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's Thesis

亞磷酸作為番茄萎凋病防治資材之潛力

Phosphonic acid as a potential treatment for controlling tomato Fusarium wilt

戴于翔

Yu-Hsiang Tai

指導教授：陳穎練 博士

Advisor: Ying-Lien Chen, Ph.D.

中華民國 114 年 6 月

June 2025

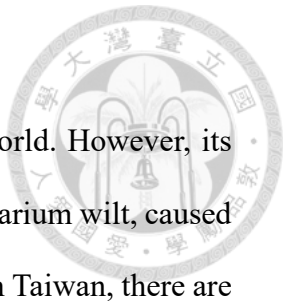
doi:10.6342/NTU202501265

中文摘要

番茄為世界上最重要的經濟作物之一，然而在栽培過程中面臨多種病害的侵襲，其中由土媒性病原真菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 引起的番茄萎凋病於台灣長期缺乏推薦的防治藥劑，僅能依靠抗病品種與耕作防治等其他手段。亞磷酸為國內「免登記植物保護資材」之一，用於防治多種作物的卵菌類病害已行之有年，雖然其抗病機制尚未被完全了解，但多數認為與誘發植物防禦反應有關。本研究透過 *in vitro* 實驗與盆栽實驗測試亞磷酸防治番茄萎凋病的能力，並利用 qPCR 分析三個番茄根部的防禦相關基因於亞磷酸處理後的表現量變化，以試圖找出亞磷酸的抗病作用機制。*In vitro* 實驗結果顯示亞磷酸於低濃度下對番茄萎凋病菌無顯著的直接抑菌或殺菌效果，且最低抑菌濃度為 3.2%，遠大於本研究測試使用的田間推薦濃度 0.2% (葉面噴灑)與 0.5% (土壤澆灌)，但兩個推薦濃度於盆栽實驗中皆出現顯著的防治效果。qPCR 分析則顯示僅澆灌處理組的部分基因表現量則有短時間地顯著上調，但無長時間維持，因此推測亞磷酸對番茄萎凋病主要機制可能為防禦預警效應(priming)。綜上所述，本研究發現亞磷酸具有防治番茄萎凋病的潛力，並期望與現行防治策略搭配使用能進一步減少病害所造成的損害。

關鍵字：番茄、番茄萎凋病菌、亞磷酸、免登記植物保護資材、防禦預警效應

doi:10.6342/NTU202501265



英文摘要

Tomato is one of the most important vegetable crops in the world. However, its production is threatened by various pests and diseases, including Fusarium wilt, caused by the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. In Taiwan, there are no recommended fungicides for managing this disease, leaving farmers to rely on resistant cultivars and cultural control methods. Phosphonic acid has been used to control oomycete diseases in various crops for decades. Although its mode of action is not fully understood, it is believed to induce plant defense responses. This study investigates the effectiveness of phosphonic acid against tomato Fusarium wilt through *in vitro* assays and pot experiments. Additionally, the expression of three defense-related genes in tomato roots was evaluated using quantitative PCR (qPCR). The *in vitro* tests revealed that phosphonic acid had little to no antifungal activity against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, with a minimum inhibitory concentration of 3.2%, much higher than the recommended field application rates (0.2% for foliar spray and 0.5% for soil-drench), both of which were used in this study. Despite this, phosphonic acid application significantly reduced disease severity in pot assays. qPCR analysis indicated that only the soil-drench treatment led to a temporary but significant upregulation of gene expression. These findings suggest that the effectiveness of phosphonic acid in controlling Fusarium wilt may result from the priming of plant defense responses. This study presents a potential supplementary method for managing tomato Fusarium wilt, aiming to improve disease control without chemical fungicides.

Key words: Tomato、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 、phosphonic acid、plant protection products exempted from registration、priming

doi:10.6342/NTU202501265

目次

doi:10.6342/NTU202501265

表次

doi:10.6342/NTU202501265

圖次

doi:10.6342/NTU202501265

壹、前言

番茄為世界上重要的經濟作物之一，不僅為多個國家料理的重要食材，也可作為水果直接食用。根據聯合國糧食與農業組織 2023 年的統計，全球番茄產量為 192,317,973 公噸，是蔬菜與瓜類組別中 20 種作物之冠，而台灣 2023 年番茄產量經行政院農業部統計為 83,660 公噸，於花果菜類中僅次於西瓜，總產值 4,881,572 千新台幣則為花果菜類中第一。因台灣地處於亞熱帶氣候區，濕熱的環境加上集約栽培使番茄容易受到病蟲害的侵襲，包括幼苗疫病、番茄黃化捲葉病、早疫病、細菌性斑點病、晚疫病、炭疽病、青枯病、萎凋病等(陽等，2012)，目前大多數的病害防治手段仍以化學藥劑為主，及透過架設溫網室阻隔蟲害及由昆蟲作為傳播媒介的病毒，然而土媒性病害因病原菌可長期殘存於土壤中的特性，使化學藥劑較難與其接觸發揮效果，提高了防治成本與困難度。

番茄萎凋病為一種真菌性土媒病害，由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 所引起，病原菌會從根部入侵植物體內，菌絲會生長穿透根部皮層至木質部增生，進而造成導管阻塞，使植物出現類似缺水的病徵(Singh *et al.*, 2017)。本病害於溫暖(約 28℃)環境下較容易發生，在高於 33℃或低於 21℃時都會使發病情況減緩。若於番茄幼苗時感染，植株會快速萎凋死亡，成株則會由下位葉片開始黃化萎凋並向上蔓延，植株通常由單側開始發病，並可從病株莖部切面發現維管束褐化，嚴重時會導致植株枯萎死亡(陳，2007)。本病害主要透過土壤及栽培介質中的菌絲或厚膜孢子來傳播，其厚膜孢子可殘存於土壤中數十年(Maurya *et al.*, 2019)，在發病較嚴重的植株，可於植株莖基部或葉部發現病兆，產生的分生孢子將透過空氣或水流散播成為二次感染源，若病原菌蔓延到果實上則可能導致種子帶病，成為另一種傳染源(陳，2007)。

在台灣，番茄萎凋病以抗病品種、抗病根砧嫁接、土壤消毒及與水稻輪作等耕作或物理手段防治為主(劉等，2016)。抗病品種方面，如花蓮亞蔬 21 號(楊等，2008)、台南亞蔬 19 號(劉等，2009)及種苗亞蔬 22 號(李等，2009)等都帶有萎

doi:10.6342/NTU202501265

凋病抗病基因。以抗病根砧嫁接的部分，由於 *F. oxysporum* 各分化型(formae speciales)對寄主具有專一性，因此使用其他作物作為根砧能有效降低番茄萎凋病的發生，也能同時預防其他土媒性病害，番茄大多使用茄子品種 EG190、EG203 及 EG219 作為根砧(鄭等，2001)。土壤消毒部分方法眾多，包括太陽能消毒、水蒸氣消毒與厭氧消毒等(吳，2025)，但太陽能消毒需依賴季節與天候，而厭氧消毒則需要將田區淹水一個月以上，兩者在實務上較難執行，因此番茄主要以高溫水蒸汽消毒為主，但高溫處理後會導致有機質加速崩解，因此事後需要額外補充。在化學防治方面，雖然撲克拉(prochloraz)與溴克座(bromuconazole)於溫室實驗中具有顯著的防治效果(Amini and Sidovich, 2010)，以邁隆(dazomet)進行土壤燻蒸也能有效降低病害發生(Gilreath and Santos, 2004)，但目前國內的推薦用藥僅有液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PMB01 與 Tcba05。PMB01 對多種作物的土媒性病害皆有防治效果，包括番茄青枯病(*Ralstonia solanacearum*)可達到 67%以上的防治率(Chou *et al*, 2022)，對小黃瓜萎凋病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)與長豇豆萎凋病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*)也都能明顯地降低病害嚴重程度(周等，2015)。Tcba05 則對長豇豆萎凋病也具有防治效果，可降低 40%的罹病度，另外對甘藍黑腐病(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)除了能在培養基上對峙培養時產生明顯抑制圈外，於田間試驗中也有 40%的防治效果(郭等，2014)。雖然目前番茄萎凋病尚無推薦的化學藥劑可以使用，但農民仍可以從「免登記植物保護資材」中挑選產品來協助防治病害。

亞磷酸為「免登記植物保護資材」之一，目前市面上有超過 70 種相關商品(農業部動植物防疫檢疫署，2023)，作為防治番茄晚疫病及其他作物卵菌類病害的預防性藥劑已行之有年。系統性殺卵菌劑福賽得(fosetyl-aluminum)於 1980 年代在美國上市，雖然其主要成分為 aluminum salt of ethyl hydrogen phosphonate，但經植物代謝後產生的亞磷酸被認為是主要的抑菌物質(Cohen and Coffey, 1986)，而後亞磷酸及其鹽類與化合物便被更廣泛的研究及應用於植物病害防治上。其對卵菌類病害的作用機制被推測具有三大類：間接誘發植物防禦反應、影響卵菌與

doi:10.6342/NTU202501265

寄主植物交互時的物質分泌、對卵菌的直接抑菌或殺菌作用(Dann and McLeod, 2021)。在誘發植物防禦反應方面亞磷酸於不同植物中有多種效果，例如對接種 *Phytophthora cinnamomi* 的加拉桉(*Eucalyptus marginata*)進行亞磷酸葉面噴灑後，細胞的木質素(lignin)與木栓質(suberin)的生產被誘導，使植物能產生物理性的屏障阻止病原菌的蔓延(Pilbeam *et al.*, 2011)；接種 *Phytophthora cryptogea* 的豇豆葉片經過亞磷酸處理後，植物防禦素(phytoalexins) kievitone 與 phaseollidin 的累積顯著提升，分別於接種後 24 小時與 48 小時來到高峰，累積量分別是無處理組的 2.35 倍與 3.39 倍(Saindrenan *et al*., 1988)；噴灑亞磷酸能使馬鈴薯對 *Phytophthora infestans* 的感染產生防禦預警效應(priming)，雖然在施藥當下沒有顯著影響，但於病原菌入侵後，預先處理亞磷酸的組別體內活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)的累積量與無處理組相比則有顯著提升(Machinandiarena *et al.*, 2012)。此外，亞磷酸對不同作物誘導的水楊酸、茉莉酸或乙烯這個三類植物防禦反應途徑也有所不同(Dann and McLeod, 2021)，例如預先處理亞磷酸的馬鈴薯在接種 *P. infestans* 24 與 48 小時候後，受水楊酸調控的基因 *StPR1* 與 *StWRKY* 表現量皆有提升(Machinandiarena *et al.*, 2012)；預先處理亞磷酸的歐洲山毛櫸(*Fagus sylvatica*)在接種 *Phytophthora plurivora* 後 6 天，多個參與水楊酸反應途徑(*PR1*、*PR2*、*PRP* 與 *WRKY*)及茉莉酸/乙烯反應途徑(*PR3* 與 *ACO*)等基因表現量皆顯著提高(Dalio *et al.*, 2014)。而在真菌類病害方面，咖啡褐眼病(*Cercospora coffeicola*)、咖啡銹病(*Hemileia vastatrix*)(Silva *et al.*, 2019)、柑橘褐斑病(*Alternaria alternata* pv. *citri*)(Yogev *et al.*, 2002)等經田間實驗皆具有防治效果，但詳細抗病機制並未被深入討論。

綜合亞磷酸在防治卵菌病害上的多重機制及對多種真菌病害也具有防治效果的性質，本研究欲利用 *in vitro* 實驗與盆栽實驗來探討亞磷酸是否能防治番茄萎凋病，此外因其對不同作物誘發防禦反應機制的差異，本研究試圖透過分析經亞磷酸處理的番茄根部中，參與不同防禦反應路徑基因表現量的變化，以對亞磷酸在番茄上的作用機制有初步的理解，並期望能提供農民在防治番茄萎凋病上更

doi:10.6342/NTU202501265

多的選項。

doi:10.6342/NTU202501265

貳、材料與方法

一、實驗菌株之培養與保存

本研究使用番茄萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (Ma *et al.*, 2010)，以 potato dextrose agar (PDA, HiMedia, India)於 25℃黑暗培養 7 天後，從菌落邊緣切下 3 塊菌絲塊加入裝有 100 mL potato dextrose broth (PDB, HiMedia, India)培養液的錐形瓶中，以 25℃、150 rpm 搖瓶黑暗培養 3 天後，使用微孔濾膜(miracloth, Merck, Germany)過濾以去除菌絲，將濾液以 3500 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液再加等量二次蒸餾水(ddH_2O)搖勻後再離心，重複上述步驟清洗 3 次，最終將分生孢子液以等體積與 50% (v/v)的甘油混和，置入冷凍管中保存於-80℃冰箱。後續實驗的分生孢子液皆以上述方式製備，唯清洗完後僅加入適量 ddH_2O，並以血球計數器計算孢子液濃度。

二、番茄萎凋病菌厚膜孢子液製備

厚膜孢子的製備參考陳等人(2015)的研究並進行部分修改。首先製備土壤培養液，將 Kekkilä Professional substrates 泥炭土(型號 OPM 420 W R8045, Kekkilä Professional, Finland)置於 65℃烘箱烘乾 3 天，磨碎後加入泥炭土重量 4 倍的蒸餾水(dH_2O)，攪拌均勻後於室溫以 60 rpm 震盪 1 小時，使用雙層紗布過濾出泥炭土萃取液，再將萃取液以微孔濾膜過濾，加入適量 glucose 配製含 0.5% glucose 之土壤培養液，以滅菌釜滅菌後備用。

於錐形瓶中裝入 100 mL 的土壤培養液，加入分生孢子液至最終濃度為 10^5 conidia/mL，於 25℃、90 rpm 搖瓶黑暗培養 5 天，使用微孔濾膜過濾並以 ddH_2O 沖洗數次，將微孔濾膜上的菌絲分裝至數個 2 mL 離心管中並放入 2 顆鋼珠，以均質機 1500 rpm 震盪 5 分鐘，再以前述方法過濾與清洗一次，去除殘留的分生孢子，收集微孔濾膜上的菌泥至 15 mL 離心管中，加入 ddH_2O 至 10 mL 以血球計數器計算厚膜孢子濃度。

doi:10.6342/NTU202501265

三、亞磷酸溶液配製

亞磷酸溶液配製時加入等重之氫氧化鉀，以調整溶液最終 pH 值至 6.1~6.2，於需要無菌的實驗則以孔洞大小 0.45 μm 的濾膜進行過濾。後續實驗參考安寶貞等人(2021)的中性化亞磷酸使用濃度與方法，盆栽實驗以 0.2%(稀釋 500 倍)進行葉面噴灑，及 0.5%(稀釋 200 倍)進行土壤澆灌，而 *in vitro* 實驗測試濃度也以 0.2%與 0.5%為主。

四、濾紙片擴散試驗

將 100 μL 濃度 10^5 conidia/mL 的分生孢子液以玻璃珠均勻塗佈於 PDA 上，待乾燥後放上 3 片直徑 6 mm 圓形濾紙片，於濾紙片上分別滴加 7 μL 無菌的 0.2%、0.5%亞磷酸溶液與 ddH_2O (對照組)，於 25℃生長箱黑暗培養 3 天後，記錄濾紙片周圍之抑制圈大小。共進行 2 次獨立實驗，每次皆有 3 個技術性重複。

五、含藥培養基試驗

將無菌的亞磷酸溶液與液態 PDA 混合，分別配製含 0.2%與 0.5%亞磷酸的 PDA 固態培養基。在含 0.2%、0.5%亞磷酸與普通 PDA 培養基中心放上直徑 5 mm 已培養 7 天的菌絲塊，於 25℃生長箱黑暗培養 7 天後，測量各處理組菌落直徑大小。每個處理組 5 個技術性重複，共進行 3 次獨立實驗。

六、亞磷酸對番茄萎凋病菌分生孢子萌芽與菌絲生長影響試驗

將無菌的亞磷酸溶液與 PDB 混和配製成 0.5%亞磷酸的 PDB 液態培養基，取 3 mL 培養液加入分生孢子液至最終濃度為 10^6 conidia/mL，以 25℃、150 rpm 搖瓶黑暗培養 6 小時後，隨機取 100 顆孢子計算發芽率，以無亞磷酸 PDB 作為對照組，各處理皆進行 3 次生物性重複。菌絲生長影響實驗以相同方式培養，但時間改為 24 小時，以顯微鏡觀察記錄並比較兩者菌絲生長情況。

doi:10.6342/NTU202501265

七、最低抑菌濃度與最低殺菌濃度試驗

將已滅菌的 12.8%亞磷酸溶液，以 PDB 於 96 孔盤上進行 2 倍序列稀釋 10 次，每孔加入 100 μL，再加入 10^4 conidia/mL 分生孢子液 100 μL，使各孔總體積為 200 μL、亞磷酸最終濃度為 0.0125%至 6.4%、及分生孢子液最終濃度為 5×10^3 conidia/mL。以只加入分生孢子液作為正對照組與只加 PDB 為負對照組，每個處理共 4 個技術性重複。96 孔盤於 25℃黑暗培養 2 天後觀察記錄，判定最低抑菌濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)之標準參考臨床和實驗室標準化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute)訂定的抗真菌藥物實驗方法〈Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - Second Edition〉，以「以肉眼觀察，發現藥物可完全抑制供試菌株生長」為 MIC 標準。依據 MIC 試驗結果，最低殺菌濃度(minimum fungicidal concentration, MFC)試驗將取處理組中 MIC 至 6.4%各 3 μL，滴於 PDA 培養基上，每個濃度進行 3 次技術性重複，以 25℃黑暗培養 2 天後觀察是否有菌落生長，未生長之最低濃度即為 MFC。

八、實驗植物之品種與種植

本實驗使用品種為農友 301 大果番茄。將種子置於浸濕的衛生紙上，於 25℃黑暗環境下放置 3 天，待其發根後移植至 40 孔育苗盤中育苗，栽培介質為 Kekkilä Professional substrates 泥炭土(型號 OPM 420 W R8045)與珍珠石 4:1 混合而成，種植於 28℃、光週期為 16 小時光照/8 小時黑暗的植物生長箱，每 1 至 2 天澆水，並於移植後第 7 天施用一次花寶二號肥料。待發芽 14 天後移植至 3 吋盆中進行後續實驗，栽培介質與環境同上。

九、亞磷酸對番茄萎凋病之防治試驗

以下盆栽實驗參考賴等人(2019)的研究並進行部分修改。本實驗因接種不同

doi:10.6342/NTU202501265

形式的病原菌分為兩個部分，皆進行三次獨立實驗。移盆後的番茄植株分組進行六種處理：1.無處理(控制組)、2.以 0.2%亞磷酸溶液葉噴、3.以 0.5%亞磷酸溶液土壤澆灌、4.只接種番茄萎凋病菌、5.以 0.2%亞磷酸葉噴處理及接種番茄萎凋病菌、6.以 0.5%亞磷酸澆灌處理及接種番茄萎凋病菌，每個組別各 7 株。葉面噴灑亞磷酸的處理方式以噴瓶於植株上方 20 公分噴灑，每盆各按壓 10 次，亞磷酸土壤澆灌處理的澆灌量在接種分生孢子液的組別為 50 mL；接種厚膜孢子的組別為 35 mL。組別 4、5、6 皆進行一次亞磷酸處理，並於處理後 3 天接種番茄萎凋病菌。

實驗第一部分以分生孢子進行接種：植株根部以水洗淨並截斷 1/2 製造傷口後，將根部浸泡在濃度為 5×10^5 conidia/mL 的分生孢子液中 40 分鐘，期間每 10 分鐘搖晃一次使孢子均勻分布，而後種植回原本盆栽中。於接種後第 21 天進行記錄，期間每 1 至 2 天澆水，於接種後 5 天施一次花寶二號肥料。

實驗第二部分以厚膜孢子進行接種：植株根部以水洗淨並截斷 1/2 製造傷口，於各盆栽植株原本位置澆灌 10 mL 濃度 10^5 chlamydospores/mL 的菌液，再將植株種回原盆栽。於接種後 28 天進行觀察記錄，期間每 1 至 2 天澆水，於接種後第 5 與 21 天施用花寶二號肥料。

各植株之罹病度將由發生黃化或萎凋的葉片占全株的比例被分為 0~4 級，0 為無發病、1 為 25%或以下、2 為 26%~50%、3 為 51%~75%、4 為 75%以上或死亡，依據這些數據計算各組別的 Disease severity index (DSI)：

DSI(%)= [(各級數×組內出現株數)之總和/(最大級數×組內總株數)] × 100

再利用 DSI 來進行防治效果的比較：

防治率(%)= [(接菌控制組 DSI-藥劑處理組 DSI) /接菌控制組 DSI] × 100

十、測試亞磷酸對蕃茄根部防禦相關基因的影響

本實驗包含植株培養與處理、根部 RNA 萃取與反轉錄、即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)三個部分。移盆後

doi:10.6342/NTU202501265

的植株培養 14 天後，分別進行 0.2%亞磷酸溶液葉噴與 0.5%亞磷酸溶液土壤澆灌 50 mL，以無處理作為對照組，於處理後 1、2、3、4 天分別對各組的植株進行根部的收集，而對照組僅於第一天收集。每個處理組各 5 株番茄，共進行 1 次獨立實驗。

RNA 萃取使用 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Taiwan)，萃取出的 RNA 經過 TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)處理去除可能存在的 DNA，再以 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)進行反轉錄 PCR 產生成 cDNA 供後續 qPCR 使用。欲分析之基因為 pathogenesis-related gene 1 (*PR1*)、lipoxygenases (*LOX*)、catalase (*CAT*)，*PR1* 為水楊酸反應途徑的上游基因(Molinari *et al.*, 2014)；*LOX* 則參與茉莉酸的生合成(Hu *et al.*,2015)；*CAT* 為過氧化氫酶基因，抗氧化酵素與 ROS 共同參與調節植物面對病原菌的初級防禦反應(Mandal *et al*., 2008)。比較時使用番茄的 Actin 基因做為參考基因，以 comparative Ct (ΔΔCt) method 校正各待測基因的表現量，qPCR 使用 DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)於 StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)機器上進行。

十一、 數據統計及分析

數據統計分析主要使用 R 語言(v4.4.1)，常態性檢定使用 Shapiro-Wilk test (函數為 shapiro.test)。變異數分析(Analysis of variance, ANOVA)使用單因子變異數分析(函數為 avo)，事後檢定使用 Tukey's honestly significant difference test (函數為 TukeyHSD)。非常態分布或非連續性資料則使用 Kruskal-Wallis rank sum test (函數為 kruskal.test)，事後檢定使用 Dunn's test (函數為 dunnTest)。司徒頓 *t* 檢定 (Student's *t*-test)則使用 Microsoft Office Excel 2019 中的內建函數運行。

doi:10.6342/NTU202501265

參、結果

一、亞磷酸於低濃度下對番茄萎凋病菌無顯著的抑制或殺菌效果

為了測試亞磷酸對番茄萎凋病菌的直接殺抗菌效果，本研究進行 MIC 與 MFC 試驗、濾紙片擴散試驗與含藥培養基試驗等三種實驗。MIC 實驗結果僅 3.2% 與 6.4%兩個濃度於觀察時無菌絲生長，兩者在 PDA 上培養後皆有長出菌落，因此得出 MIC 為 3.2%，MFC 則大於 6.4%，超出本次實驗範圍。此濃度已遠大於目前田間使用的濃度，也就是後續本實驗主要測試的 0.2%與 0.5%。

濾紙片擴散實驗中 0.2%與 0.5%亞磷酸在所有重複中皆無出現抑制圈(圖一)，因此推測亞磷酸對番茄萎凋病菌的分生孢子發芽沒有顯著影響，含藥 PDB 培養試驗也得出了相似的結果：無加藥 PDB 分生孢子發芽率為 86.5 ± 4.0%，0.5%亞磷酸處理組發芽率則為 78.1 ± 5.6%，以 Student's *t*-test 進行統計分析，兩者間並無顯著差異(p >0.1)(圖二 B)。含藥培養基試驗則有較明顯的變化，控制組菌落平均大小為 6.91 ± 0.14 cm、0.2%亞磷酸處理組為 6.85 ± 0.21 cm、0.5%亞磷酸處理組為 6.48 ± 0.10 cm，以單因子變異數分析顯示組間具有顯著差異(p < 0.05)，經 Dunn's test 事後檢定得知控制組與 0.2%亞磷酸處理組間無顯著差異，而 0.5%亞磷酸處理組則與另兩組皆有顯著差異(圖三 B)。若將兩個處理組的菌落外觀與控制組比較，處理組的菌絲密度有所下降，色素表現也相對減弱，而且濃度越高差異越明顯(圖三 A)，由此可推測亞磷酸對番茄萎凋病的菌絲生長有些許影響，然而以含藥 PDB 培養 24 小時的菌絲外觀經顯微鏡觀察，於巨觀方面的如菌絲是否較容易結成球狀，及細胞層面如菌絲尖端是否有畸形等與控制組皆無明顯的差異(圖二 A)。綜合以上結果推測亞磷酸對番茄萎凋病菌絲或許僅在生長速度方面有所影響，而且於低濃度下影響輕微，可能需要高濃度才會出現較明顯的差異。

二、亞磷酸處理能提高番茄植株對番茄萎凋病菌的抵抗能力

亞磷酸於番茄植株上展現出較明顯的萎凋病防治效果，以分生孢子作為接種

doi:10.6342/NTU202501265

源時，只接種病原菌的控制組 DSI 總平均為 66.9%，0.2%亞磷酸葉噴組的 DSI 為 32.1% (防治率 43.1%)，0.5%亞磷酸土壤澆灌組的 DSI 則為 45.2%(防治率 34.3%)，兩個亞磷酸處理組與接種控制組相比皆有顯著差異，但彼此間無顯著差異(表二、圖四 D)。植株外觀上兩個亞磷酸處理組雖然於株高與生長勢表現上弱於無接種病原菌的組別，且都有出現葉片黃化萎凋或植株死亡，但其嚴重程度與發生頻率皆低於無亞磷酸處理組(圖四)。

以厚膜孢子作為接種源，只接種病原菌的控制組 DSI 總平均為 27.4%，0.2%亞磷酸葉噴組的 DSI 為 20.2% (防治率 26.1%)，0.5%亞磷酸土壤澆灌組的 DSI 則為 8.3%(防治率 69.6%)，0.2%亞磷酸葉噴組與接種控制組間無顯著差異，但 0.5%亞磷酸澆灌組與另兩組皆有顯著差異 (表三、圖四 E)。因接種源接種方式的不同，本組的 DSI 皆低於接種分生孢子的組別，且僅 0.5%亞磷酸澆灌組具顯著防治效果，其在發病率與嚴重程度上皆顯著低於接菌控制組，而 0.2%亞磷酸葉噴組在發病率上與接菌控制組則大致相同(圖四)。雖然厚膜孢子組整體葉部病徵較分生孢子組輕微，但植株外觀上有接種的組別株高與生長勢仍弱於健康植株，額外進行莖基部橫切觀察維管束褐化情形後，發現褐化現象與葉部病徵相符，所有出現葉片黃化萎凋的植株維管束皆有產生褐化，反之則沒有。綜合上述實驗結果可得出，亞磷酸能防治病害的原因並非來因其對番茄萎凋病菌具有殺菌或抑菌能力，而可能是透過誘導番茄植株引發防禦反應的方式。

第三次的分生孢子接種實驗時，0.5%亞磷酸澆灌組出現明顯藥害，主要症狀為生長緩慢至停滯，植株生長速度於處理後 7 天開始與其他組別出現差異，使無接種的植株最終高度與有接種組別相似，而有接種的澆灌組則容易提早死亡，將澆灌量從 50 mL 改為 35 mL 後藥害發生頻率顯著降低，因此厚膜孢子部分實驗改為澆灌 35 mL，葉噴組則沒有出現過藥害。

三、亞磷酸能促進部分番茄根部防禦相關基因的表現

本實驗利用 qPCR 分析番茄根部與水楊酸(*PR1*)、茉莉酸(*LOX*)、ROS 與抗氧

doi:10.6342/NTU202501265

化酵素(*CAT*)三種防禦相關基因的表現量變化試圖找出亞磷酸提升番茄對萎凋病抗病能力的機制，並透過設計不同的施藥部位與時間來探討這些影響是否具有系統性或時效性。0.5%亞磷酸澆灌處理組與 0.2%亞磷酸葉噴處理組番茄根部 *PR1* 表現量變化趨勢相反，第一天澆灌組的表現量為控制組的 1.88 倍，並於後續天數持續下降至第四天 0.29 倍，而葉噴組第一天 *PR1* 表現量為控制組的 1.18 倍，後續逐漸上升至第四天 1.83 倍(圖五 A)，但兩個處理組所有天數與控制組相比皆無顯著差異。*LOX* 整體基因表現量變化與 *PR1* 相反，澆灌組第一天相對表現量為 0.77 倍，於後續天數持續上升至第四天 3.59 倍；葉噴組第一天相對表現量為 1.87 倍，於後續天數持續下降至第四天 0.41 倍(圖五 B)，澆灌組第三、第四天及葉噴組第四天數據與控制組相比具有顯著差異。澆灌組 *CAT* 第一天的相對表現量顯著提升至 4.98 倍，但於第二天快速下降至 0.75 倍，後續 2 天相對表現量分別為 1.46 倍與 0.87 倍；葉噴組 *CAT* 表現量的變化幅度則小於澆灌組，第一天相對表現量較低為 0.47 倍，後續三天數分別為 1.17 倍、1.51 倍、0.77 倍(圖五 C)，兩個處理組基因表現量與控制組相比僅第一天具有顯著差異。

doi:10.6342/NTU202501265

肆、討論

本研究盆栽實驗結果顯示亞磷酸處理能提高番茄對萎凋病的抗病能力，然而大部分 *in vitro* 實驗亞磷酸都未對 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 展現出顯著的抑菌或殺菌效果，因此推測亞磷酸主要抗病機制並非來自其對番茄萎凋病菌的直接作用。在濾紙片擴散實驗中，亞磷酸處理並未出現明顯的抑制圈，代表其無法顯著抑制番茄萎凋病菌分生孢子的發芽，此與發芽率實驗及 MIC 實驗的結果相符。在菌絲生長方面，液態培養下的番茄萎凋病菌菌絲外觀與生長並未因亞磷酸處理產生明顯變化，而 PDA 固態培養基上，0.5%亞磷酸處理的抑制效果雖然在統計上具有顯著差異，但僅有 6.2%的抑制率。綜合上述實驗，亞磷酸於現行田間使用的 0.2%與 0.5%濃度下，對 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 孢子的萌芽與生長幾乎沒有顯著抑制效果。根據前人的研究，亞磷酸化合物(phosphonate)對香蕉黃葉病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 雖具有抑制效果，但其效果隨著環境中磷酸鹽(phosphate)濃度提高而降低(Davis *et al.*, 1994)。而 *Fusarium solani* 的有性世代(*Nectria haematococca*)能快速吸收環境中的亞磷酸化合物將其代謝氧化為磷酸鹽類(Guest and Bompeix, 1991)，此現象與亞磷酸對卵菌的直接抑菌機制類似，亞磷酸鹽與磷酸鹽進入 *Phytophthora palmivora* 細胞內是透過相同的運輸系統，但與磷酸根離子不同，亞磷酸根離子無法被細胞直接使用，因此與磷酸化相關的代謝反應皆受到干擾，最終造成生長停滯(Griffith *et al.*, 1989)。由於目前亞磷酸對卵菌的完整抑菌機制尚未明瞭，且與 *Fusarium* 之間交互作用的研究也較為不足，未來可以對 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 的亞磷酸與磷酸代謝機制進行研究，試圖解釋其拮抗亞磷酸的機制。

盆栽實驗接種分生孢子時，亞磷酸葉噴處理組與澆灌處理組統計上皆有顯著的防治效果，防治率分別為 43.1%與 34.3%；然而於接種厚膜孢子時僅澆灌組有顯著防治效果，防治率 69.6%為葉噴組 26.1%的 2.67 倍，而且接菌控制組的 DSI 僅有接種分生孢子時的 0.41 倍。因此對厚膜孢子發芽能力進行測試，於 PDB 培

doi:10.6342/NTU202501265

養 24 小時後皆有發芽與菌絲生長，所以推測厚膜孢子組發病率低落的主要原因為接種時間與空間不足。盆栽實驗設計為接種後 21 天記錄是因為此時控制組往往已明顯發病甚至死亡，然而厚膜孢子接種濃度低於分生孢子，且無強制接種需依賴厚膜孢子發芽後從周圍土壤移動至番茄根部，導致整體病程拉長，雖然有調整至接種後 28 天再進行記錄，但因為生長時間拉長造成番茄根部長出 3 吋盆栽底部，使根部未觸碰到培養土進而降低接種效率，同時礙於實驗於生長箱進行，內部空間有限，若更換大型盆栽則會影響實驗植株數量，且植株高度也會受限，因此若將實驗移至溫室進行，並拉長實驗時間與增加各植株的生長空間，應能改善整體的發病率，且在接種控制組 DSI 上升的情況下，各處理組的防治率變動也會縮小，減少統計上的誤差。

此外，盆栽實驗中途有發生藥害，第三次分生孢子接種實驗亞磷酸澆灌組出現生長停滯，於處理後 7 天株高開始與其他組別出現明顯差距，並一直持續到實驗結束，而後重複實驗兩次皆遇到相同情況。亞磷酸於前人研究中便有出現多種藥害報導，症狀包含葉片壞死、落葉、生長異常、葉片黃化甚至植株死亡(Hardy *et al.*, 2001)，被報導過的植物包括酪梨、杏仁、櫻桃、橘子等等(Liang and Ni, 2023; Wicks and Hall, 1990; Walker, 1989)，而多數是亞磷酸施用頻率或濃度過高導致，除葉面噴灑過量使殘留部位因鹽分過高造成逆境外，植物體內的亞磷酸鹽含量也與藥害嚴重程度呈正相關(Barrett *et al.*, 2004)，尤其是針對已經缺磷的植物，植物無法代謝亞磷酸，需經由根部釋出利用土壤中的細菌轉化為磷酸再吸收，但此過程十分緩慢，而亞磷酸又會干擾植物體內的正常缺磷補償機制，例如抑制蕓薹屬(*Brassica*)植物酸性磷酸酶(acid phosphatase)與 high-affinity plasmalemma Pi translocator 的表現量，造成更嚴重的傷害(McDonald *et al.*, 2001)。本實驗在減少亞磷酸的澆灌量後，藥害發生率顯著下降，因此後續厚膜孢子盆栽實驗澆灌量從 50 ml 降至 35 ml。目前仍無法確定為何最初兩次實驗與事前測試沒有發生藥害，推測為第三次實驗時使用新泥炭土，雖然型號相同，但廠商有告知此批泥炭土含水量比以往高很多，推測可能為產地環境出現變化，或者是長時間高濕度的密封

doi:10.6342/NTU202501265

環境促使了泥炭土內微生物的反應，導致有機質成分發生改變，進而造成藥害突然發生。

綜合上述盆栽實驗的兩個問題，雖然亞磷酸處理組在防治番茄萎凋病上具有顯著效果，但後續需要對適合番茄的亞磷酸澆灌量進行最佳化，透過調整濃度、劑量與施用頻率以降低藥害發生率，並優化厚膜孢子盆栽實驗的條件，以確認在接種源不同下兩種處理的防治效果是否有差異。以目前結果而言，由於田間實際上的接種源以厚膜孢子為主，故澆灌處理效果較佳，但為預防藥害的發生，推薦幼苗或剛移植的番茄改以葉面噴灑施藥，待植株生長超過一個月較成熟後再採用土壤澆灌。

目前已知亞磷酸在無病原菌存在時，也能提升阿拉伯芥 (Pérez-Zavala *et al.*, 2024)、馬鈴薯(Burra *et al.*, 2014)與大豆(Arfaoui *et al.*, 2020)多種防禦相關基因的表現量，因此本研究想瞭解亞磷酸對番茄是否有類似效果，及試圖解釋番茄對 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 產生抗病能力的原因。透過觀察番茄根部 *PR1*、*LOX*、*CAT* 三個基因於亞磷酸處理後表現量的變化後發現，0.2%亞磷酸葉噴處理未能於任何時間提高任一基因的表現量，且整體影響幅度也小於澆灌處理組，而 0.5%亞磷酸澆灌處理則於第三、第四天與第一天分別顯著提高 *LOX* 與 *CAT* 表現量。根據前人研究，亞磷酸水溶性高，易於被植物體吸收並透過輸導組織上下傳輸，且亞磷酸能使用與磷酸相同的運輸系統，進一步提高其在細胞間的移動性(Danova-alt *et al.*, 2008; Achary *et al.*, 2017)，因此推測葉噴與澆灌處理組間的差異非由亞磷酸缺乏移行性所導致，可能為葉噴處理濃度與劑量較少，較難於根部累積至反應所需的濃度，且澆灌組植株能持續吸收土中殘留的亞磷酸，進一步拉大兩者差距。

Pathogenesis-related protein 1 (PR1)為受水楊酸調控的免疫指標蛋白之一，水楊酸可透過葉噴顯著降低番茄萎凋病的嚴重程度(Chakraborty, 2021)，且 Di 等人(2017)發現轉基因番茄 *NahG*(水楊酸被分解無法累積)接種 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 後，其發病嚴重度顯著提高，因此推測水楊酸途徑可提升番茄對番茄

doi:10.6342/NTU202501265

萎凋病菌的抗性。本次實驗兩個處理組 *PR1* 皆僅有小幅度上升，且無長時間維持，然而 Vinas 等人(2020)於水耕環境下每七天進行葉噴，連續施用三次後有觀察到 *PR1* 表現量顯著上升，推測此為施用總劑量與頻率的差異所造成。但由於本實驗盆栽實驗仍有抗病效果，因此推測亞磷酸除了能直接提升水楊酸反應相關表現外，於較低劑量就有 priming 的效果，使相關基因於病原菌入侵後能更快更激烈的反應，未來可以透過比較亞磷酸前處理對番茄感染番茄萎凋病菌後，*PR1* 基因表現量的差異來驗證此假設。

脂氧合酶(Lipoxygenases, LOX)可催化特定脂肪酸的氧合反應，其產物多為細胞信息傳遞物質，其中就包含茉莉酮酸(Jasmonate，包括茉莉酸與其酯類)(Upadhyay *et al.*, 2018)，茉莉酸作為植物重要防禦相關激素之一，被認為主要參與草食性昆蟲與腐生病原菌相關的防禦反應(Macioszek *et al.*, 2023)，而 Di 等人(2017)發現番茄突變株 *def1*(無法合成茉莉酸)與轉基因植株 *35S::prosystemin*(過量表現茉莉酸路徑正調控因子)接種 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 後，兩者的發病程度與控制組皆無顯著差異，因此推測茉莉酸途徑並無參與番茄對番茄萎凋病菌的防禦反應。因此本實驗雖然發現 *LOX* 表現量有顯著提升，但可能並非亞磷酸對番茄萎凋病菌的主要抗病機制，後續實驗可使用類似的茉莉酸缺乏突變株進行盆栽實驗，以確認亞磷酸的抗病能力是否依賴茉莉酸途徑。

番茄的氧化爆起作用(oxidative burst)為對抗 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 感染重要的初級防禦手段之一，在病原菌入侵初期，ROS 的快速累積與釋放往往是植物最早啟動的防禦反應，以過量的 ROS 引發細胞計畫性死亡，阻擋病原菌的入侵與養分獲取，但反應過後多餘的 ROS 會波及其他細胞，因此需要抗氧化酵素如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)與過氧化氫酶(catalase, CAT)等酵素來維持 ROS 的平衡(Mandal *et al.*, 2008)。本實驗 *CAT* 表現量於處理後第一天顯著提高後便快速下降，此趨勢與番茄萎凋病菌感染番茄時 CAT 的活性變化類似，其活性於感染後 24 小時達到高峰，而後便持續下降(Mandal *et al.*, 2008)，推測為番茄對 *CAT* 的調控比較敏感，尤其在沒有高濃度 H_2O_2 情況下。

doi:10.6342/NTU202501265

綜合本研究結果，雖然預先施用亞磷酸能降低 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 在蕃茄上的發病率與葉部病徵，但植株高度仍會因病原菌而生長受限且無法根除病害，因此推薦配合現有的防治手段一同使用，主要可在進行晚疫病或其他卵菌類病害預防性施用亞磷酸時，達到共同防治的效果。後續可對現今使用的抗病品種及抗病根覘嫁接的番茄進行較大規模的田間試驗，了解亞磷酸在不同品種的番茄上是否有相似的效果，此外因為研究中盆栽實驗接種前僅施用一次亞磷酸，未來田間實驗也可對定期多次施用亞磷酸的防治效果進行評估，以便制定出合適的施用頻率與劑量，避免藥害的發生。

doi:10.6342/NTU202501265

伍、參考文獻

1. 安寶貞、蔡志濃、林筑蘋。2021。植物誘導性抗病。載於謝廷芳、安寶貞、林筑蘋(主編)，作物病害之非農藥防治實務專書(頁 57-64)。台中市：行政院農業委員會農業試驗所。
2. 李建勳、柯天雄、陳正次 2009。小果番茄新品種「種苗亞蔬 22 號」。種苗科技專訊 65: 11-13。
3. 吳旻皇。2025。淺談土壤消毒之方法。苗栗區農業專訓 109:19-21。
4. 周浩平、王惠美、黃櫧昌。2015。應用液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 防治作物土壤傳播性病害之效果評估。高雄區農業改良場 103 年報 58-60。
5. 陳任芳。2007。番茄萎凋病之預防策略。花蓮區農業專訊 62:18-19。
6. 陳媛鈺、林宗俊、鍾文鑫、王智立。2015。篩選抑制番茄萎凋病菌厚膜孢子發芽之拮抗細菌。植物病理學會刊 24(3&4):251-266。
7. 郭建志、陳俊位、廖君達、陳葦玲、蔡宜峯。2014。液化澱粉芽孢桿菌在作物病害防治的開發與應用。臺中區農業改良場特刊 121:69-86。
8. 楊秀珠、余思葳、黃裕銘。2011。番茄之病蟲害發生與管理。合理、安全及有效使用農藥輔導教材—蔬菜 8。
9. 楊素絲、陳正次、全中和。2008。番茄新品種花蓮亞蔬 21 號之育成。花蓮區農業改良場研究彙報 26:65-80。
10. 農業部動植物防疫檢疫署。2023。已登錄之免登記植物保護資材產品清單。
11. 鄭安秀、王仕賢、黃山內。2001。番茄嫁接茄子根砧防治土傳病害。台南區農業專訊 35:1-3。
12. 劉依昌、黃瑞彰、蔡孟旅、黃秀雯。2016。小果番茄設施栽培及健康管理技術。臺南區農業改良場技術專刊 105-3。

doi:10.6342/NTU202501265

13. 劉依昌、韓錦絲、謝明憲、王仕賢、王仁晃、陳正次。2009。番茄台南亞蔬19號之育成。臺南區農業改良場研究彙報 53:12-23。
14. 賴于歆、徐立航、陳穎練。2019。小麥赤黴病菌與番茄萎凋病菌之 PSD2 基因影響磷脂質組成、生長與產孢。植物醫學 61(1):1-18。
15. Achary, V. M. M., Ram, B., Manna, M., Datta, D., Bhatt, A., Reddy, M. K. & Agrawal, P. K. 2017. Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control. Plant Biotechnology Journal 15:1493-1508.
16. Amini, J., & Sidovich, D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with Fusarium wilt of tomato. Journal of Plant Protection Research 50(2):172-178.
17. Arfaoui, A., El Hadrami, A., Adam, L. R., & Daayf, F. 2020. Combining *Streptomyces hygroscopicus* and phosphite boosts soybean's defense responses to *Phytophthora sojae*. BioControl 65:363-375.
18. Barrett, S. R., Shearer, B. L., & Hardy, G. E. St. J. 2004. Phytotoxicity in relation to in planta concentration of the fungicide phosphite in nine Western Australian native species. Australasian Plant Pathology 33:521-528.
19. Burra, D. D., Berkowitz, O., Hedley, P. E., Morris, J., Resjö, S., Levander, F., Liljeroth, E., Andreasson, E., & Alexandersson, E. 2014. Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. BMC Plant Biology 14:254.
20. Cohen, T., & Coffey, M. D. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. Annual Review of Phytopathology 24:311-338.
21. Chakraborty, N. 2021. Salicylic acid and nitric oxide cross-talks to improve innate immunity and plant vigor in tomato against *Fusarium oxysporum* stress. Plant Cell Reports 40:1415-1427.
22. Chou, H. P., Huang, Y. C., Lin, Y. H., & Deng, W. L. 2022. Selection, formulation,

doi:10.6342/NTU202501265

and field evaluation of Bacillus amyloliquefaciens PMB01 for its application to manage tomato bacterial wilt disease. Agriculture 12(10):1714.

23. Dalio, R. J., Fleischmann, F., Humez, M., & Osswald, W. 2014. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. PLoS ONE 9(1): e87860.
24. Dann, E., & McLeod, A. 2021. Phosphonic acid: a long-standing and versatile crop protectant. Pest Management Science 77: 2197-2208.
25. Danova-Alt, R., Dijkema, C., DE Waard, P., & Köck, M. 2008. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells-kinetic and ^{31}P nuclear magnetic resonance studies. Plant, Cell & Environment 31(10):1510-1521.
26. Davis, A. J., Say, M., Snow, A. J., & Grant, B. R. 1994. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* to phosphonate. Plant Pathology 43:200-205.
27. Di, X., Gomila, J. & Takken, F. L.W. 2017. Involvement of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling pathways in the susceptibility of tomato to *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology 18:1024-1035.
28. Gilreath, J. P., & Santos., B. M. 2004. Methyl bromide alternatives for weed and soilborne disease management in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Crop Protection 23:1193-1198.
29. Griffith, J. M., Smillie, R. H., Niere, J. O., & Grant, B. R. 1989. Effect of phosphate on the toxicity of phosphite in *Phytophthora palmivora*. Archives of Microbiology 152:425-429.
30. Guest, D., & Bompeix, G. 1990. The complex mode of action of phosphonates. Australasian Plant Pathology 19:113-115.
31. Hardy, G. E. St. J., Barrett, S., & Shearer, B. L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. Australasian Plant Pathology 30:133-139.

doi:10.6342/NTU202501265

32. Hu, T., Hu, Z., & Zeng, H. 2015. Tomato lipoxygenase D involved in the biosynthesis of jasmonic acid and tolerance to abiotic and biotic stress in tomato. Plant Biotechnology Reports 9:37-45.
33. Liang, Y. P., & Ni, H. F. 2023. The effect of different phosphite spray formulas on phytotoxicity and phosphite uptake of avocado and control efficacy against *Phytophthora* root rot. Journal of Taiwan Agricultural Research 72(2):81-96.
34. Ma, L. J., van der Does, H., Borkovich, K. et al. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. Nature 464:367-373
35. Machinandiarena, M. F., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Daleo, G. R., & Andreu, A. B. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. Journal of Plant Physiology 169(14): 1417-1424.
36. Macioszek, V. K., Jęcz, T., Ciereszko, I., & Kononowicz, A. K. 2023. Jasmonic acid as a mediator in plant response to necrotrophic fungi. Cells 12(7):1027.
37. Mandal, S., Mitra, A., & Mallick, N**.** 2008. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiological and Molecular Plant Pathology 72:56-61.
38. Maurya, S., Dubey, S., Kumari, R., & Verma, R. 2019. Management tactics for fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.): A review. Management 4(5):1-7
39. McDonald, A. E., Grant, B. R., & Plaxton, W. C. 2001. Phosphite (phosphorous acid): Its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. Journal of Plant Nutrition 24(10):1505-1519.
40. Molinari, S., Fanelli, E. & Leonetti, P. 2014. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in *Mi-1*-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. Molecular Plant Pathology 15:255-264.

doi:10.6342/NTU202501265

41. Pérez-Zavala, F. G., Ojeda-Rivera, J. O., Herrera-Estrella, L., & López-Arredondo, D. 2024. Beneficial Effects of Phosphite in A*rabidopsis thaliana* mediated by activation of ABA, SA, and JA biosynthesis and signaling pathways. Plants 13(13):1873.
42. Pilbeam, R. A., Howard, K., Shearer, B. L., & Hardy, G. E. St. J. 2011.Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. Trees 25:1121-1131.
43. Safaie-Farahani, A & Taghavi, S. M. 2017. Transcript analysis of some defense genes of tomato in response to host and non-host bacterial pathogens. Molecular Biology Research Communications 6:177-183.
44. Saindrenan, P., Barchietto, T., Avelino, J., & Bompeix, G. 1988. Effects of phosphite on phytoalexin accumulation in leaves of cowpea infected with *Phytophthora cryptogea*. Physiological and Molecular Plant Pathology 32(3):425-435.
45. Silva, J. A. G., Resende, M. L. V., Monteiro, A. C. A., Pádua1, M. A., Guerra-Guimarães, L., Fernanda L. Medeiros, F. L., Stéfanny A. Martins, S. A., & Botelho1, D. M. S. 2019. Resistance inducers applied alone or in association with fungicide for the management of leaf rust and brown eye spot of coffee under field conditions. Journal of Phytopathology 167:430-439.
46. Singh, V. K., Singh, H. B., & Upadhyay, R. S. 2017. Role of fusaric acid in the development of '*Fusarium* wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. Plant Physiology and Biochemistry 118:320-332.
47. Upadhyay, R. K., & Mattoo, A. K. 2018. Genome-wide identification of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) lipoxygenases coupled with expression profiles during plant development and in response to methyl-jasmonate and wounding. Journal of Plant Physiology 231:318-328.

doi:10.6342/NTU202501265

48. Vinas, M., Mendez, J. C., & Jiménez, V. M. 2020. Effect of foliar applications of phosphites on growth, nutritional status and defense responses in tomato plants. Scientia Horticulturae 265:109200.
49. Walker, G. E. 1989. Phytotoxicity in mandarins caused by phosphorous acid. Australasian Plant Pathology 18:57-59.
50. Wicks, T., & Hall, B. 1990. Evaluation of phosphonic (phosphorous) acid for the control of *Phytophthora cambivora* on almond and cherry in South Australia. Australasian Plant Pathology 19:132-133.
51. Yogev, E., Sadowsky, A., Solei, Z., Oren, Y., & Orbach, Y. 2006. The performance of potassium phosphite for controlling Alternaria brown spot of citrus fruit. Journal of Plant Diseases and Protection 113(5):207-213.

doi:10.6342/NTU202501265

陸、圖表集

表一、本研究 RT-qPCR 使用的引子序列

Table 1. Primers used in this study.

Primer	Use	Sequence (5' to 3')	Reference
JC2355	F-tomato *PR1*	GGATCGGACAACGTCCTTAC	(Safaie-Farahani and Taghavi, 2017)
JC2356	R-tomato *PR1*	GCAACATCAAAAGGGAAATAAT	
JC2361	F-tomato *CAT*	TGGAAGCCAACTTGTGGTGT	(Safaie-Farahani and Taghavi, 2017)
JC2362	R-tomato *CAT*	ACTGGGATCAACGGCAAGAG	
JC2363	F-tomato *LOX*	GGCTTGCTTTACTCCTGGTC	(Safaie-Farahani and Taghavi, 2017)
JC2364	R-tomato *LOX*	AAATCAAAGCGCCAGTTCTT	
JC2365	F-tomato *Actin*	AACTGGGATGATATGGAGAAGA	(Safaie-Farahani and Taghavi, 2017)
JC2366	R-tomato *Actin*	TCTCAACATAATCTGGGTCAT	

doi:10.6342/NTU202501265

表二、盆栽實驗接種分生孢子各組之 Disease severity index 與防治率

Table 2. Disease severity index and control rate in plant pot assay with tomato inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* conidia.

Phosphonic acid applied rate(%)/method	Trial 1		Trial 2		Trial 3		Trial 4	
	DSI (%)	Control rate (%)	DSI (%)	Control rate (%)	DSI (%)	Control rate (%)	DSI (%)	Control rate (%)
Control(water)	67.9	-	60.7	-	42.9	-	96.4	-
0.2 / foliar spray	28.6	57.9	46.4	23.6	21.4	50.1	-	-
0.5 / soil-drench	46.4	31.7	32.1	47.1	X[a]	-	67.8	29.6

[a] Soil-drench with 0.5% phosphonic acid cause significant phytotoxic damage, mainly growth inhibition, in trial 3. Thus, the data is discarded.

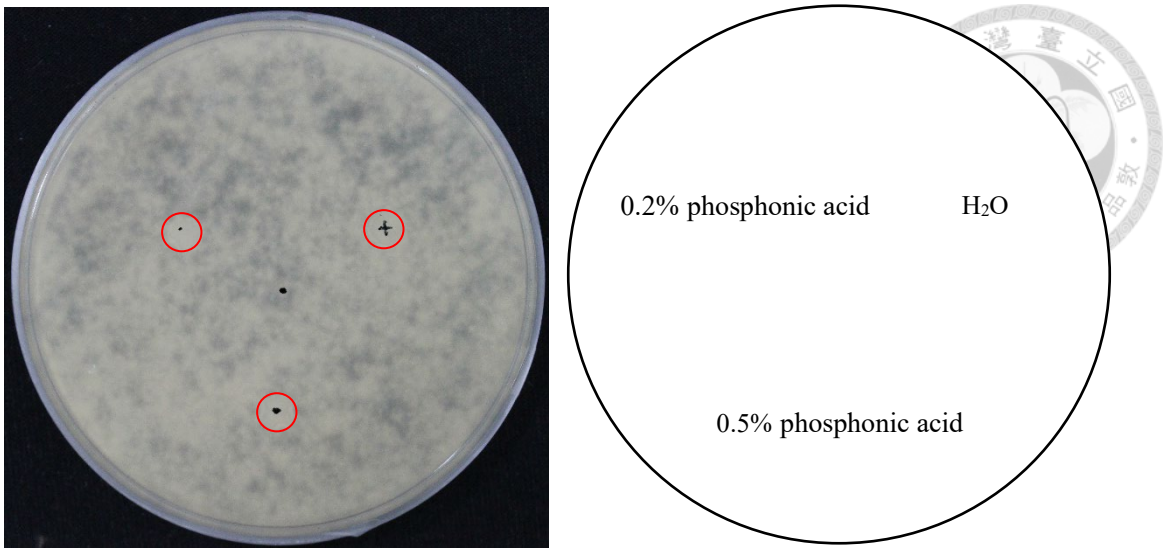
doi:10.6342/NTU202501265

表三、盆栽實驗接種厚膜孢子各組之 Disease severity index 與防治率

Table 3. Disease severity index and control rate in plant pot assay with tomato inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* chlamydospores.

Phosphonic acid applied rate (%)/method	Trial 1		Trial 2		Trial 3	
	DSI (%)	Control rate (%)	DSI (%)	Control rate (%)	DSI (%)	Control rate (%)
Control(water)	21.4	-	28.6	-	32.1	-
0.2 / foliar spray	21.4	0	28.6	0	10.71	66.6
0.5 / soil-drench	10.7	50	14.3	50	0	100

doi:10.6342/NTU202501265



圖一、亞磷酸無法抑制番茄萎凋病菌分生孢子的萌芽生長

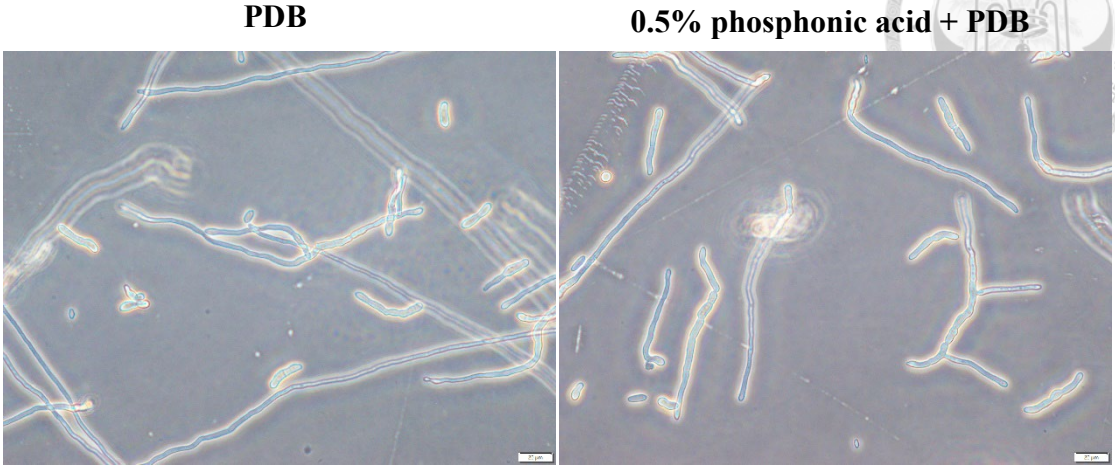
先將 100 µL 濃度 10^5 conidia/mL 的番茄萎凋病菌分生孢子液均勻塗佈於 PDA 上，而後放上 3 片直徑 6 mm 的濾紙片(左圖紅圈處)，分別滴上 7 µL 的 0.2%、0.5%亞磷酸溶液與 ddH_2O (對照組)，於 25℃生長箱黑暗培養 3 天後，記錄濾紙片周圍之抑制圈大小。

Figure 1. Phosphonic acid did not inhibit the conidia germination of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* on PDA.

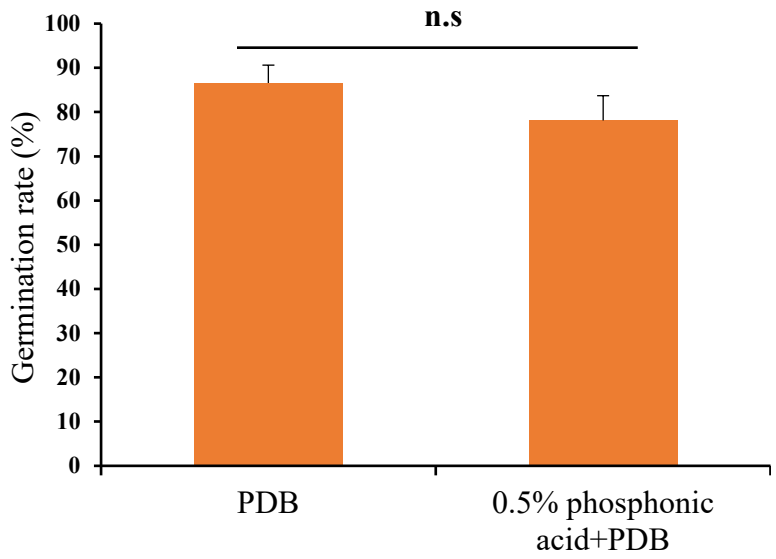
The 100 µL of conidia suspension at 10^5 conidia/mL were evenly spread on PDA plates. Then, three 6 mm diameter filter papers were placed on top in the position of red circles in the left photo. 7 µL of 0.2%, 0.5% phosphonic acid and ddH_2O were added to each filter paper respectively. After incubated in the dark at 25℃ for 3 days, the size of inhibition zones around each filter paper was measured.

doi:10.6342/NTU202501265

(A)



(B)



圖二、亞磷酸對番茄萎凋病菌分生孢子萌芽與生長無顯著影響

將番茄萎凋病菌分生孢子液個別加入 3 mL 的 PDB 與含 0.5%亞磷酸的 PDB 液態培養基，使培養液最終濃度為 10^6 conidia/mL，於 25℃、150 rpm 搖瓶黑暗培養 6 小時後計算發芽率，並於培養 24 小時後，以顯微鏡觀察記錄並比較兩者菌絲生長情況。(A)為兩個處理組發芽後的菌絲，比例尺為 20 μm、(B)為兩者的發芽率，以 Student's *t* test 進行分析(*$p < 0.05$)，n.s 表示統計上無顯著差異，誤差線為該處理組的標準差。

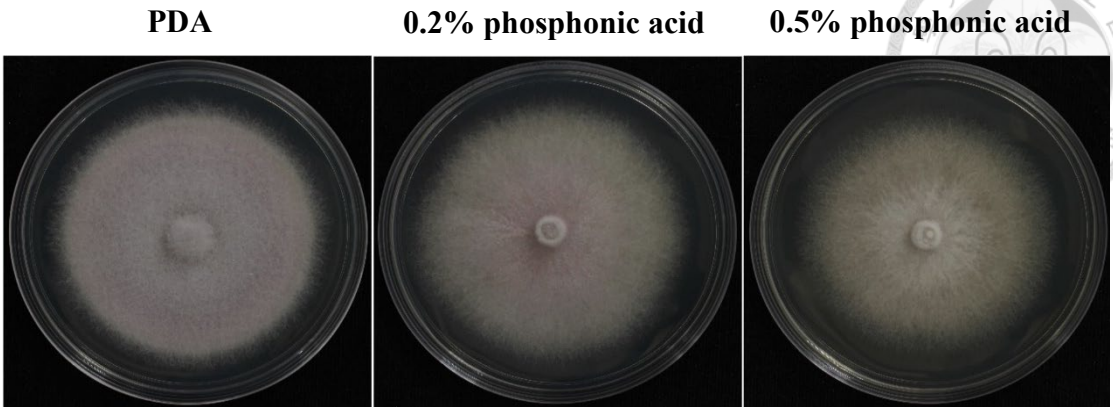
doi:10.6342/NTU202501265

Figure 2. Phosphonic acid did not have a significant impact on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* conidia germination and hyphal growth in PDB.

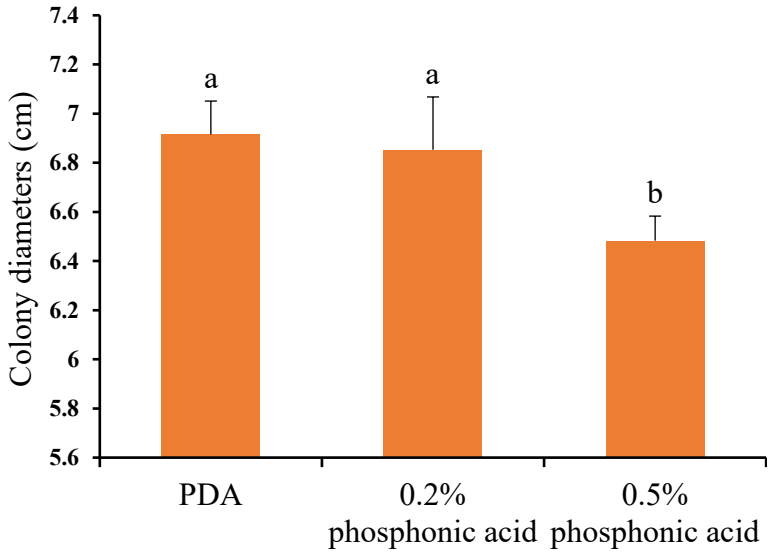
Fresh conidia suspension was added into 3 mL of PDB, and PDB with 0.5% phosphonic acid until final concentration reached 10^6 conidia/mL. After incubated in the dark at 25℃ and 150 rpm for 6 hours, conidia germination rate was measured. Hyphae morphology was observed under microscope after incubated at the same condition but for 24 hours. (A) Hyphae of both treatments. Scale bars, 20 μm. (B) Conidia germination rate of both treatments was analyzed by Student's *t* test with a significance level of $p = 0.05$. The n.s represents no significant difference between two groups. Error bars represent standard deviations.

doi:10.6342/NTU202501265

(A)



(B)



圖三、亞磷酸能抑制番茄萎凋病菌的菌絲生長

在含 0.2%、0.5%亞磷酸與普通的 PDA 培養基中心放上直徑 5 mm 已培養 7 天的番茄萎凋病菌菌絲塊，於 25℃生長箱黑暗培養 7 天後，測量各處理組菌落直徑大小。(A)各處理組之菌落外觀、(B)菌落直徑數據，本實驗數據使用單因子變異數分析($\alpha = 0.05$)，以 Tukey HSD test 進行事後檢定，不同字母的組別間具有顯著差異，誤差線為該處理組的標準差。

Figure 3. Phosphonic acid inhibited the hyphal growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* at higher concentration.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* was grown on a PDA for 7 days. Subsequently, 5

doi:10.6342/NTU202501265

mm diameter agar disks were excised from the cultures and transferred onto other PDA plates, and PDA plates containing 0.2% or 0.5% phosphonic acid. After incubated in the dark at 25℃ for 7 days, the diameter of each colony was measured. (A) Colony morphology and growth of three treatments. (B) Colony diameter data was analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test. Bars with different letters are significantly different according to Tukey's honestly significant difference test ($p < 0.05$). Error bars represent standard deviations.

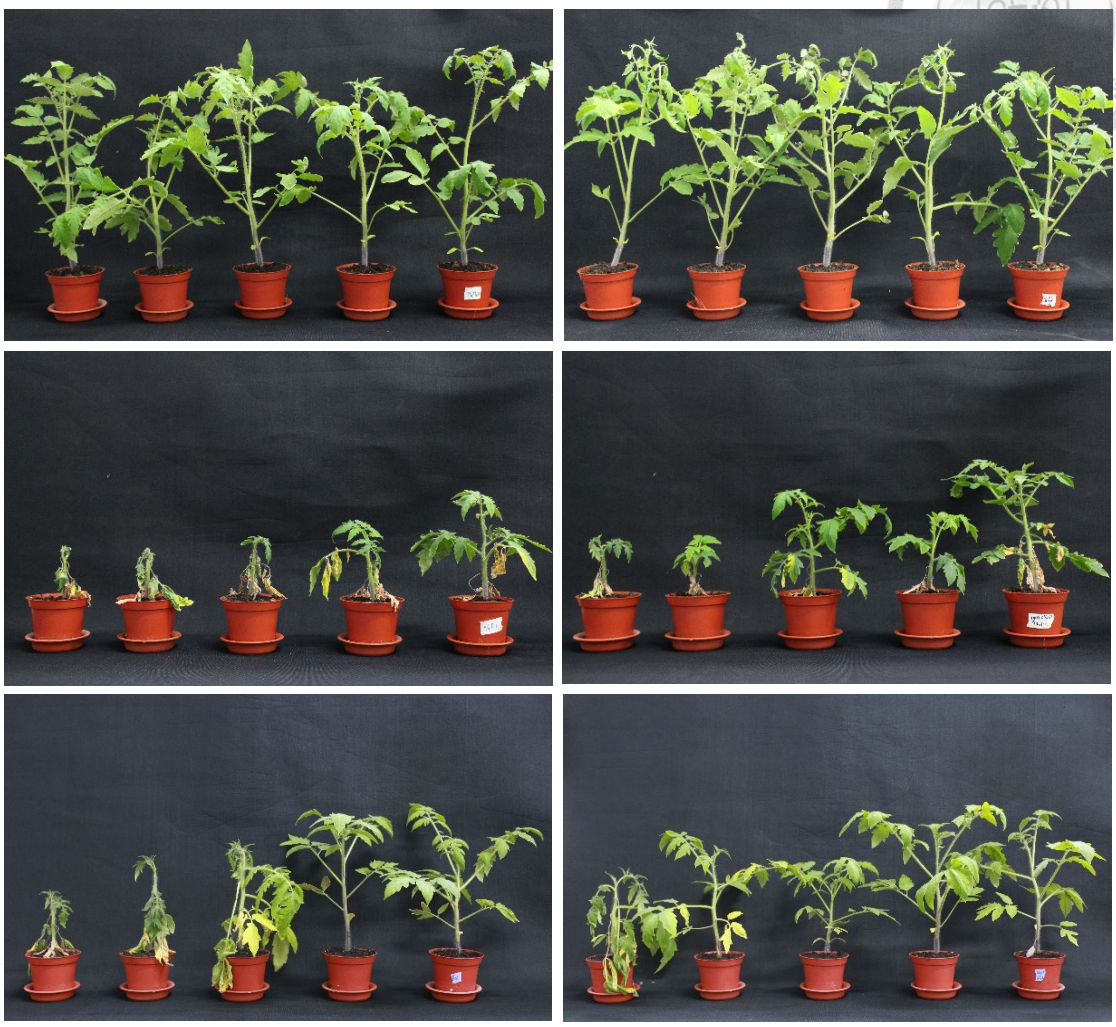
doi:10.6342/NTU202501265

(A)

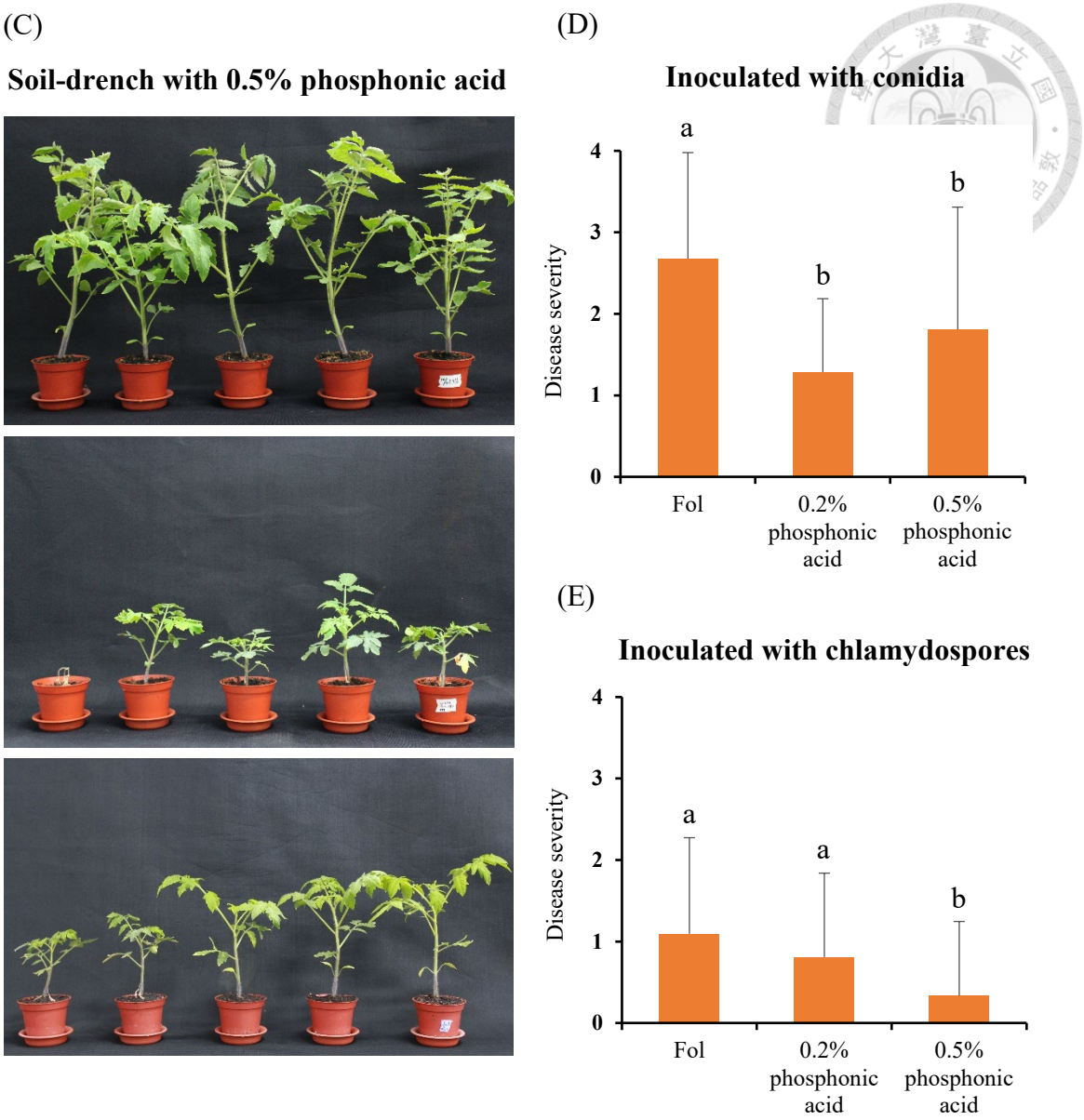
H_2O

(B)

Foliar spray with 0.2% phosphonic acid



doi:10.6342/NTU202501265



圖四、葉噴或澆灌亞磷酸皆能提高番茄對番茄萎凋病的抗病能力

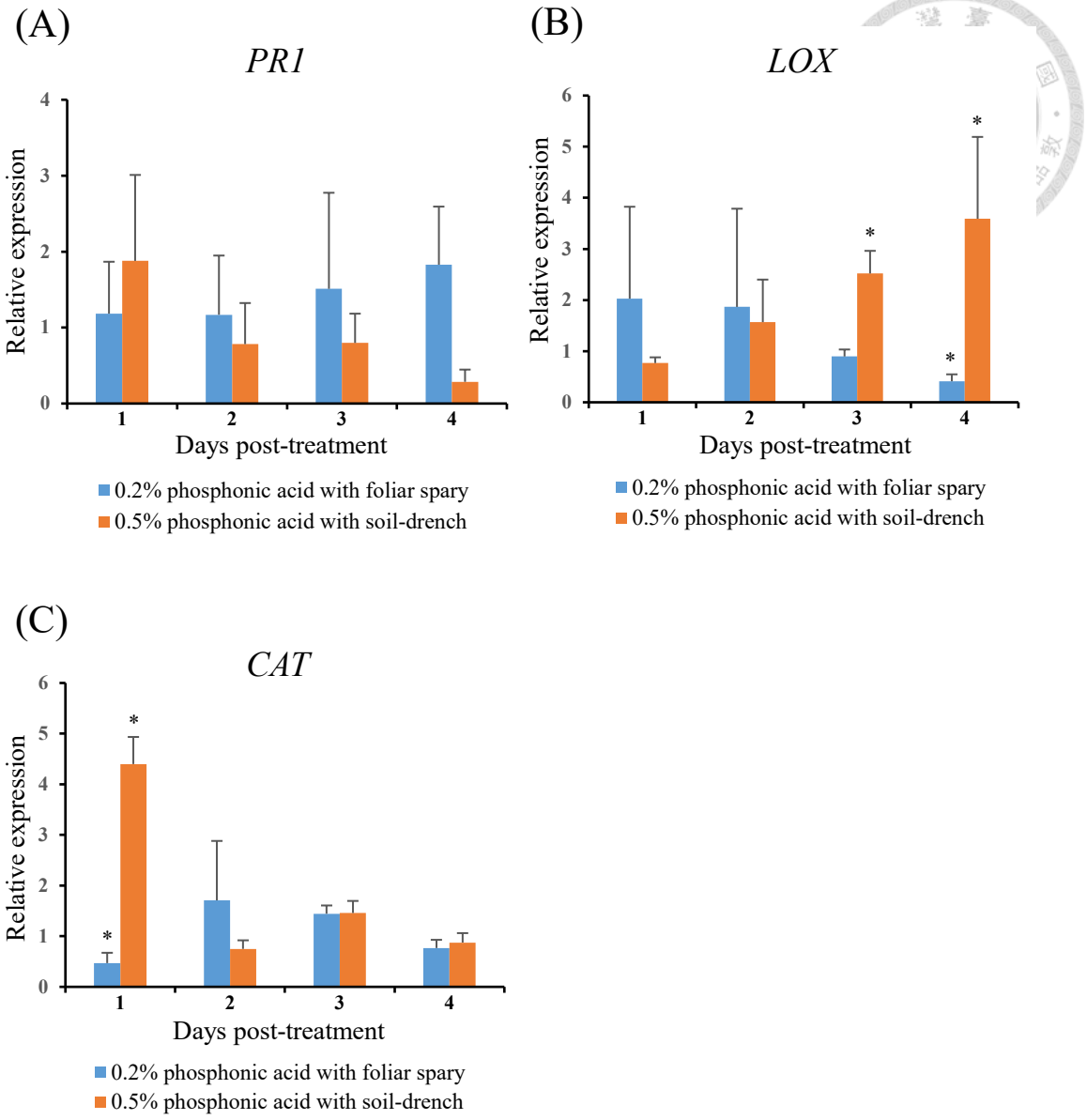
移盆後番茄苗分批進行 0.2%亞磷酸葉面噴灑、0.5%亞磷酸土壤澆灌、與無處理(控制組)，於處理後 3 天將植株根部接種番茄萎凋病菌後種回原盆栽，於接種後 21 或 28 天記錄各組的發病情況與計算 DSI 值。(A)、(B)、(C)分別為三種處理組，各組上圖為無接菌的植株、中間為接種分生孢子、下圖為接種厚膜孢子。(D)、(E)分別為接種分生孢子與厚膜孢子組別的罹病度，使用無母數分析($\alpha = 0.05$)，並以 Dunn's test 進行事後檢定，不同字母的組別間具有顯著差異，誤差線為該處理組的標準差。

doi:10.6342/NTU202501265

Figure 4. Both foliar spray and soil-drench applications of phosphonic acid reduced the severity of Fusarium wilt in tomato.

Two-week-old tomatoes were treated with foliar spraying with 0.2% phosphonic acid, soil drenching with 0.5% phosphonic acid or none as control. Three days after treatments, tomatoes were inoculated by either conidia suspension or chlamydospore suspension. Disease severity was measured at 21 or 28 days post-inoculation depending on inoculation methods. (A), (B) and (C) represent three different treatments. In each treatment, the upper one is no inoculation, the middle one is inoculated with conidia and the bottom one is inoculated with chlamydospores. (D) and (E) are disease severity data of two inoculation methods. The data was analyzed using Kruskal-Wallis rank sum test and followed by Dunn's test. Bars with different letters are significantly different according to Dunn's test ($p < 0.05$). Error bars represent standard deviations.

doi:10.6342/NTU202501265



圖五、亞磷酸能誘導部分番茄根部防禦相關基因的表現

種植 28 天的番茄植株分組進行 0.2%亞磷酸葉面噴灑、0.5%亞磷酸土壤澆灌、與無處理(控制組)，並於處理後 1、2、3、4 天對各個組別進行根部 RNA 萃取，並透過 qPCR 分析 *PR1*、*LOX*、*CAT* 三個基因的相對表現量，以番茄的 Actin 基因做為參考基因，以 comparative Ct (ΔΔCt) method 校正各待測基因的表現量。(A)、(B)、(C)分別為 *PR1*、*LOX*、*CAT* 三個基因在經亞磷酸葉噴或澆灌處理後，四天內相對表現量的變化。各基因表現量與控制組以 Student's *t* test 進行統計分析(*$p < 0.05$)，誤差線為該處理組的標準差。

doi:10.6342/NTU202501265

Figure 5. Phosphonic acid induced the expression of some defense-related genes in tomato roots.

Four-week-old tomatoes were treated with foliar spraying with 0.2% phosphonic acid, soil drenching with 0.5% phosphonic acid or none as control. Tomato roots of all treatment were harvested and extracted for RNA at 1, 2, 3, and 4 days post-treatment, except control group only harvested on the first day post-treatment. Gene expression levels relative to the internal control *Actin* gene were quantified by RT-qPCR. (A), (B), and (C) are the relative expression level of *PR1*, *LOX*, and *CAT* at 1, 2, 3, and 4 days post-treatment. Both treatments were compared with control group separately using Student's *t* test with a significance level of $p = 0.05$. '*' represent $p < 0.05$. Error bars represent standard deviations.

doi:10.6342/NTU202501265