

國立中興大學植物病理學系
Department of Plant Pathology
National Chung Hsing University

碩士學位論文

Master Dissertation

Acibenzolar-S-methyl 防治不結球白菜病害之應用與
可能抗病機制之探討

Application of acibenzolar-S-methyl and its resistance
mechanism in controlling diseases of Pak-choi

National Chung Hsing University

指導教授：鍾文鑫 (Wen-Hsin Chung)

研究生：許翠蘭 (Tsui-Lan Hsu)

中華民國一百年七月

July 2011

國立中興大學植物病理學系
碩士學位論文

題 目：Acibenzolar-S-methyl 防治不結球白菜病害之
應用與可能抗病機制之探討

姓 名：許翠蘭 學 號：7098035011

經口試通過特此證明

論文指導教授：

國立中興大學植物病理學系副教授

鍾文鑫 博士

論文考試委員：

行政院農業委員會種苗改良繁殖場
生物技術課副研究員兼課長

鍾文全 博士

國立中興大學植物病理學系副教授

張碧芳 博士

國立中興大學植物病理學系副教授

鍾文鑫 博士

鍾文全

張碧芳

鍾文鑫

中 華 民 國 一 〇 〇 年 七 月 十 三 日

誌謝

感謝恩師 鍾文鑫老師在研究所兩年給予許多的教誨與指導，使我在數據的呈現與表達上多有訓練。也感謝老師在生活中的關懷與鼓勵，使我能繼續不斷的往前。

論文初稿承蒙 鍾文全博士與張碧芳博士的悉心斧正，幫助論文中圖表之呈現更為完美，也細心地修改論文許多遺漏的細節，使整本論文更為完善。

研究的過程中感謝植物病害管理研究室提供病原菌，園藝學系蔬菜實驗室提供的小白菜種子。還要感謝植物病害管理研究室、微生物訊息傳遞研究室與生理與分子病理實驗室等提供的儀器，協助我完成論文中大部分的數據。

特別感謝宗俊學長在酵素分析上給予許多的幫助與建議，使我不至走許多迂迴的道路。

於實驗室 2 年來，感謝舒雅學姊以簡顯易懂的教學給予我實驗上的幫助，還會三不五時提供好吃的自製點心給我解饞；感謝以錚學長在課業、實驗與論文撰寫等方面提供許多寶貴的建議與見解，也時時帶我去覓食解決基本民生需求；感謝苡琦和千祥兩位同學在課業與研究上彼此扶持、互相鼓勵，一同走過各種關卡；感謝小可學長、人瑋學長、旻遠學長、俐雯學姊、婉玉學姊、盈潔、志恩、俊延、以及許多大學部的學弟妹們提供各樣的幫助與建議。另外，還要謝謝冠民讓我再晚也能完成酵素分析的實驗。

感謝研究所兩年來召會中弟兄姊妹們的關心與代禱，謝謝 SH 成員對我許多的包容與扶持。腓 1:19 「因為我知道，這事藉著你們的祈求，和耶穌基督之靈全備的供應，終必叫我得救。」

最後，感謝我最最親愛的父親與母親，是你們使我生活無慮地完成這兩年的學業，感謝你們在背後默默為我付出的一切，叫我可以盡情自由的奔跑。謹此將論文獻給我最親愛的家人和所有愛我的朋友們，謝謝你們！

摘要

Acibenzolar-S-methyl (ASM) 係苯并噻二唑 (benzothiadiazole) 的衍生物，其透過植物體內的水楊酸訊號傳遞路徑，誘導植物產生防禦反應而達到防治病害之效，此現象稱為誘導性抗病 (induced resistance)。本研究目的為探討 ASM 應用在不結球白菜上是否會造成生理傷害、能否防治不結球白菜炭疽病 (anthracnose) 和苗立枯病 (damping-off)、及 ASM 誘導抗病之可能作用機制。以葉面噴灑和種子浸泡 2 種方式處理 1、10 和 100 mg/L ASM，觀察對王冠和三鳳 2 號品種的生長影響。結果顯示施用高濃度 (100 mg/L) ASM 時會引起植株鮮重減少、矮化或葉片畸形等藥害 (phytotoxicity)；而種子方面，浸泡高濃度 ASM 的時間越久，則越容易引起種子發芽率降低或幼苗生長勢較差等徵狀。在防治炭疽病試驗中，於接種病原菌前預先處理 1 和 10 mg/L ASM，經統計分析其罹病度後得知，於接種前 1 天施用 1 與 10 mg/L ASM 之防治效果可達 80% 以上，而接種前 4 天內皆為有效防治之施藥時間點，防治效果可超過 50%，其中預先處理 10 mg/L ASM 之防治效果與百克敏和亞托敏的防治效果相同。於種子浸泡 ASM 防治不結球白菜苗立枯病之試驗中，僅有以 10 mg/L ASM 處理三鳳 2 號品種種子 18 小時以上能防治立枯病，然此種處理條件亦會對幼苗生長造成影響，對植株生長影響甚大，顯示 ASM 不適合以種子浸泡之方式處理不結球白菜。本試驗分析不結球白菜抗病相關之酵素，結果得知王冠品種之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性於處理 1 mg/L ASM 後 24 小時達最高，而三鳳 2 號品種之 SOD 活性於處理 10 mg/L ASM 後 24 小時達最高；而接種炭疽病菌後，王冠品種的活性皆明顯高於對照組，三鳳 2 號品種的活性則於 12 小時後明顯高於對照組 0.7 倍。然於接種前 3 小時施用 1 與 10 mg/L ASM 之王冠品種於 6 小時起 SOD 活性開始上升，在 24 小時後活性增加 0.5 與 0.7 倍；三鳳 2 號品種分別預處理 1 與 10 mg/L ASM 之後的 SOD 活性於 3 和 6 小時後開始明顯增加，24 小時後活性增加 0.3 與 0.4 倍。於過氧化氫酶 (catalase, CAT) 之活性測定，顯示處理 10 mg/L ASM 的王冠品種於 6 小時活性會降低 0.6 倍，但隨後又回復至與對照組無明顯差異，然三鳳 2 號品種於施用各處理所測得之 CAT 活性皆無明顯差異。另王冠品種於接種病原菌後 3 與 18 小時，CAT 活性明顯降低 0.8 與 0.5 倍；而三鳳 2 號品種則於接種後 6 小時，活性明顯減少 0.8 倍。

若接種前 3 小時預處理 10 mg/L ASM 之王冠品種，CAT 活性於 6 小時後明顯降低 0.8 倍，而三鳳 2 號品種預處理 1mg/L ASM 之活性，於 12 小時後明顯降低 0.7 倍。過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性測定指出，處理 1 mg/L ASM 後王冠品種之 POD 於第 5 天活性增加達 1.4 倍，處理 10 與 100 mg/L ASM 後 POD 於第 4 天活性達到最高，分別較對照組增加 1.9 與 4.2 倍；三鳳 2 號品種處理 1 與 10 mg/L ASM 後之 POD 活性於 1 天後開始增加，而 100 mg/L ASM 處理之植株於 4 天後開始增加，且所有處理組之活性皆可持續至第 7 天，活性分別較對照組增加 0.5、1.0、0.9 倍。此兩種品種接種病原菌後，王冠品種的 POD 活性於 1 天後開始上升，於第 6 天時明顯增加 0.9 倍；而三鳳 2 號品種之活性則於第 6 天才明顯增加 0.3 倍。王冠品種預處理 1 mg/L ASM 之 POD 活性於 3 天後開始顯著增加，第 6 天明顯增加達 0.7 倍；而預處理 10 mg/L ASM 之活性於 3 小時內立刻被活化，於第 3 天明顯增加達 0.6 倍；另預處理 100 mg/L ASM 之活性於 1 天起顯著增加，則於第 5 天明顯增加達 1.7 倍。三鳳 2 號品種預處理 1 mg/L ASM 之 POD 活性與對照組無明顯差異；而預處理 10 mg/L ASM 後之活性於第 3 天明顯增加 0.7 倍；另預處理 100 mg/L ASM 植株之 POD 活性於第 6 天後明顯增加 0.4 倍。於苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 之活性測定，結果顯示王冠品種處理 1 與 10 mg/L ASM 後，PAL 活性於第 3 天明顯增加 0.1 與 0.2 倍；100 mg/L ASM 處理之植株體內活性於 5 天後明顯增加，於第 7 天活性增加達 0.2 倍。而三鳳 2 號品種施用 1、10、100 mg/L ASM 後 7 天，PAL 活性分別明顯增加 0.4、0.4、0.6 倍。於接種病原菌後，王冠品種於 6 天後，PAL 活性明顯增加 0.2 倍；而三鳳 2 號品種的活性無任何改變。此外，王冠品種在接種前預先處理 1 mg/L ASM 之 PAL 活性無任何改變，而預處理 10 與 100 mg/L ASM 後，PAL 活性於第 6 天皆明顯增加 0.2 倍。三鳳 2 號品種預處理 1 mg/L ASM 後 PAL 活性無任何改變，而預處理 10 mg/L ASM 植株的活性，則於 6 天後明顯增加 0.3 倍；另預處理 100 mg/L ASM 後的 PAL 活性於 3 小時與第 4 天顯著增加 0.4 與 0.2 倍。前人研究指出，植物抗病性的產生除上述與抗病有關酵素外，亦包含病程相關蛋白質 (pathogenesis-related proteins, PR protein) 和總酚化物 (total phenolic compounds) 等，未來將進一步分析其他與抗病性產生有關之機制。

關鍵字：acibenzolar-S-methyl (ASM)、不結球白菜、誘導性抗病、藥害、機制



Abstract

Acibenzolar-S-methyl (ASM) is one of the derivatives of benzothiadiazole. It can induce plant defense responses to control diseases by salicylic acid signaling pathway. Thus, ASM can be an alternative control agent in protecting crops. In this study, the objectives are 1) estimation of phytotoxicity caused by ASM on Pak-choi (*Brassica campestris* L. Chinese Group), 2) efficacy of controlling anthracnose and damping-off of Pak-choi, 3) possibility of resistant mechanisms inducing by ASM in Pak-choi. Based on leaf spraying and seed soaking, two Pak-choi cultivars of Wang Guan and San Feng No.2 were treated with 1, 10, and 100 mg/L ASM, respectively. The leaf spraying results indicated that Pak-choi could show some abnormal symptoms caused by 100 mg/L ASM, including fresh weight reduction, dwarf or deformation of leave shape. For seed treatment, the rate of seed germination were reduced, or even germination the seedling did not show healthy under 10 or 100 mg/L ASM. Comparing the efficacy of two cultivars pre-treated with 1 and 10 mg/L ASM 1 day or 4 day before inoculated 10^5 conidia/ml *C. higginsianum* PA01 could induce resistance and reduce more than 80% or 50% disease severity, respectively. Consequently, the two cultivars pre-treated with 10 mg/L ASM showed same efficacy as treated fungicides of pyraclostrobin and azoxystrobin. The other side, only San Feng No.2 cultivar showed good efficacy to against damping-off caused by *Rhizoctonia solani* when the seeds soaked with 10 mg/L ASM for 18 hrs. However, the seedlings of two cultivars showed abnormal symptoms after treated with 10 mg/L ASM. Thus, seed treatment might not good method for controlling damping-off. For carrying out the resistance mechanism of Pak-choi, several enzymes corresponded with crops resistance were analyzed, including superoxidase dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and phenylalanine ammonia lyase (PAL). The activity of SOD in Wang Guan cultivar was highest at 24 hrs after treated with 1 mg/L ASM, however, the activity of SOD in San Feng No.2 cultivar was highest at 24 hrs after treated with 10 mg/L ASM. The activities of SOD in Wang Guan cultivar were 0.6 ~ 0.8 times high; meanwhile, the activity of SOD in San Feng No.2 cultivar was 0.7 times high at 12 hrs after inoculated with *C. higginsianum* PA01. The activities of SOD in Wang Guan cultivar were 0.7 and 0.5 times high at 24 hrs, and the activities of SOD in San Feng No.2 cultivar were 0.3 and 0.4 high at 24 hrs after pre-treated with 1 and 10 mg/L ASM. In the activity of CAT, the Wang Guan cultivar was reduced 0.6

times high at 6 hrs after treated 10 mg/L ASM and subsequently returned to normal level. Moreover, the activity of CAT in San Feng No.2 cultivar did not show significant difference after treated with ASM. After inoculation, the activities of CAT in Wang Guan cultivar were reduced 0.8 and 0.5 times at 3 and 18 hrs and the activity of CAT in San Feng No.2 cultivar was reduced 0.8 times at 6 hrs. The other side, the activity of CAT in Wang Guan cultivar was reduced 0.8 times at 6 hrs after pre-treated with 10 mg/L ASM, however, the activity of CAT in San Feng No.2 cultivar was reduced 0.7 times at 12 hrs after pre-treated with 1 mg/L ASM. The POD test indicated that the activity of POD in Wang Guan cultivar was increased around 1.4 times high at 5 days after treated 1 mg/L ASM, and the POD activities were 1.9 and 4.2 times high at 4 days after treated 10 and 100 mg/L ASM, respectively. Meanwhile, the activity of POD in San Feng No.2 cultivar was increased at 1 day after treated with 1 and 10 mg/L, and the activity increased at 4 days after with 100 mg/L. In this test, the activities of POD in the two cultivars were induced and the activities could be persisted for 7 days. Comparing the POD activities without inoculation, the POD activities in Wang Guan cultivar and San Feng No.2 cultivar were increased 0.9 and 0.3 times at 6 days after inoculation. Moreover, the POD activities of Wang Guan cultivar were highest at 6 days, 3 days and 5 days after pre-treated with 1, 10, and 100 mg/L ASM, respectively. However, the activity of POD in San Feng No.2 cultivar did not show significant difference after pre-treated with 1 mg/L ASM. The activity of POD in San Feng No.2 cultivar was increased 0.7 times at 3 days after pre-treated with 10 mg/L ASM, and the activity of POD in San Feng No.2 cultivar was increased 0.4 times at 6 days after pre-treated with 100 mg/L ASM. For the activity of PAL in Pak-choi, the Wang Guan cultivar was increased significantly 0.1 and 0.2 times high at 3 days after treated with 1 and 10 mg/L ASM, and the PAL activity was increased significantly at 5 days and increased 0.2 times high at 7 days after treated with 100 mg/L ASM. The other sides, the activities of PAL in San Feng No.2 were increased 0.4, 0.4, and 0.6 times high at 7 days after treated with 1, 10, and 100 mg/L ASM, respectively. The activity of PAL in Wang Guan cultivar was increased 0.2 times at 6 days, however, the activity of PAL in San Feng No.2 cultivar did not show significant difference after inoculating. The activity of PAL in Wang Guan cultivar did not show significant difference after pre-treated with 1 mg/L ASM, however, the activities of PAL in Wang Guan cultivar were both increased 0.2

times at 6 days after pre-treated with 10 and 100 mg/L ASM. The activity of PAL in San Feng No.2 cultivar did not show significant difference after pre-treated with 1 mg/L ASM, however, the activity of PAL in San Feng No.2 cultivar was increased 0.3 times at 6 days after pre-treated with 10 mg/L ASM. Moreover, the activities of PAL in San Feng No.2 were increased 0.4 and 0.2 times at 3 hrs and 4 days after pre-treated with 100 mg/L ASM. In this study, the other defense responses of crops were not examined, including pathogenesis-related (PR) proteins or content of total phenolic compounds. These resistance mechanisms will be carried out in future.

Keywords: acibenzolar-S-methyl (ASM), Pak-choi, induced resistance, phytotoxicity, mechanism



目 次

中文摘要	i
英文摘要	iv
目次	vii
前言	1
材料與方法	4
一、供試植物	4
二、供試菌株	4
三、Acibenzolar-S-methyl (ASM) 配製	4
四、ASM 對病原菌菌絲生長之影響	4
五、ASM 對不結球白菜生長與發芽之影響	5
六、ASM 防治不結球白菜炭疽病之應用	5
(一)白菜炭疽病接種源之製備與接種	5
(二)防治不結球白菜炭疽病之溫室試驗評估	6
1. ASM 防治白菜炭疽病之評估	6
2. ASM 與不同作用機制之殺菌劑防治白菜炭疽病之比較	6
七、ASM 防治不結球白菜幼苗立枯病之應用	6
(一)白菜幼苗立枯病接種源之製備	6
(二)浸泡 ASM 對防治不結球白菜幼苗立枯病之評估	7
八、酵素活性測定	7
(一)酵素測定材料取樣	7
(二)超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 之活性測定	8
(三)過氧化氫酶 (catalase, CAT) 之活性測定	8
(四)過氧化酵素 (peroxidase, POD) 之活性測定	9
(五)苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 之活性測 定	9
九、統計分析	10
結果	11

一、ASM 對病原菌菌絲生長之影響	11
二、施用 ASM 對不結球白菜生長之影響	11
三、防治不結球白菜炭疽病之溫室試驗評估	12
(一)ASM 防治白菜炭疽病之評估	12
(二)比較 ASM 與不同作用機制之殺菌劑防治白菜炭疽病的效果	13
三、ASM 防治不結球白菜幼苗立枯病之應用	13
四、酵素活性測定	14
(一)超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 之活性測定	14
(二)過氧化氫酶 (catalase, CAT) 之活性測定	14
(三)過氧化酵素 (peroxidase, POD) 之活性測定	15
(四)苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 之活性測定	16
討論	18
參考文獻	23



表目次

表一、不同濃度 ASM 對 <i>Colletotrichum higginsianum</i> PA01 與 <i>Rhizoctonia solani</i> N-1 菌絲生長之影響	28
表二、施用不同濃度與次數之 ASM 對王冠與三鳳 2 號品種之生長影響	29
表三、浸泡不同濃度 ASM 與不同時間浸泡對王冠和三鳳 2 號種子發芽率之影響	30
表四、不同時間下預先處理不同濃度 ASM 對王冠與三鳳 2 號炭疽病之防治效果	31
表五、比較 ASM 與其他殺菌劑對不結球白菜炭疽病之防治效果	32
表六、王冠和三鳳 2 號種子以不同濃度 ASM 浸泡不同時間後對幼苗立枯病之防治效果	33
表七、王冠和三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，24 小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化.....	34
表八、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，24 小時內之超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的變化.....	35
表九、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，24 小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化	36
表十、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，24 小時內之過氧化氫酶 (CAT) 活性的變化.....	37
表十一、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化	38
表十二、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，6 天內之過氧化酵素 (POD) 活性的變化	39
表十三、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 活性的變化.....	40
表十四、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，6 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (PAL) 活性的變化....	41

圖目次

圖一、施用 100 mg/L ASM 對不結球白菜植株外觀之影響。(A)王冠品種 (B)三鳳 2 號品種。.....	42
圖二、處理 100 mg/L ASM 對不結球白菜幼苗外觀之影響。(A)王冠品種對照組 (B) 王冠品種處理組 (C)三鳳 2 號品種對照組 (D)三鳳 2 號品種處理組。.....	43
圖三、王冠品种植株處理不同濃度 ASM 後,24 小時內之超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的變化。.....	44
圖四、三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後,24 小時內之超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的變化。.....	45
圖五、王冠與三鳳 2 號品种植株接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01, 24 小時內之超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的變化。.....	46
圖六、王冠品种植株處理不同濃度 ASM 後,再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01, 24 小時內之超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的變化。.....	47
圖七、三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後,再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01, 24 小時內之超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的變化。.....	48
圖八、王冠品种植株處理不同濃度 ASM 後,24 小時內之過氧化氫酶 (CAT) 活性的變化。.....	49
圖九、三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後,24 小時內之過氧化氫酶 (CAT) 活性的變化。.....	50
圖十、王冠與三鳳 2 號品种植株接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01, 24 小時內之過氧化氫酶 (CAT) 活性的變化。.....	51
圖十一、王冠品种植株處理不同濃度 ASM 後,再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01, 24 小時內之過氧化氫酶 (CAT) 活性的變化。.....	52
圖十二、三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後,再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01, 24 小時內之過氧化氫酶 (CAT) 活性的變化。.....	53
圖十三、王冠品种植株處理不同濃度 ASM 後,7 天內之過氧化酵素 (POD) 活性的變化。.....	54
圖十四、三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後,7 天內之過氧化酵素 (POD) 活性的變化。.....	54

性的變化。	55
圖十五、王冠與三鳳 2 號品種植株接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，6 天內之 過氧化酵素 (POD) 活性的變化。	56
圖十六、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，6 天內之過氧化酵素 (POD) 活性的變化。	57
圖十七、三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，6 天內之過氧化酵素 (POD) 活性的變化。	58
圖十八、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之苯丙胺酸氮裂解酵素 (PAL) 活性的變化。	59
圖十九、三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之苯丙胺酸氮裂解酵素 (PAL) 活性的變化。	60
圖二十、王冠與三鳳 2 號品種植株接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，6 天內之 苯丙胺酸氮裂解酵素 (PAL) 活性的變化。	61
圖二十一、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C. higginsianum</i> PA01，6 天內之苯丙胺酸氮裂解酵素 (PAL) 活性的變化。	62
圖二十二、三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 <i>C.</i> <i>higginsianum</i> PA01，6 天內之苯丙胺酸氮裂解酵素 (PAL) 活性的變化。	63

前言

化學農藥自二次世界大戰後陸續問世，不僅解決農業生產過程中的病蟲害問題，也大幅提升了農產品的質與量。然而，大量施用化學農藥的同時，也對環境和人類健康造成極大的衝擊，如破壞生態平衡、病原菌和害蟲產生抗藥性、農藥殘留危害人類健康等 (Wang et al., 2009)。隨著人類對自身健康與環境保育意識日漸重視，世界各國皆趨向資源與環境品質能永續利用為目標的「永續農業」發展 (American Society of Agronomy, 2011)。而在化學農藥開發上也都以高效能、低毒性、低污染、以及具選擇性農藥為主 (Wu, 2009)，其中有一類的化學農藥能刺激植物啟動防禦機制以抵抗外來的病原菌攻擊 (Wang et al., 2009)。誘導性抗病可有效地防治多種作物病害 (Vallad and Goodman, 2004)，不像其他的化學殺菌劑會使病原菌產生抗藥性，且對人類健康和環境衝擊的影響較少藥物殘留之問題 (Cao et al., 2005)。因此誘導性抗病成為防治病害的新策略之一，亦可與傳統作物保護方法互補 (Walters et al., 2005a)。

藉由誘導物 (inducer) 啟動植物防禦系統，以抵抗病原菌和食草動物之攻擊，或是非生物逆境，此現象稱為誘導性抗病 (induced resistance) (Walters et al., 2005b; Faessel et al., 2008)。早在 1901 年 Ray 和 Beauverie 兩位學者同時觀察到此現象，他們將欲接種的病原菌以熱或冷處理使其失去毒力，隨後再接種具毒力的菌株，結果顯示寄主具有抗病的能力 (Faessel et al., 2008)。這種藉由死體寄生型病原菌 (necrotrophic pathogen) 而廣泛地活化植物系統性防禦機制的現象，又稱為系統性獲得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) (Oostendorp et al., 2001)。White (1979) 發現水楊酸 (salicylic acid, SA) 在系統獲得抗性中扮演重要的角色，並且施用水楊酸於番茄植株上可誘導抗病反應。植物啟動抗病反應需透過水楊酸訊號傳遞路徑活化細胞中的 nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1) 蛋白質，被活化的 NPR1 單體能進入細胞核中與 TGA transcription factors 結合就能活化抗病相關基因，如病程相關蛋白質 (pathogenesis-related proteins, PR protein) (Pieterse et al., 2009)。

除水楊酸這類天然誘導物外，Kuć 於 1982 年證實有兩類的化合物能像死體寄生型病原菌一樣可誘導植物產生抗病反應，分別為 2,6-dichloro isonicotinic acid

(INA) 和其衍生物與 benzo [1,2,3] thiadiazole 衍生物。而利用 benzo [1,2,3] thiadiazole 衍生物中的 S-methyl benzo[1,2,3] thiadiazole-7-carbothiate (acibenzolar-S-methyl, ASM) 作為誘導植物抗病性的商品已於歐美地區販售 (Oostendorp et al., 2001)。ASM 化學名稱為 benzo (1,2,3) thiadiazole-7- carbothioic acid-S-methyl ester (BTH)，由先正達 (Syngenta) 公司所開發的產品，在歐洲以 Bion[®] 50 WG (Syngenta Ltd., Basel) 作為商品名登記，而在美國的商品名為 Actigard[®] 50 WG (Syngenta Crop Protection, Greensboro, N.C.)。ASM 是苯并噻二唑 (benzothiadiazole) 的衍生物，根據殺菌劑抗藥性行動委員會 (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC) 所制定的殺菌劑作用機制分類，其歸屬於誘導寄主防禦反應的一群 (<http://www.frac.info>)。其本身不具有殺菌之效，而是透過植物體內的水楊酸訊號傳遞路徑，誘導植物產生防禦反應 (Oostendorp et al., 2001)。

ASM 能誘導出的防禦反應包括活化氧族 (active oxygen species, AOS) 的累積進而活化超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (catalase, CAT) 和氧化酵素 (peroxidase, POD) 等抗氧化酵素；植物防禦素 (phytoalexins) 的產生；PR proteins (如 chitinase 或 β -1,3-glucanase) 的產生；以及增加苯基丙酸類生合成途徑 (phenylpropanoid pathway) 的酵素以產生具有抗生物活性能力之二次代謝物或是強化細胞壁的木質素 (lignin) 等 (Faessel et al., 2008)。

ASM 最早在歐洲被應用到田間防治小麥白粉病 (*Triticum aestivum* L.) 和黑麥白粉病 (*Hordeum vulgare* L.) (Görlach et al., 1996)。近年來更推薦用於防治多種由病原生物，包括真菌、細菌、病毒、線蟲 (Owen et al., 2002; Chinnasri et al., 2006)、及寄生植物所引起的作物病害 (Véronési et al., 2009) 等。目前已知 ASM 可防治田間 32 種作物病害，若加上溫室試驗測試結果，已超過 14 科的作物利用 ASM 進行病害防治，例如油菜 (*Brassica napus* L.) (Liu et al., 2006) 和花椰菜 (*B. oleracea* L. var. *botrytis* L.) (Ziadi et al., 2001) 等。然而，有許多研究指出利用 ASM 誘導作物產生抗性常有副作用產生，如小麥在分蘗期間施用 Bion[®] 溶液會減少分蘗數，進而降低其生物量 (biomass) (Heil et al., 2000)；此外當澆灌 5 μ M 以上的 ASM 濃度時可防治木瓜疫病，但濃度高達 100 μ M 時，木瓜植株較其他處理組明顯矮小 (Zhu et al., 2003)。前人研究指出產生誘導性抗病所消耗的碳素和能量來源為與植物初級生長所需競爭而來。因此，在評估 ASM 能否防治作物病害的同時，也需評估是否會

影響作物的產量 (Heil, 2001)。

台灣位處亞熱帶，適合許多短期栽培之食用蔬菜生長，其中不結球白菜 (Pak-choi, Chinese mustard, or non-heading Chinese cabbage; *Brassica campestris* L. Chinese Group) 為主要的食用葉菜之一。不結球白菜原產於中國南方亞熱帶地區，別名小白菜、青菜、散葉白菜或菘。臺灣的小白菜係最早隨先民渡海來台的蔬菜之一，發源於華南，推測由中國一個品種衍生而來，與中國的小白菜有多種類型有所差異。不結球白菜包括普通白菜 (青梗白菜、白梗白菜)、烏塌菜、菜薹 (油菜苔與紫菜苔)、薹菜與分蘗菜 (Wang and Lin, 2005)。依據《農業統計年報》統計，包含小白菜、油菜及青梗白菜的不結球白菜在民國 98 年的栽培面積約為 4,903 公頃，其中以雲林縣 2,528 公頃之栽種面積為最大。不結球白菜全年皆可生產，民國 98 年的產量約為 80,646 公噸 (<http://www.coa.gov.tw>)。而在不結球白菜栽培過程中以 *Colletotrichum higginsianum* Sacc. apud. Higgins 所引起的炭疽病，和 *Rhizoctonia solani* Kühn 所引起的立枯病為主要病害 (Wang and Lin, 2005)。然在台灣針對此兩種病害之推薦藥劑，只有百克敏 (pyraclostrobin) 與賓克隆 (pencycuron) (Fei et al., 2010)。由於推薦防治藥劑種類稀少，使得農民常濫用農藥，加上栽培期短，故農藥的殘留問題一直都是令人關注的焦點 (Wen, 2006)。因此，增加可施用並符合永續農業理念之藥劑是勢在必行。而本文所提及之 ASM 則符合現行農業發展趨勢之藥劑，然到目前為止尚無應用 ASM 防治不結球白菜病害之相關研究。故本研究之目的為探討 ASM 應用在不結球白菜上是否會造成生理傷害、能否防治不結球白菜炭疽病和苗立枯病、以及其誘導抗病之可能機制。

材料與方法

一、供試植物

本試驗使用不結球白菜 (*Brassica campestris* L. Chinese Group) 之王冠與三鳳 2 號兩品種作為供試植株。對炭疽病較感病之王冠品種發病率約為 39.4%，對炭疽病較抗病之三鳳 2 號品種發病率約為 16.7%。三鳳 2 號係由農友種苗公司購得，而王冠係由國立中興大學園藝學系蔬菜實驗室提供。首先，將不結球白菜種子播到盛裝泥炭土 (Bas Van Burren No. 4 peat moss; BVB No. 4, Massland, Netherlands) 之塑膠盆中，種植在中興大學自然採光之溫室中。7 天後，即幼苗欲長出第 1 片真葉時，移植到裝有泥炭土的 3 吋黑色塑膠軟盆中。移苗後 3-7 天供試驗之用。

二、供試菌株

以國立中興大學植物病理學系病害管理研究室所提供之白菜炭疽病病原菌 (*Colletotrichum higginsianum* Sacc. apud. Higgins PA01) 與幼苗立枯病病原菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn N-1) 作為供試菌株。將兩株病原菌培養在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA)，*C. higginsianum* PA01 培養在不照光、28°C 定溫箱，*R. solani* N-1 培養在不照光、24°C 定溫箱。

三、Acibenzolar-S-methyl (ASM) 配製

取 0.2 g 之 Actigard® 50 WG (50 % acibenzolar-S-methyl, WG, Syngenta) 溶入 1 公升的蒸餾水中，即為 100 mg/L ASM 溶液，再以 10 倍稀釋法分別配出 10 mg/L 和 1 mg/L 的 ASM 溶液供試驗之用。

四、ASM 對病原菌菌絲生長之影響

將 0、1、10、100 和 500 mg/L ASM 分別添加至滅菌後的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基中，再倒入四分格塑膠培養皿中並待其凝固。以直徑 5 mm 的打孔器於長滿 *C. higginsianum* PA01 和 *R. solani* N-1 之培養基上打洞，將菌絲塊移入已添加 ASM 的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Difco, USA)，每一處理有四重複。後將 *C. higginsianum* PA01 培養在不照光、28°C 定溫箱，第 8 天測量其菌落直徑；而 *R. solani*

N-1 培養在不照光、24 °C 定溫箱，第 2 天測量其菌落直徑。最後，分別計算兩株菌絲分別在含 ASM 之培養基上的菌絲生長抑制率 (Inhibition rate of mycelial growth, %)，計算公式如下：

$$\begin{aligned} & \text{菌絲生長抑制率 (Inhibition rate of mycelial growth, \%)} \\ &= \frac{(\text{對照組菌落直徑}-\text{處理組菌落直徑})}{\text{對照組菌落直徑}} \times 100\% \end{aligned}$$

五、ASM 對不結球白菜生長與發芽之影響

將株齡 10 天大之供試植株分成 4 組 (A, B, C, D) 進行不同處理，A 組為每隔 7 天施用 ASM 並連續施 3 次；B 組為每隔 10 天施用 ASM 並連續施用 3 次；C 組為每隔 7 天施用 ASM 並連續施用 2 次；D 組為每隔 10 天施用 ASM 並連續施用 2 次。4 組處理分別施用 1、10 和 100 mg/L 等 3 種不同濃度之 ASM。另外，以噴施蒸餾水的處理作為對照組。每處理 3 重複，每重複 3 棵植株。在試驗期間觀察植株生長情形，是否會對小白菜造成藥害。於處理 30 天後，記錄地上部之鮮重和株高。

另將王冠和三鳳 2 號的種子分別浸泡在 1、10、100 mg/L ASM 溶液中，浸泡 12 與 24 小時後將種子取出並吹乾，挑取 10 粒種子置放於鋪有滅菌濾紙之直徑 9 cm 塑膠培養皿中，並再加入 2 ml 無菌蒸餾水予以保濕，於室溫下進行發芽試驗。本實驗以浸泡在蒸餾水中的種子作為對照組，每處理三重複。於處理後 1 天與 3 天記錄發芽率，並觀察發芽過程中有無異常。

六、ASM 防治不結球白菜炭疽病之應用

(一) 白菜炭疽病接種源之製備與接種

取用培養 7-10 天之白菜炭疽病病原菌，以無菌水將分生孢子洗下，配製成 10^5 conidia/ml 之孢子懸浮液。接種方法參考 Lin (2001) 所發表之方法，將配製好之孢子懸浮液噴灑在供試植株上，並套袋保濕放置在自然採光之溫室培養，每處理 3 重複，連續進行 2 次試驗。接種後的植株套袋於 16-18 個小時後移除，第 7 天記錄第 3 與第 4 位葉的罹病度。罹病度的計算方式如下：0 級為葉片無任何病斑數；

1 級為病斑面積介於 1- 10 %；2 級為病斑面積介於 11- 25 %；3 級為病斑面積介於 26- 50 %；4 級為病斑面積大於 50 %。罹病度計算公式如下：

$$\text{罹病度 (Disease severity, \%)} = \frac{\sum (\text{罹病級數} \times \text{該級數之葉數})}{\text{總調查葉數} \times 4} \times 100\%$$

(二)防治不結球白菜炭疽病之溫室試驗評估

1. ASM 防治白菜炭疽病之評估

第 1 次試驗以株齡 14 天 (4~5 片真葉) 的供試植株，分別在接種白菜炭疽病菌前第 1、4、7、10 天施用 1 和 10 mg/L 兩種濃度之 ASM，以蒸餾水處理作為對照，再依照前述方法接種，比較罹病度之差異。第 2 次試驗是依據第 1 次試驗的結果，選擇在接種白菜炭疽病菌前第 4、5、6、7 天施用 1 和 10 mg/L ASM，同樣以蒸餾水處理作為對照，再依照前述方法接種，於接種後第 7 天比較罹病度之差異。共重複 2 次試驗，每處理 3 重複，每重複 3 棵植株。

2. ASM 與不同作用機制之殺菌劑防治白菜炭疽病之比較

於接種前第 4 天，將株齡 14 天之不結球白菜植株施用 1 與 10 mg/L ASM，實驗另加入推薦之 23.6 % 百克敏乳劑 (23.6 % Pyraclostrobin, EC, BASF) 稀釋 3,000 倍，並加入其他相同作用機制之藥劑，包括 10 % 亞托敏水懸劑 (10 % Azoxystrobin, SC, 先正達) 稀釋 2,000 倍、44.2 % 克收欣水懸劑 (44.2 % Kresoxim-methyl, SC, BASF) 稀釋 2,500 倍，此外再加入常推薦用於防治炭疽病之 50 % 免賴得可濕性粉劑 (50 % Benomyl, WP, 興農) 稀釋 1,500 倍。本實驗以水處理作為對照，再依照前述方法接種，比較罹病度之差異。每處理 3 重複，每重複 3 棵植株，共進行 2 次試驗。

七、ASM 防治不結球白菜幼苗立枯病之應用

(一) 白菜幼苗立枯病接種源之製備

製備方法參考 Tsai (2009) 所發表將 100 g 馬鈴薯切丁放入裝入組織培養瓶中，經高溫高壓殺菌釜消毒後，再放入 10 個直徑 9 mm 的 *R. solani* N-1 菌絲塊，於不照光、30 °C 定溫箱中培養 1 週後，將長滿菌絲的馬鈴薯取出秤重，並加入 400 ml 無菌水後，以果汁機均質。最後，拌入 1 kg 消毒過的泥炭土 (Bas Van Burren No. 4 peat moss; BVB No. 4, Massland, Netherlands)，混勻後置於室溫 (25 °C) 下 2-3 星期，每天打開袋口透氣，每週均勻混拌。實驗中參考 Huang (1996) 的方法，利用小葉百喜草 (*Paspalum notatum* Flügge) 種子誘釣法測量土壤中的 *R. solani* N-1 含量，以含菌 90 % 以上的土壤作為接種源。

(二) 浸泡 ASM 對防治不結球白菜幼苗立枯病之評估

將王冠和三鳳 2 號的種子分別浸泡在 1、10、100 mg/L ASM 溶液中，並將浸泡 0、6、12、18、24 小時後的種子，取出 24 粒種子吹乾，播種在含有 *R. solani* N-1 感染土的 3 × 3 × 3 (cm) 的穴盤中，每穴 2 粒種子，每處理 3 重複，每重複有 4 個穴。將浸泡在無菌蒸餾水中的種子播在感染土和無菌土中，作為正對照組 (positive control) 和負對照組 (negative control)。1 週後，計算每處理組的存活率，並觀察種子發芽生長過程中有無異常。

八、酵素活性測定

(一) 酵素測定材料取樣

用前述移苗後之供試植株移入 80 × 45 × 45 (cm) 的 100 目網製養蟲箱中，放置在中興大學自然採光之溫室。首先，將 1、10、100 mg/L ASM 施用於 4~5 片真葉之植株上。超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 與過氧化氫酶 (catalase, CAT) 測定之樣本於處理 ASM 後 6、12、24 小時取樣 (Deepak et al., 2006)；而過氧化酵素 (peroxidase, POD) 與苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 測定之樣本於處理 ASM 後開始連續 7 天於同一時間取樣 (Faize et al., 2004)。另一試驗是先施用 1、10、100 mg/L ASM 於 4~5 片真葉之植株上，隔 3 個小時後再接種炭疽菌孢子懸浮液 (10^5 conidia /ml) (Deepak et al., 2006; Cools and Ishii, 2002)。SOD 與 CAT 測定之樣本於處理 ASM 後 6、12、24 小時取

樣；POD 與 PAL 於處理 ASM 後開始連續 6 天於同一時間取樣。以直徑 5 mm 的打孔器在每株的第 4 位葉打下 6 個葉圓片 (disc)，即約 0.05 g 之植物葉片組織，再放入微量離心管 (eppendoff) 中，置於冰上。最後，將樣本保存在 -20°C 冰箱中。

(二) 超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 之活性測定

參考 Deepak 氏等人 (2006) 的方法，將約 0.05 g 之植物葉片組織放入微量離心管中，再浸入液態氮中保持低溫，利用小量球磨式粉碎機 (Oscillating mill Type MM400, Retsh GmbH, Germany)，以每秒 30 下的頻率研磨 1 分鐘。將植物組織磨碎後，加入 0.5 ml 萃取緩衝液 (50 mM potassium phosphate buffer, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride, 1 mM polyethyleneglycol, 4% polyvinylpyrrolidone, pH 7.0) 並均勻震盪，再以 4 °C、12,000 g 離心 20 分鐘，取上清液移入新的微量離心管中。取 100 µl 的酵素粗萃液與 100 µl 反應液 A (150 mM potassium phosphate buffer, 39 mM methionine, 0.3 mM EDTA, 225 µM NBT, pH 7.8) 加入 96 孔盤中，再加入 30 µl 反應液 B (20 µM riboflavin)，最後以無菌水加至 300 µl，在無光照下 7 分鐘後，再以多功能盤式分析儀 (multifunction reader) (Infinite[®] 200, Tecan Austria GmbH, Austria) 偵測 60 分鐘內波長 570 nm 吸光值的變化，以每分鐘 SOD 抑制 50% NBT 之吸光值變化表示。最後，以 Bradford 蛋白質定量法，測粗萃取液中的總蛋白質含量，計算出每毫克 (mg) 的蛋白質中有多少酵素活性。

(三) 過氧化氫酶 (catalase, CAT) 之活性測定

參考 Deepak 氏等人 (2006) 的方法，將約 0.1 g 之植物葉片組織放入微量離心管中，再浸入液態氮中保持低溫，利用小量球磨式粉碎機，以每秒 30 下的頻率研磨 1 分鐘。將植物組織磨碎後，加入 1 ml 萃取緩衝液 (50 mM Potassium phosphate buffer, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride, 1 mM polyethyleneglycol, 4% polyvinylpyrrolidone, pH 7.0) 並均勻震盪，再以 4 °C、12,000 g 離心 20 分鐘，取上清液移入新的微量離心管中。取 20 µl 酵素粗萃取液，加入 1 mL 的反應液 (150 mM potassium phosphate buffer pH 7.0、75 mM H₂O₂ 水溶液、以及無菌水以 1:1:1 的比例均勻混合) 於石英管混合均勻後，即以分光光度計 (spectrometer) (MBA

2000, PerkinElmer Inc., USA) 測定 240 nm 之吸光值，偵測時間為 1 分鐘，空白試驗以 20 μ l 萃取緩衝液代替酵素萃取液。酵素活性單位 (unit) 為每分鐘消耗 1 μ mol 之 H_2O_2 。最後，以 Bradford 蛋白質定量法，測粗萃取液中的總蛋白質含量，計算出每毫克 (mg) 的蛋白質中有多少酵素活性。

(四) 過氧化酵素 (peroxidase, POD) 之活性測定

參考 Hsieh (2010) 的方法，將約 0.05 g 之植物葉片組織放入微量離心管中，再浸入液態氮中保持低溫，利用小量球磨式粉碎機，以每秒 30 下的頻率研磨 1 分鐘。將植物組織磨碎後，加入 0.5 ml 萃取緩衝液 (50 mM Potassium phosphate buffer, pH 5.8, 0.8 M KCl) 並均勻震盪，再以 4 $^{\circ}C$ 、12,000 g 離心 20 分鐘，取上清液移入新的微量離心管中。將酵素粗萃取液、磷酸鉀緩衝液、反應液 A (21.6 mM Guaiacol)、反應液 B (39 mM H_2O_2) 以 1:10:10:9 的比例均勻混合後，以多功能盤式分析儀偵測 1 分鐘內波長 470 nm 吸光值得變化，再以 Bradford 蛋白質定量法，測粗萃取液中的總蛋白質含量。依下列公式計算過氧化酵素之活性 (Units/ μ g)：

$$\text{POD 活性 (Units}/\mu\text{g}) = (\Delta A_{470}) / (26.6 [\text{消光係數}] \times 1 [\text{反應時間}] \times \text{蛋白質總量})$$

1 Unit = 1 μ mol tetraguaiacol produced / min

(五) 苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 之活性測定

參考 Hsieh (2010) 的方法，將 0.1 g 之植物組織放入微量離心管中，再浸入液態氮中保持低溫，利用小量球磨式粉碎機，以每秒 30 下的頻率研磨 1 分鐘。將植物組織磨碎後，加入 1 ml 萃取緩衝液 (50 mM Tris buffer, pH=8.5)，以 4 $^{\circ}C$ 、12,000 g 離心 20 分鐘，取上清液移入新的微量離心管中，將酵素粗萃取液、萃取緩衝液與反應液 (30 mM L-phenylalanine) 以 1:1:1 的比例均勻混合後，放入水浴槽 37 $^{\circ}C$ 。1 小時後放置冰上並加入 20 μ l 6N HCl 溶液，以終止反應。最後，取 250 μ l 加入 96 孔盤中，以多功能盤式分析儀偵測波長 290 nm 之吸光值。對照以肉桂酸 (cinnamic acid, Sigma) 作標準曲線，推算反應時間內肉桂酸的產量，並利用 Bradford 蛋白質定量法，測粗萃取液中的總蛋白質含量。依下列公式計算 PAL 之酵素活性 (nmole/h/ μ g)：

PAL activity (nmole/ h/ μg)= (148.18* (ΔA_{290})- 0.4674)/ 單位體積中蛋白質之總量 (μg)

九、統計分析

將上述評估不結球白菜生長與防治不結球白菜炭疽病之溫室試驗所獲得之數據輸入統計軟體 SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) 進行統計分析，採用鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 分析各個處理組間 5% 的顯著差異 ($p \leq 0.05$)；評估對不結球白菜生長的試驗中採用 1% 的顯著差異 ($p \leq 0.01$)。而上述防治不結球白菜幼苗立枯病之試驗與酵素活性測試則採用最小顯著差異性測驗 (least significant difference, LSD) 分析各個處理組間 5% 的顯著差異 ($p \leq 0.05$)。



結果

一、ASM 對病原菌菌絲生長之影響

將 *C. higginsianum* PA01 培養在已添加 1、10、100 mg/L ASM 的 PDA 培養基中，於培養 8 天後計算菌絲抑制率，得知 PA01 於上述三個濃度下，菌絲生長並未受到抑制，然於添加 500 mg/L ASM 時，菌絲生長抑制率為 34.9%。另一方面，*R. solani* N-1 的菌絲生長明顯受到 ASM 的影響，在 1、10、100 mg/L 之 ASM 的 PDA 培養基中，菌絲抑制率分別為 3.2%、27.5% 及 34.4%，而當 ASM 添加至 500 mg/L 時，其菌絲生長抑制率更達到 44.0% (表一)。

二、施用 ASM 對不結球白菜生長之影響

評估 ASM 是否對不結球白菜生長造成影響，分別以 1、10 及 100 mg/L 三種不同濃度的 ASM 施用於植株。經統計分析得知王冠品種以 1 與 10 mg/L ASM 處理後，不論施用次數或兩次施藥時間間距為何，在王冠品種的鮮重上皆無明顯差異，惟有在施用 100 mg/L ASM 的植株鮮重減少 33.5~43.9%。在株高測量上，除施用 1 與 10 mg/L ASM 的 B 處理組 (每隔 10 天施用 ASM 並連續施用 3 次) 比對照組高 10.7% 與 10.4% 外，其他處理組皆無明顯差異 (表二)。

另一方面，三鳳 2 號處理 1 與 10 mg/L 後，得知不同處理對三鳳 2 號品種的鮮重與對照組皆無明顯差異；而施用 100 mg/L 的植株鮮重比對照組減少了 48.5~72.3%。在株高方面，三鳳 2 號處理 1 與 10 mg/L 後，所有處理組與對照組皆無明顯差異；然施用 100 mg/L 後，除 D 處理組 (每隔 10 天施用 ASM 並連續施用 2 次) 無明顯差異外，其餘 3 個處理組之株高較對照組減少 13.8~28.8% (表二)。

在本試驗證實施用 100 mg/L ASM 對不結球白菜的生長具某程度影響。除了在鮮重與株高觀測上顯示有明顯降低外，在形態上，亦發現施用 ASM 後葉片出現狹長、不自然彎曲、皺葉或葉柄變長等畸形葉 (圖一)。然此現象在新生的葉片上不明顯。

此外，在此種子浸泡 ASM 是否影響發芽率與生長情形實驗中，得知種子浸泡在 1、10 及 100 mg/L ASM 溶液中 12 小時後，王冠和三鳳 2 號種子發芽率和發芽情形皆與對照組無明顯差異 (表三)。當浸泡時間延長至 24 小時，浸泡在 1 mg/L

ASM之王冠種子發芽率仍不受影響，然浸泡於10 mg/L處理組的種子發芽率明顯降低55.0%；持續觀察得知放置2天後發芽率可回復，與對照組無明顯差異。相較於10 mg/L處理，浸泡24小時之100 mg/L處理組的發芽率皆低於對照組，證實100 mg/L ASM會降低王冠種子發芽率達52.0% (表三)。另一方面，三鳳2號種子在浸泡ASM至24小時後，除100 mg/L處理組可導致種子發芽率降低10.3%外，其他處理組皆與對照組無明顯差異 (表三)。

三、防治不結球白菜炭疽病之溫室試驗評估

(一)ASM防治白菜炭疽病之評估

第1次試驗中，接種病原菌前第1、4、7、10天先施用1與10 mg/L ASM後接種病原菌。結果經統計分析其罹病度後，得知接種前1天施用1 mg/L ASM即可明顯降低王冠與三鳳2號的罹病度，減少分別達87.3%與65.2%；接種前第4天施用1 mg/L ASM的處理組，則分別可降低王冠和三鳳2號的罹病度達68.1%與30.4%；而接種前第7或10天施用1 mg/L ASM之供試植株則皆與對照組無明顯差異 (表四)。另一方面，施用10 mg/L ASM的防治效果亦以接種前1天處理者最佳，王冠和三鳳2號的罹病度分別減少83.0%和84.4%；而接種前第4天施用者，則分別減少罹病度達80.9%和53.5%；而接種前第7或10天施用之供試植株則皆與對照組無明顯差異 (表四)。比較施用1與10 mg/L後抗病效果差異，指出於接種前1天或4天施用1或10 mg/L ASM對白菜炭疽病的防治效果皆無顯著差異。此外，從結果亦得知處理ASM以有效防治白菜炭疽病之臨界點落於4-7天之間 (表四)。

依據第1次試驗結果，進一步分析接種前第4、5、6、7天施用ASM的罹病度。在接種前4天與5天處理1 mg/L ASM後，王冠和三鳳2號於第4天處理ASM的罹病度分別減少64.8%和56.5%；而處理1 mg/L ASM第5天後，則罹病度減少達43.2%和34.8%。接種前第6天處理1 mg/L ASM之王冠品種罹病度比對照組減少35.2%，而三鳳2號品種的罹病度與對照組無明顯差異。另於接種前第7天施用之供試植株的罹病度，皆與對照組無明顯差異 (表四)。

另一方面，於接種前第4天施用10 mg/L ASM的王冠品種之罹病度降低達73.0

%，但於前 5 天施用 10 mg/L ASM 的王冠品種則與對照組之罹病度無明顯差異。此外，施用 10 mg/L ASM 於三鳳 2 號後，其罹病度於第 4 天和第 5 天分別降低達 56.5 % 和 43.6 %；而於接種前第 6 天處理 10 mg/L ASM 之供試植株的罹病度皆與對照組無明顯差異。此外，接種前第 7 天處理 10 mg/L ASM 之三鳳 2 號品種罹病度比對照組減少 29.0 %，而王冠品種的罹病度與對照組無明顯差異 (表四)。

(二)比較 ASM 與不同作用機制之殺菌劑防治白菜炭疽病的效果

比較預處理 1、10 mg/L ASM 與 4 種供試殺菌劑防治白菜炭疽病之效果，結果依鄧肯氏多變域分析顯示，所有處理組與對照組皆能有效防治炭疽病的發生。其中以施用稀釋 3,000 倍百克敏的防治效果最佳，王冠上的罹病度僅 1.40 %，而三鳳 2 號為 3.48 %。試驗中，預處理 10 mg/L ASM 後防治炭疽病的效果與施用亞托敏、克收欣及免賴得在王冠品種上無明顯差異，然預處理 1 mg/L ASM 對防治白菜炭疽病效果最差。在三鳳 2 號品種上，預先施用 10 mg/L ASM 對白菜炭疽病的防治效果和亞托敏與百克敏無明顯差異；而施用 1 mg/L ASM 與克收欣，對不結球白菜炭疽病防治效果較差 (表五)。

National Chung Hsing University

三、ASM 防治不結球白菜幼苗立枯病之應用

比較將不結球白菜種子浸泡在不同 ASM 濃度與不同處理時間後，對防治幼苗立枯病之試驗中，得知王冠品種於 1、10 及 100 mg/L ASM 處理 12 小時內的存活率為 8.3 ~ 33.3 %，與對照組皆無明顯差異；而處理 1 mg/L ASM 18 與 24 小時之種子存活率分別為 45.8 % 與 20.8 %，與對照組皆無明顯差異，然處理 10 與 100 mg/L ASM 18 與 24 小時後，其存活率比對照組明顯減少達 44.5 % 以上 (表六)。三鳳 2 號品種於 10 mg/L ASM 處理 18 或 24 小時以上後再播種，能有效防治幼苗立枯病，且種子存活率提升達 66.6 % 和 46.1 %，其餘處理則無明顯差異 (表六)。另外，試驗過程中觀察到不結球白菜種子於 10 mg/L ASM 溶液中浸泡 18 小時以上，或是 100 mg/L 中浸泡 12 小時以上，其幼苗明顯比對照組矮小。

四、酵素活性測定

(一)超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 之活性測定

將不結球白菜預處理 1、10 及 100 mg/L ASM 後，於 6、12、24 小時測定 SOD 之活性。測定結果顯示，王冠品種在處理 1 mg/L ASM 於 24 小時後，SOD 活性顯著增加 (表八與圖三)；而三鳳 2 號品種，則只有在處理 10 mg/L ASM 24 小時後，SOD 的活性才較其他處理組有明顯上升 (表八與圖四)。

預先處理無菌水後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液，並於第 6、12、24 小時測試 SOD 的活性，結果指出王冠品種的 SOD 活性皆明顯高於對照組；三鳳 2 號品種於 12 小時後，其體內 SOD 活性明顯高於對照組 0.7 倍 (表九與圖五)。

預先處理 ASM 後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液之處理組，於第 6、12、24 小時後開始測試 SOD 的活性，結果指出王冠品種預先施用 1 mg/L ASM 之植株，於第 6 小時起 SOD 活性明顯較對照組上升 0.4 倍，於 24 小時後活性增加 0.7 倍；而處理 10 mg/L ASM 植株則於第 6 小時起活性較對照組明顯增加 0.6 倍，於 24 小時後活性增加 0.5 倍；處理 100 mg/L ASM 植株，於 6 至 12 小時間與對照組相比分別顯著增加 0.7 與 0.5 倍 (表九與圖六)。在三鳳 2 號品種方面，預處理 1 mg/L ASM 者之 SOD 活性於 3 小時開始明顯有上升的趨勢，活性增加 0.4~0.5 倍；處理 10 mg/L ASM 之植株，分別於 6 與 24 小時之 SOD 活性皆比對照組明顯增加 0.4 倍；而預先以 100 mg/L ASM 處理之植株的 SOD 活性於 3 小時內明顯增加 0.8 倍，然處理 3 小時後 SOD 活性下降至與對照組無明顯差異 (表九與圖七)。

(二)過氧化氫酶 (catalase, CAT) 之活性測定

將不結球白菜預處理 1、10 和 100 mg/L ASM 後，於 6、12、24 小時測定 SOD 之活性。測定結果顯示，除處理 10 mg/L ASM 之王冠品種於 6 小時的活性明顯較對照組低 0.6 倍外，王冠其他處理組和三鳳 2 號之處理組皆無任何明顯差異 (表十、圖八、圖九)。

預先處理無菌水後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液，並於處理 ASM 後第 6、12、24 小時後測試 SOD 之活性。結果顯示王

冠品種於接種病原菌後 3 與 18 小時，CAT 活性明顯比對照組低 0.8 與 0.5 倍；而三鳳 2 號品種於接種病原菌後 6 小時，活性明顯比對照組低 0.8 倍 (表十一與圖十)。

先處理 ASM 後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液，並於處理 ASM 第 6、12、24 小時後測試 SOD 之活性。結果顯示僅預先處理 10 mg/L ASM 的王冠品種於 6 小時的活性明顯較對照組低 0.8 倍外，其他處理組皆無任何明顯差異 (表十一與圖十一)；在三鳳 2 號品種方面，除預處理 1 mg/L ASM 之植株於 12 小時的活性明顯較對照組低 0.7 倍外，其餘處理組皆無任何明顯差異 (表十一與圖十二)。

(三) 過氧化酵素 (peroxidase, POD) 之活性測定

將不結球白菜處理 1、10 和 100 mg/L ASM 後，連續 7 天測定 POD 之活性變化。結果顯示，王冠品種處理 1 mg/L ASM 後，體內 POD 活性於 2 天後開始明顯上升，於第 5 天 POD 活性達最高，較對照組增加 1.4 倍；處理 10 mg/L ASM 後的 POD 活性，同樣於 2 天後開始明顯上升，於第 4 天 POD 活性達到最高，較對照組增加 1.9 倍；而處理 100 mg/L ASM 後的 POD 活性，則於 3 天後開始顯著增加，於第 4 天 POD 活性達到最高，較對照組增加 4.2 倍 (表十二與圖十三)。在三鳳 2 號品種方面，處理 1 與 10 mg/L ASM 後的 POD 活性，於 1 天後開始顯著增加，且活性延至第 7 天仍比對照組明顯高出 0.5 與 1.0 倍；而處理 100 mg/L ASM 植株的 POD 活性，於第 4 天開始明顯增加，於第 7 天時活性增加到 0.9 倍 (表十二與圖十四)。

先處理無菌水後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液，並連續 6 天測定 POD 活性。結果指出，王冠品種的 POD 活性於 1 天後開始上升，於第 6 天時活性達到最高，較對照組明顯增加 0.9 倍；而三鳳 2 號品種之 POD 活性於 6 天後才開始增加，較對照組明顯增加 0.3 倍 (表十三與圖十五)。

先處理 ASM 後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液，並連續 6 天測定 POD 活性。結果指出，王冠品種預先處理 1 mg/L ASM 之 POD 活性於 3 天後開始顯著增加，於第 6 天達到最高，較對照組明顯高出 0.7 倍；而預處理 10 mg/L ASM 之處理組別，其 POD 活性於 3 小時內立刻被活化，於第 3 天達到最高，較對照組高出 0.6 倍；另預先處理 100 mg/L ASM 之植株，其 POD

活性於 1 天後開始顯著增加，活性於第 5 天達到最高，較對照組高出 1.7 倍（表十三與圖十六）。與王冠品種比較，三鳳 2 號品種預先處理 1 mg/L ASM 之植株，其 POD 活性與對照組無明顯差異；預處理 10 mg/L ASM 之組別，其 POD 活性於第 3 天明顯比對照組高 0.7 倍，然第 4 天後活性開始下降；而預處理 100 mg/L ASM 之植株於第 6 天活性明顯比對照組高 0.4 倍（表十三與圖十七）。

（四）苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 之活性測定

將不結球白菜處理 1、10 和 100 mg/L ASM 後，連續 7 天測定 PAL 之活性。結果顯示，王冠品種處理 1 mg/L ASM 之植株，其體內 PAL 活性僅在第 3 天時明顯增加 0.1 倍；處理 10 mg/L ASM 植株的 PAL 活性，於 2 至 3 天間明顯高於對照組 0.2 倍；處理 100 mg/L ASM 的 PAL 活性於第 5 天開始明顯增加，於第 7 天時活性達最高，較對照組增加 0.2 倍（表十四與圖十八）。在三鳳 2 號品種上，處理 1 mg/L ASM 之植株，其體內 PAL 活性於第 2 天時明顯增加 0.2 倍，然活性於 3 天後開始減少，直到 7 天後活性較對照組明顯增加 0.4 倍；處理 10 mg/L ASM 植株的 PAL 活性，於 1 至 2 天間分別明顯高於對照組 0.3 與 0.1 倍，然活性於 3 天後開始減少，而第 5 與第 7 天活性皆較對照組明顯增加 0.4 倍；處理 100 mg/L ASM 的 PAL 活性於 1 至 2 天間明顯高於對照組 0.2 倍，然活性於 3 至 4 天間開始減少，於第 5 天後又開始明顯增加，活性最高可增加到 0.6 倍（表十四與圖十九）。

先處理無菌水後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液，並連續 6 天測定 PAL 活性。結果指出，王冠品種於 6 天後 PAL 活性明顯增加 0.2 倍；而三鳳 2 號品種體內 PAL 活性無任何改變（表十五與圖二十）。

先處理 ASM 後 3 小時，再接種 10^5 conidia/ml 的 *C. higginsianum* PA01 孢子懸浮液，並連續 6 天測定 PAL 活性。結果指出，王冠品種預先處理 1 mg/L ASM 之 PAL 活性無任何改變；而預先處理 10 mg/L ASM 後，其 PAL 活性於第 3 天明顯增加 0.2 倍，然第 4 至 5 天活性減少，直到第 6 天 PAL 活性又比對照組明顯增加 0.2 倍；另預處理 100 mg/L ASM 之植株，於 6 天後 PAL 活性明顯增加 0.2 倍（表十五與圖二十一）。與王冠品種比較，三鳳 2 號品種預先處理 1 mg/L ASM 之植株，其體內 PAL 活性無任何改變；而預處理 10 mg/L ASM 植株的 PAL 活性，3 小時起顯著增加，於 6 天後增加的 PAL 活性比對照組多 0.3 倍；另預先處理 100 mg/L ASM

後的 PAL 活性於 3 至 24 小時顯著增加 0.4 與 0.1 倍，然 2 天後活性減少，於第 4 和第 5 天活性又明顯增加 0.2 與 0.1 倍 (表十五與圖二十二)。



討論

被 FRAC 歸納為殺菌劑的 ASM，其本身不具有殺菌之效，而是透過植物體內的水楊酸訊號傳遞路徑來誘導植物產生防禦反應 (Oostendorp et al., 2001)。然本研究所使用的供試菌株 *C. higginsianum* PA01 的菌絲生長於高濃度 500 ppm ASM 下可被影響，且對 *R. solani* N-1 菌絲生長抑制更是明顯。ASM 之化學結構帶有苯環，而苯環和其衍生物對哺乳類、細菌、植物、昆蟲和真菌等多種生物皆具生物活性 (Freed and Haque, 1976)，因此 ASM 對生物細胞自然具有某一定的影響，特別是在高濃度時，且對不同微生物的影響亦不相同。目前被報導可受到影響的真菌有瓜類蔓枯病病原菌 *Didymella bryoniae* (Ishii et al., 1999) 與葡萄貴腐病病原菌 *Botrytis cinerea* (Múnoz and Moret, 2010) 的菌絲生長同樣會受 ASM 的影響。此外，前人研究指出，雖然 ASM 被證實會抑制 *R. solani* AG-1 和 AG-4 菌絲生長與減少菌核的形成，但不會影響病原菌的毒力 (Rohilla et al., 2001; Faessel et al., 2008)，顯示 ASM 對真菌只屬於抑制而非毒殺作用。

本研究證實高濃度的 ASM 會影響不結球白菜的正常生長，且造成植株鮮重減少、矮化、或葉片畸形等徵狀。前人研究亦指出高濃度 ASM 可造成各種作物的不正常生長，如胡瓜 (Ishii et al., 1999)、小麥 (Heil et al., 2000)、菜豆 (Bigirimana and Höfte, 2002)、菸草 (Perez et al., 2003) 及木瓜 (Zhu et al., 2003) 等，而造成的徵狀與本實驗中的不結球白菜的徵狀類似。此外，亦有研究顯示，ASM 會影響植物共生菌的不親合性，如大豆施用高濃度的 ASM 時，其根部固氮根瘤 (nodulation) 與菌根 (mycorrhization) 的形成都會降低 (Faessel et al., 2010)。另一方面，本研究亦測試以浸泡方式處理不結球白菜種子後之影響，結果亦證實在高濃度下對不結球白菜種子的發芽率或幼苗生長有明顯影響。前人研究亦指出，大豆 (Faessel et al., 2008)、西瓜 (Buzi et al., 2004) 及豇豆 (Latunde-Dada and Lucas, 2001) 等種子以浸泡方式處理 ASM 後，可引起種子發芽延遲、發芽率不佳及生長不良等影響。本試驗的結果指出當不結球白菜種子浸泡在高濃度 (100 mg/L) ASM 下會造成發芽率降低或生長勢較差等藥害，並且浸泡時間越久，對其生長影響越大。推測可能因為，於誘導防禦反應中，會產生大量的活化氧族需消耗能量，以及經苯基丙酸類生合成途徑產生的植物防禦素 (phytoalexin) 所需之碳源從植物初級代謝中轉移

至次級代謝 (Bolton, 2009; Faessel et al., 2008)。而植物在生長的初期是組織快速分化之發育階段，因此於植物生長過程中越早施用 ASM 對植物生長發育的影響越大。故要將 ASM 應用在防治不結球白菜病害的同時需顧及藥害的問題，以找出最佳的施用劑量與時間點。

比較 ASM 與其他殺菌劑防治炭疽病效果，顯示施用 10 mg/L ASM 可達與供試殺菌劑之相同效果。由於 ASM 為抗病誘導劑，可誘導植物產生不同的反應，在田間無農藥殘留問題。目前 ASM 已被證實可誘導 14 科植物產生抗病反應，進而防治不同病原所引起的病害，如將 ASM 施用在油菜葉片能減少由 *Leptosphaeria biglobosa* 所引起的葉片壞疽和莖潰瘍的病徵 (Liu et al., 2006)；在花椰菜幼苗上施用 0.075 mg a.i. mL⁻¹ ASM 於 1 天後，就能減少露菌病 (*Peronospora parasitica*) 50 % 的產孢量 (Ziadi et al., 2001)。而其他亦有日本梨黑星病 (Faize et al., 2004)、菜豆炭疽病 (Bigirimana and Höfte, 2002)、胡瓜炭疽病 (Cool and Ishii, 2002)、番茄青枯病 (Pradhanang et al., 2005)、菸草之番茄斑點萎凋病毒病 (Tomato spotted wilt virus, TSWV) (Pappu et al., 2000)、鳳梨腎形線蟲 (*Rotylenchulus reniformis*) 與根瘤線蟲 (*Meloidogone javanica*) (Chinnasri et al., 2003)、及油菜之寄生植物分枝列當 (*Orobanche ramosa*) (Véronési et al., 2009) 等防治成功之案例。這些研究也同時說明施用 ASM 後能快速誘導抗病反應，且具相當防治效果。在本試驗中，於接種前 1 天施用 1 與 10 mg/L ASM 之防治效果可達到 80 % 以上，而在 4 天內預先處理 ASM 的防治效果超過 50 %，證明 ASM 可在 1 天內快速誘導抗病反應，然不結球白菜的誘導抗病能力卻無法長時間持續表現。前人研究指出當單子葉植物施用 ASM 時，具有長效性的防治效果，而雙子葉植物皆無此現象 (Oostendorp et. al., 2001)。另對炭疽病感受性較高的王冠品種於處理 ASM 後，防治效率提升較三鳳 2 號上明顯，推測原因為三鳳 2 號具有某程度抗病性，因此施用 ASM 時無法突顯誘導抗病之效果。前人研究指出於感性與中度抗性菜豆以防治炭疽病之研究中，ASM 引起的誘導性抗病在感性或中度抗病的植物中所獲得防治效果較佳 (Bigirimana and Höfte, 2002)，即對較抗病的品種而言 ASM 能提升寄主之防治效率相對較為有限。

除了葉部噴施與土壤澆灌的方法外，有些研究指出 ASM 應用於種子處理能防治土壤傳播性病害或是葉部病害，如油菜 (Jensen et al., 1998)、腰果 (cashew) (Lopez and Lucas, 2002)、西瓜 (Buzi et al., 2004)、大豆 (Faessel et al., 2008) 等作

物種子，經施用 ASM 後即可有效防治病害。本試驗結果指出，以 10 mg/L ASM 處理三鳳 2 號品種之種子 18 小時以上確實具有防治立枯病的效果，然此種處理條件同時亦會對幼苗造成藥害，對植株生長影響甚大。因此，推測應用 ASM 於不結球白菜的防治方法中，不適合以種子浸泡之方式而達到誘導抗病之效。未來防治不結球白菜苗立枯病可考慮以低濃度澆灌的方式於播種後施用，ASM 不僅能抑制 *R. solani* 的菌絲生長，又能誘導不結球白菜產生抗病性。

本研究測試與抗病相關之酵素，結果顯示對炭疽病較抗病之三鳳 2 號品種之 SOD 活性於接種炭疽病菌後 3 至 18 小時間快速增加，活性可高達 100 Units/ mg proteins；然較感病的王冠品種於相同時間內可測到活性顯著增加，但 SOD 活性僅到 60 Units/ mg proteins，此結果指出抗感性不同的不結球白菜，其 SOD 的活性表現隨寄主而有差異。另預先處理 1 和 10 mg/L ASM 在王冠和三鳳 2 號品種上，SOD 活性於 24 小時明顯增加，是抗病反應中早期的反應。SOD 能將超氧自由基 (superoxide radical, O_2^-) 還原成過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 和氧氣，為過氧化氫的供應者 (Deepak et al., 2006)。而超氧自由基與過氧化氫等活化氧族不僅參與編程性細胞死亡 (programmed cell death)、訊號傳遞或是逆境反應等，亦能直接對病原菌造成傷害 (Deepak et al., 2006; Thatcher et al., 2005)。因此，活化氧族的產生於植物防禦反應中具有一定重要性。

在 CAT 活性表現上，王冠與三鳳 2 號品種分別於接種病原菌後 3 與 6 小時，CAT 活性明顯比對照組低。在所有處理組中，只有施用 10 mg/L ASM 之王冠品種在不論有無接種條件下，CAT 活性皆於 6 小時明顯較對照組低。同樣地，施用 ASM 在胡瓜上亦有抑制 CAT 活性之現象，可能是 POD 會與 CAT 競爭過氧化氫 (Deepak et al., 2006)，而 POD 利用過氧化氫不只能降低對植物細胞的氧化傷害，亦能使細胞壁木質化進而防止病原菌入侵 (Thatcher et al., 2005)，對防禦病原菌有重大的意義。

POD 酵素活性方面，預先處理 1 和 10 mg/L ASM 在王冠和三鳳 2 號品種上 POD 活性表現有所不同，王冠品種於 2 天後 POD 活性明顯增加，並於第 4 天活性達到高峰；三鳳 2 號品種則是處理後 1 天 POD 活性明顯增加，並且第 3 和第 4 天的活性較高，即與防治試驗的結果一致。前人研究中證實 POD 活性的增加在植物防禦反應中扮演重要的角色，POD 為酚化物氧化相關的酵素，其與細胞壁木質化的過

程有密切相關 (Soylu et al., 2003; Thatcher et al., 2005)。藉由與過氧化氫反應以刺激木質素的形成，同時亦降低過氧化氫對植物細胞的氧化傷害 (Deepak et al., 2006; Thatcher et al., 2005)。許多研究亦指出在蕃茄 (Soylu et al., 2003)、葡萄 (Reuveni, 1998)、可可 (Resende et al., 2002)、胡瓜 (Cool and Ishii, 2002) 和日本梨 (Faize et al., 2004) 等多種作物上的 POD 活性均可被 ASM 誘導活化。因此，推測 POD 為不結球白菜施用 ASM 後，可能扮演誘導防禦反應中重要的角色。

王冠與三鳳 2 號品種在接種病原菌後 PAL 活性皆無明顯增加，顯示在不結球白菜對炭疽病之防禦反應上 PAL 扮演非主要因子。PAL 為苯基丙酸類生合成途徑 (phenylpropanoid pathway) 中的關鍵酵素，不僅能產生具殺菌效果之酚類化合物，甚至是植物生合成水楊酸的重要酵素 (Lin and Ishii, 2009; Shibata et al., 2010)。然 PAL 已經被證實在同為十字花科的阿拉伯芥抗病性上不是主要合成水楊酸的關鍵酵素，在阿拉伯芥上是經由另一條水楊酸合成路徑，在莽草酸途徑 (shikimate pathway) 中 isochorismate synthase (ICS) 能將 chorismate 轉變成 isochorismate 再進而產生水楊酸 (Shibata et al., 2010; Vogt, 2010)。此結果也同樣應證在圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 上，透過 ICS 作為關鍵酵素所生合成的水楊酸才是產生抗病能力的主要因子 (Shibata et al., 2010)。另在探討日本梨誘導抗病之機制研究指出有多種防禦機制可被誘導，包括多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP)、PR proteins (PR1, chitinase, PR10)、PAL、POD、SOD、CAT 等多種酵素活性提升，而 PAL 被認為是防禦反應中的次要角色 (Faize et al., 2004)。本試驗中，單處理 ASM 的植株體內 PAL 活性於第 7 天有明顯增加；而預先處理 ASM 再接種病原菌的處理中，則以施用 10 和 100 mg/L ASM 的處理組於 3 或 4 天後活性才開始有明顯增加，在此時間點上同時亦是病徵快速發展的階段，因此推斷施用 ASM 來誘導不結球白菜產生抗病能力，PAL 可能是在抗病過程之晚期扮演主要的角色，而非早期產生水楊酸調控整體的防禦反應，可能與產生具殺菌效果之酚類化合物或植物防禦素以抑制炭疽病原菌晚期之發展有關。

本研究初步推測，ASM 誘導不結球白菜產生抗病性的可能機制為，初期 SOD 活性即可快速增加，POD 活性扮演主要的抗病反應，而 PAL 於抗病過程之晚期較為重要，而 CAT 活性則不受 ASM 和病原菌感染之影響。另外，推測在病原菌侵

入感染過程中，不結球白菜體內 SOD 的表現可能是決定對炭疽病菌感受性不同之原因。然而，還有其他可能的抗病反應如 PR proteins 和總酚化物等未能得知其在防禦反應中扮演的角色，未來有待進一步研究探討。



参考文献

- American Society of Agronomy, 2011. Sustainable agriculture. Guilford Rd., Madison, WI, USA: American Society of Agronomy. Website: <https://www.agronomy.org/about-agronomy/sustainable-agriculture>. (2011/7/7)
- Beauverie J, 1901. Essais d'immunisation des végétaux contre des maladies rypotogamiques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 133: 107-110.
- Bigirimana J, Höfte M, 2002. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica* 30: 159-168.
- Bolton MD, 2009. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 487-497.
- Buzi A, Chilosi G, De Sillo D, Magro P, 2004. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with alicyclic Acid. *Journal of Phytopathology* 152: 34-42.
- Cao J, Jiang W, He H, 2005. Induced resistance in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against infection by *Penicillium expansum* by postharvest infiltration of acibenzolar-S-methyl. *Journal of Phytopathology* 153: 640-646.
- Chinnasri B, Sipes BS, Schmitt DP, 2003. Effects of acibenzolar-s-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 35: 110-114.
- Chinnasri B, Sipes BS, Schmitt DP, 2006. Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. *Journal of Nematology* 38: 319-325.
- Cools HJ, Ishii H, 2002. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 273-280.
- Deepak SA, Ishii H, Park P, 2006. Acibenzolar-S-methyl primes cell wall strengthening genes and reactive oxygen species forming/ scavenging enzymes in cucumber after fungal pathogen attack. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 52-61.
- Faessel L, Nassr N, Lebeau T, Walter B, 2008. Effects of the plant defence inducer, acibenzolar-S-methyl, on hypocotyl rot of soybean caused by *Rhizoctonia solani* AG-4. *Journal of Phytopathology* 156: 236-242.
- Faize M, Faize L, Koike N, Ishizaka M, Ishii H, 2004. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense

- responses. *Phytopathology* 94: 604-612.
- Fei WQ, Wang YQ, Chen FX, Lin XM, Li YH, 2010. Plant protection manual (vegetables). Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute Council of Agriculture. Taichung. 280pp.
- Freed VH, Haque R, 1976. Chemical structure and properties of selected benzene compounds in relation to biological activity. *Environmental Health Perspectives* 13: 23-26.
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J, 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8: 629-643.
- Ishii H, Tomita Y, Horio T, Narusaka Y, Nakazawa Y, Nishimura K, Iwamoto S, 1999. Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology* 105: 77-85.
- Heil M, Hilpert A, Kaiser W, and Linsenmair KE, 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *Journal of Ecology* 88: 645-654.
- Heil M, 2001. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology* 107:137-146.
- Huang RZ, 1996. Quantitative estimation of *Rhizoctonia* spp., the organisms of turfgrass brown patch and their control. Taichung: Master Dissertation of National Chung Hsing University. 152pp.
- Hsieh TY, 2010. Evaluation for efficacy of total protein extracted from *Alternaria tenuissima* APR01 on inducing Chinese cabbage seedlings resistant to *Rhizoctonia* damping-off. Taichung: Master Dissertation of National Chung Hsing University. 47pp.
- Jensen BD, Latunde-Dada AO, Hudson D, Lucas JA, 1998. Protection of *Brassica* seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pesticide Science* 52: 63-69.
- Kuč J, 1982. Induced immunity to plant diseases. *BioScience* 32: 854-860.
- Latunde-Dada AO, Lucas JA, 2001. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 199-208.
- Lin CL, 2001. Biological characteristics and control of the causal agent of Cruciferous vegetable anthracnose. Taichung: Master Dissertation of National Chung Hsing University. 66pp.

- Lin TC, Ishii H, 2009. Accumulation of H₂O₂ in xylem fluids of cucumber stems during ASM-induced systemic acquired resistance (SAR) involves increased LOX activity and transient accumulation of shikimic acid. *European Journal of Plant Pathology* 125: 119-130.
- Liu SY, Liu Z, Fitt BDL, Evans N, Foster SJ, Huang YJ, Latunde-Dada AO, Lucas JA, 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *Leptosphaeria biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. *Plant Pathology* 55: 401-412.
- Lopez AMQ, Lucas JA, 2002. Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. *European Journal of Plant Pathology* 108: 409-420.
- Muñoz Z, Moret A, 2010. Sensitivity of *Botrytis cinerea* to chitosan and acibenzolar-S-methyl. *Pest Management Science* 66: 974-979.
- Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, Staub T, 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107: 19-28.
- Owen KJ, Green CD, Deverall BJ, 2002. A benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. *Australasian Plant Pathology* 31: 47-53.
- Pappu HR, Csinos AS, McPherson RM, Jones DC, Stephenson MG, 2000. Effect of acibenzolar-S-methyl and imidacloprid on suppression of tomato spotted wilt *Tospovirus* in flue-cured tobacco. *Crop Protection* 19: 349-354.
- Perez L, Rodriguez ME, Rodriguez F, Roson C, 2003. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Crop Protection* 22: 405-413.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM, 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Pradhanang PM, Ji P, Momol MT, Olson SM, Mayfield JL, Jones JB, 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 89: 989-993.
- Ray J, 1901. Les maladies cryptogamiques des végétaux. *Revue Générale de Botanique* 13: 15-151.
- Resende MLV, Nojosa GBA, Aguilar MAG, Silva LHCP, Perez JO, Andrade GCG, Carvalho GA, Castro RM, 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51: 621-628.
- Reuveni M, 1998. Relationships between leaf age, peroxidase and β -1,3-glucanase activity, and resistance to downy mildew in grapevines. *Journal of Phytopathology*

146: 525-530.

Rohilla R, Singh US, Singh RL, 2001. Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Pest Management Science* 58: 63-69.

Shibata Y, Kawakita K, Takemoto D, 2010. Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 1130-1142.

Soylu S, Baysal Ö, Soyulu EM, 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science* 165: 1069-1075.

Thatcher LF, Anderson JP, Singh KB, 2005. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32: 1-19.

Tsai YC, 2009. Screening antagonistic *Streptomyces* and antifungal metabolites analysis of *Streptomyces* sp. A272. Dissertation. Taichung: Master Dissertation of National Chung Hsing University. 103pp.

Vallad GE, Goodman RM, 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.

Véronési C, Delavault P, Sirmier P, 2009. Acibenzolar-S-methyl induces resistance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) against branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). *Crop Protection* 28: 104-108.

Vogt T, 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.

Walters D, Newton A, Lyon G, 2005a. Induced resistance: helping plants to help themselves. *The Biologist* 52: 28-33.

Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G, 2005b. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* 95: 1368-1373.

Wang HL, Hsieh TF, Chung YY, 2009. Control of plant diseases and pests with non-pesticide. *Scientific Development* 443: 42-49.

Wang ST, Lin ZK, 2005. Taiwan agriculture encyclopedia (Crop II): Chinese mustard. Council of Agriculture Executive Yuan, Taipei, ROC. 926pp.

Wen X, 2006. Farm life: Organic vegetables are keep consumers' mind on buying and eating. *Agricultural Information in Kaohsiung County* 91: 8-10.

- White RF, 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412.
- Wu ZY, 2009. Trends of pesticide formulation. *Agriculture Policy and Review* 209: 90.
- Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Le Corre D, Silue D, 2001. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)–downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* 50: 579-586.
- Zhu JZ, Qiu X, Moore PH, Borth W, Hu J, Ferreira S, Albert HH, 2003. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 237-248.



表一、不同濃度 ASM 對 *Colletotrichum higginsianum* PA01 與 *Rhizoctonia solani* N-1 菌絲生長之影響

Table 1. Effect of ASM on the mycelial growth of *Colletotrichum higginsianum* PA01 and *Rhizoctonia solani* N-1

Concentration (mg/L)	Inhibition rate of mycelial growth (%)	
	<i>C. higginsianum</i> PA01	<i>R. solani</i> N-1
1	0	3.2
10	0	27.5
100	0	34.4
500	34.9	44.0

表二、施用不同濃度與次數之 ASM 對王冠與三鳳 2 號品種之生長影響

Table 2. Effect of different concentrations and frequency of ASM on growth of Wang Guan and San Feng No.2

Concentration (mg/L)	Treatment ^a	Fresh weight (g/each plant)		Height (cm/each plant)	
		Wang Guan	San Feng No.2	Wang Guan	San Feng No.2
100	A	6.96±1.67 d ^b	3.64±1.11 d	17.55±1.62 ab	14.80±1.63 de
	B	6.86±1.79 d	3.15±1.35 d	16.16±0.93 b	12.94±2.42 e
	C	6.25±1.30 d	5.26±1.86 d	16.60±1.49 ab	15.68±2.18 c
	D	7.41±2.45 d	5.86±1.52 d	17.26±1.09 ab	17.22±2.83 bc
10	A	11.95±1.69 ab	9.43±3.67 c	17.64±1.14 ab	18.98±1.97 ab
	B	9.53±0.92 c	10.40±2.38 bc	18.39±1.94 a	18.83±1.46 ab
	C	9.96±1.00 bc	11.01±2.78 abc	17.73±1.25 ab	18.68±1.97 ab
	D	11.56±2.19 abc	10.68±2.79 ab	17.80±2.18 ab	19.33±1.16 ab
1	A	12.32±2.11 a	12.21±2.65 abc	16.32±2.08 ab	19.64±1.95 a
	B	12.59±0.91 a	13.72±3.04 a	18.43±1.55 a	18.93±1.61 ab
	C	10.17±1.91 bc	12.54±1.29 ab	16.87±1.96 ab	19.31±1.09 ab
	D	11.92±1.78 ab	10.26±2.45 bc	17.77±1.52 ab	18.75±1.26 ab
CK		11.13±1.68 abc	11.37±2.33 abc	16.65±1.62 b	18.17±1.55 ab

^a A: the plants was treated different concentrations of ASM per 7 day for 3 times; B: the plants was treated different concentrations of ASM per 10 day for 3 times; C: the plants was treated different concentrations of ASM per 7 day for 2 times; D: the plants was treated different concentrations of ASM per 10 day for 2 times.

^b Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test.

表三、浸泡不同濃度 ASM 與不同時間浸泡對王冠和三鳳 2 號種子發芽率之影響

Table 3. Effect of different concentrations and time of ASM on germination of Wang Guan and San Feng No.2

Cultivar	Concentration (mg/L)	Germination (%)							
		12 hrs			24 hrs				
		1st ^a	3th		1st	3th			
Wang Guan	100	73.3	a ^b	80.0	a	33.3	b	40.0	b
	10	76.6	a	83.3	a	30.0	b	50.0	ab
	1	76.6	a	83.3	a	60.0	a	83.3	a
	0 (CK)	83.3	a	83.3	a	66.7	a	83.3	a
	LSD	3.35		2.56		2.37		3.04	
San Feng No.2	100	93.3	a	96.7	a	86.7	b	86.7	b
	10	90.0	a	90.0	a	100	a	100	a
	1	90.0	a	90.0	a	93.3	ab	93.3	ab
	0 (CK)	100	a	100	a	96.7	a	96.7	a
	LSD	1.30		0.99		0.85		0.85	

^a Seeds of Wang Guan and San Feng No.2 were treated with different concentrations of ASM for 12 hrs or 24 hrs, respectively. Seed germination was recorded 1st and 3th days after incubation at 28 °C.

^b Means within the same column followed by the same letter are not significant different according to least significant difference (LSD).

表四、不同時間下預先處理不同濃度 ASM 對王冠與三鳳 2 號炭疽病之防治效果

Table 4. Estimation of efficacy in controlling anthracnose of Wang Guan and San Feng No.2 after treatments with different concentrations and time of ASM

Concentration (mg/L)	Days before inoculation (Day) ^a	Disease severity ^b (%)			
		Experiment I		Experiment II	
		Wang Guan	San Feng No.2	Wang Guan	San Feng No.2
10	1	11.1 b ^c	5.6 c	ND	ND
	4	12.5 b	16.7 bc	13.9 e	20.9 c
	5	ND ^d	ND	59.7 a	27.1 c
	6	ND	ND	51.4 ab	44.5 ab
	7	75.0 a	26.4 ab	56.9 a	34.1 bc
	10	82.0 a	36.1 a	ND	ND
1	1	8.3 b	12.5 c	ND	ND
	4	20.8 b	25.0 bc	18.1 de	20.9 c
	5	ND	ND	29.2 cd	31.3 bc
	6	ND	ND	33.3 c	37.5 ab
	7	70.8 a	27.8 bc	33.7 bc	45.9 a
	10	84.7 a	59.2 a	ND	ND
CK		65.3 a	35.9 ab	51.4 ab	48.0 a

^a The date was plants treated ASM before *C. higginsianum* PA01 inoculation.

^b Disease severity of Pak-choi (cvs. Wang Guan and San Feng No.2) was recorded 7 days in greenhouse.

^c Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test.

^d ND: no data

表五、比較 ASM 與其他殺菌劑對不結球白菜炭疽病之防治效果

Table 5. Comparison of efficacy between ASM and other fungicides in controlling anthracnose of Pak-choi

Treatment	Disease severity ^a (%)	
	Wang Guan	San Feng No.2
ASM 1 mg/L	31.93 b ^b	17.37 b
ASM 10 mg/L	16.67 c	11.10 bc
Pyraclostrobin 3000x	1.40 d	3.48 c
Azoxystrobin 2000x	13.90 cd	9.03 bc
Kresoxim-methyl 2500x	13.90 cd	13.90 b
Benomyl 1500x	25.00 bc	26.38 a
CK	56.93 a	36.80 a

^a Disease severity of Pak-choi (cvs. Wang Guan and San Feng No.2) was recorded 7 days in greenhouse.

^b Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test.



表六、王冠和三鳳 2 號種子以不同濃度 ASM 浸泡不同時間後對幼苗立枯病之防治效果

Table 6. Estimation of efficacy in controlling damping-off of Wang Guan and San Feng No.2 after treatments with different concentrations and time of ASM

Cultivar	Concentration (mg/L)	Survival rate ^c (%)									
		Hours after treatments with ASM									
		0		6		12		18		24	
Wang Guan	100	2.1	b ^d	20.8	b	14.6	b	4.2	c	10.5	c
	10	10.4	b	27.1	b	35.4	b	22.9	bc	8.4	c
	1	12.5	b	27.1	b	20.9	b	35.4	b	20.8	bc
	CK1 ^a	4.2	b	22.9	b	16.7	b	22.9	bc	29.2	b
	CK2 ^b	75.0	a	75.0	a	79.2	a	85.4	a	75.0	a
	LSD	1.21		1.84		1.80		1.75		1.47	
San Feng No.2	100	58.3	b	64.6	ab	66.7	b	66.7	ab	66.7	bc
	10	47.9	b	56.3	b	66.7	b	83.3	a	79.2	ab
	1	60.4	b	54.2	b	72.9	ab	66.7	ab	66.7	bc
	CK1	68.8	ab	75.0	ab	68.8	ab	50.0	b	54.2	c
	CK2	89.6	a	85.4	a	87.5	a	85.4	a	89.6	a
	LSD	2.15		2.31		1.62		1.58		1.71	

^a CK1: infested soil

^b CK2: non-infested soil

^c Survival rate of Pak-choi seedlings (cvs. Wang Guan and San Feng No.2) was recorded 7 days in greenhouse.

^d Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

表七、王冠和三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，24 小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化

Table 7. Changes in activity of superoxidase dismutase in Wang Guan and San Feng No.2 within 24hrs after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	SOD activity (10^{-2} Units/ mg)			
		Hours after treatments with ASM			
		0	6	12	24
Wang Guan	100	35.33 b ^b	52.25 a	36.21 a	29.84 b
	10	41.51 b	43.82 a	37.39 a	34.80 b
	1	61.67 a	55.20 a	39.30 a	45.70 a
	CK	64.12 a	40.13 a	41.51 a	35.33 b
	LSD	18.89	16.98	9.72	9.53
San Feng No.2	100	60.63 a	44.17 b	54.51 a	43.36 c
	10	74.65 a	59.32 a	62.46 a	99.51 a
	1	53.93 a	61.18 a	66.21 a	60.63 bc
	CK	61.40 a	58.52 a	59.28 a	68.61 b
	LSD	22.11	12.31	21.01	18.65

^a Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

表八、王冠與三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24 小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化

Table 8. Changes in activity of superoxidase dismutase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	SOD activity (10^{-2} Units/ mg)				
		Hours after treatments with ASM				
		0	3	6	12	24
Wang Guan	100+I ^a	35.33 b ^b	43.38 b	67.55 a	67.21 ab	42.55 bc
	10+I	41.51 b	57.08 ab	63.79 ab	60.07 abc	59.02 ab
	1+I	61.67 a	63.66 a	54.64 b	53.14 bc	63.91 a
	CK+I	64.12 a	62.91 a	68.36 a	71.46 a	67.07 a
	CK	64.12 a	49.68 ab	40.13 c	43.53 c	38.22 c
	LSD	18.83	16.21	13.08	17.43	17.96
San Feng No.2	100+I	60.63 ab	61.65 a	76.78 ab	53.98 c	54.68 c
	10+I	74.65 a	43.34 bc	82.93 a	62.06 c	98.98 a
	1+I	53.93 bc	55.64 a	86.92 a	86.30 b	87.68 a
	CK+I	61.40 ab	54.98 a	66.67 ab	103.43 a	72.55 b
	CK	61.40 ab	34.09 c	58.52 b	59.28 c	68.61 b
	LSD	19.34	10.63	21.88	15.36	11.58

^a I: Inoculation

^b Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

表九、王冠與三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，24 小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化

Table 9. Changes in activity of catalase in Wang Guan and San Feng No.2 within 24 hrs after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	CAT activity (10^3 Units/ mg)			
		Hours after treatments with ASM			
		0	6	12	24
Wang Guan	100	9.61 b	39.74 a	23.45 a	23.15 a
	10	29.30 a	16.94 b	28.42 a	31.35 a
	1	17.47 ab	27.84 ab	13.77 a	17.58 a
	CK	21.59 ab	44.64 a	16.77 a	25.79 a
	LSD	14.16	18.75	17.53	18.69
San Feng No.2	100	21.10 a	21.10 a	35.45 ab	16.99 a
	10	15.45 a	24.87 a	49.05 a	19.53 a
	1	8.98 a	18.17 a	18.46 b	20.56 a
	CK	33.99 a	20.14 a	21.68 ab	14.71 a
	LSD	25.42	17.30	29.11	18.88

^a Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

表十、王冠與三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24 小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化

Table 10. Changes in activity of catalase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	CAT activity (10^3 Units/ mg)				
		Hours after treatments with ASM				
		0	3	6	12	24
Wang Guan	100+I ^a	9.61 b ^b	33.44 a	29.58 ab	21.61 a	23.27 ab
	10+I	29.30 a	40.14 a	11.13 b	12.89 a	20.22 ab
	1+I	17.47 ab	20.41 a	32.04 ab	10.01 a	15.24 ab
	CK+I	21.59 ab	27.21 a	8.19 b	13.55 a	12.16 b
	CK	21.59 ab	30.77 a	44.64 a	16.77 a	25.79 a
	LSD	13.22	26.83	27.22	11.70	13.38
San Feng No.2	100+I	21.10 a	11.10 a	18.04 ab	19.88 ab	15.53 a
	10+I	15.45 a	12.60 a	11.66 b	28.13 a	25.20 a
	1+I	8.98 a	14.36 a	25.90 a	7.39 bc	27.10 a
	CK+I	33.99 a	25.20 a	21.68 ab	4.70 c	13.48 a
	CK	33.99 a	12.11 a	20.14 ab	21.68 a	14.71 a
	LSD	31.88	14.68	13.77	12.44	18.92

^aI: Inoculation

^bMeans within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

表十一、王冠與三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化

Table 11. Changes in activity of peroxidase in Wang Guan and San Feng No.2 within 7 days after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	Peroxidase activity (10^{-1} Units/ mg)								
		Days after treatments with ASM								
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Wang Guan	100	50.65 ab	66.09 a	36.71 d	119.01 a	180.23 a	114.89 a	125.62 a	129.26 a	
	10	56.66 a	58.79 ab	52.01 b	79.53 b	99.32 b	78.98 b	92.49 b	93.63 b	
	1	44.90 b	48.29 b	64.99 a	61.24 c	63.14 c	87.15 b	83.15 b	67.44 b	
	CK	48.68 ab	54.29 ab	48.10 c	34.74 d	34.61 d	35.76 c	41.24 c	55.66 c	
	LSD	9.92	14.93	3.54	10.78	25.28	14.95	9.47	8.79	
San Feng No.2	100	38.23 b	51.24 bc	51.37 b	54.41 b	74.28 a	79.27 a	67.20 b	100.40 a	
	10	41.34 b	58.45 b	68.59 a	86.42 a	85.57 a	63.86 b	93.04 a	103.10 a	
	1	52.40 a	72.38 a	71.44 a	81.68 a	75.01 a	63.86 b	78.18 ab	74.41 b	
	CK	35.73 b	42.17 c	40.90 b	52.22 b	50.96 b	46.01 c	42.48 c	51.08 c	
	LSD	15.77	10.34	14.99	21.19	16.45	5.44	20.68	19.85	

^a Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

表十二、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化

Table 12. Changes in activity of peroxidase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	Peroxidase activity (Units/ mg)							
		Days after treatments with ASM							
		0	3hrs	1	2	3	4	5	6
Wang Guan	100+I	69.47 b	74.67 b	109.38 a	116.24 a	104.70 b	123.76 a	158.99 a	150.23 a
	10+I	66.93 b	113.61 a	111.14 a	115.60 a	128.95 a	101.27 bc	95.35 c	113.50 b
	1+I	95.16 a	85.24 b	63.67 c	81.60 b	97.67 b	114.00 ab	115.87 b	134.58 ab
	CK+I	65.94 b	77.44 b	91.89 b	89.92 b	99.51 b	87.09 c	88.13 c	146.17 a
	CK	65.94 b	73.24 b	63.70 c	85.70 b	81.87 c	88.39 c	58.77 d	78.78 c
	LSD	10.17	12.63	8.56	18.08	11.62	16.51	18.66	24.89
San Feng No.2	100+I	12.56 a	11.06 b	23.53 a	17.30 a	15.88 b	18.45 ab	12.96 a	23.39 a
	10+I	10.36 a	21.23 a	18.39 ab	17.70 ab	22.17 a	17.12 ab	17.62 a	16.77 b
	1+I	12.95 a	10.46 b	16.00 b	11.07 b	15.68 b	15.14 b	6.51 b	15.21 b
	CK+I	18.36 a	22.29 a	19.99 ab	13.98 ab	16.61 b	11.18 c	14.19 a	21.72 a
	CK	18.36 a	22.29 a	22.01 a	18.07 a	13.40 b	20.43 a	17.05 a	16.21 b
	LSD	9.88	4.25	5.40	6.79	3.89	4.17	5.13	2.48

^a I: Inoculation

^b Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

表十三、王冠與三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 活性的變化

Table 13. Changes in activity of phenylalanine ammonia lyase in Wang Guan and San Feng No.2 within 7 days after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	Phenylalanine ammonia lyase (nmole/ h/ μ g)								
		Days after treatments with ASM								
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Wang Guan	100	28.80 a	29.18 b	25.47 ab	25.10 ab	28.31 a	27.84 a	31.68 a	34.90 a	
	10	22.18 b	19.18 c	27.10 a	27.76 a	25.89 a	20.11 c	26.90 b	23.13 c	
	1	16.17 c	20.10 c	24.86 ab	26.20 a	28.23 a	23.59 b	23.98 b	27.01 bc	
	CK	27.98 a	29.18 a	23.59 b	23.27 b	25.67 a	23.66 b	26.27 b	28.03 b	
	LSD	3.74	1.77	3.06	2.29	3.72	3.16	4.45	4.44	
San Feng No.2	100	19.17 b	22.34 b	20.70 a	25.54 a	20.59 a	24.26 a	26.85 a	24.20 a	
	10	24.69 a	24.21 a	19.28 ab	26.88 a	20.69 a	26.40 a	20.20 b	21.87 a	
	1	24.20 a	19.65 c	20.61 a	22.62 a	23.12 a	19.00 b	20.75 b	21.12 a	
	CK	18.54 b	18.18 c	17.31 b	23.85 a	21.70 a	18.49 b	18.84 b	15.18 b	
	LSD	3.50	1.54	3.13	5.86	3.65	2.99	2.23	4.96	

^a Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).

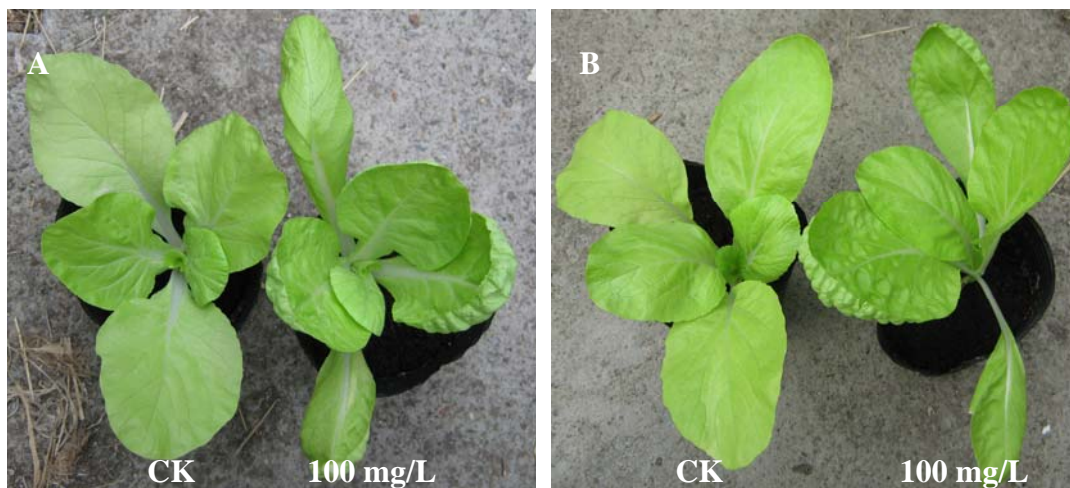
表十四、王冠與三鳳 2 號品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (PAL) 活性的變化

Table 14. Changes in activity of phenylalanine ammonia lyase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM

Cultivar	Concentration (mg/ L)	Phenylalanine ammonia lyase (nmole/ h/ μ g)							
		Days after treatments with ASM							
		0	3hrs	1	2	3	4	5	6
Wang Guan	100+I	20.00 a	19.31 a	16.54 a	18.43 a	18.48 b	18.14 a	17.36 b	19.75 a
	10+I	13.89 c	17.28 ab	14.18 b	18.07 ab	22.55 a	16.11 a	19.49 a	19.84 a
	1+I	14.11 c	15.36 b	12.04 b	14.16 c	14.68 c	13.07 b	16.20 b	17.04 b
	CK+I	17.28 b	16.38 b	17.19 a	15.99 bc	17.75 b	16.53 a	15.93 b	19.71 a
	CK	17.28 b	18.90 a	16.77 a	19.37 a	18.70 b	17.21 a	16.35 b	17.13 b
	LSD	2.09	2.62	2.21	2.40	2.87	2.75	2.14	1.73
San Feng No.2	100+I	28.22 a	28.95 a	25.17 ab	23.99 ab	20.76 b	28.26 ab	29.30 a	25.72 ab
	10+I	25.23 a	25.54 ab	26.79 a	26.56 a	27.01 a	30.20 a	25.73 b	28.84 a
	1+I	24.11 b	24.30 bc	22.76 c	20.67 c	18.42 c	19.91 c	20.79 c	19.30 c
	CK+I	28.40 a	21.32 c	22.62 c	22.20 bc	20.40 b	21.72 c	17.33 d	24.55 ab
	CK	28.40 a	21.32 c	22.86 c	25.36 ab	21.31 b	23.52 c	26.22 b	22.44 bc
	LSD	3.94	3.51	2.55	2.81	1.47	4.63	2.60	4.63

^a I: Inoculation

^b Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to least significant difference (LSD).



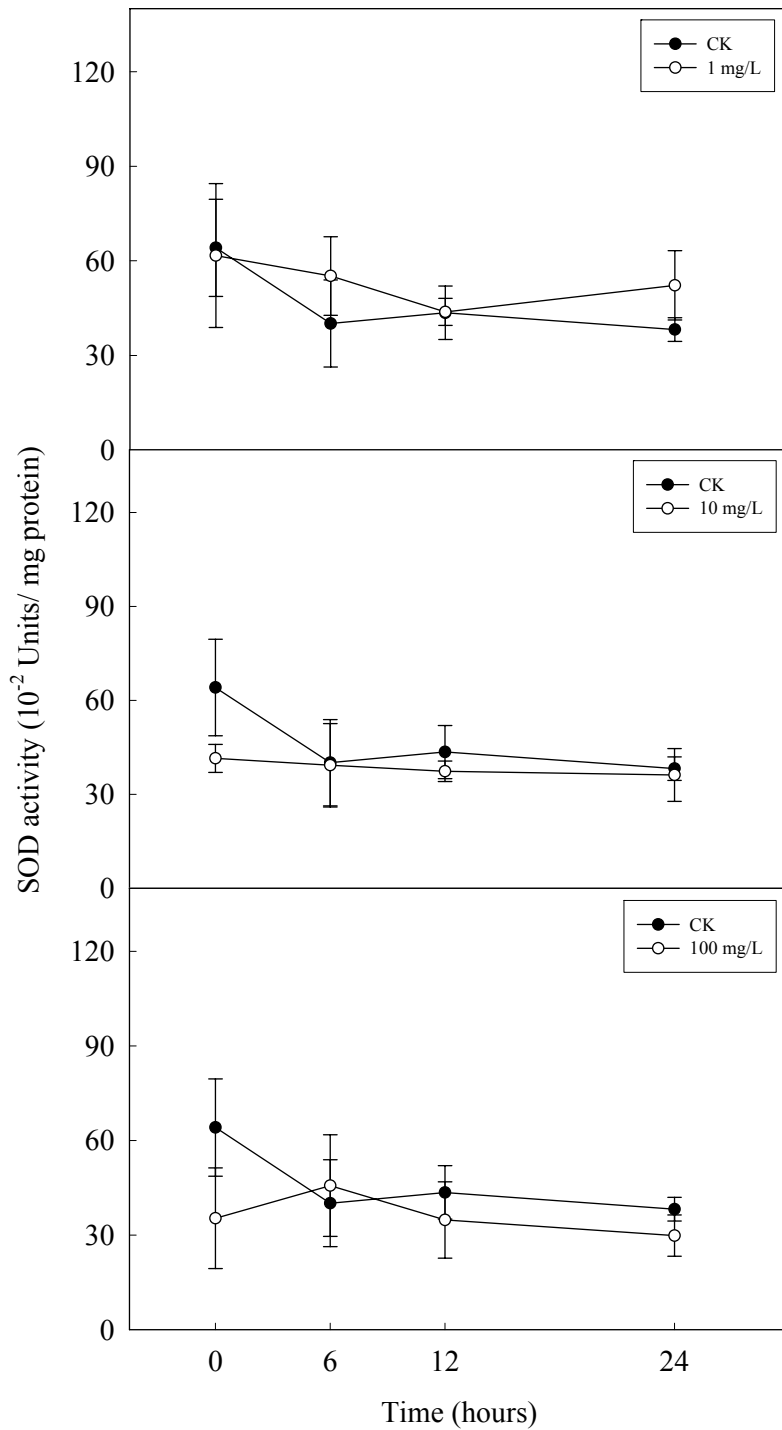
圖一、施用 100 mg/L ASM 對不結球白菜植株外觀之影響。(A)王冠品種 (B)三鳳 2 號品種。

Fig. 1 Effects of ASM on plant growth of Pak-choi (*Brassica campestris* L. Chinese Group) after treated with 100 mg/L ASM. (A) Wang Guan (B) San Feng No.2.



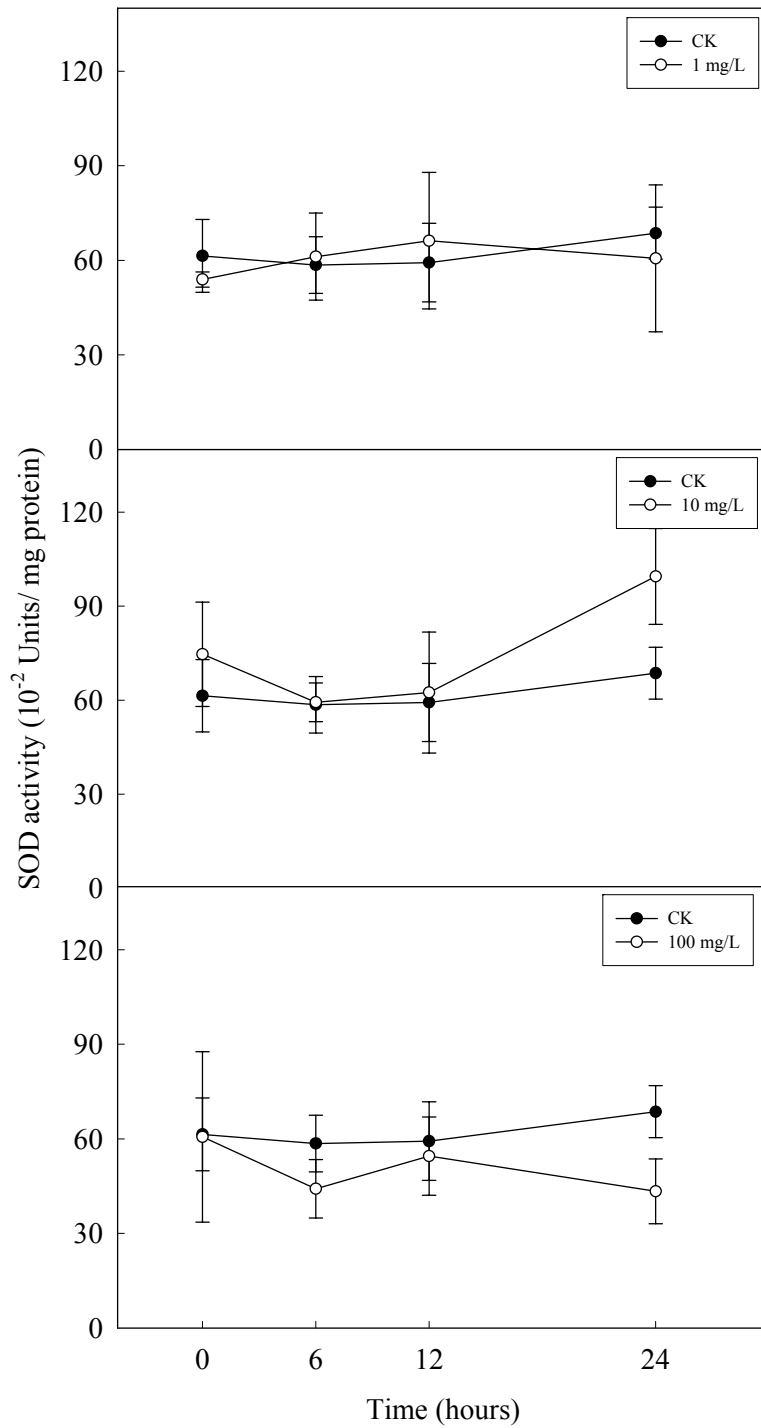
圖二、處理 100 mg/L ASM 對不結球白菜幼苗外觀之影響。(A)王冠品種對照組 (B)王冠品種處理組 (C)三鳳 2 號品種對照組 (D)三鳳 2 號品種處理組。

Fig. 2 Effects of ASM on seedling of Pak-choi (*Brassica campestris* L. Chinese Group) after treated with 100 mg/L ASM. (A) CK of Wang Guan (B) Treatment of Wang Guan (C) CK of San Feng No.2 (D) Treatment of San Feng No.2.



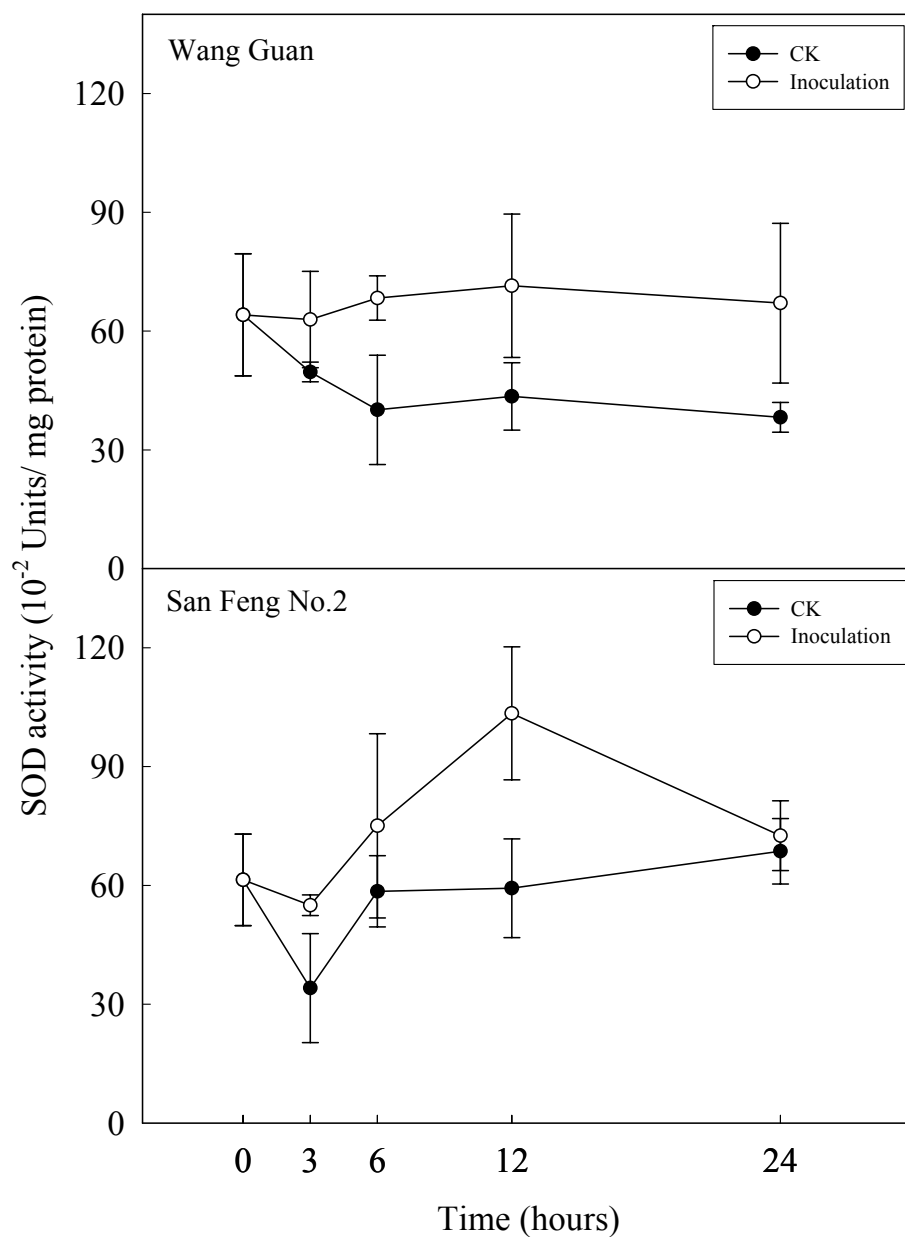
圖三、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，24 小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化。

Fig. 3 Changes in activity of superoxidase dismutase in Wang Guan within 24hrs after treatments with different concentrations of ASM.



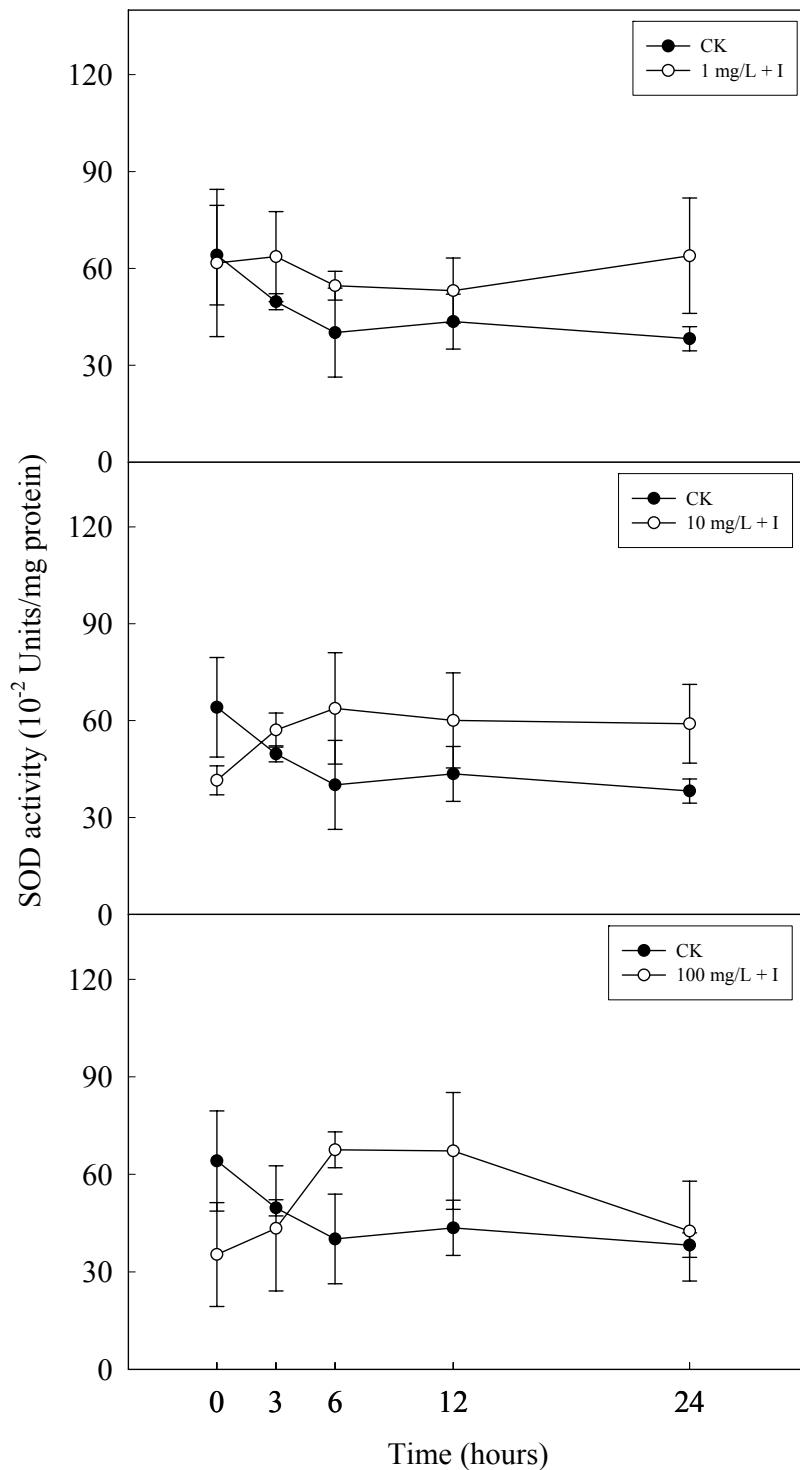
圖四、三鳳2號品种植株處理不同濃度ASM後，24小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化。

Fig. 4 Changes in activity of superoxidase dismutase in San Feng No.2 within 24 hrs after treatments with different concentrations of ASM.

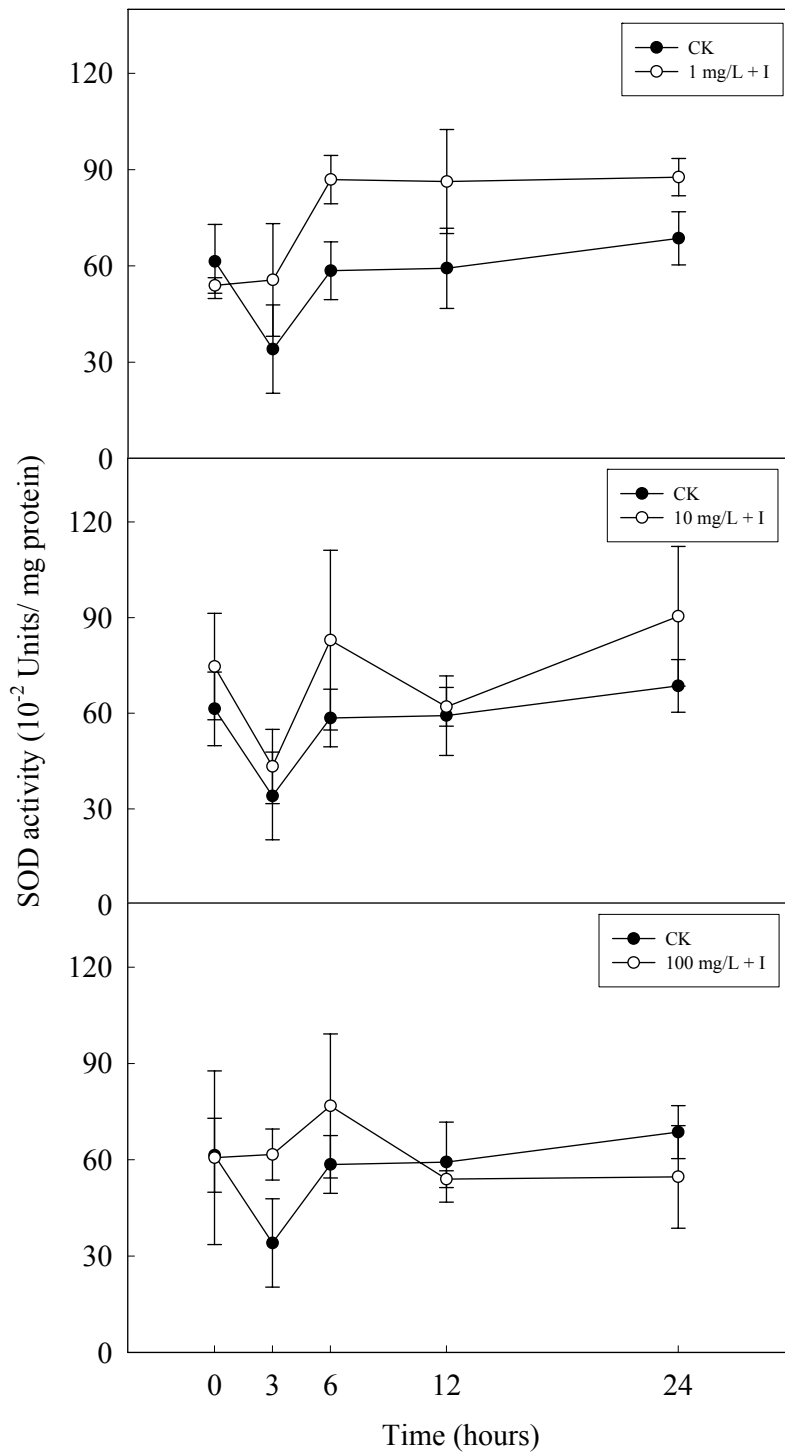


圖五、王冠與三鳳2號品種植株接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化。

Fig. 5 Changes in activity of superoxidase dismutase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01.

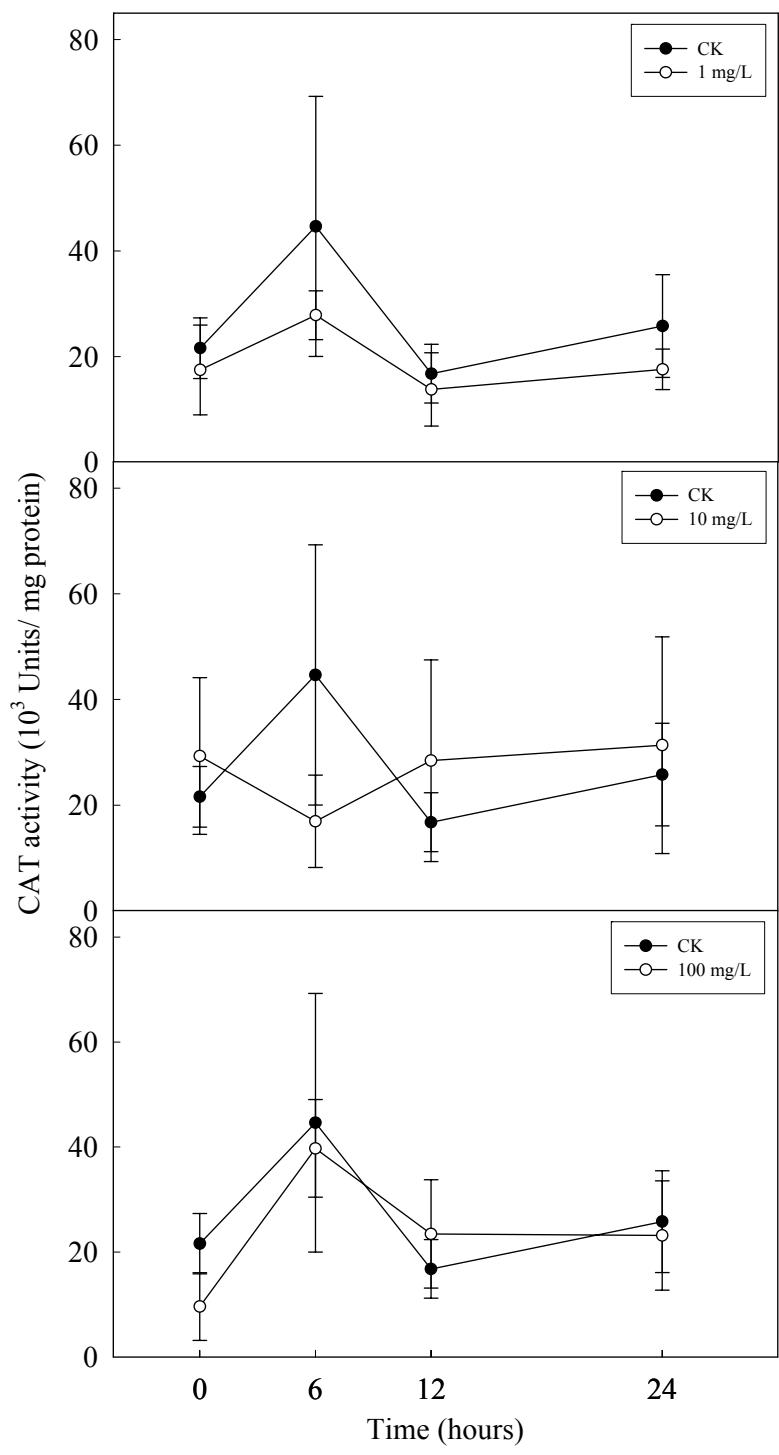


圖六、王冠品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24 小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化。
 Fig. 6 Changes in activity of superoxidase dismutase in Wang Guan inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.



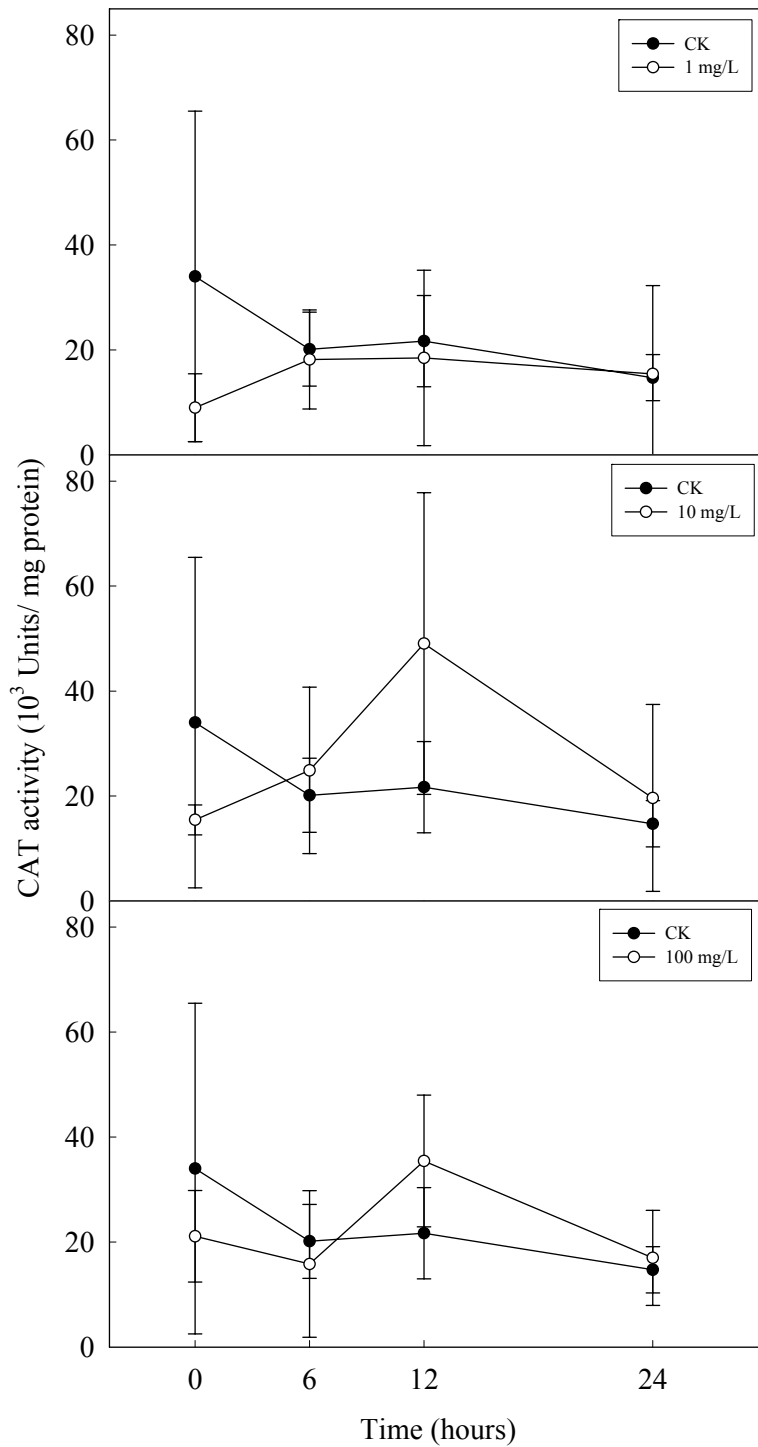
圖七、三鳳2號品種植株處理不同濃度ASM後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24小時內之超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 活性的變化。

Fig. 7 Changes in activity of superoxidase dismutase in San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.



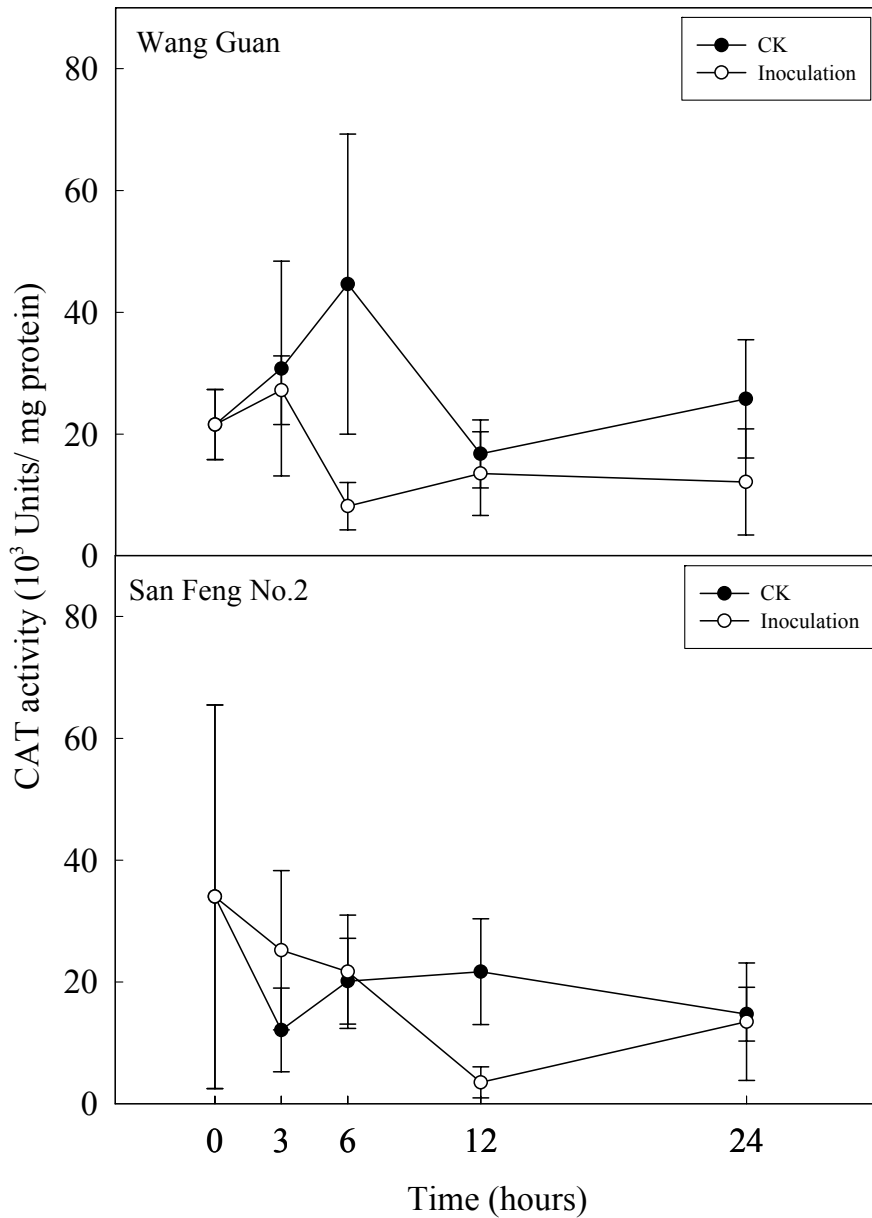
圖八、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，24 小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化。

Fig. 8 Changes in activity of catalase in Wang Guan within 24 hrs after treatments with different concentrations of ASM.



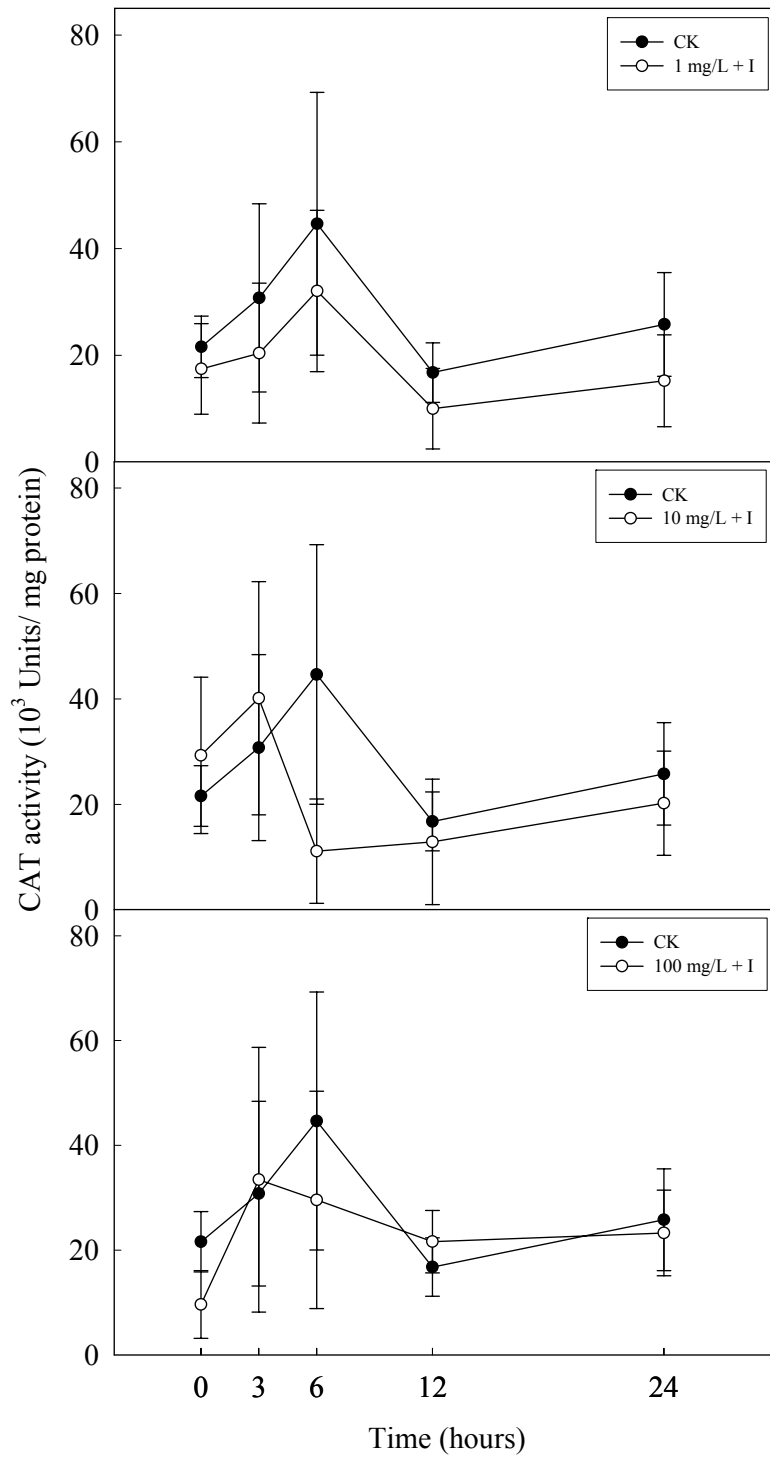
圖九、三鳳2號品種植株處理不同濃度ASM後，24小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化。

Fig. 9 Changes in activity of catalase in San Feng No.2 within 24 hrs after treatments with different concentrations of ASM.



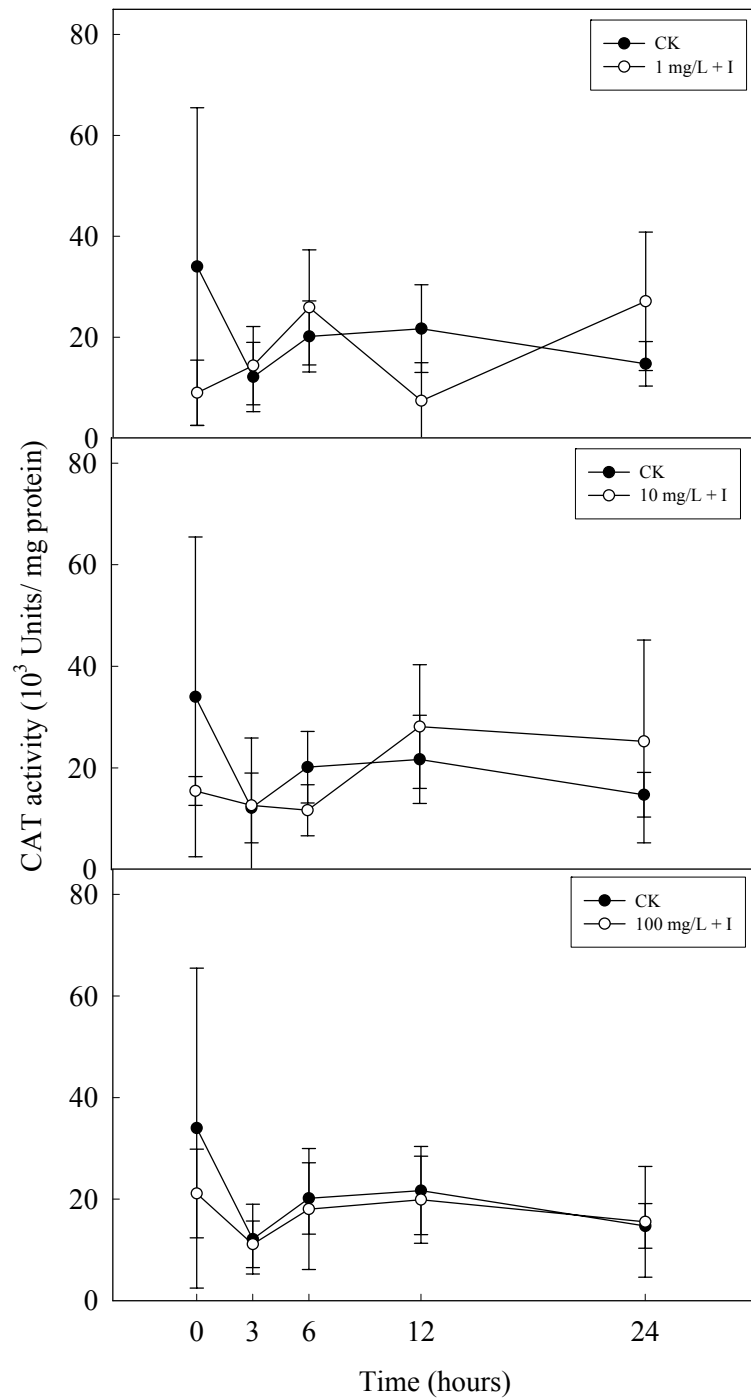
圖十、王冠與三鳳2號品種植株接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化。

Fig. 10 Changes in activity of catalase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01.



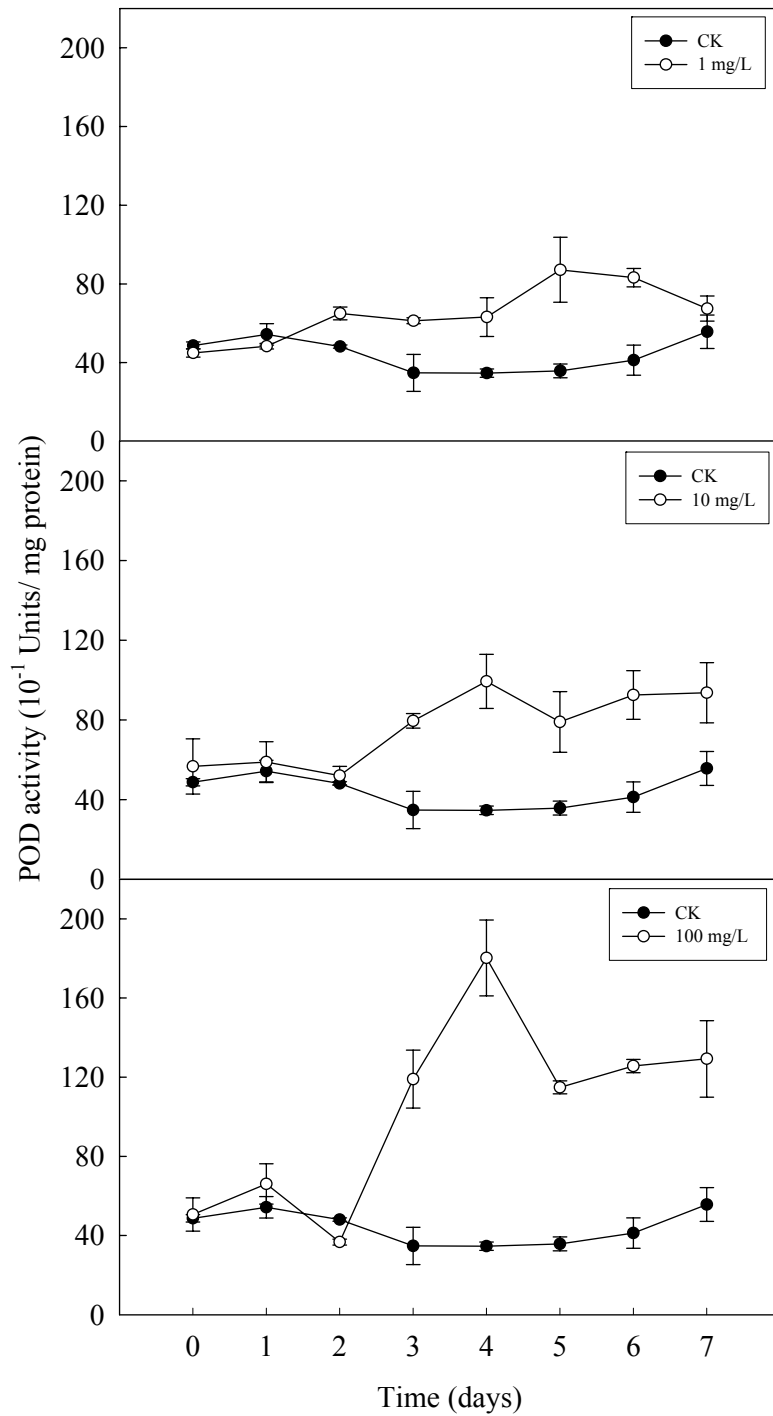
圖十一、王冠品种植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24 小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化。

Fig. 11 Changes in activity of catalase in Wang Guan inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.



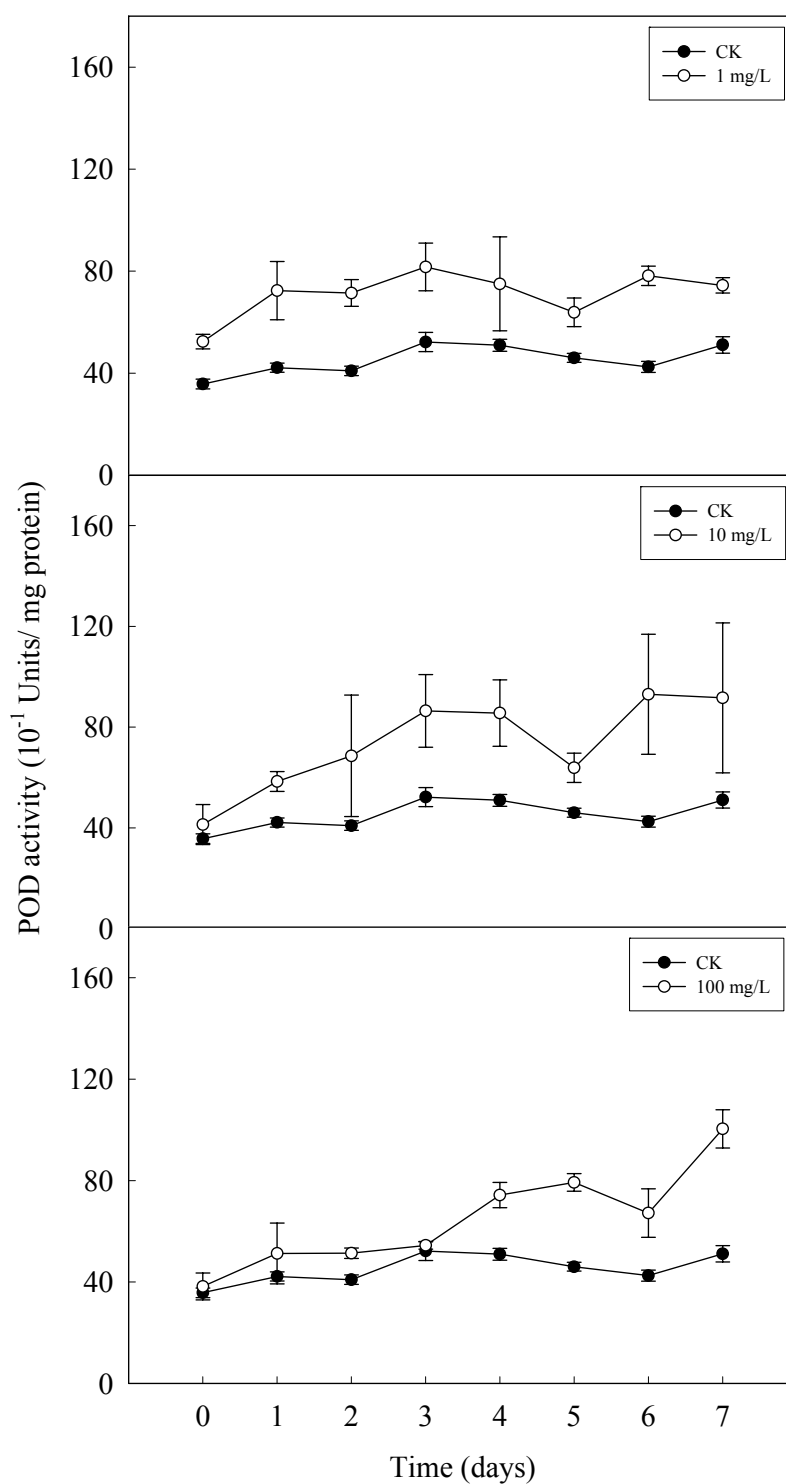
圖十二、三鳳2號品種植株處理不同濃度ASM後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，24小時內之過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性的變化。

Fig. 12 Changes in activity of catalase in San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.



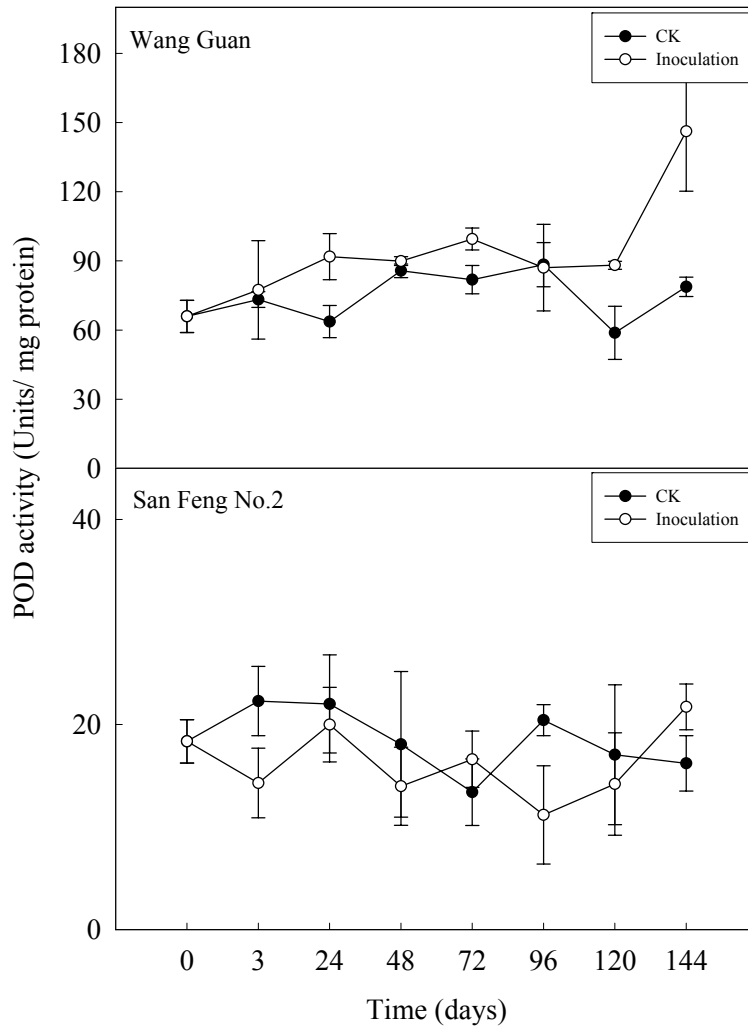
圖十三、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化。

Fig. 13 Changes in activity of peroxidase in Wang Guan within 7 days after treatments with different concentrations of ASM.



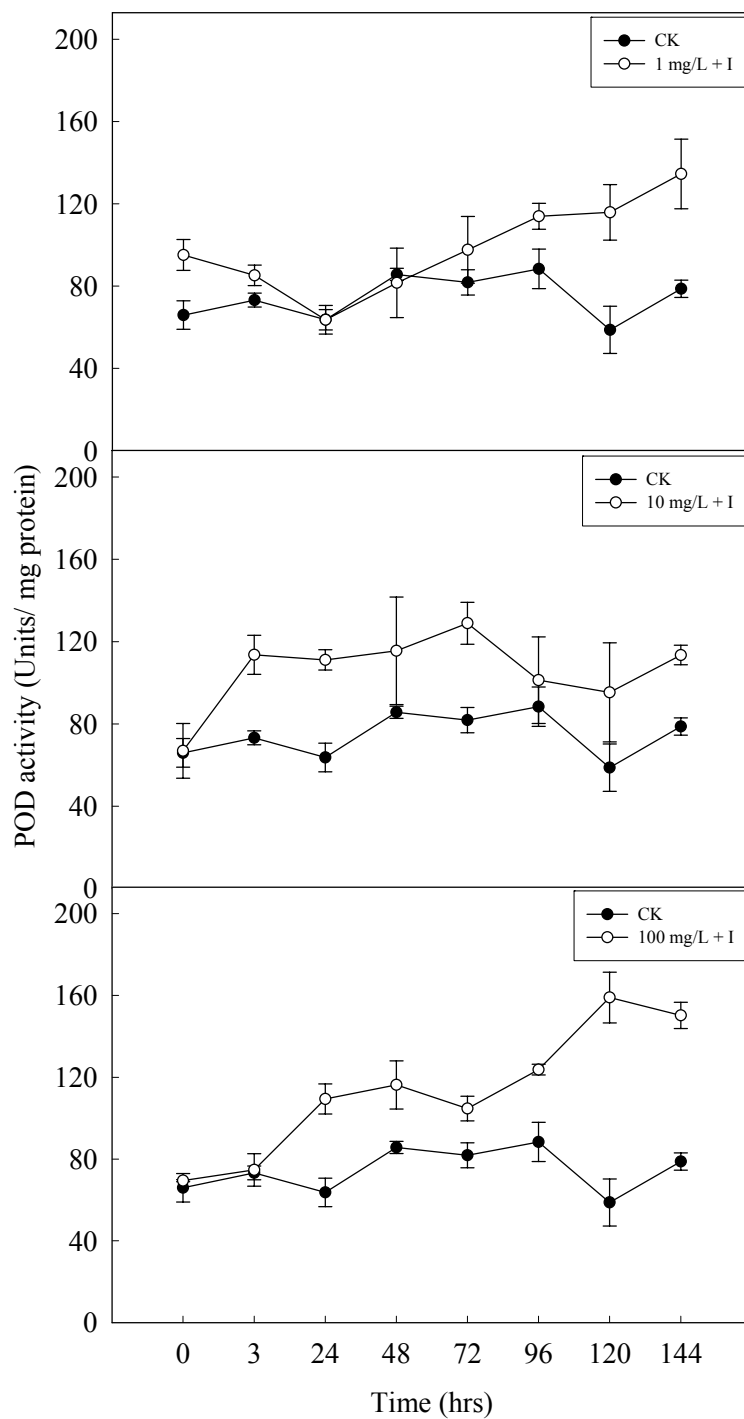
圖十四、三鳳2號品種植株處理不同濃度ASM後，7天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化。

Fig. 14 Changes in activity of peroxidase in San Feng No.2 within 7 days after treatments with different concentrations of ASM.



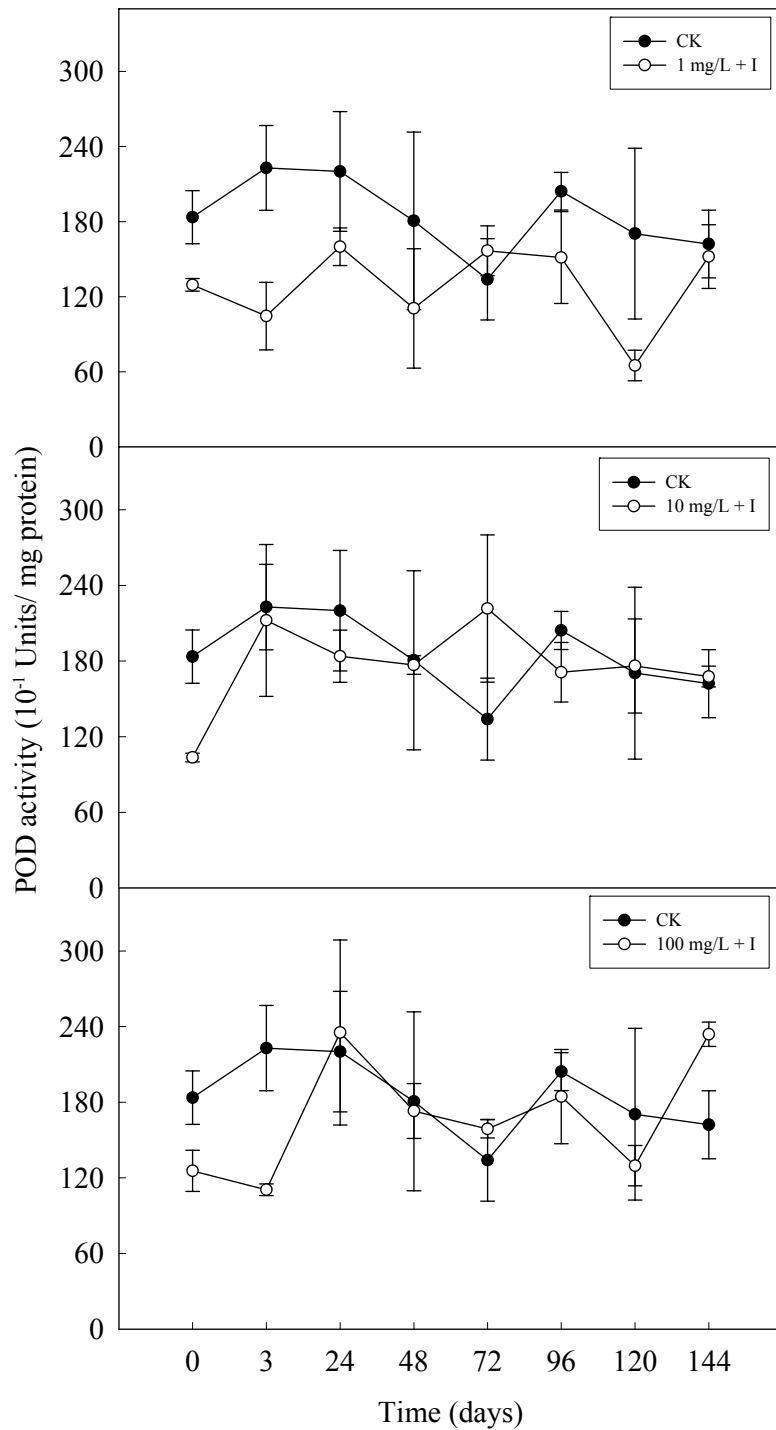
圖十五、王冠與三鳳 2 號品種植株接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化。

Fig. 15 Changes in activity of peroxidase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01.



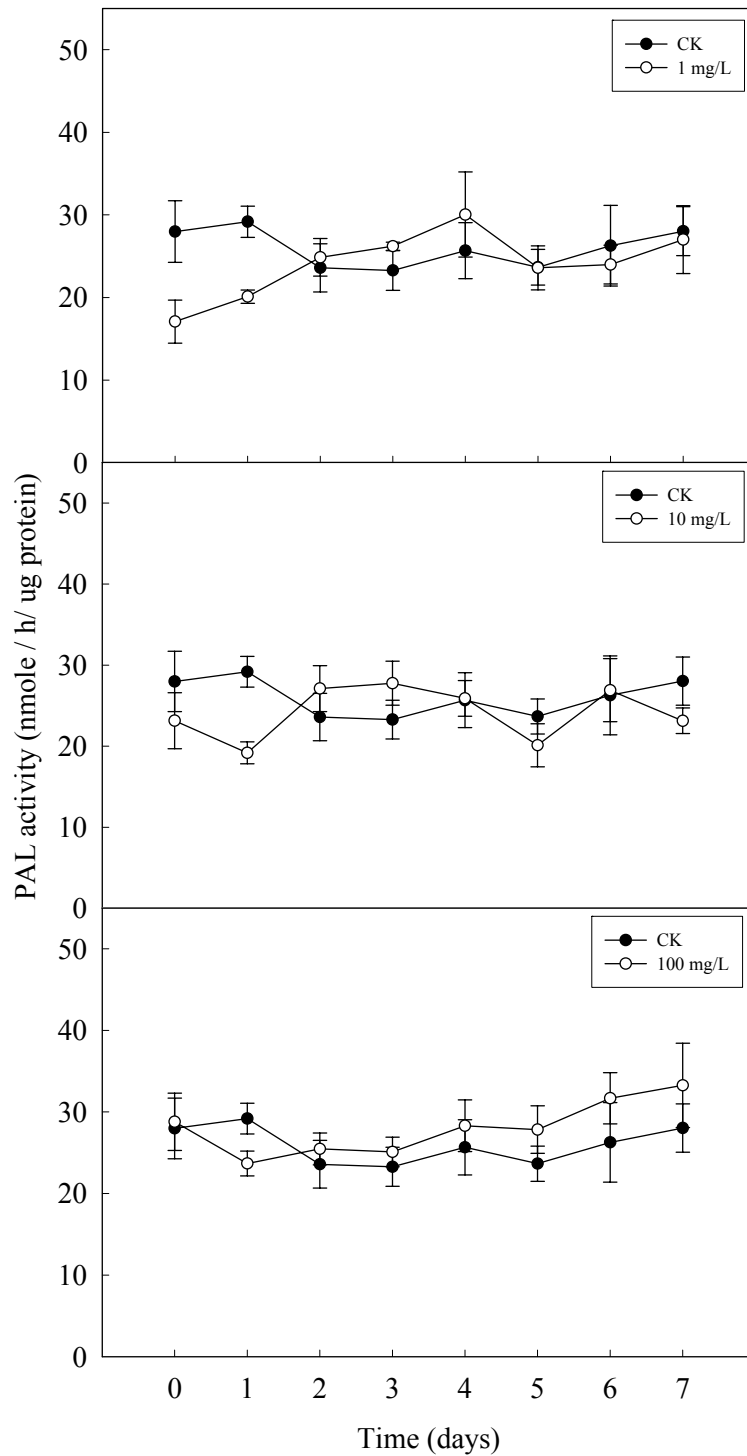
圖十六、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化。

Fig. 16 Changes in activity of peroxidase in Wang Guan inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.



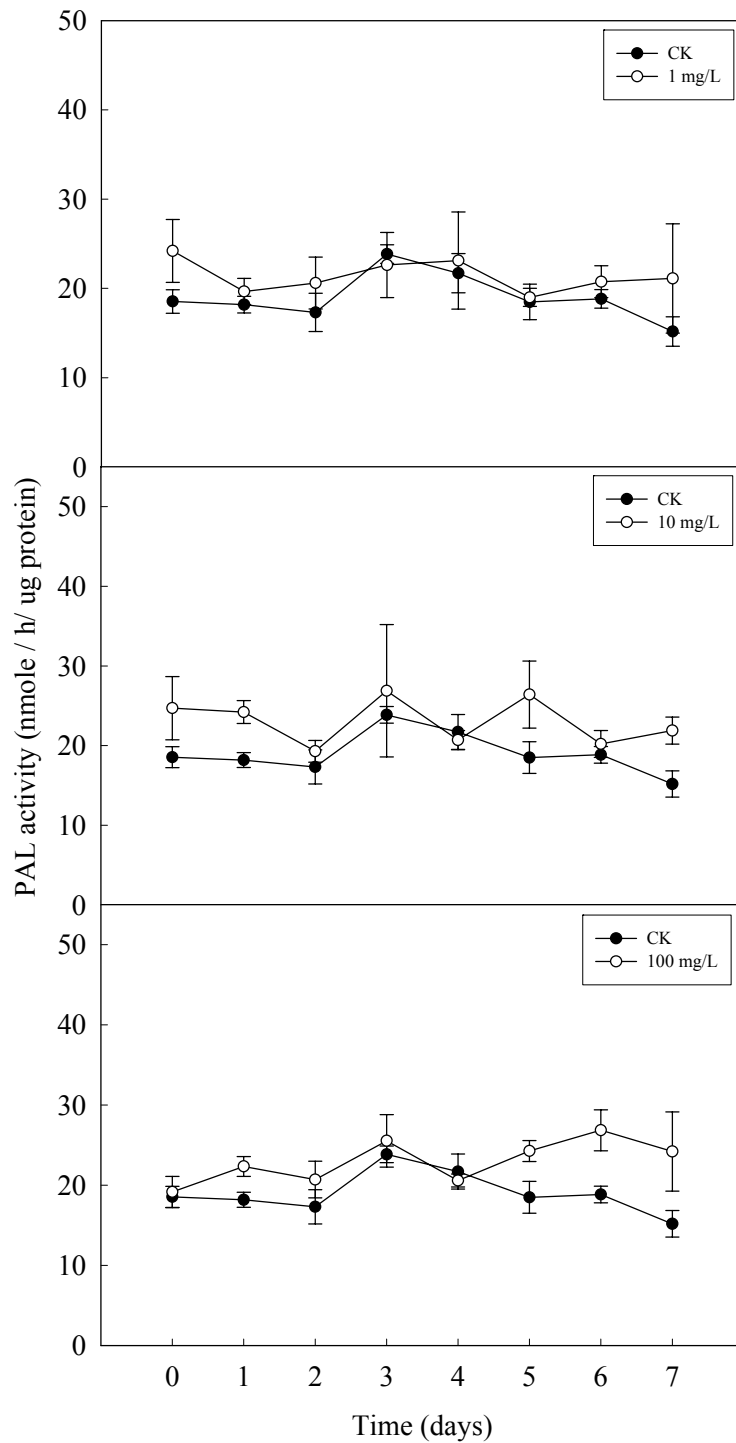
圖十七、三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性的變化。

Fig. 17 Changes in activity of peroxidase in San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.



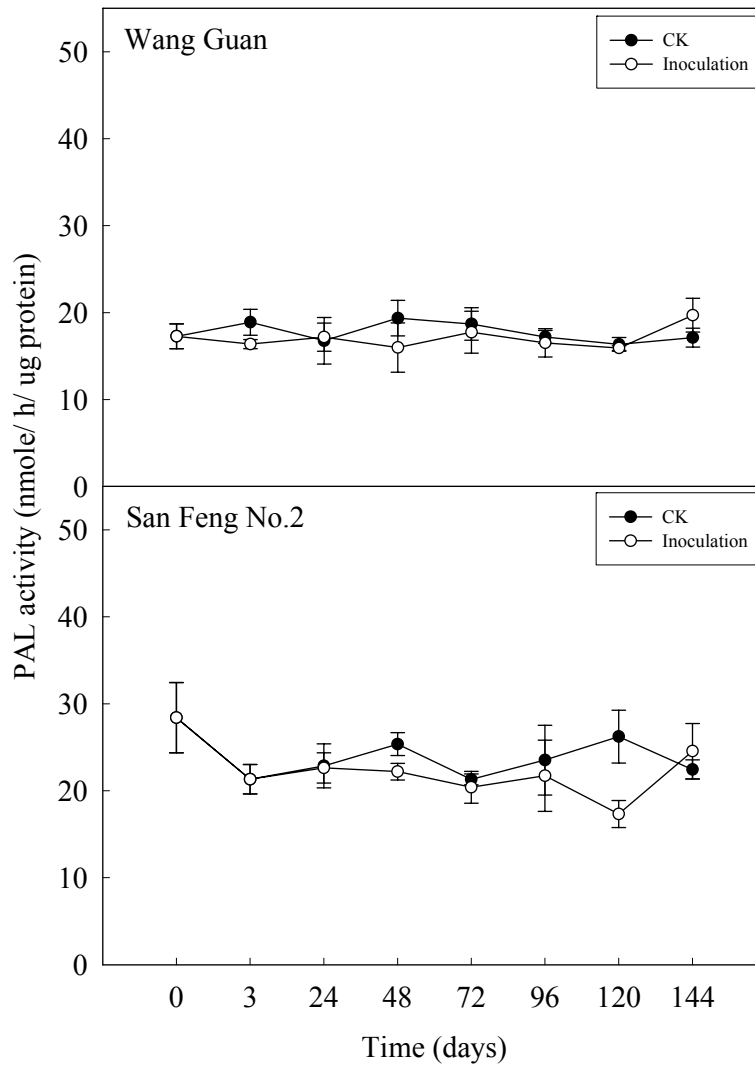
圖十八、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，7 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 活性的變化。

Fig. 18 Changes in activity of phenylalanine ammonia lyase in Wang Guan within 7 days after treatments with different concentrations of ASM.



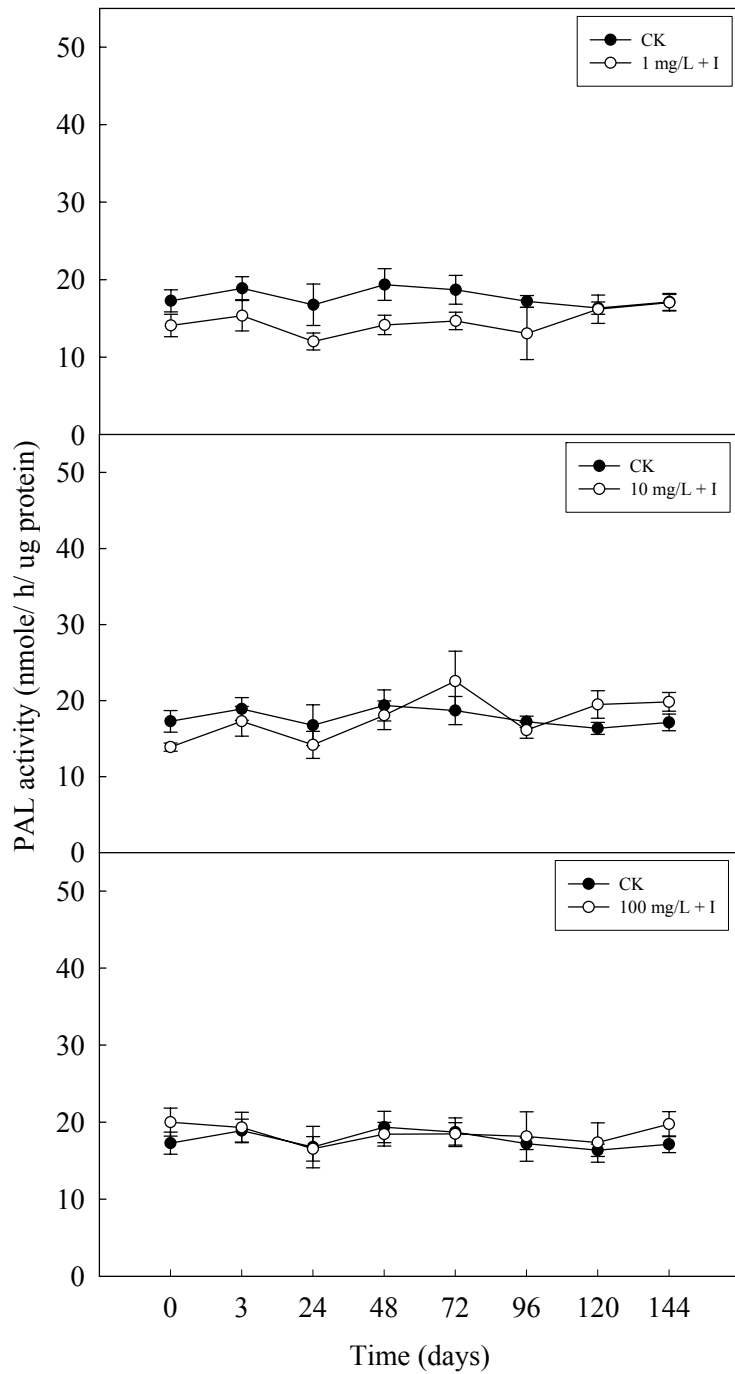
圖十九、三鳳2號品種植株處理不同濃度ASM後，7天內之苯丙氨酸裂解酵素 (PAL) 活性的變化。

Fig. 19 Changes in activity of phenylalanine ammonia lyase in San Feng No.2 within 7 days after treatments with different concentrations of ASM.



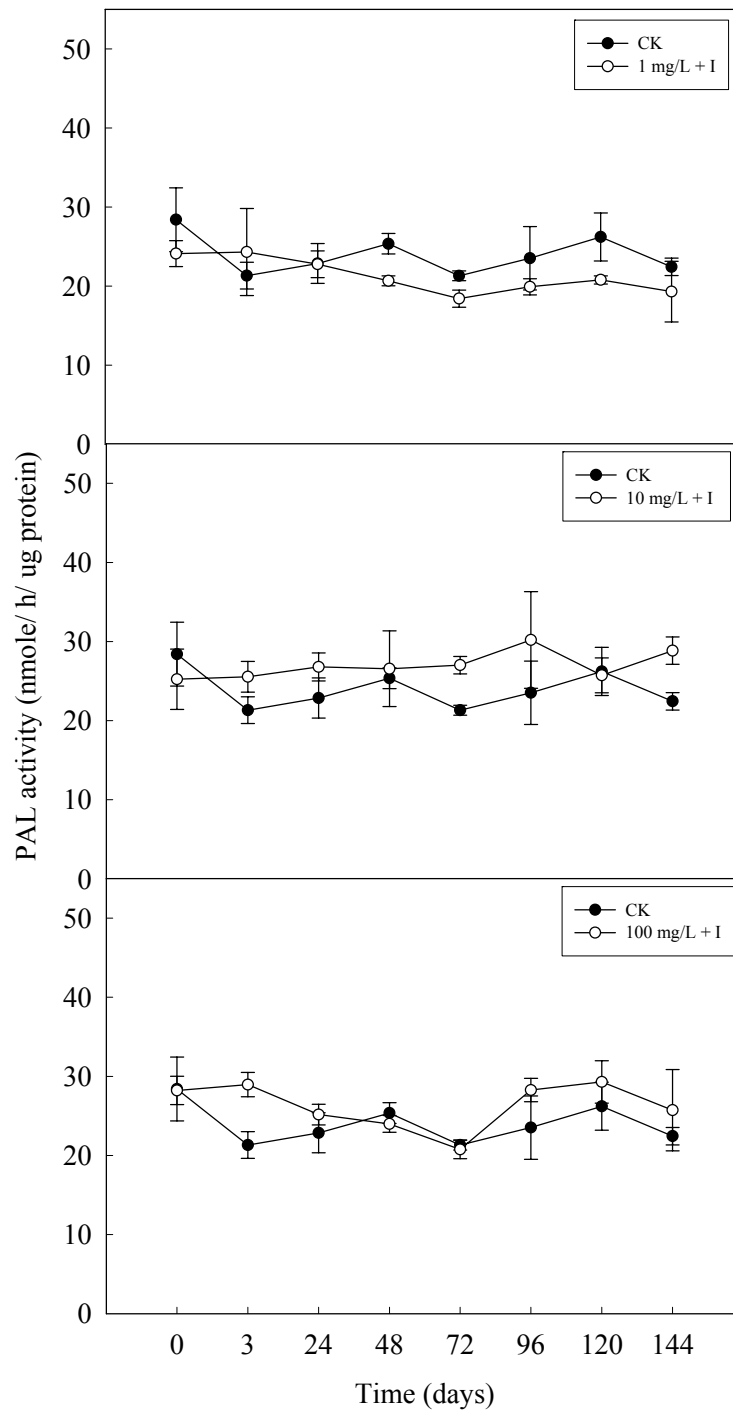
圖二十、王冠與三鳳 2 號品種植株接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (PAL) 活性的變化。

Fig. 20 Changes in activity of phenylalanine ammonia lyase in Wang Guan and San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01.



圖二十一、王冠品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (PAL) 活性的變化。

Fig. 21 Changes in activity of phenylalanine ammonia lyase in Wang Guan inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.



圖二十二、三鳳 2 號品種植株處理不同濃度 ASM 後，再接種炭疽病菌 *C. higginsianum* PA01，6 天內之苯丙胺酸氨裂解酵素 (PAL) 活性的變化。

Fig. 22 Changes in activity of phenylalanine ammonia lyase in San Feng No.2 inoculated with *C. higginsianum* PA01 after treatments with different concentrations of ASM.