓器的比例為 70.2%，然而經過 100、1000、5000 和 10000 mg/L 幾丁寡醣處理後，正常發芽並產生壓器的孢子數量便大幅下降，分別降至 57.1%、15.4%、0.5% 及 0.002% [圖一 (B)]。

得知幾丁寡醣可以抑制炭疽病菌孢子發芽後產生壓器，接下來想探討幾丁寡醣是否能抑制炭疽病菌之菌絲生長。每 2 天觀察菌落生長情形並量測菌落大小，結果發現，到了第 6 天仍未觀察到各處理組與對照組的菌落大小之間有任何差異 (圖二)。

二、幾丁寡醣防治草莓炭疽病之效果評估：

(一)、 幾丁寡糖防治草莓炭疽病之效果評估 (草莓組織培養苗)

由於幾丁寡糖能有效抑制孢子正常發芽但無法抑制其菌絲生長，因此推論幾丁寡糖可能較適合用於預防草莓炭疽病的發生上。為了了解幾丁寡糖是否能預防草莓炭疽病的發病，及其可以使草莓植株有效產生抗性的施用方式及濃度，先以草莓組織培養苗進行以下試驗：

1. 只噴一次幾丁寡糖，隔一小時接種 (1, 1H)

未施用幾丁寡糖的對照組，其炭疽病的病害嚴重度可達 81.2%，預處理 100、1000、5000 和 10000 mg/L 幾丁寡糖的植株，炭疽病的病害嚴重度均較低，分別為 71.7%、60.4%、48.6% 和 51.5%。其中，5000 與 10000 mg/L 之處理組的炭疽病病害嚴重度與對照組相比有顯著差異 ($P < 0.05$)；施用 5000 mg/L 的幾丁寡糖與對照組相比，可以減少 32.6% 的嚴重度 [圖三 (A)]。

2. 連噴三次幾丁寡糖，隔一週接種 (3, 1W)

由於田間並無法準確預期病原菌何時會出現，為了更貼近農民的病害管理方式，將施用幾丁寡糖的頻率改為每週一次，且連續施用三週。結果顯示，未施用幾丁寡糖的對照組病害嚴重度高達 79.0%；但處理 100、1000、5000 和 10000 mg/L 幾丁寡糖的植株，病害嚴重度有降低的趨勢，其三次獨立試驗平均值分別是 57.5%、43.5%、36.1% 和 51.7%。處理 1000、5000 與 10000 mg/L 之病害嚴重度與對照組相比有顯著差異 ($P < 0.05$)；其中，施用 5000 mg/L 幾丁寡糖的植株，其病害嚴重度與對照組相比，減少高達 42.9% [圖三 (B)]。

3. 只噴一次幾丁寡糖，隔一週接種 (1, 1W)

由上述結果得知連續三週噴施三次幾丁寡糖可顯著減緩炭疽病的危害，為了瞭解若僅施用一次幾丁寡糖是否即可達到類似的防治效果，因此將草莓植株在接種前一週施用一次幾丁寡糖，觀察其接種炭疽病菌後對病害嚴重度的影響。結果顯示，預處理 5000 與 10000 mg/L 幾丁寡糖的植株之病害嚴重度與對照組有顯著差異 ($P < 0.05$)。對照組植株，於接種炭疽病菌 *C. siamense* ML133 後第六天的病害嚴重程度為 94.2%；處理 100、1000、5000 與 10000 mg/L 的幾丁寡糖後，炭疽病的病害嚴重度分別降低為 86.0%、82.8%、76.8% 和 75.4%。其中，與對照組相比，施用 10000 mg/L 的幾丁寡糖處理組可以減少 18.8% 的病害嚴重度 [圖三 (C)]。

(二)、幾丁寡糖防治草莓炭疽病之效果評估 (草莓走莖苗)

由於田間種植的種苗多數為走莖繁殖苗，因此為模擬一般田間的植株狀態，將上述植株材料改成農民培育之走莖苗，針對以組織培養苗測試出、防治效果較好的施用頻率，測試於草莓走莖苗施用幾丁寡糖，是否仍有防治炭疽病之成效及施用幾丁寡糖之合適濃度。

1. 只噴一次幾丁寡糖，隔一小時接種 (1, 1H)

以走莖苗作為試驗植株，接種六天後的病程發展結果可見，與對照組之病害嚴重度相比 (72.1%)，100、1000、5000 和 10000 mg/L 處理組有顯著下降，其三次試驗平均值分別是 55.7%、49.5%、48.5% 與 43.9%，與對照組相比分別減少 16.4%、22.6%、23.6% 和 28.2% [圖四 (A)]。

2. 連噴三次幾丁寡糖，隔一週接種 (3, 1W)

與對照組的病害嚴重度 75.9% 相比，連續施用 5000 和 10000 mg/L 幾丁寡糖的處理組，其病害嚴重度顯著下降，三次獨立試驗的平均值分別是 46.0% 和 44.5%，較對照組減少 29.9% 和 31.4% 的病害嚴重度 [圖四 (B)]。

(三)、幾丁寡糖防治草莓炭疽病之效期評估

由圖五可見幾丁寡糖施用於草莓後，防治炭疽病之效期。不論是組織培養苗或走莖苗，施用 5000 與 10000 mg/L 幾丁寡糖的處理組，其第六天觀察到的病害嚴重度與對照組相比，均有顯著差異。將幾丁寡糖施用於組織培養苗時，對照組之病害嚴重度為 85.2%，而施用 5000 與 10000 mg/L 幾丁寡糖處理組之植株，病害嚴重度分別為 52.3% 和 59.5%，比對照組病害嚴重度分別減少 32.9% 和 25.7% [圖五 (A)]。當以走莖苗進行試驗時，對照組之病害嚴重度為 77.7%，而施用 5000 與 10000 mg/L 幾丁寡糖之處理組植株，病害嚴重度分別為 42.9% 和 49.7%，較對照組之病害嚴重度分別減少 34.8% 和 28% [圖五 (B)]。

(四)、幾丁寡糖治療草莓炭疽病之效果評估

由圖六可得知幾丁寡糖是否具有治療草莓炭疽病的效果，結果顯示無論是噴施何種濃度的幾丁寡糖水溶液，各處理組之病害嚴重度與對照組相比皆無顯著差異，顯示一旦草莓炭疽病發病，施用幾丁寡糖並無法抑制病程發展。

三、幾丁寡糖對草莓葉枯病菌之抑菌試驗：

接下來想了解幾丁寡糖是否也能抑制草莓葉枯病菌的孢子發芽或菌絲生長。不論是 100、1000、5000 或 10000 mg/L 幾丁寡糖處理組之孢子發芽率，

與未含幾丁寡醣的對照組 (CK) 相比均較低，且皆具有極顯著差異 ($P < 0.01$) [圖七 (A)]。對照組的孢子發芽率為 98.8%，而隨著處理的幾丁寡醣濃度越高，葉枯病菌孢子發芽率越低；處理 100、1000、5000 和 10000 mg/L 幾丁寡醣後，孢子發芽率分別降為 65.7%、17.3%、0.58% 和 0.08% [圖七 (B)]。

此外，為了探究幾丁寡醣能否抑制葉枯病菌之菌絲生長，每 2 天觀察一次菌落生長情形，並記錄其菌落直徑。直至第 8 天，對照組與各處理組的菌落直徑間並沒有顯著差異 (圖八)，顯示幾丁寡醣無法抑制葉枯病菌菌絲生長。

四、 幾丁寡醣防治草莓葉枯病之效果評估：

由上述結果得知，幾丁寡醣可有效抑制草莓葉枯病菌孢子發芽，但無法抑制其菌絲生長，由此可推測幾丁寡醣可能也是較適合用在預防葉枯病的發生上。為了測試幾丁寡醣是否能用以防治草莓葉枯病，以前述防治炭疽病之植體試驗結果為基礎，採用防治率較高的兩種施用方式，即施用一次幾丁寡醣隔一小時後接種病原菌，以及連續施用三次幾丁寡醣並於一週後接種病原菌，評估幾丁寡醣防治葉枯病的效果。

1. 只噴一次幾丁寡醣，隔一小時接種 (1, 1H)

處理 5000 與 10000 mg/L 的植株之病害嚴重度，與未施用幾丁寡醣的對照組相比，有顯著 ($P < 0.05$) 或極顯著 ($P < 0.01$) 差異，病徵明顯較對照組輕微。對照組的病害嚴重度為 93.5%，而處理 100、1000、5000 和 10000 mg/L 幾丁寡醣的植株，三次獨立試驗的病害嚴重度平均值分別是 91.0%、77.1%、52.6% 和 38.1%。與對照組相比，施用 5000 和 10000 mg/L 幾丁寡醣後，可以分別減少 40.9% 與 55.4% 的草莓葉枯病嚴重度 [圖九 (A)]。

2. 連噴三次幾丁寡醣，隔一週接種 (3, 1W)

與對照組相比，5000 與 10000 mg/L 兩處理組之病害嚴重度有極顯著差異 ($P < 0.01$)。處理 100、1000、5000 和 10000 mg/L 幾丁寡醣的植株，其草莓葉枯病的病害嚴重度三次獨立試驗平均值分別是 82.4%、79.6%、53.1% 和 51.5%，而對照組為 86.5%。其中，施用 5000 與 10000 mg/L 幾丁寡醣的處理組與對照組的病害嚴重度相比，分別減少了 33.4% 與 35.0% [圖九 (B)]。

3. 連噴三次幾丁寡醣，隔兩週接種 (3, 2W)

由圖九可見針對草莓葉枯病施用幾丁寡醣時，對草莓植株的保護時效。任一處理組之病害嚴重度與對照組相比皆無顯著差異 (圖十)。此結果顯示施用幾丁寡醣兩週後就會失去對草莓葉枯病的防治效果。

綜合上述結果得知，幾丁寡醣可用來防治草莓葉枯病，濃度以 5000 mg/L 和 10000 mg/L 為佳，此二濃度於施用一小時後便能有保護效果。連續三週噴施三次的情況下，於一週後，防治草莓葉枯病的效用仍在；然而，經過兩週後再進行測試，則無法看到保護效果。

五、 幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌之抑菌試驗：

幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌的體外試驗結果可知，任一處理組的菌數皆與對照組無顯著差異 (圖十一)，顯示幾丁寡醣無法抑制細菌性角斑病菌之生長。

六、 幾丁寡醣防治草莓細菌性角斑病之效果評估：

雖然幾丁寡糖無法直接抑制細菌性角斑病菌生長，但由於之前研究顯示幾丁寡糖可以透過誘導植物防禦反應以對抗細菌性病害 (Jia *et al.*, 2018)，因此接下來便直接將幾丁寡糖施用於草莓植株上，測試幾丁寡糖是否對細菌性角斑病有防治效果。與防治葉枯病之植體試驗方式相同，是根據前述防治炭疽病之植體試驗結果為基礎，採取防治率較高的兩種施用方式進行試驗，即施用一次幾丁寡糖隔一小時接種病原菌與連續施用三次幾丁寡糖於一週後接種病原菌，並以草莓組織培養苗作為試驗材料。

1. 只噴一次幾丁寡糖，隔一小時接種 (1, 1H)

將不同濃度的幾丁寡糖施用於草莓組織培養苗後，隔一小時接種細菌性角斑病菌 *X. fragaria* B001。結果如圖十二所示，對照組與各處理組的病害嚴重度在統計上均無顯著差異 [圖十二 (A)]。

2. 連噴三次幾丁寡糖，隔一週接種 (3, 1W)

接下來採用每週噴施一次，連續施用三週不同濃度的幾丁寡糖後，隔一週接種病原菌。由結果可知，對照組與各處理組間的病害嚴重度並無顯著差異 [圖十二 (B)]。

綜合上述結果可以得知，施用幾丁寡糖對於草莓細菌性角斑病並無防治效果。由於以上兩種試驗結果與對照組皆無顯著差異，因此便不需要測試幾丁寡糖對防治細菌性角斑病害之效期評估。

七、 防禦相關抗氧化酵素活性測定：

為了了解噴施幾丁寡糖後的草莓植株，於炭疽病感染後測定防禦相關抗氧化酵素的變化情形。由結果可見，施用 5000 mg/L 幾丁寡糖處理組與對照組

相比，接種前和接種後 24 小時前，CAT 活性並沒有明顯的差異，但在接種後 48 和 72 小時活性顯著提升。接種後 48 小時對照組與處理組之 CAT 平均活性分別是 78.3 和 122.5 Units • mg⁻¹ protein，接種後 72 小時則分別為 55.2 和 137.7 Units • mg⁻¹ protein (圖十三)。SOD 的活性於接種炭疽病菌前後變化不大，且有無預處理幾丁寡糖對 SOD 活性影響也不大，處理組和對照組各時間點的活性間均無差異。POD 的活性雖然隨著炭疽病菌感染後時間越久，活性有逐漸變高的趨勢，然而幾丁寡糖處理組和對照組之間亦無差異，顯示幾丁寡糖並不會影響草莓感染炭疽病菌後，SOD 和 POD 之活性 (圖十四、圖十五)。而 PAL 活性的測定結果可發現，炭疽病菌感染後 PAL 活性變化並不大，但在感染後 72 小時觀察到對照組與處理組間 PAL 活性差距拉大的情形；處理幾丁寡糖的植株，在感染後 72 小時 PAL 的活性與對照組相比有顯著差異，高出 31769.6 Units • mg⁻¹ protein (圖十六)。綜合上述結果得知，以 5000 mg/L 幾丁寡糖處理草莓之後，能於炭疽病感染後期誘導植株產生 CAT 與 PAL，使兩酵素的活性提高。

八、幾丁寡糖誘導活性氧化物質 H₂O₂ 累積之影響：

由於經過 5000 mg/L 幾丁寡糖處理後的草莓植株，於接種炭疽病菌後期能誘導 CAT 活性，推測幾丁寡糖可能可以透過 CAT 活性來清除炭疽病菌感染所產生的 H₂O₂。為了證實這個可能性，以 DAB 將葉片染色，確認抗氧化酵素活性測定試驗中，各時間點收集的葉片中之 H₂O₂ 累積情形。

由 DAB 染色結果可見，在對照組的葉片中，炭疽病菌接種後 24 小時開始出現 H₂O₂ 累積所造成的深褐色小點，接種後 48 和 72 小時仍能看見明顯的 H₂O₂ 累積，但以接種後 24 小時的葉片中有最多深褐色累積物，接種後

72 小時甚至開始有病斑出現。而在施用 5000 mg/L 幾丁寡糖的處理組葉片中，除了接種炭疽病菌後 24 小時有些許 H_2O_2 所造成的深褐色累積物，其餘時間點幾乎沒有看到深褐色小點的存在 [圖十七 (A)]。由於幾丁寡糖處理組，於接種後 48 小時 CAT 活性顯著上升，因此特別比較該一時間點的 H_2O_2 累積情形。從葉片代表區域放大圖可明顯看到對照組有明顯 H_2O_2 造成的點狀深褐色累積物，但處理組則無明顯累積 [圖十七 (B)]；而放大接種後 72 小時對照組與處理組的一小部分葉片，可見對照組仍有點狀深褐色累積物，但處理組葉片已幾乎沒有 H_2O_2 累積 [圖十七 (C)]。

伍、討論



幾丁質和其衍生物，如：幾丁聚醣和幾丁寡醣，可作為病原相關分子模式 (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) 誘導植物產生抗性以減輕病害感染 (Sharp, 2013 ; De Tender *et al.*, 2021)。除此之外，幾丁寡醣亦具有直接抑菌的功效 (Albuquerque *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2015; Goya *et al.*, 2016)。因此，本研究推論幾丁寡醣誘導植物產生抗性或是直接抑制病原菌的特性，可能可以用來防治草莓病害。總體結果顯示，幾丁寡醣可以抑制炭疽病菌的壓器形成與葉枯病菌的孢子發芽，但無法抑制炭疽病菌和葉枯病菌的菌絲生長，且無法抑制細菌性角斑病菌的生長。盆栽試驗結果發現，幾丁寡醣可以防治炭疽病與葉枯病，但對細菌性角斑病沒有防治效果。防禦相關酵素的活性測定，在接種炭疽病菌後 48 和 72 小時，經過幾丁寡醣預處理的植株中，CAT 活性明顯被誘導，且 72 小時後可維持較對照組高的 PAL 活性。從 DAB 的染色結果可以觀察到炭疽病菌感染後會誘導 H_2O_2 的產生與累積，但在幾丁寡醣處理的葉片中 H_2O_2 累積量下降，可能與幾丁寡醣處理後 CAT 活性提高有關。

壓器是部分真菌 (如：炭疽病菌) 孢子發芽管前端特化的結構，其內部可以產生巨大膨壓，用以直接侵入寄主細胞。本研究發現幾丁寡醣可以抑制炭疽病菌孢子產生壓器，與之前在水稻稻熱病菌 (*Pyricularia oryzae*) 的研究中觀察到其孢子發芽後的壓器生成會受到幾丁聚醣抑制類似。文獻指出，水稻稻熱病菌的壓器生成會受到幾丁聚醣抑制，推測抑制效果是由於幾丁聚醣在發芽管 (germ tubes) 前端累積 (Kuroki *et al.*, 2017)，進而誘導生理變化，使酚類物質在真菌及植物體中累積 (Camacho *et al.*, 2017 ; Lopez-Moya *et al.*, 2017)，因此影響了壓器中黑色素的生合成途徑 (Federico *et al.*, 2021)。然而幾丁寡醣是否也是利用類似的機制造成壓器分化受阻，或許可以透過測試幾丁寡醣是否進

入菌絲並累積於發芽管前端進行探討。除此之外，在複式顯微鏡下，可以觀察到處理 1000 及 5000 mg/L 幾丁寡醣處理組其孢子壓器有明顯變形的現象 (10000 mg/L 處理組幾乎沒有壓器產生)(附圖一)。

雖然幾丁寡醣對抑制炭疽病菌的孢子發芽沒有顯著效果，但在抑制葉枯病菌孢子發芽試驗中，可見隨幾丁寡醣濃度提高，葉枯病菌的發芽率有明顯的下降趨勢。Palma-Guerrero 等人 (2008) 比較幾丁聚醣影響不同真菌孢子發芽的可能原因，推測影響真菌對幾丁聚醣敏感度高低可能是因為 chitosanase 活性的差異，孢子產生的 chitosanase 活性越低，對幾丁聚醣的抑制越敏感，由此可知，並非所有真菌對幾丁寡醣或幾丁聚醣都同樣敏感 (El Ghaouth *et al.*, 1992; Hassan and Chang, 2017)。而以幾丁寡醣抑制孢子發芽而言，實驗結果顯示葉枯病菌比炭疽病菌更為敏感，可能與此兩種真菌水解幾丁寡醣的能力有關。

本研究中，處理組與對照組中炭疽病菌與葉枯病菌菌絲生長情形，均未有顯著差異，與 El Gueddari 等人 (2002) 的研究類似。其研究結果發現，幾丁聚醣對培養基上的菌絲不會有影響，但會存在於侵入植物體的小麥莖鏽病菌 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* 細胞壁表面，使植物可以產生 chitinases 分解菌絲細胞壁。此外，幾丁寡醣對於影響真菌的孢子發芽較菌絲生長更為敏感，與先前 Palma-Guerrero 等人 (2008) 的試驗結果相符。不過，亦有研究結果持相反結果，隨幾丁聚醣的濃度提高，對鷹嘴豆萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Race 1 (Foc1) 菌絲的抑制效果更為明顯 (Narula *et al.*, 2020)。由於該篇文章並未提及是否調整過添加幾丁聚醣水溶液後對照組與處理組的 pH 值，推測抑制菌絲的可能原因為幾丁聚醣不如小分子的幾丁寡醣可以直接溶於水溶液且水溶液 pH 值呈中性，幾丁聚醣需要酸性溶液助溶，因此隨幾丁聚醣濃度提高，該處理組的 pH 值會越低，因而造成菌絲生長受阻。而以 pH 值經

過調整之幾丁聚醣水溶液進行抑制真菌菌絲生長的數個研究中，則發現不同真菌對幾丁聚醣的敏感度差異極大：*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 的菌絲生長明顯受到幾丁聚醣抑制，*Pythium ultimum* 則只有在最高濃度的處理組 (2 mg/mL) 中可見抑制效果 (Palma-Guerrero *et al.*, 2008)。

相較於抑制炭疽病菌的壓器生成與葉枯病菌的孢子發芽效果顯著，幾丁寡醣對細菌性角斑病菌生長的抑制效果不佳。有文獻指出，相較於抑制真菌孢子發芽效果顯著，幾丁聚醣的對細菌的抗菌作用通常不敏感 (Kong *et al.*, 2010)。有幾位研究員發現，幾丁聚醣對革蘭氏陽性菌 (Gram-positive Bacteria) 的抑制效果較革蘭氏陰性菌 (Gram-negative Bacteria) 佳 (Tayel *et al.*, 2010; Lee and Je, 2013)，是由於細胞壁結構的不同。細菌性角斑病菌為革蘭氏陰性菌，具有單層或少層的肽聚醣細胞壁，其外一層不對稱的脂雙層外膜，細胞壁與外膜間則含有維持生命的代謝酵素。相較於革蘭氏陽性菌，革蘭氏陰性菌具有雙層膜結構，可能因此能有效阻絕幾丁寡醣進到細胞質 (Xing *et al.*, 2015)，而成為幾丁寡醣對細菌性角斑病菌抑制效果不佳的原因之一。

由於幾丁寡醣可以抑制炭疽病菌孢子壓器的形成及葉枯病菌孢子的發芽，但無法抑制其菌絲生長，因此推定，幾丁寡醣在農業上較適合作為預防病害的保護劑施用。因此假設在病原菌侵入前施用幾丁寡醣，應可以減輕植物受到病害影響的程度。在組織培養苗接種炭疽病菌試驗中，每週施用一次、連續施用三週之後隔一週接種的幾丁寡醣施用方式，其防治率最高，當中又以 5000 mg/L 幾丁寡醣處理可高達 42.9% 防治率；而只施用一次隔一小時接種與施用一次隔一週的兩種施用方式，其處理組與對照組的病害嚴重度則沒有顯著差異。值得一提的是，連續三週施用 10000 mg/L 幾丁寡醣，防治率與對照組相比沒有顯著差異，可能是因為在第三次噴施後觀察到組織培養苗葉片出現焦枯

狀 (附圖二)，疑似藥害使植體受傷，讓病原菌更易入侵感染所致。相較於相對強健的走莖繁殖苗，10000 mg/L 幾丁寡糖連續施用不會有藥害問題，因此在此濃度處理下仍可看到對炭疽病的防治效果，但效果與噴施 5000 mg/L 者相似，並未因為濃度提高而效果更佳。在相同施用頻率的試驗中，走莖苗與組織培養苗的接種試驗結果類似，連續三週施用幾丁寡糖的防治效果優於只施用一次幾丁寡糖，5000 mg/L 幾丁寡糖施用於走莖苗對炭疽病的防治率分別為 29.9% 與 19.4%。雖然有關幾丁寡糖的研究資料較少，但有不少文獻指出，採後作物施用幾丁聚糖後，能夠形成半透性塗層，減少病原菌入侵，進而增加農產品的儲架壽命 (Chong *et al.*, 2015)。此外，幾丁聚糖可以誘導作物產生細胞壁增強分子 (如木栓質素，黑色素和木質素)，進而形成物理屏障 (Kumaraswamy *et al.*, 2018)。多次施用幾丁寡糖除了可能因此產生保護屏障，亦可能因為幾丁寡糖附著於葉面更為全面，而增加直接抑菌的效果，降低病原菌侵入的機會，因而多次施用具有較顯著的防治效果。

由上述實驗可知，幾丁寡糖確實可作為保護劑，為了評估幾丁寡糖是否有作為治療劑的潛力，在接種炭疽病菌後，待植株於第三天出現病徵，再施用幾丁寡糖水溶液。由結果可見，即便將幾丁寡糖濃度提高至 20000 mg/L，與對照組相比，仍不具顯著差異。因此，幾丁寡糖在農業施用上，相較於治療劑，較適合作為保護劑。其與許多研究試驗方法相同，在接種病原菌前預先施用幾丁寡糖，可以預防病害嚴重發生，而非在接種病原菌後才施用 (Ben-Shalom *et al.*, 2003；Yin *et al.*, 2013；Yang *et al.*, 2017；Ma *et al.*, 2019)。

為評估幾丁寡糖其他可能的防治對象，以利給予農民更多的參考依據，針對草莓兩大新興病害，進行植體試驗。在葉枯病菌接種的試驗中，5000 mg/L 與 10000 mg/L 的幾丁寡糖處理可大幅度降低葉枯病的嚴重程度；在細菌性角

斑病菌的接種試驗中，所有測試的幾丁寡糖濃度均對細菌性角斑病菌的防治沒有明顯效果。此外，實驗過程中發現，10000 mg/L 幾丁寡糖連三週施用後再接種細菌性角斑病菌的植株，接種後兩週，草莓葉背除了明顯有透化現象外，與對照組相比，病斑處多湧出乳白色黏稠菌液（附圖三）。推測可能是因為高濃度的幾丁寡糖造成藥害，使細菌得以從傷口進入，或是細菌性角斑病菌可能可以利用幾丁寡糖作為其生長的養分，因此濃度越高、生長越好。有研究指出，*Xanthomonas* sp. 可以產生 chitinase (Sakka *et al.*, 1998)，但尚未知其是否可以產生 chitosanase，目前只有 *Enterobacter* sp. 和 *Bacillus* sp. 這兩屬的細菌被發現可以生成 chitinase 與 chitosanase (Zhu *et al.*, 2007)。

幾丁寡糖在植株上可以發揮防治功效，除了可能是因為其具有直接抑菌能力外，也可能是源於幾丁寡糖可以誘導宿主對病原菌產生抗性反應的能力（朱，2018；Zeng *et al.*, 2010）。近年來，已有不少文獻指出，幾丁寡糖對許多宿主而言是強大的免疫激發子 (Immunity elicitor)，經幾丁寡糖預處理的植株可以有有效的調控防禦能力，進而對隨後遭遇的生物或非生物逆境有更強烈的防禦反應 (Bonin *et al.*, 2020；Jia *et al.*, 2020)。為了確認幾丁寡糖是否誘發草莓植株的防禦反應，測試預處理幾丁寡糖且接種炭疽病菌之草莓植株的防禦相關酵素變化。由結果可見，在未接種炭疽病菌前，預處理幾丁寡糖的處理組和對照組的 CAT、SOD、POD 與 PAL 活性並沒有顯著差異，但接種病原菌後 72 小時，處理組葉片的 PAL 活性與對照組相比具顯著差異。而在接種後 48 及 72 小時，處理組的 CAT 活性也比對照組高且具有極顯著差異，由於這些抗氧化酵素與植物防禦有關 (Kim and Hwang, 2014；Sharma and Ahmad, 2014)，因此此結果表示幾丁寡糖具有誘導草莓產生防禦反應的能力。其中，處理組在接種後 48 小時的 CAT 活性較對照組高，與先前文獻的實驗結果可以相互印證，在番茄施

用幾丁聚醣後，再接種上 *Fusarium andiyazi*，處理組 CAT 的基因表現在 48 小時有明顯上調 (Chun *et al.*, 2019)。

當植物遭受逆境時，會累積 ROS，如 H_2O_2 ，而 ROS 會參與細胞的生理反應，如訊息傳遞、計畫性細胞死亡 (Programmed cell death) 和過敏性反應 (Hypersensitive reaction) 等等。炭疽病菌 (生物逆境) 會誘導植物產生 ROS，造成氧化逆境，而植物會設法和緩氧化壓力，使植物不致受損。而幾丁聚醣可以更快和緩逆境，其中可能原因為幾丁質或幾丁聚醣是某些病原菌細胞壁的組成部分，當幾丁質或是幾丁質衍生物，如幾丁寡醣，與植物接觸時，便會使植物誤判為病原菌入侵，進而啟動防禦反應。經由酵素活性測定已知幾丁寡醣可以誘導植物 CAT 活性，催化 H_2O_2 轉為 H_2O 和 O_2 ，進而和緩氧化壓力。藉由 DAB 染色法確認草莓植株葉片 H_2O_2 的累積與緩和氧化逆境狀況發現，處理組在接種炭疽病菌後 0 和 24 小時，可見 H_2O_2 的累積，但至 48 和 72 小時，便可見 H_2O_2 的累積有所減少；而對照組在接種炭疽病菌後 24 小時可以看見明顯的 H_2O_2 累積，在接種後 48 及 72 小時，與處理組相比，仍有較多的褐色累積物，可見此染色結果與 CAT 活性測定結果互相吻合。由酵素活性測定結果與 H_2O_2 染色結果可以推定幾丁寡醣會減緩 H_2O_2 累積所造成的氧化逆境。

為評估幾丁寡醣對於防治草莓炭疽病和葉枯病之效期，將連噴 3 週幾丁寡醣的植株隔 2 週再進行接種。雖然在高濃度 (5000 和 10000 mg/L) 幾丁寡醣施用下，對於炭疽病害仍可見其防治效果，但對於防治葉枯病害而言，處理組與對照組無顯著差異。因此在田間施用上，若僅用在預防炭疽病時，可以兩週噴施一次幾丁寡醣，但若需共同預防炭疽病與葉枯病時，則建議噴施幾丁寡醣的頻率為每週。

由幾丁寡醣防治草莓病害之抗病效果測試可見，除了受藥害影響的植株外，幾丁寡醣在施用濃度上普遍具有 dose-dependent effect，無論是防治炭疽病或是葉枯病，幾丁寡醣的防治率隨濃度 (0-10000 mg/L) 增加而有所提高。不過，不代表濃度越高效果越好，連續每週施用幾丁寡醣的頻率可以有效提高的防治效果，但在第三次施用 10000 mg/L 幾丁寡醣後，即可能出現藥劑傷害的灼傷狀，而且因為施用濃度高，防治成本也高。因此，防治草莓炭疽病及葉枯病，建議每週施用濃度約為 5000 mg/L 的幾丁寡醣水溶液，可以降低草莓炭疽病約 42.9% 的嚴重度及葉枯病 33.4% 的嚴重度。

若以每週噴施 5000 mg/L 的幾丁寡醣預防草莓炭疽病和葉枯病，每次每株約需 10 mL 幾丁寡醣溶液，1 kg 的幾丁寡醣粉末約新台幣 2600 元 (誠麗誠麗實業股份有限公司)，每分地種植以 5000 株草莓來算，施用 5000 mg/L 的幾丁寡醣於一分地的草莓園，一週所需幾丁寡醣施用成本約為新台幣 650 元。而根據草莓良好農業規範 (TGAP)，當育苗期葉片出現病斑時，開始施化學藥劑，每隔 7 天施藥一次，連續三次，其中，待克利和腐絕是推薦施用於防治炭疽病的藥劑。以稀釋 3000 倍的炭剋 (待克利，廠牌：Syngenta) 防治炭疽病害為例，每分地成本約需新台幣 140 元。雖然待克利的價格比幾丁寡醣低廉許多，但幾丁寡醣可以用於有機農業與友善農業，亦可以結合 IPM 與農業化學藥劑交錯使用，因此有其發展潛力。

在草莓植株的施用上，無論是受大眾歡迎的豐香品種或是目前普遍栽種的香水品種，施用幾丁寡醣皆可以預防其主要病害。由於豐香品種對炭疽病極為感病，而香水品種雖較耐炭疽病，但對葉枯病十分感病。研究結果發現，幾丁寡醣對於草莓炭疽病以及葉枯病皆有防治效果。因此，若栽種品種為豐香或是香水，在病害好發的季節可以預先施用幾丁寡醣作為保護劑，若病害嚴重發生，

則可以施用化學殺菌劑加以防治，達到減少病原菌抗藥性與農藥殘留的問題，
共同管理田間有害生物。



陸、結論



草莓是臺灣重要的經濟作物，作為溫帶作物生長在熱帶及亞熱帶交界的臺灣，容易受到氣候條件影響而飽受病原菌入侵，因而施用大量殺菌劑以防治多種病害。為了減輕大量化學農業藥劑所造成的環境汙染、農藥殘留等威脅人類生命健康的嚴重副作用，多加利用高安全性資材以降低化學藥劑使用量是勢不可擋的趨勢。

幾丁寡醣施用在香水品種草莓上，可以有效防治炭疽病以及葉枯病，但無法防治細菌性角斑病。對於炭疽病菌的壓器生成與葉枯病菌的孢子發芽而言，幾丁寡醣展現了顯著的抑菌的能力，說明了幾丁寡醣可以做為農業保護劑使用。此外，幾丁寡醣具有減少 ROS 累積並誘導宿主產生抗性的能力，可以藉由防禦相關酵素與抗氧化酵素活性的測定，以及葉片 DAB 染色得到證實。

幾丁寡醣除了提供有機農業及友善農業防治病害的新選擇，亦可以結合 IPM 與化學農業藥劑搭配使用。在做好耕作、物理及生物防治的前提下，於病害好發季節可以施用幾丁寡醣預防豐香品種易得的炭疽病以及嚴重肆虐香水品種的葉枯病，作為病害出現的防線。施用過程需正確且即時診斷害物與植株狀況，若田區受細菌性角斑病為害，則須暫時停用幾丁寡醣。相信如此一來，定可以為化學農藥減量與永續農業的目標盡一份心力。

柒、參考文獻

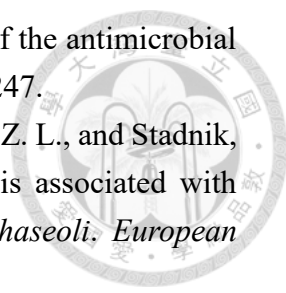
1. 王清玲。2010。作物蟲害非農藥防治資材。農試所特刊 142: 84-85。
2. 王偉玲、王展及王晶英。2010。植物過氧化物酶活性測定方法優化。實驗室研究與探索 29: 21-23。
3. 安寶貞、蔡志濃、徐子惠、楊正偉及林筑蘋。2012。草莓萎凋病之研究初報。中華民國植物病理學會會刊 21: 148-149。
4. 朱盛祺。2018。寡糖植物免疫調節疫苗於作物病害防治之應用。苗栗區農業專訊 84: 16-18。
5. 朱盛祺及鐘珮哲。2013。非農藥應用與草莓健康管理。苗栗區農業專訊 61: 14-16。
6. 吳岱融。2018。草莓種苗產業概況與市場契機。農友月刊 69: 22-25。
7. 吳岱融。2021。草莓產業品種與苗栗 1 號之育成。2021 草莓研發成果與產業應用研討會專輯 114-117。
8. 吳彰哲及黃瀚寧。2010。湛藍奇蹟：蝦蟹殼中的寶貝—幾丁質。科學發展 448: 12-19。
9. 吳竑毅、蔡季芸、吳意眉、鍾嘉綾及鐘珮哲。2021。臺灣草莓葉枯病之發生與鑑定。中華民國 109 年度植物病理學年會 5-6。
10. 吳岱融、鐘珮哲及李裕娟。2018。隔離生產之草莓種苗田間定植後炭疽病感病評估。苗栗區農業改良場研究彙報 7: 33-41。
11. 李敏郎。2009。植物殺菌劑之使用介紹。作物診斷與農藥安全使用手冊 6: 61-89。
12. 李豐在。2005。草莓灰黴病之防治策略。花蓮區農業專訊 54: 11-12。
13. 邵玲。2010。植物生理學實驗教學中 H_2O_2 可視化檢測方法的改進。植物生理學通訊 46: 385-387。
14. 林俊義、安寶貞、張清安、羅朝村及謝廷芳。2004。作物病害之非農藥防治。農業試驗所特刊 110。
15. 姚瑞禎。2014。草莓新病害—萎凋病。桃園區農業專訊 90: 10-11。
16. 徐巧芳、鄭婷文、陳冠勳、連怡婷、林政谷、黃卓君、夏凱及王惠亮。2020。由 *Neopestalotiopsis rosae* 引起之臺灣草莓新病害與藥劑篩選。植物醫學 62: 39-47。
17. 許永華。1984。草莓青枯病—台灣新紀錄的草莓病害。桃園區農業改良場研究彙報 2: 59-63。
18. 莊曉萍。2019。木瓜農藥減量管理成效彰 保護身體又有好收益。農傳媒。
19. 莊鈴木及吳孟玲。2005。非農藥防治應用：礦物油及生物防治。林業叢刊 170: 1-17。

20. 張雅玲、朱盛祺及王仁助。2014。處理非農藥防治資材對有機栽培草莓苗生育之影響。台灣農學會報 15: 39-53。
21. 張小莉、王鵬程及宋純鵬。2009。植物細胞過氧化氫的測定方法。植物學報 44: 103-106。
22. 張嘉滿、高景輝和王自存。2007。乙烯誘導芥藍葉片老化過程中之抗氧化反應。臺灣園藝 53: 427-400。
23. 陳冠霖、張碧芳及黃振文。2017。臺灣草莓萎凋病菌之生理生化特性分析。植物醫學 59: 13-22。
24. 陳澄河。2003。蝦蟹殼傳奇。科學發展 369: 62-67。
25. 陳玉芹、聶姬鋒、客紹英、陳桂平及宋麗莎。2008。不同倍性藍超氧化物歧化酶的活性變化。唐山師範學院學報 30: 44-47。
26. 黃德昌。2008。台灣作物細菌性病害防治要領。作物診斷與農藥安全使用技術手冊 142-161。
27. 彭淑貞。2002。利用草莓走莖檢測草莓青枯病菌技術。農政與農情 116。
28. 彭淑貞、姚瑞禎及李煜輝。2013。草莓白粉病 (*Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*) 防治藥劑篩選研究。苗栗改良場研究彙報 3: 33-42。
29. 曾獻嫻及陳保良。2021。草莓種苗病害驗證作業簡介。2021 草莓研發成果與產業應用研討會專輯 35-39。
30. 葉文彬。2010。幾丁聚醣之製備及其於農業之應用。臺中區農業改良場特刊 105: 127-131。
31. 劉增城。1998。草莓王國大湖鄉。苗栗區農業專訊 4。
32. 蔣永正。2011。植物對環境逆境之調控與應用。農政與農情 231。
33. 盧煜勝。2004。草莓栽培管理。行政院委員會苗栗區改良場技術手冊 1-13。
34. 簡怡文、邱燕欣、文紀鑾及張定霖。2021。草莓健康種苗之生產。2021 草莓研發成果與產業應用研討會專輯 11-22。
35. 羅國偉。2012。草莓田間管理技術。桃園區農業技術專輯-草莓專輯 9: 9-13。
36. 鐘珮哲。2016。草莓病害檢測技術之應用與發展。苗栗區農業專訊 76: 13-14。
37. 鐘珮哲及吳添益。2018a。草莓栽培管理技術降低炭疽病發生率之探討。苗栗區農業專訊 81: 1-3。
38. 鐘珮哲及吳添益。2018b。草莓大小葉，先釐清土壤或種苗帶菌—萎凋病緊急手術採「切除患部」，疾病預防採「土壤健康促進」。豐年雜誌 68: 88-93。
39. 鐘珮哲及吳竑毅。2020。草莓育苗病害管理策略。苗栗區農業專訊 89: 9-11。
40. 鐘珮哲、吳竑毅及曹嘉惠。2020。偵測潛伏感染期草莓炭疽病病原菌技術之研發。苗栗區農業改良場 研究彙報 9: 46-57。
41. 鐘珮哲及潘俊傑。2018。草莓苗培育經驗談。苗栗區農業專訊 81: 4-6。

42. 鐘珮哲、彭淑貞、張廣森、楊秀珠及余思葳。2012。草莓病蟲害之發生與管理。合理、安全及有效使用農藥輔導教材 1-31。
43. 鐘珮哲、黃勝泉、蔡正賢、吳添益、張訓堯、張素貞及吳登楨。2014。草莓健康管理生產體系之研究。102 年度重點作物健康管理生產體系及關鍵技術之研發成果研討會論文集 46-57。
44. Alburquenque, C., Bucarey, S.A., Neira-Carrillo, A., Urzúa, B., Hermosilla, G., and Tapia, C.V. 2010. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Medical Mycology* 48: 1018-1023.
45. Andreazza, F., E Vacacela Ajila, H., Haddi, K., Colares, F., Pallinia, A., and E Oliveira, E. 2018. Toxicity to and egg-laying avoidance of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) caused by an old alternative inorganic insecticide preparation. *Pest Management Science* 74: 861-867.
46. Amrutha, P., and Vijayarghavan, R. 2018. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf blight of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7: 622-628.
47. Ayoubi, N., and Soleimani, M. J. 2016. Strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotamica*. *Current Microbiology* 72: 329-336.
48. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
49. Boller T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 189-214.
50. Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., and Fallik, E. 2003. Controlling gray mold caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22: 285-290.
51. Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
52. Braun, P. G., and Hildebrand, P. D. 2013. Effect of sugar alcohols, antioxidants and activators of systemically acquired resistance on severity of bacterial angular leaf spot (*Xanthomonas fragariae*) of strawberry in controlled environment conditions. *Plant Pathology* 35: 20-26.
53. Bautista-Banos, S., Hernandez-Lopez, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum*

- gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
54. Bindoli, A., and Rigobello, M. P. 2013. Peroxidase biochemistry and redox signaling. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 407-412.
 55. Bestfleisch, M., Richter, K., Wensing, A., Wünsche, J.N., Hanke, M.-V., Höfer, M., Schulte, E., and Flachowsky, H. 2015. Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria* L.). *Plant Pathology* 64: 71-80.
 56. Bonin, M., Sreekumar, S., Cord-Landwehr, S., and Moerschbacher, B. M. 2020. Preparation of defined chitosan oligosaccharides using chitin deacetylases. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1-22.
 57. Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., and Kumar, N. S. 2020. Chitosan as an environment friendly biomaterial - a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 150: 1072-1083.
 58. Chun, S. C., and Chandrasekaran, M. 2019. Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato. *International Journal of Biological Macromolecules* 125: 948-954.
 59. Camacho, E., Chrissian, C., Cordero, R. J. B., Liporagi-Lopes, L., Stark, R. E., and Casadevall, A. 2017. N-acetylglucosamine affects *Cryptococcus neoformans* cell-wall composition and melanin architecture. *Microbiology* 163: 1540-1556.
 60. Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K., and Acharya, K. 2015. Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific Reports* 5: 1-14.
 61. Chong, J. X., Lai, S. J., Yang, H. S. 2015. Chitosan combined with calcium chloride impacts fresh-cut honeydew melon by stabilising nanostructures of sodium-carbonate-soluble pectin. *Food Control* 53 : 195-205.
 62. Cheong, Y. H., and Kim, M. C. 2010. Functions of MAPK cascade pathways in plant defense signaling. *Plant Pathology Journal* 26: 101-109.
 63. Chandrasekaran, M., Kim, K. D., and Chun, S. C. 2020. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: a review. *Processes* 8: 1-21.
 64. Chung, P. C., Wu, H. Y., Ariyawansa, H. A., Tzean, S. S., and Chung, C. L. 2019. First report of anthracnose crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. *Plant Disease* 103: 1775-1776.
 65. Chung, P. C., Wu, H. Y., Wang, Y. W., Ariyawansa, H. A., Hu, H. P., Hung, T. H., Tzean, S. S., and Chung, C. L. 2020. Diversity and pathogenicity of

- Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. *Scientific Reports* 10: 10664.
66. Daranas, N., Rosello, G., Cabrefiga, J., Donati, I., Frances, J., Badosa, E., Spinelli, F., Montesinos, E., and Bonaterra, A. 2019. Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Annals of Applied Biology* 174: 92-105.
67. Divya, K., Thampi, M., Vijayan, S., Varghese, S., and Jisha, M. S. 2020. Induction of defence response in *Oryza sativa* L. against *Rhizoctonia solani* (Kuhn) by chitosan nanoparticles. *Microbial Pathogenesis* 149: 1-7.
68. De Tender, C., Vandecasteele, B., Verstraeten, B., Ommeslag, S., De Meyer, T., De Visscher, J., Dawyndt, P., Clement, L., Kyndt, T., and Debode, J. 2021. Chitin in strawberry cultivation: foliar growth and defense response promotion, but reduced fruit yield and disease resistance by nutrient imbalances. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 34: 227-239.
69. Epstein, A. H. 1966. Angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease Report* 50: 167.
70. Embaby, E. M. 2007. First record of *Pestalotia* rot on strawberry plants in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology* 35: 89-90.
71. El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., and Asselin, A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82: 398-402.
72. El Gueddari, N. E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M., and Deising, H. B. 2002. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist* 156: 103-112.
73. Freeman, B. C., and Beattie, G. A. 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Pathology and Microbiology Publications* 94:1-12.
74. Fang, X. P., Chen, W. Y., Xin, Y., Zhang, H. M., Yan, C. Q., Yu, H., Liu, H., Xiao, W. F., Wang, S. Z., Zheng, G. Z., Liu, H. B., Jin, L., Ma, H. S., and Ruan, S. L. 2012. Proteomic analysis of strawberry leaves infected with *Colletotrichum fragariae*. *Journal of Proteomics* 75: 4074-4090.
75. Federico, L. M., Magdalena, M. U, Miriam, O. R. Vincent, M., Were, M. D., Fricker, G. L., Luis, V. L. L., and Nicholas, J. T. 2021. Chitosan inhibits septin-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in a protein kinase C and Nox1 NADPH oxidase-dependent manner. *New Phytologist* 230: 1578-1593.

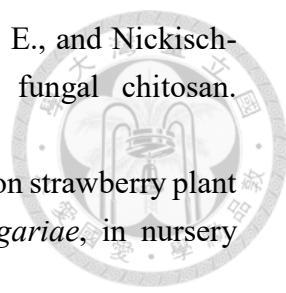
- 
76. Goy, R. C., de Britto, D., and Assis, O. B. G. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros-Ciencia E Tecnologia* 19: 241-247.
77. Garces-Fiallos, F. R., de Borba, M. C., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., and Stadnik, M. J. 2017. Delayed upward colonization of xylem vessels is associated with resistance of common bean to *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli*. *European Journal of Plant Pathology* 149: 477-489.
78. Gillings, M. R., Fahy, P. C., and Bradley, J. 1998. Identification of *Xanthomonas fragariae*, the cause of an outbreak of angular leaf spot on strawberry in South Australia, and comparison with the cause of previous outbreaks in New South Wales and New Zealand. *Plant Pathology* 27: 97-103.
79. Goya, R. C., Moraisb, S. T. B., and Assis, O. B. G. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 122-127.
80. Guo, X., Sun, T., Zhong, R., Ma, L., You, C., Tian, M., and Wang, C. W. 2018. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components. *Frontiers in Pharmacology* 9: 1-10.
81. He, Y. Q., Bose, S. K., Wang, W. X., Jia, X. C., Lu, H., and Yin, H. 2018. Pre-harvest treatment of chitosan oligosaccharides improved strawberry fruit quality. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 1-13.
82. Hassan, O., and Chang, T. 2017. Chitosan for eco-friendly control of plant disease. *Asian Journal of Plant Pathology* 11: 53-70.
83. Hyodo, H., and Fujinami, H. 1989. The effects of 2, 5-norbornadiene on the induction of the activity of 1-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase and of phenylalanine ammonia-lyase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant and Cell Physiology* 30: 857-860.
84. Hancock, J. F., Finn, C. E., Luby, J. J., Dale, A., Callow, P. W., and Serce, S. 2010. Reconstruction of the strawberry, *Fragaria xananassa*, using genotypes of *F. virginiana* and *F. chiloensis*. *Hortscience* 45: 1006-1013.
85. Howard, C. M., Maas, J. L., Chandler, C. K., and Albregts, E. E. 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease* 76: 976-981.
86. Hammerschmidt, R., Nuckles, E. M., and Kuc, J. 1982. Association of enhanced peroxidase-activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20: 73-82.

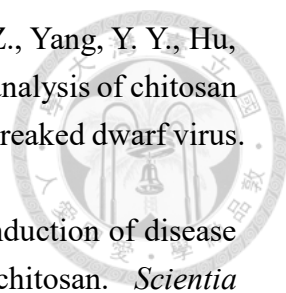
87. Hernández-Téllez, C. N., Plascencia-Jatomea, M., and Cortez-Rocha, M. O. 2016. Chapter 12 - chitosan-based bionanocomposites: development and perspectives in food and agricultural applications. *Academic Press* 315-338.
88. Huang, H. L., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., and Zhao, Y. 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-10.
89. Ishikawa, S. 2004. Simple diagnosis using ethanol immersion of strawberry plants with latent infection by *Colletotrichum acutatum*, *Dendrophoma obscurans*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Journal of General Plant Pathology* 70: 249-255.
90. Jung, W. J., and Park, R. D. 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Marine Drugs* 12: 5328-5356.
91. Jia, X. C., Qin, H. Q., Bose, S. K., Liu, T. M., He, J. X., Xie, S. Q., Ye, M. L., and Yin, H. 2020. Proteomics analysis reveals the defense priming effect of chitosan oligosaccharides in *Arabidopsis-Pst* DC3000 interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 149: 301-312.
92. Jogaiah, S., Satapute, P., De Britto, S., Konappa, N., and Udayashankar, A. C. 2020. Exogenous priming of chitosan induces upregulation of phytohormones and resistance against cucumber powdery mildew disease is correlated with localized biosynthesis of defense enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules* 162: 1825-1838.
93. Jia, X. C., Zeng, H. H., Wang, W. X., Zhang, F. Y., and Yin, H. 2018. Chitosan oligosaccharide induces resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis thaliana* by activating both salicylic acid- and jasmonic acid-mediated pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31: 1271-1279.
94. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., and Park, H. J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144: 51-63.
95. Kim, D. S., and Hwang, B. K. 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany* 65: 2295-2306.
96. Kumaraswamy, R. V., Kumaria, S., Choudhary, R. C. Palb, A., Raliyac, R., Biswas, P., and Saharan, V. 2018. Engineered chitosan based nanomaterials: bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. *International Journal of Biological Macromolecules* 113: 494-506.

97. Kuroki, M., Okauchi, K., Yoshida, S., Ohno, Y., Murata, S., Nakajima, Y., Taguchi, H., Saitoh, K., Teraoka, T., Narukawa, M., and Kamakura, T. 2017. Chitin-deacetylase activity induces appressorium differentiation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports* 7.
98. Kim, S. K., and Rajapakse, N. 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. *Carbohydrate Polymers* 62: 357-368.
99. Kato, M., and Shimizu, S. 1987. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany* 65: 729-735.
100. Lopez-Moya, F., Escudero, N., Zavala-Gonzalez, E. A., Esteve-Bruna, D., Blázquez, M. A., Alabadí, D., and Lopez-Llorca, L. V. 2017. Induction of auxin biosynthesis and *WOX5* repression mediate changes in root development in *Arabidopsis* exposed to chitosan. *Scientific Reports* 7: 16813.
101. Lin, W. L., Hu, X. Y., Zhang, W. Q., Rogers, W. J., and Cai, W. M. 2005. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *Plant Physiology* 162: 937-944.
102. Lee, D. S., and Je, J. Y. 2013. Gallic acid-grafted-chitosan inhibits foodborne pathogens by a membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:6574-6579.
103. Lowe, A., Rafferty-McArdle, S. M., and Cassells, A. C. 2012. Effects of AMF- and PGPR-root inoculation and a foliar chitosan spray in single and combined treatments on powdery mildew disease in strawberry. *Agricultural and Food Science* 21: 28-38.
104. Meier, U. 2001. Growth stages of mono-and dicotyledonous plants. *Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry*.
105. Ma, Z. X., Garrido-Maestu, A., and Jeong, K. C. 2017. Application, mode of action, and *in vivo* activity of chitosan and its micro and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. *Carbohydrate Polymers* 176: 257-265.
106. Wenneker, M., and Kanne, J. 2010. Effect of potassium bicarbonate on the control of powdery mildew (*Sphaerotheca mors-uvae*) of gooseberry (*Ribes uva-crispa*). *Journal of Semantics* 366-370.
107. Mertely, J. C., and Legard, D. E. 2004. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Disease* 88: 407-412.
108. Ma, B., Wang, J. H., Liu, C. Z., Hu, J. F., Tan, K. F., Zhao, F. Y., Yuan, M., Zhang J. H., and Gai, Z. J. 2019. Preventive effects of fluoro-substituted benzothiadiazole

- derivatives and chitosan oligosaccharide against the rice seedling blight induced by *Fusarium oxysporum*. *Plants-Basel* 8: 1-18.
109. Narula, K., Elagamey, E., Abdellatef, M. A. E., Sinha, A., Ghosh, S., Chakraborty, N., and Chakraborty, S. 2020. Chitosan-triggered immunity to *Fusarium* in chickpea is associated with changes in the plant extracellular matrix architecture, stomatal closure and remodeling of the plant metabolome and proteome. *Plant Journal* 103: 561-583.
110. Nelson, M., Gubler, W. D., and Shaw, D. V. 1996. Relative Resistance of 47 Strawberry cultivars to powdery mildew in California greenhouse and field environments. *Plant Disease* 80: 326-328.
111. Naveed, M., Phil, L., Sohail, M., Hasnat, M., Baig, M., Ihsan, A. U., Shumzaid, M., Kakar, M. U., Khan, T. M., Akabar, M., Hussain, M. I., and Zhou, Q. G. 2019. Chitosan oligosaccharide (COS): an overview. *International Journal of Biological Macromolecules* 129: 827-843.
112. Obregón, V. G., Meneguzzi, N., Ibañez, M., Lattar, T., and Kirschbaum, D. 2018. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. *Plant Disease* 102: 1856-1856.
113. Paulus, A. O. 1990. Fungal diseases of strawberry. *Hortscience* 25: 885-889.
114. Prasannath, K. 2017. Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. *Journal of Agricultural Sciences* 11: 38-48.
115. Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., and Dwivedi, U. N. 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 6: 1-16.
116. Pichyangkura, R., and Chadchawan, S. 2015. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196: 49-65.
117. Penet, L., Guyader, S., Petro, D., Salles, M., and Busslere, F. 2014. Direct splash dispersal prevails over indirect and subsequent spread during rains in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting yams. *PLoS ONE* 9.
118. Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 421-426.
119. Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J., and Lopez-Llorca, L. V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology* 104: 541-553.
120. Robinson, R. H. 1924. The preparation of spray materials. *Station Bulletin* 201: 4-6.

121. Roberts, P. D., Berger, R. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., and Stall, R. E. 1997. Disease progress, yield loss, and control of *Xanthomonas fragariae* on strawberry plants. *Plant Disease* 81: 917-921.
122. Romanazzi G., Feliziani E., and Sivakumar D. 2018. Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology* 9: 2745.
123. Rahman, M.H., Hjeljord, L.G., Aam, B.B., Sørli, M., and Tronsmo, A. 2015. Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *European Journal of Plant Pathology* 141: 147-158.
124. Roberts, P. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., Stall, R. E., and Berger, R. D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* 80: 1283-1288.
125. Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., and Parra-Robles, B. E. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease* 104: 2054-2059.
126. Smith, S. N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bulletin* 16: 97-120.
127. Sharp, R. G. 2013. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy* 3: 757-793.
128. Sharma, I., and Ahmad, P. 2014. Chapter 4 - catalase: a versatile antioxidant in plants. *Oxidative Damage to Plants Antioxidant Networks and Signaling* 131-148.
129. Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J. Y., Zuo, Q., Zhang, G. Z., Wang, Q., Yan, J. Y., Zhang, W., and Li, X. H. 2021. Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Protection* 147: 1-8.
130. Sakka, K., Kusaka, R., Kawano, A., Karita, S., Sukhumavasi, J., Kimura, T., and Ohmiya, K. 1998. Cloning and sequencing of the gene encoding chitinase ChiA from *Xanthomonas* sp. strain AK and some properties of ChiA. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86: 527-533.
131. Schmitz, I. M., McNamar, D. G., Scott, P. R., and Harris, K. M. 1992. "*Xanthomonas fragariae*". In quarantine pests for Europe. *Data Sheets on European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization* 829-833.

- 
132. Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., and Nickisch-Hartfiel, A. 2010. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 47:10-14.
 133. Turechek, W. W., and Peres, N. A. 2009. Heat treatment effects on strawberry plant survival and angular leaf spot, caused by *Xanthomonas fragariae*, in nursery production. *Plant Disease* 93: 299-308.
 134. Thordal-Christensen, H., Zhang, Z. G., Wei, Y. D., and Collinge, D. B. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11: 1187-1194.
 135. van der Wolf, J. M., Evenhuis, A., Kastelein, P., Krijger, M. C., Funke, V. Z., van den Berg, W., and Moene, A. F. 2018. Risks for infection of strawberry plants with an aerosolized inoculum of *Xanthomonas fragariae*. *European Journal of Plant Pathology* 152: 711-722.
 136. Wojdyla, A. T. 2012. Effect of vegetable and mineral oils on the germination of spores of *Diplocarpon rosae* Wolf. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus* 11: 143-156.
 137. Wyenandt A. 2020. *Neopestalotiopsis* - Something to scout for in fall-transplanted strawberry. *Plant & Pest Advisory*.
 138. Wu, H. Y., Lai, Q. J., Wu, Y. M., Chung, C. L., Chung, P. C., and Lin N. C. 2021a. First report of *Xanthomonas fragariae* causing angular leaf spot on strawberry (*Fragaria × ananassa*) in Taiwan. *Plant Disease* 105: 1187.
 139. Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., and Chung, P. C. 2021b. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Disease* 105: 487.
 140. Wen, H., Wei, J., Zhang, G., Bi, Y., and Yan, Z. 2019. Laboratory toxicity of nine fungicides against *Neopestalotiopsis clavispora*. *Chinese Journal of Pesticide Science* 21: 437-443.
 141. Xing, K., Zhu, X., Peng, X., and Qin, S. 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 569-588.
 142. Yin, H., Li, Y., Zhang, H. Y., Wang, W. X., Lu, H., Grevsen, K., Zhao, X., and Du, Y. G. 2013. Chitosan oligosaccharides-triggered innate immunity contributes to oilseed rape resistance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *International Journal of Plant Sciences* 174: 722-732.

- 
143. Yang, A. M., Yu, L., Chen, Z., Zhang, S. X., Shi, J., Zhao, X. Z., Yang, Y. Y., Hu, D. Y., and Song, B. A. 2017. Label-free quantitative proteomic analysis of chitosan oligosaccharide-treated rice infected with southern rice black-streaked dwarf virus. *Viruses-Basel* 9: 1-16.
144. Zeng, K. F., Deng, Y. Y., Ming, J. A., and Deng, L. L. 2010. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. *Scientia Horticulturae* 126: 223-228.
145. Zhu, X., Wang, Q. M., Cao, J. K., and Jiang, W. B. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *Food Processing and Preservation* 32: 770-784.
146. Zhu, X. F., Zhou, Y., and Feng, J. I. 2007. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 8: 831-838.
147. Zhou, Y. H., Zhang, L., and Zeng, K. F. 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biological Control* 96: 39-47.

捌、圖表集

表一、草莓苗之炭疽病病害嚴重度分級表

Table 1. Symptoms of each severity scale in a 6-scale scoring system used for assessment of disease severity of anthracnose on strawberry seedlings.

Scale	Symptom	Severity
	Anthracnose	% of lesion
0		Healthy
1		1~10% leaf area with lesions
2		11~25% leaf area with lesions
3		25~50% leaf area with lesions
4		50~75% leaf area with lesions
5		75~100% leaf are with lesions

表二、 草莓苗之葉枯病病害嚴重度分級表

Table 2. Symptoms of each severity scale in a 6-scale scoring system used for assessment of disease severity of leaf blight on strawberry seedlings.

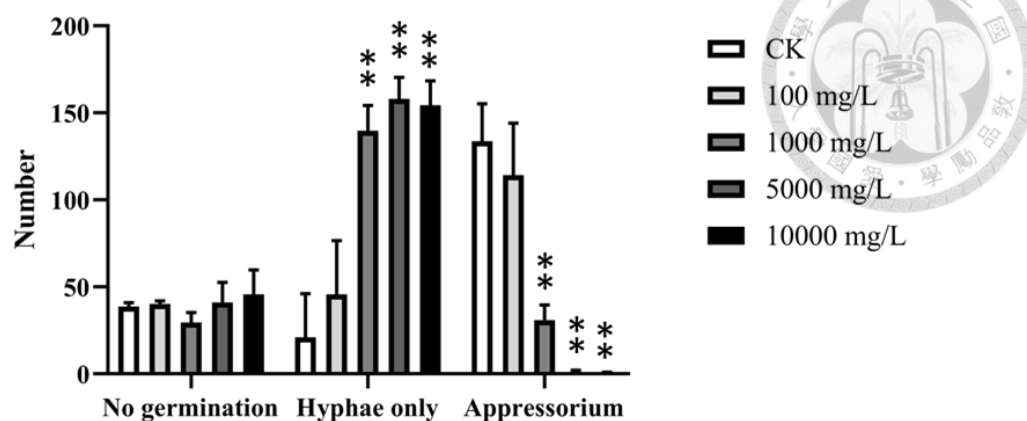
Scale	Symptom	Severity
	Leaf blight	% of lesion
0		Healthy
1		1~10% leaf area with lesions
2		11~25% leaf area with lesions
3		25~50% leaf area with lesions
4		50~75% leaf area with lesions
5		75~100% leaf are with lesions

表三、 草莓苗之細菌性角斑病病害嚴重度分級表

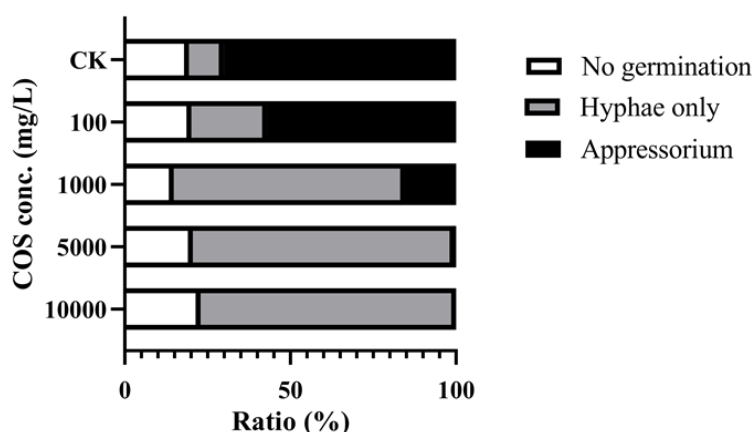
Table 3. Symptoms of each severity scale in a 6-scale scoring system used for assessment of disease severity of bacterial angular leaf spot of strawberry seedlings.

Scale	Symptom	Severity
	Bacterial angular leaf spot	% of lesion
0		Healthy
1		1~10% leaf area with lesions
2		11~25% leaf area with lesions
3		25~50% leaf area with lesions
4		50~75% leaf area with lesions
5		75~100% leaf are with lesions

(A)



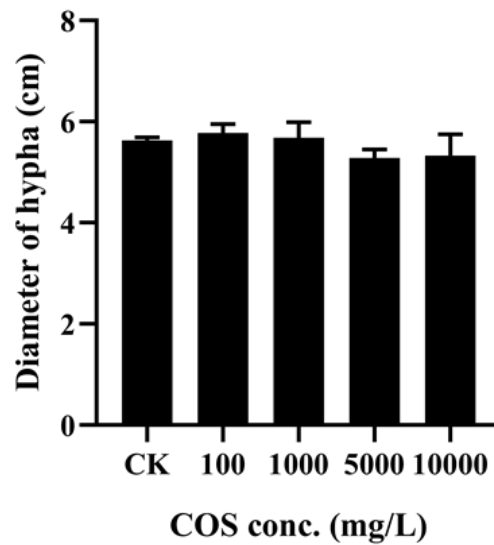
(B)



圖一、不同濃度幾丁寡糖對草莓炭疽病菌孢子發芽與壓器產生之影響

Figure 1. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on spores germination and appressorium formation of *Colletotrichum siamense* ML133.

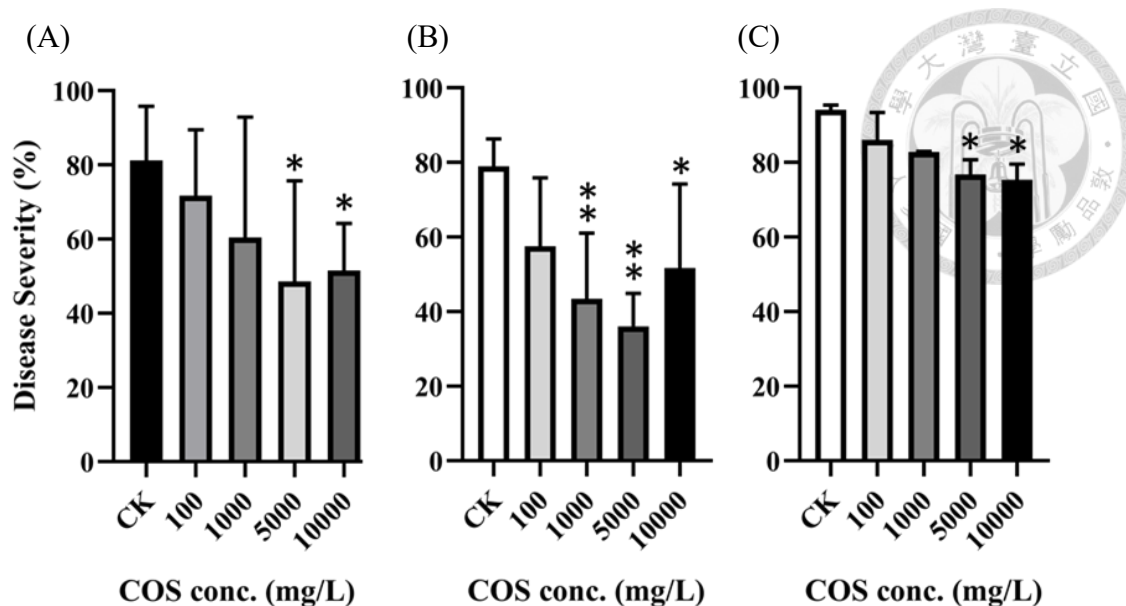
The number (A) and the percentage (B) of ungerminated spores (No germination) and germinated spores without (Hyphae only) and with appressorium (Appressorium) of *C. siamense* ML133 in 200 randomly-picked spores after 24 hours treatment with different concentrations of COS. Data were analyzed by the analysis of variance (ANOVA) with $P < 0.01$. Three independent experiments were performed with three replicates for each treatment ($n = 3$). Asterisks “*” and “**” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).



圖二、不同濃度幾丁寡糖對草莓炭疽病菌菌絲生長之影響

Figure 2. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on hyphal growth of *Colletotrichum siamense* ML133.

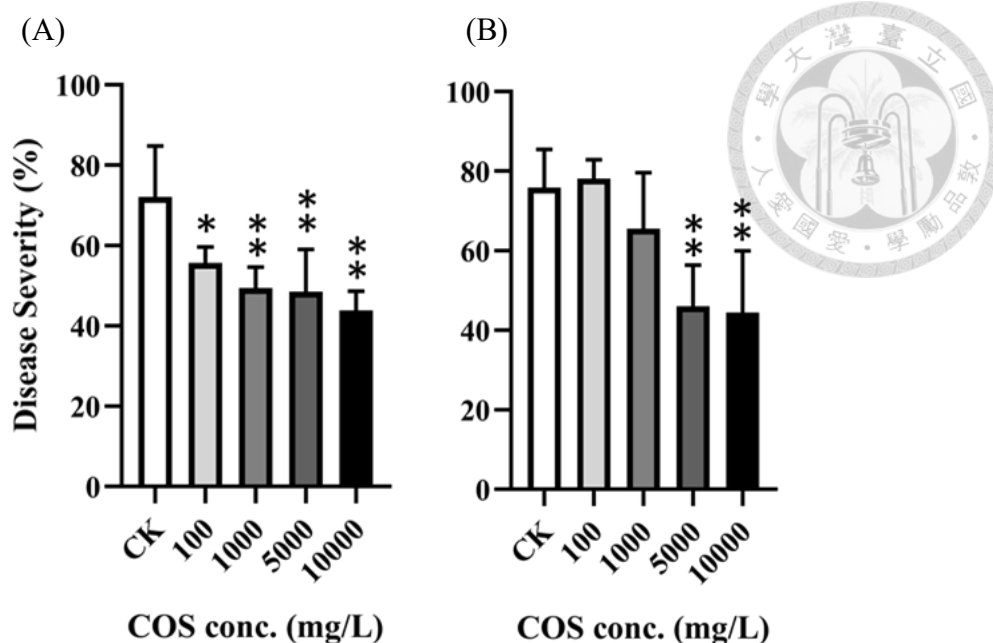
The hyphal growth inhibition assay of COS was performed on potato dextrose agar (PDA) supplemented with different concentrations of COS. A 0.75 cm-diameter agar plug cut from the edge of *C. siamense* ML133 hypha was inoculated at the center of each plate. The hyphal diameter was measured 6 days after incubation at 28 °C under dark. Data were analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with four replicates for each treatment (n = 4).



圖三、 草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓炭疽病抗性之影響

Figure 3. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Colletotrichum siamense* ML133 using micropropagated strawberry seedlings.

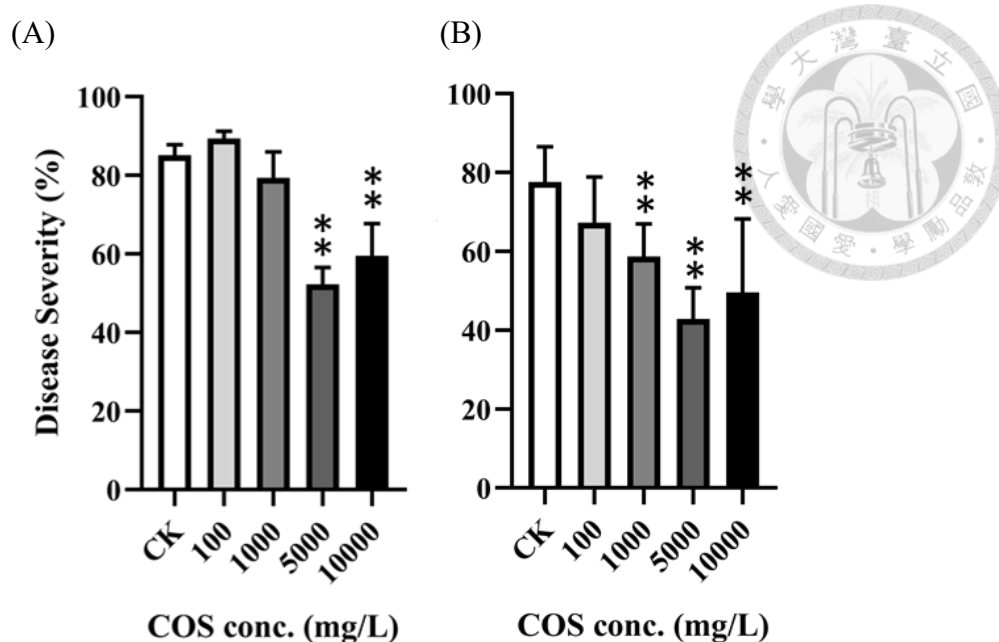
Disease severity caused by *C. siamense* ML133 on 5-week-old strawberry plants pretreated with COS 1 hour (A) and 1 week (B and C) before spray inoculation of *C. siamense* ML133. Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed once (A and C) or 3 times with 1-week interval (B) on micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as control (CK). One hour or one week after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) was monitored every day, and disease severity was recorded at 6-day post inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment. Asterisks “*” and “**” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).



圖四、草莓走莖苗預施用不同濃度幾丁寡糖對草莓炭疽病抗性之影響

Figure 4. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Colletotrichum siamense* ML133 using strawberry seedlings from runner.

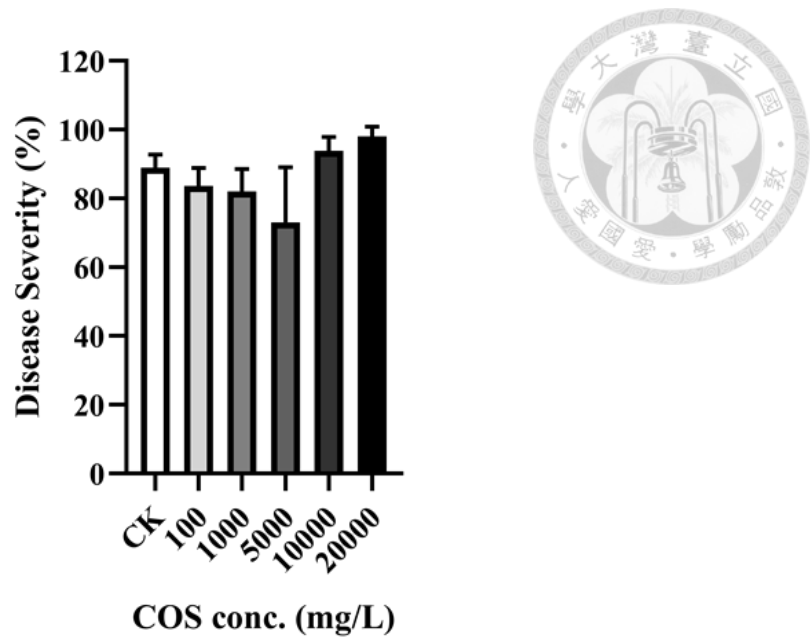
Disease severity caused by *C. siamense* ML133 on strawberry plants pretreated with COS 1 hour (A) and 1 week (B) before spray inoculation of *C. siamense* ML133. Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed once (A) or 3 times with 1-week interval (B) on strawberry seedlings from runners. ddH₂O was used as control (CK). One hour or one week after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) was monitored every day, and disease severity was recorded at 6-day post inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment. Asterisks “*” and “**” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).



圖五、草莓組織培養苗與草莓走莖苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓炭疽病抗性之效期評估

Figure 5. Evaluation of validity of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Colletotrichum siamense* ML133 using micropropagated strawberry seedlings and strawberry seedlings from runner.

Disease severity caused by *C. siamense* ML133 on strawberry plants pretreated with COS 2 weeks before spray inoculation of *C. siamense* ML133. Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed 3 times with 1-week interval on micropropagated strawberry seedlings (A) and strawberry seedlings from runners (B). ddH₂O was used as control (CK). Two weeks after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) was monitored every day, and disease severity was recorded at 6-day post inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) (n = 5), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment. Asterisks “*” and “**” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).

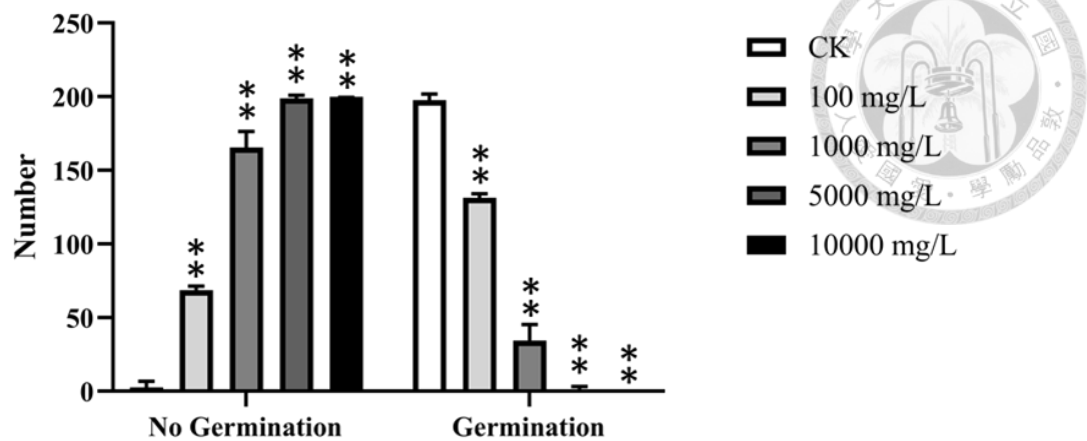


圖六、幾丁寡糖對炭疽病治療效果評估

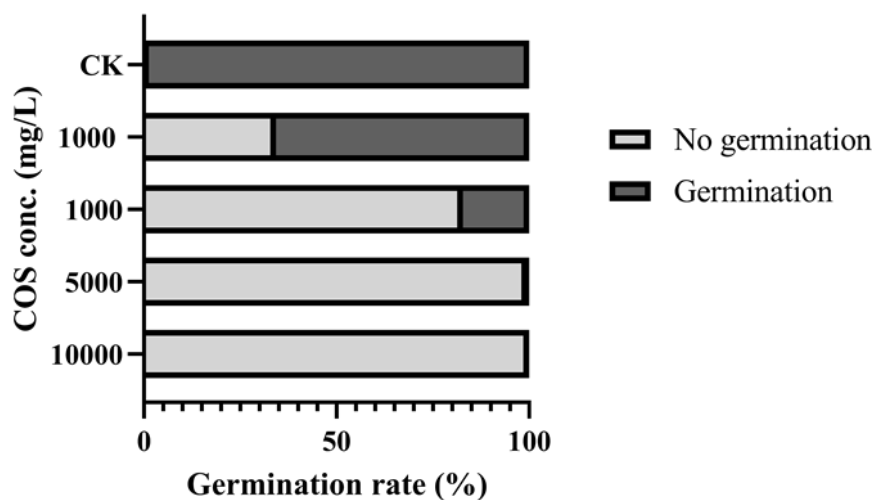
Figure 6. Therapeutic effectiveness of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Colletotrichum siamense* ML133 using micropropagated strawberry seedlings.

Disease severity caused by *C. siamense* ML133 on 5-week-old strawberry plants treated with COS after spray inoculation of *C. siamense* ML133. Different concentrations (100, 1000, 5000, 10000 and 20000 mg/L) of COS were sprayed once after the symptoms of anthracnose appearing on micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as control (CK). Strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) was monitored every day, and disease severity was recorded at 6-day post inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment.

(A)



(B)

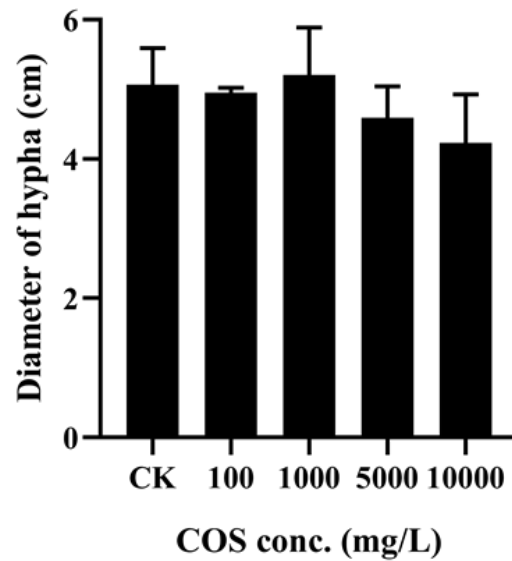


圖七、不同濃度幾丁寡糖對草莓葉枯病菌孢子發芽之影響

Figure 7. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on spores germination of *Neopestalotiopsis rosae* ML2411.

The number (A) and the percentage (B) of ungerminated spores (No germination) and germinated spores (Germination) of *N. rosae* ML2411 in 200 randomly-picked spores after 24 hours treatment with different concentrations of COS.

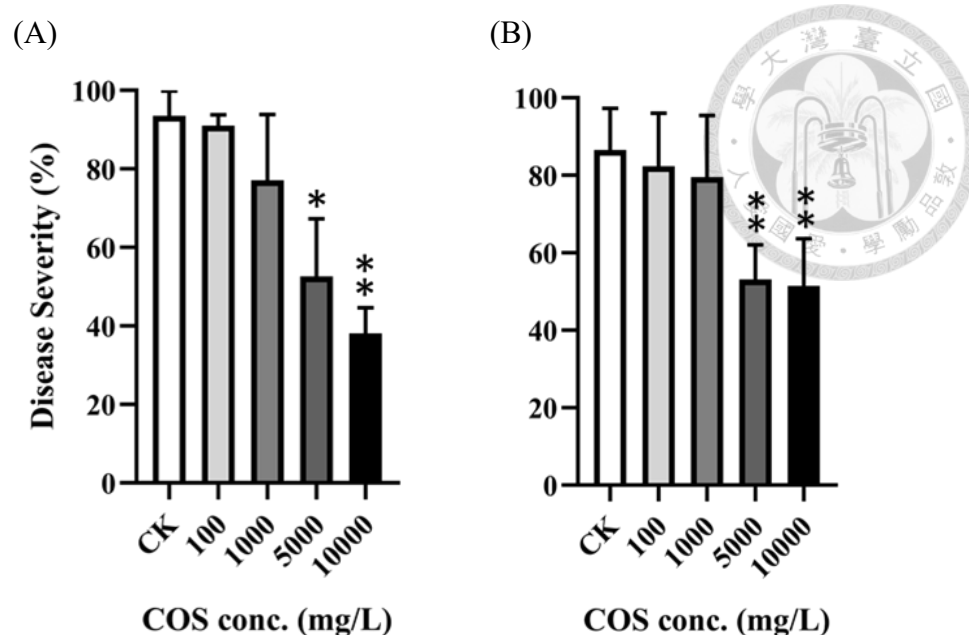
Changes were analyzed by the analysis of variance (ANOVA) with $P < 0.01$. Three independent experiments were performed with three replicates for each treatment ($n = 3$). Asterisks “*” and “***” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).



圖八、不同濃度幾丁寡糖對草莓葉枯病菌菌絲生長之影響

Figure 8. Effect of chitosan oligosaccharide at different concentrations on hyphal growth of *Neopestalotiopsis rosae* ML2411.

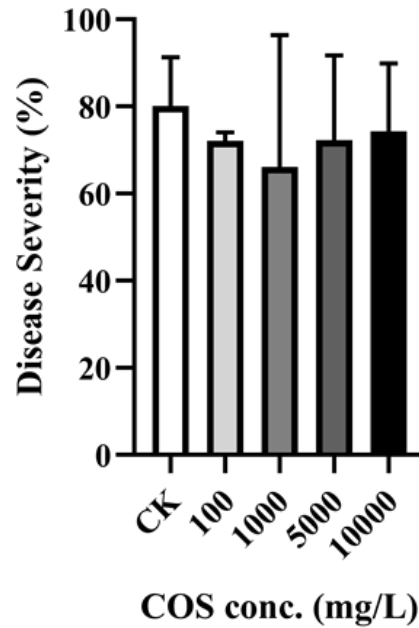
The hyphal growth inhibition assay of COS was performed on potato dextrose agar (PDA) supplemented with different concentrations of COS. A 0.75 cm-diameter agar plug cut from the edge of *N. rosae* ML2411 hypha was inoculated at the center of each plate. The hyphal diameter was measured 6 days after incubation at 25 °C under dark. Data were analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with four replicates for each treatment (n = 4).



圖九、草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡糖對草莓葉枯病抗性之影響

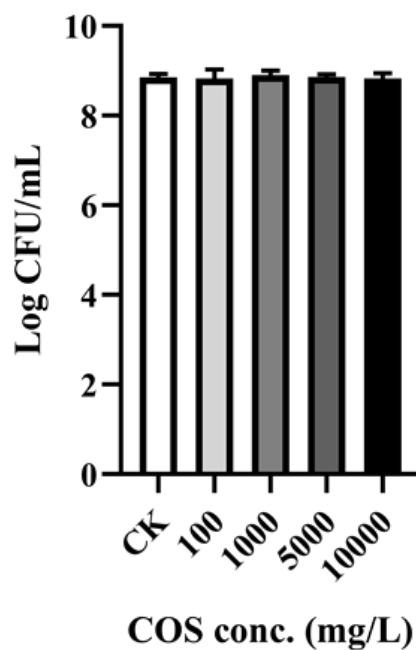
Figure 9. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Neopestalotiopsis rosae* ML2411 using micropropagated strawberry seedlings.

Disease severity caused by *N. rosae* ML2411 on 5-week-old strawberry plants pretreated with COS 1 hour (A) and 1 week (B) before spray inoculation of *N. rosae* ML2411. Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed once (A) or 3 times with 1-week interval (B) on micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as control (CK). One hour or one week after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *N. rosae* ML2411. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 23 ± 2 °C) was monitored every day, and disease severity was recorded at 14-day post inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment. Asterisks “*” and “**” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).



圖十、 草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡糖對草莓葉枯病抗性之效期評估
Figure 10. Evaluation of validity of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Neopestalotiopsis rosae* ML2411 using micropropagated strawberry seedlings.

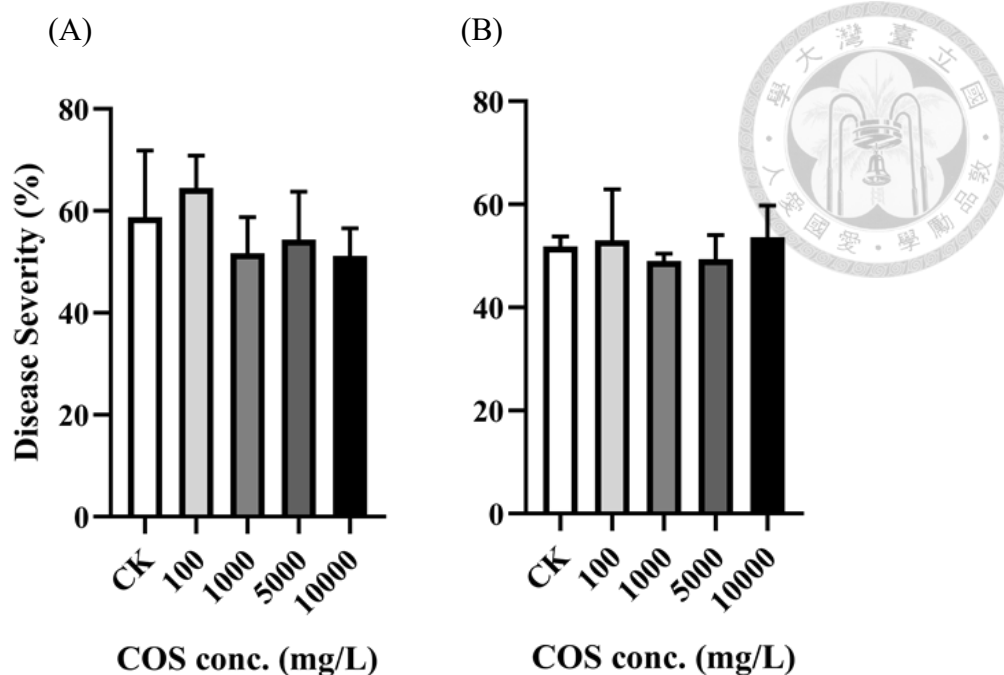
Disease severity caused by *N. rosae* ML2411 on 5-week-old strawberry plants pretreated with COS 2 weeks before spray inoculation of *N. rosae* ML2411. Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed 3 times with 1-week interval on micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as control (CK). One week after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *N. rosae* ML2411. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 23 ± 2 °C) was monitored every day, and disease severity was recorded at 14-day post inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment.



圖十一、不同濃度幾丁寡糖對草莓細菌性角斑病菌生長之影響

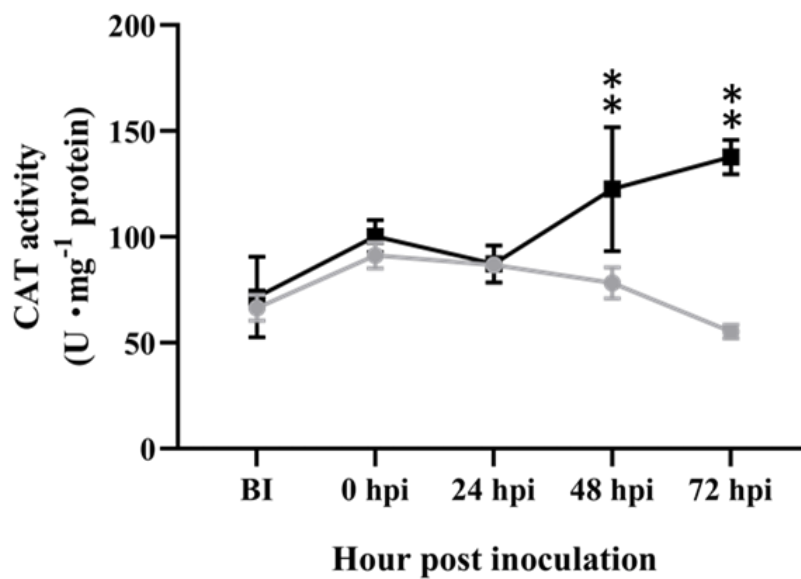
Figure 11. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on bacterial growth of *Xanthomonas fragariae* B001.

Cells of *X. fragariae* were collected from 5-day culture, washed and adjusted to O.D = 1 (1×10^9 CFU/mL). Serial dilution was carried out and aliquot of each dilution was plated on sucrose peptone agar (SPA) supplemented with different concentrations of COS. All plates were incubated at 20 °C for 5 days and bacterial number grown on each plate was calculated. Data were represented as mean and standard deviation (SD) (n = 4), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with four replicates for each treatment.



圖十二、組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病抗性之影響
Figure 12. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Xanthomonas fragariae* B001 using micropropagated strawberry seedlings.

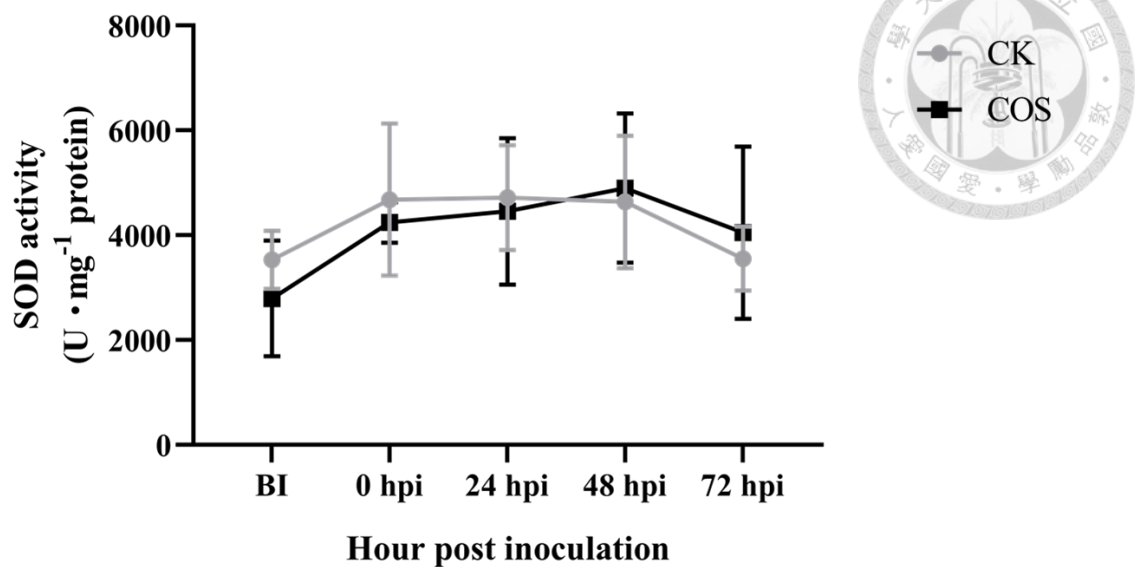
Disease severity caused by *X. fragariae* B001 on 5-week-old strawberry plants pretreated with COS 1 hour (A) and 1 week (B) before spray inoculation of *X. fragariae* B001. Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed once (A) or 3 times with 1-week interval (B) on micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as control (CK). One hour or one week after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with bacterial suspension (1×10^9 CFU/mL) of *X. fragariae* B001. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 23 ± 2 °C) was monitored every day, and disease severity was recorded at 14-day post inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment.



圖十三、組織培養苗預處理幾丁寡醣後接種炭疽病菌對草莓抗氧化酵素過氧化氫酶活性之影響

Figure 13. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) pretreatment and after inoculation of *Colletotrichum siamense* ML133 on the catalase (CAT) activity in micropropagated strawberry seedlings.

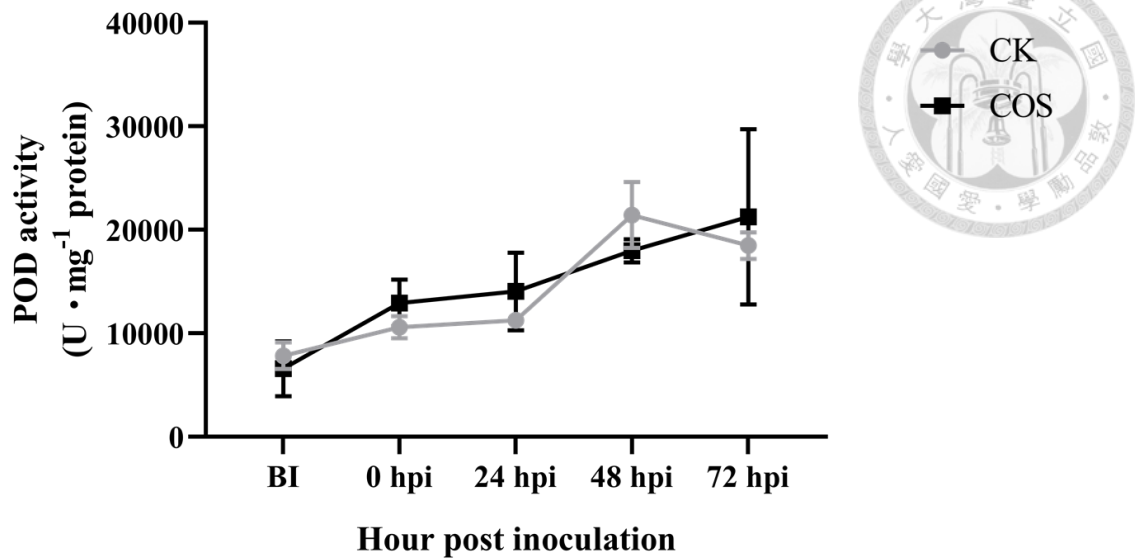
One week after pretreatment of water (CK) or 5000 mg/L COS (COS) 3 times with 1-week interval, strawberry plants were sprayed with water or spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease developed in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) and leaves were collected before inoculation (BI) and 0, 24, 48 and 72 hours after *C. siamense* ML133 inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment. Asterisks “*” and “**” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).



圖十四、組織培養苗預處理幾丁寡醣後接種炭疽病菌對草莓抗氧化酵素超氧化物歧化酶活性之影響

Figure 14. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) retreatment and after inoculation of *Colletotrichum siamense* ML133 on the superoxide dismutase (SOD) activity in micropropagated strawberry seedlings.

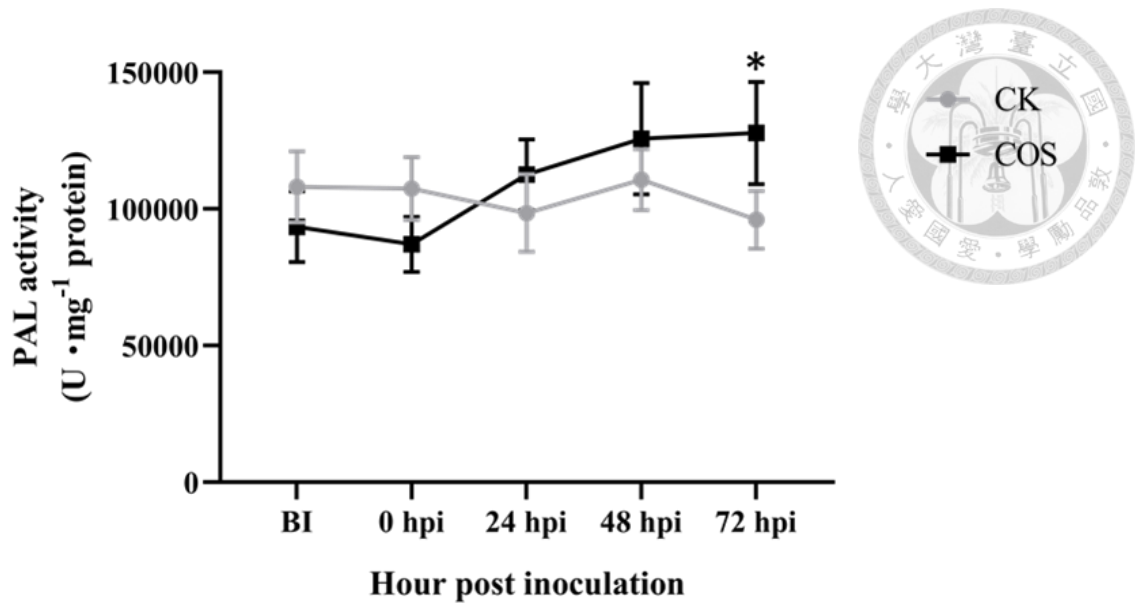
One week after pretreatment of water (CK) or 5000 mg/L COS (COS) 3 times with 1-week interval, strawberry plants were sprayed with water or spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease developed in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) and leaves were collected before inoculation (BI) and 0, 24, 48 and 72 hours after *C. siamense* ML133 inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment.



圖十五、組織培養苗預處理幾丁寡醣後接種炭疽病菌對草莓抗氧化酵素過氧化酶活性之影響

Figure 15. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) pretreatment and after inoculation of *Colletotrichum siamense* ML133 on the peroxidase (POD) activity in micropropagated strawberry seedlings.

One week after pretreatment of water (CK) or 5000 mg/L COS (COS) 3 times with 1-week interval, strawberry plants were sprayed with water or spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease developed in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) and leaves were collected before inoculation (BI) and 0, 24, 48 and 72 hours after *C. siamense* ML133 inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment.

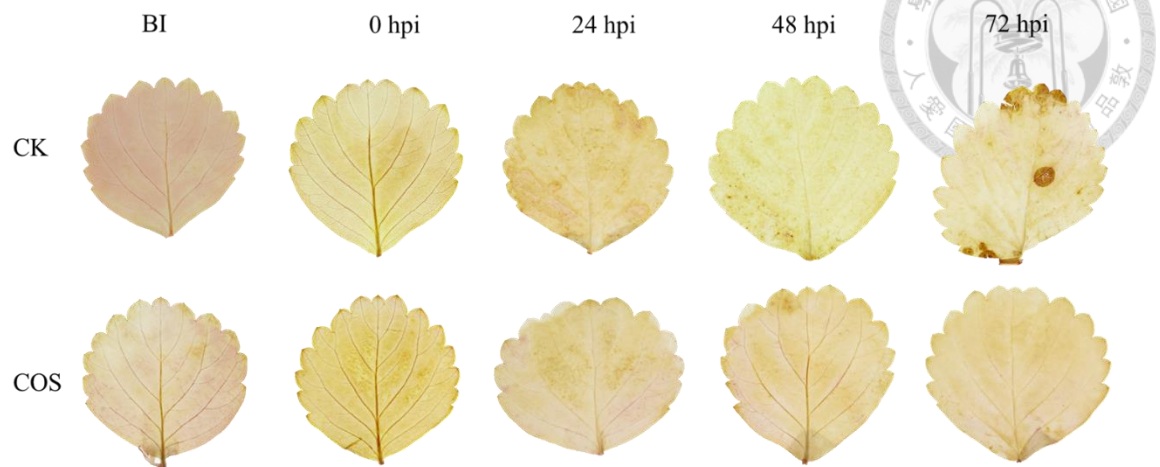


圖十六、組織培養苗預處理幾丁寡醣後接種炭疽病菌對草莓防禦性酵素苯丙胺酸裂解酶活性之影響

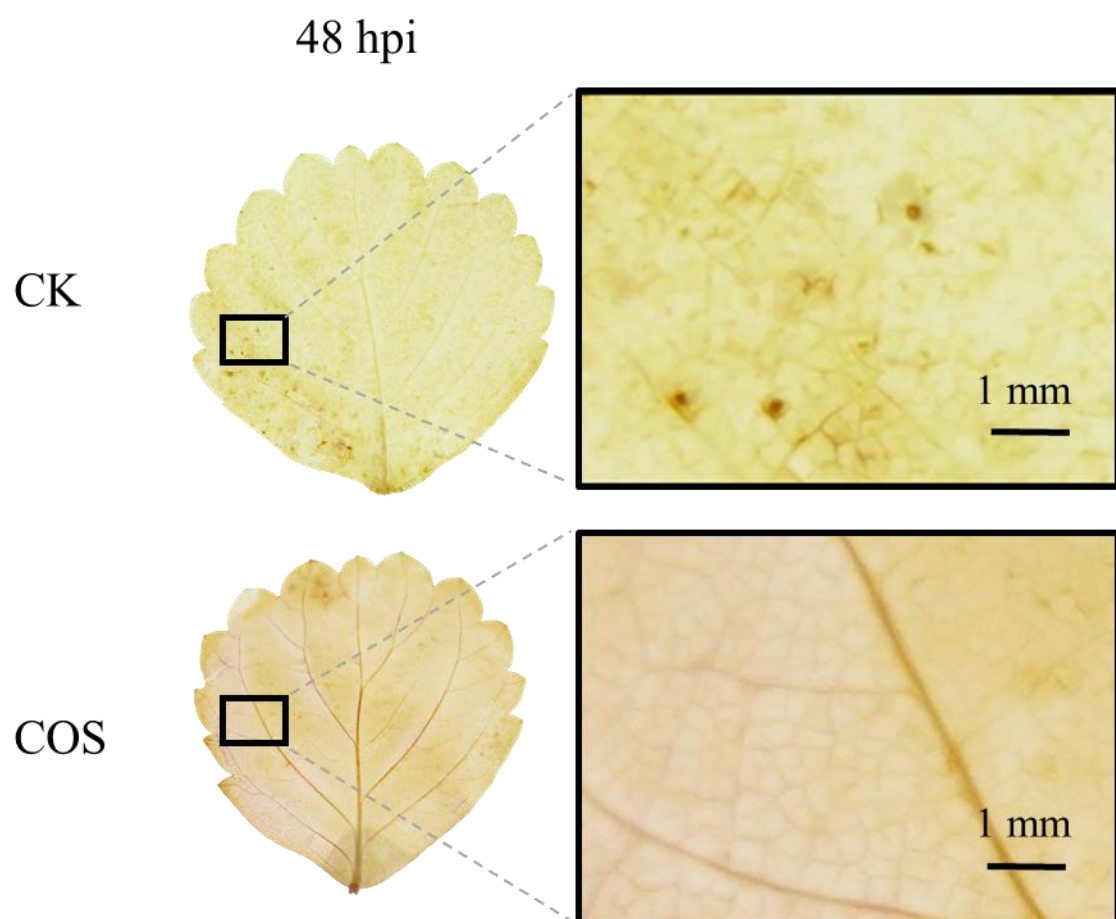
Figure 16. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) pretreatment and after inoculation of *Colletotrichum siamense* ML133 on the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in micropropagated strawberry seedlings.

One week after pretreatment of water (CK) or 5000 mg/L COS (COS) 3 times with 1-week interval, strawberry plants were sprayed with water or spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease developed in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) and leaves were collected before inoculation (BI) and 0, 24, 48 and 72 hours after *C. siamense* ML133 inoculation. Data were represented as mean and standard deviation (SD) ($n = 5$), and analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Three independent experiments were performed with five replicates for each treatment. Asterisks “*” and “**” indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between control and COS-treated groups, respectively, determined by Tukey’s studentized range test (Honestly significant difference, HSD).

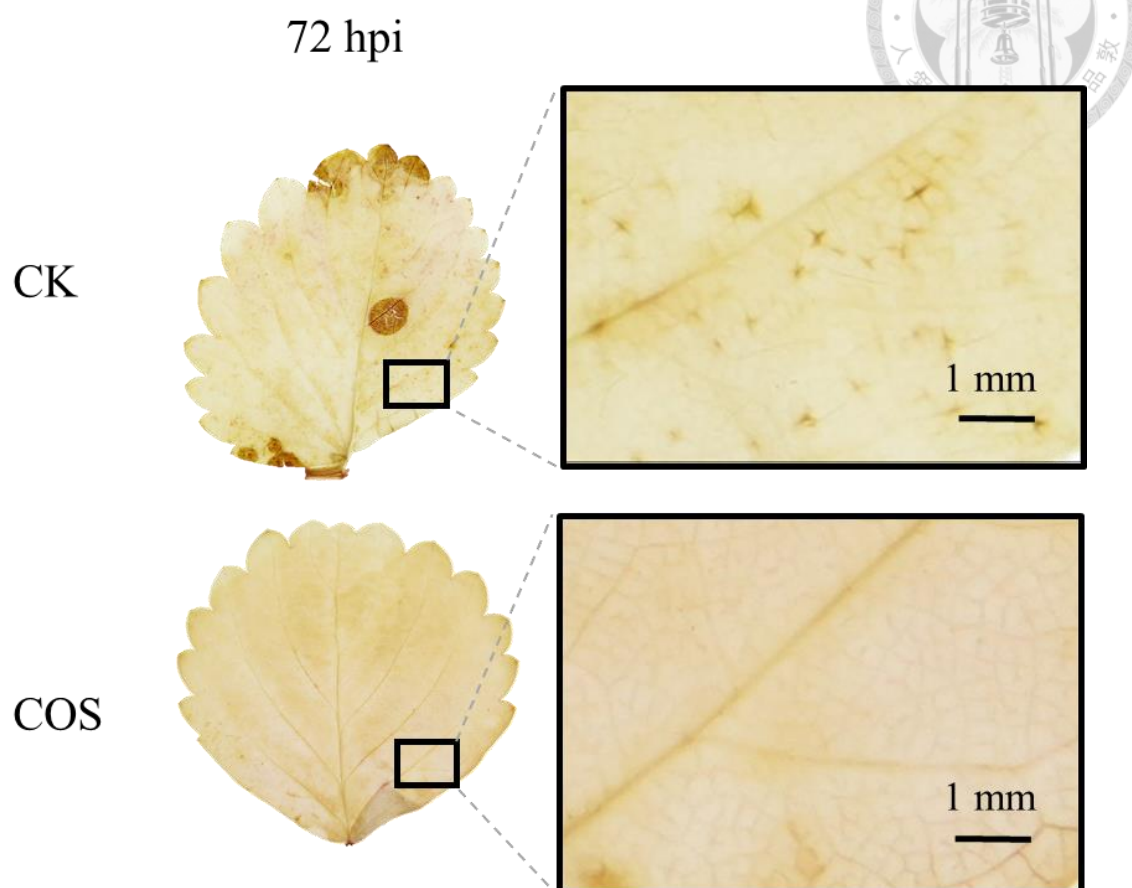
(A)



(B)



(C)

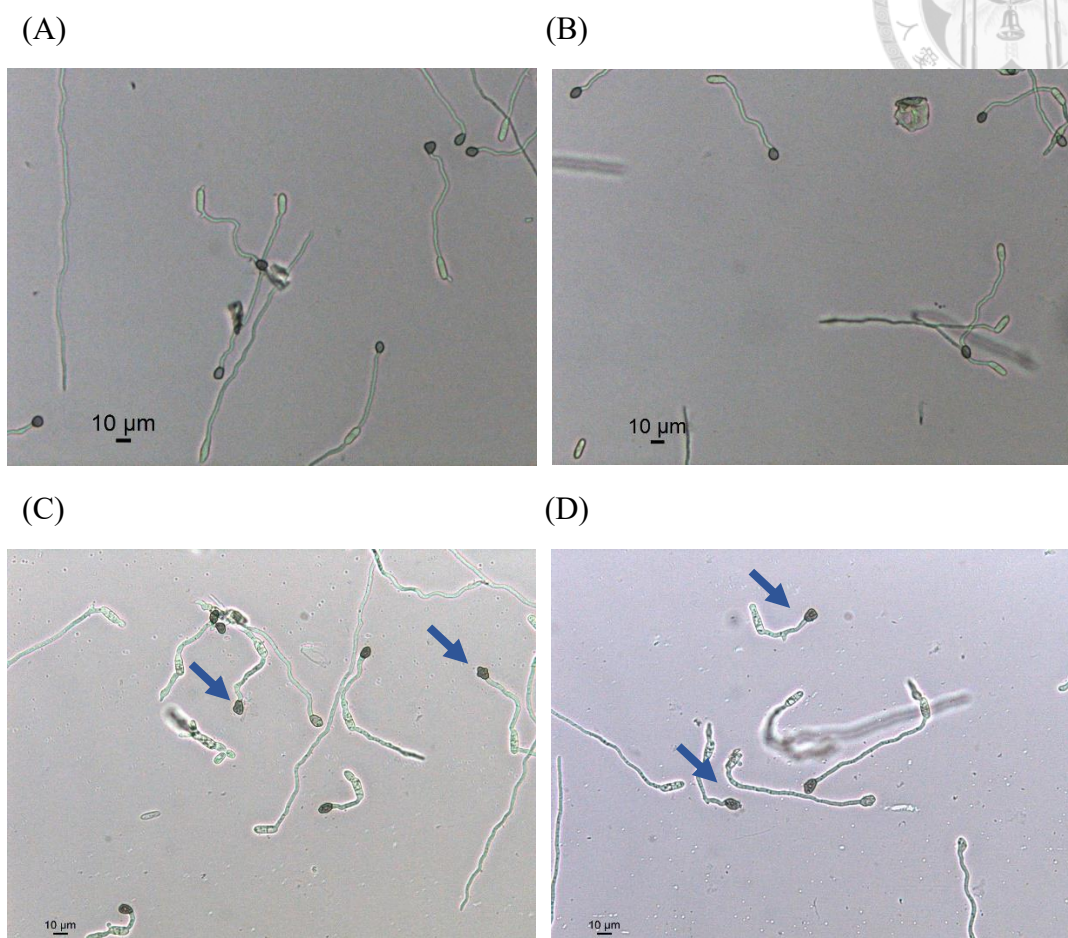


圖十七、幾丁寡糖可降低炭疽病菌在草莓葉片中誘導的 H_2O_2 累積

Figure 17. Pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) can reduce H_2O_2 accumulation in strawberry leaves inoculated with *Colletotrichum siamense* ML133.

Micropropagated strawberry seedlings were sprayed with water (CK) or 5000 mg/L COS (COS) once a week for 3 weeks. One week after the last application of COS, strawberry plants were sprayed with water or inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease was developed in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, $28 \pm 2^\circ\text{C}$), and leaves were collected at 0, 24, 48 and 72 hours after *C. siamense* ML133 inoculation and before inoculation (BI) for checking H_2O_2 accumulation (A). The third leaf of each plant was excised and the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) was evaluated by a 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) staining method. Magnified images of leaflets from plants 48 hours (B) and 72 hours (C) after inoculation of *C. siamense* ML133 and stained with DAB.

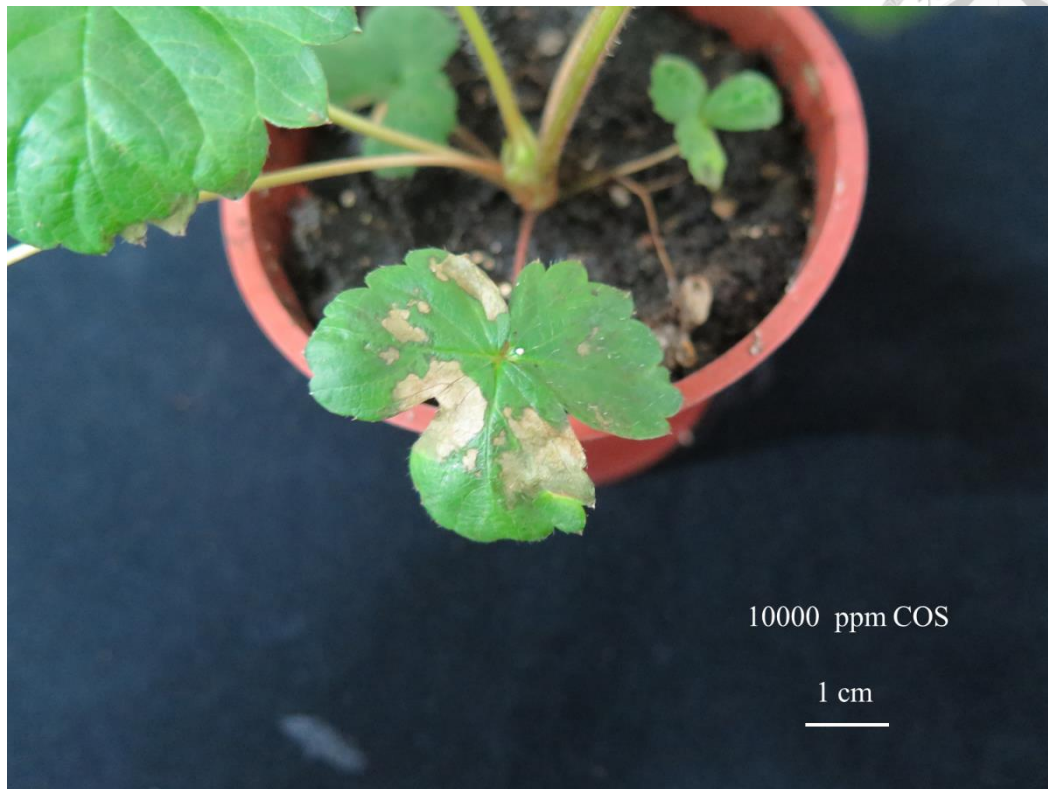
玖、附錄



附圖一、處理幾丁寡糖導致炭疽病菌孢子壓器變形

Supplementary Figure 1. Treatment of chitosan oligosaccharide (COS) on *Colletotrichum siamense* ML133 spores caused deformation of the appressoria.

Spores of *C. siamense* ML133 24 hours after treatment without (A) and with 100 (B)、1000 (C) and 5000 mg/L (D) of COS. The deformed appressoria were indicated by arrows.

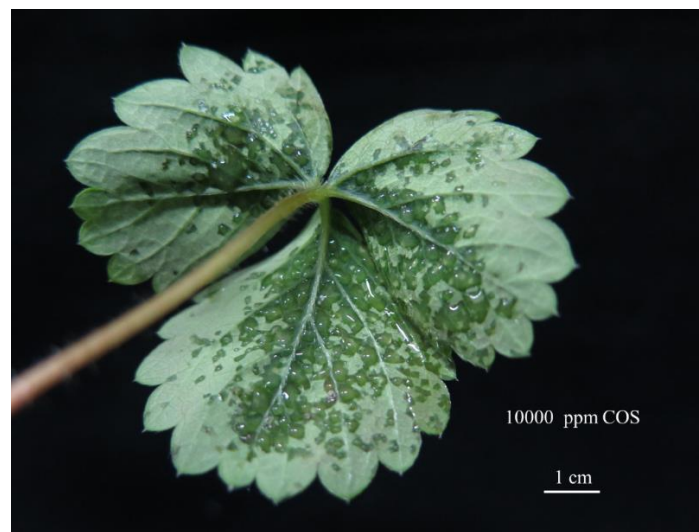


附圖二、每週施用一次 10000 mg/L 幾丁寡醣，三週後，組織培養苗出現焦枯病徵

Supplementary Figure 2. Scorch-like symptoms on leaves of micropropagated strawberry seedlings treated with 10000 mg/L chitosan oligosaccharide (COS) once a week for three times.

This photograph was taken 7 days after the last application of COS.

(A)



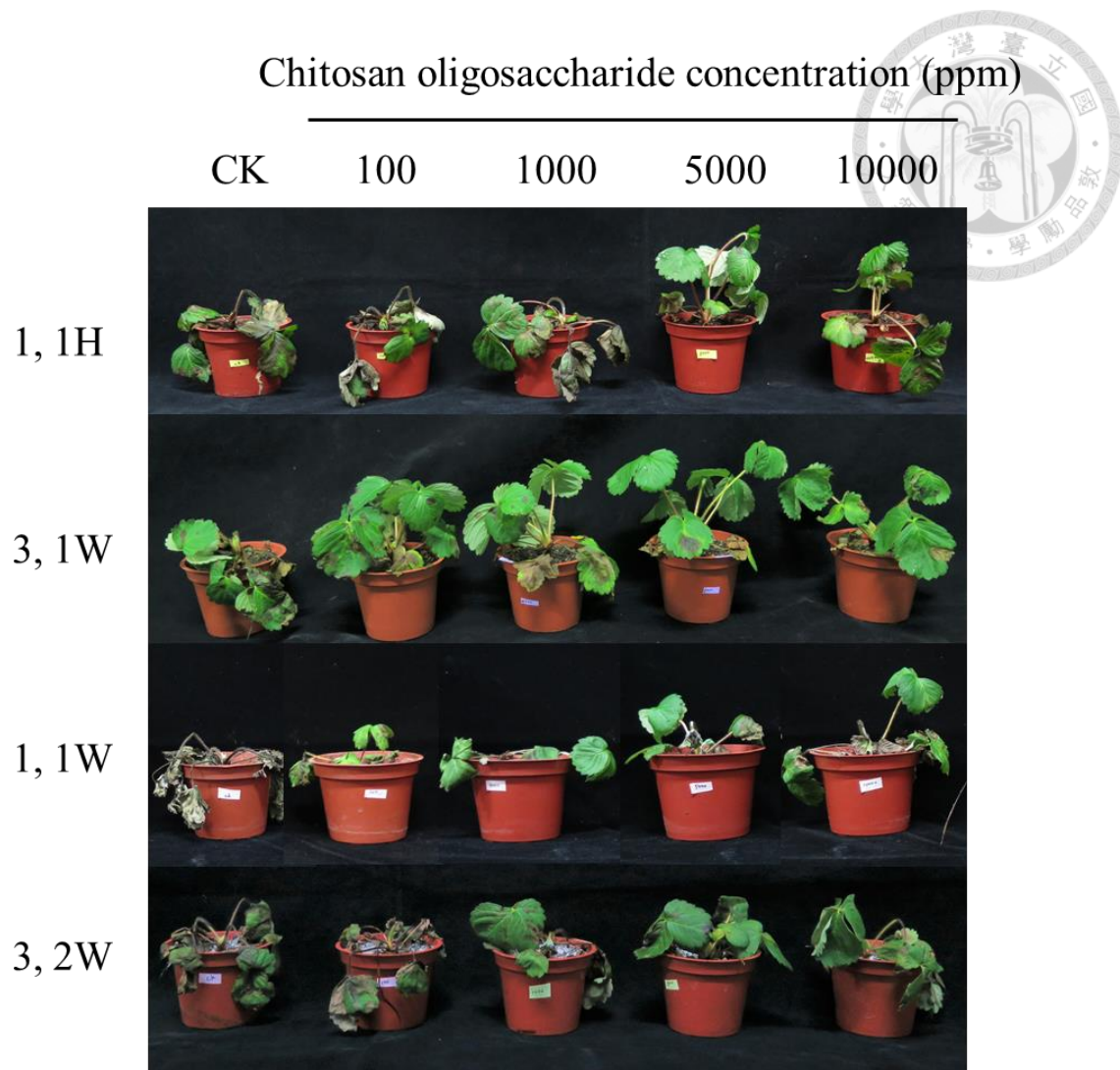
(B)



附圖三、連施三週 10000 mg/L 幾丁寡醣後接種細菌性角斑病菌之病徵

Supplementary Figure 3. Symptoms of strawberry leaves pretreated with 10000 mg/L chitosan oligosaccharide (COS) three times after inoculation of *Xanthomonas fragariae* B001.

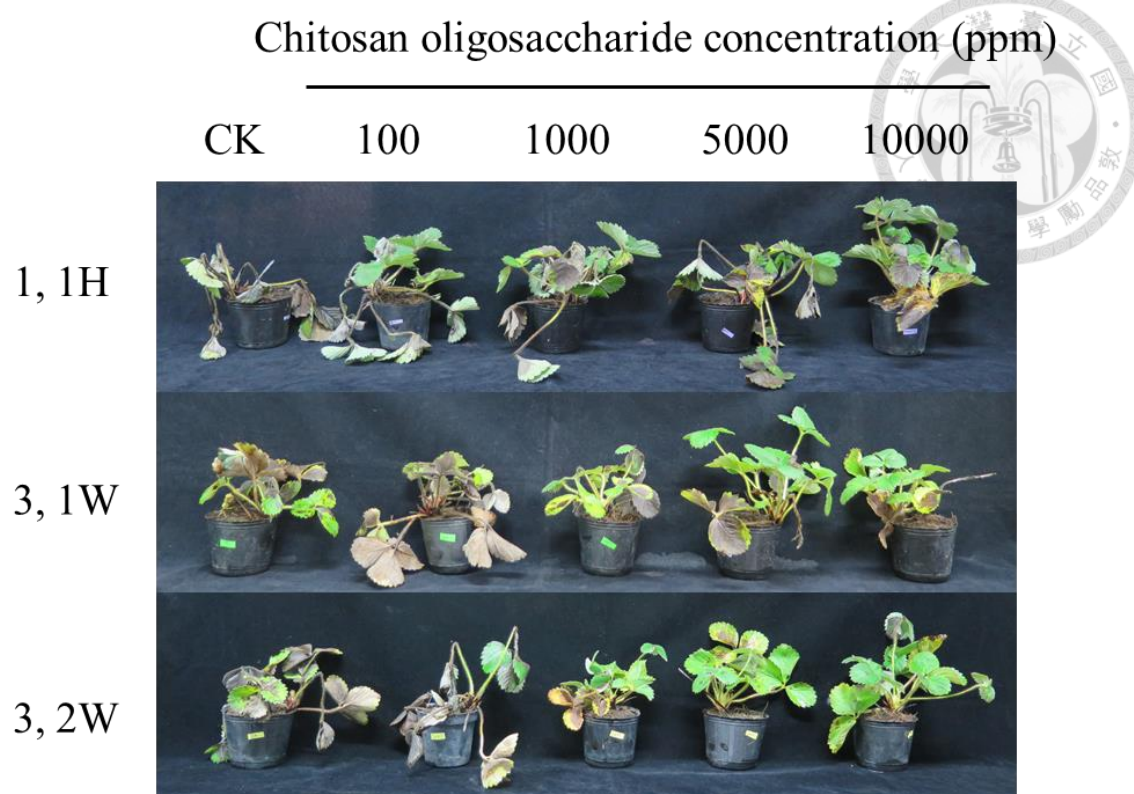
10000 mg/L COS was sprayed on micropropagated strawberry seedlings once a week for three weeks. Plants sprayed with water were used as control (CK). One week after the last application of COS, strawberry plants were inoculated with 1×10^9 CFU/mL *X. fragariae* B001. The photographs were taken 14 days after inoculation of *X. fragariae* B001. Bacterial ooze can be observed on the abaxial surfaces of the inoculated leaves of strawberry plants pretreated with 10000 mg/L COS (A), but not with water (CK) (B).



附圖四、草莓組織培養苗預施用不同濃度與頻率幾丁寡醣對草莓炭疽病抗性影響之植株樣態

Supplementary Figure 4. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations and frequencies on strawberry resistance against *Colletotrichum siamense* ML133 using micropropagated strawberry seedlings.

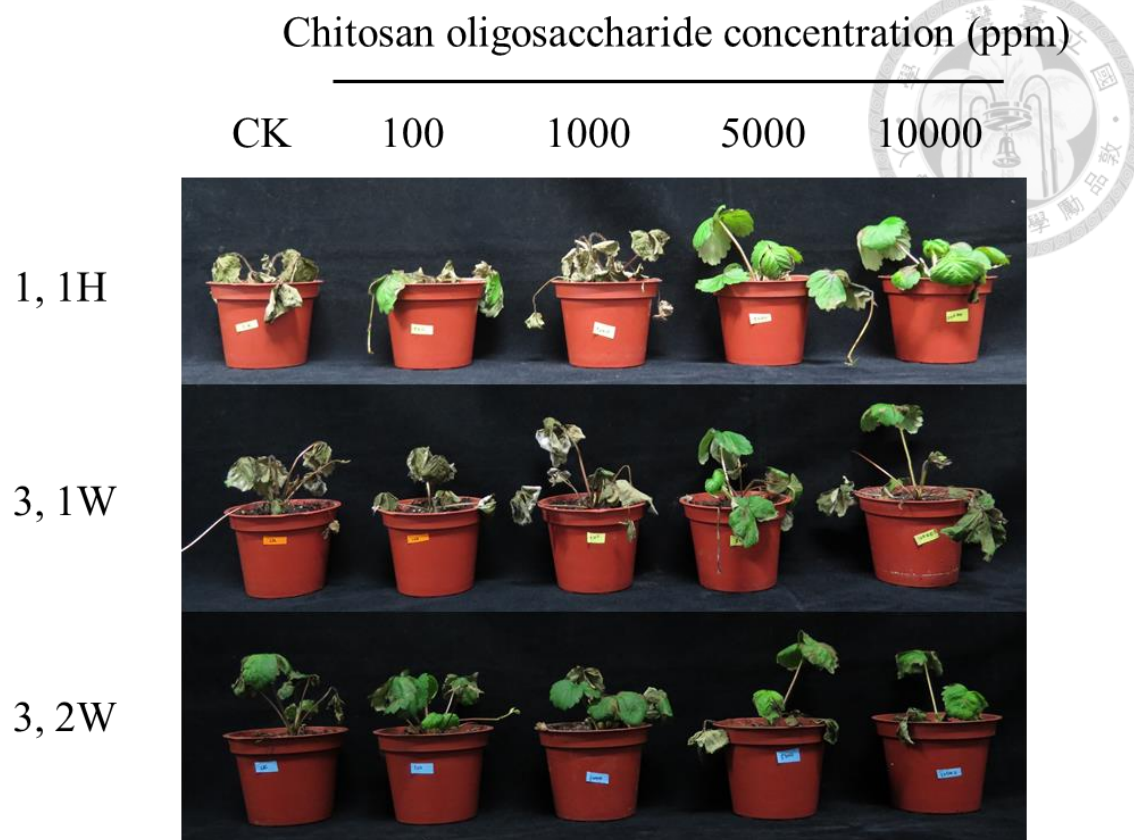
Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed once (1, 1H and 1, 1W) or 3 times with 1-week interval (3, 1W and 3, 2W) on 5-week-old micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as control (CK). One hour (1, 1H) or one week (1, 1W and 3, 1W) or two weeks (3, 2W) after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) was monitored every day, and the photographs were taken at 6-day post inoculation.



附圖五、草莓走莖苗預施用不同濃度與頻率幾丁寡糖對草莓炭疽病抗性影響之植株樣態

Supplementary Figure 5. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations and frequencies on strawberry resistance against *Colletotrichum siamense* ML133 using strawberry seedlings from runner.

Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed once (1, 1H) or 3 times with 1-week interval (3, 1W and 3, 2W) on strawberry seedlings from runner. ddH₂O was used as control (CK). One hour (1, 1H) or one week (3, 1W) or two weeks (3, 2W) after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *C. siamense* ML133. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 28 ± 2 °C) was monitored every day, and the photographs were taken at 6-day post inoculation.



附圖六、草莓組織培養苗預施用不同濃度與頻率幾丁寡糖對草莓葉枯病抗性影響之植株樣態

Supplementary Figure 6. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations and frequencies on strawberry resistance against *Neopestalotiopsis rosae* ML2411 using micropropagated strawberry seedlings.

Different concentrations (100, 1000, 5000 and 10000 mg/L) of COS were sprayed once (1, 1H and 1, 1W) or 3 times with 1-week interval (3, 1W and 3, 2W) on 5-week-old micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as control (CK). One hour (1, 1H) or one week (1, 1W and 3, 1W) or two weeks (3, 2W) after pretreatment of COS, strawberry plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/mL) of *N. rosae* ML2411. Disease development in a humid chamber under controlled conditions (16/8h light/dark photoperiod, 23 ± 2 °C) was monitored every day, and the photographs were taken at 14-day post inoculation.