

應用幾丁寡醣防治草莓葉枯病與細菌性角斑病之效果評估

羅筱君¹、林乃君^{1, 2*}

¹ 國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程

² 國立臺灣大學農業化學系

* 聯絡作者, E-mail: nlin@ntu.edu.tw

摘要

羅筱君、林乃君。2023。應用幾丁寡醣防治草莓葉枯病與細菌性角斑病之效果評估。植物醫學65(2): 53-64。

草莓是臺灣重要的經濟作物，近年來因品種更迭，造成兩大新興病害—葉枯病與細菌性角斑病的出現，而目前臺灣種植最多的香水品種對葉枯病極為感病，造成農民嚴重損失，為現今草莓產業急需解決的病害問題。本研究由尋求可用於臺灣草莓產業的天然安全資材切入，藉由測試幾丁寡醣對草莓葉枯病和細菌性角斑病致病菌之抑菌能力，並觀察其對病害嚴重度的影響，評估幾丁寡醣應用於防治此二種草莓新興病害之效果。結果顯示，幾丁寡醣可以抑制葉枯病菌孢子發芽，但無法完全抑制細菌性角斑病菌於培養基中的生長。每週以 5,000 mg/L 幾丁寡醣施於草莓植株時，防治葉枯病效果佳，可以顯著降低發病嚴重度，但用於防治細菌性角斑病則無效；以幾丁寡醣防治葉枯病需每週噴施，兩週施用一次則無效果。本研究提供了幾丁寡醣應用於草莓葉枯病防治潛力之成效，以及合適的施用頻率及濃度，希望未來可將幾丁寡醣導入田間草莓有害生物整合管理 (Integrated pest management, IPM) 的策略中，以達到減少化學藥劑施用量與頻率的目標。

關鍵詞：草莓葉枯病、草莓細菌性角斑病、幾丁寡醣、有害生物整合管理

緒言

草莓 (*Fragaria x ananassa* Duchesne) 是薔薇科 (Rosaceae) 草莓屬 (*Fragaria*) 之多年生草本植物，在臺灣是蔬菜中花果菜類單位面積產值最高之作物。早期因為豐香 (桃園一號) 香氣濃郁、含糖量高，且風味深受消費者喜愛，為臺灣主要栽培品種。隨著夏季氣溫逐年升高，加上頻繁降雨，豐香種苗因不耐熱以及炭疽病嚴重發生，逐漸被其他品種取代。其中，香水品

種開花期較豐香早、結果量較豐香多，且果實硬度較高而便於運輸，因而成為近 3、4 年農民普遍栽種的品種^(1,2)。

然而近年在香水品種上發現新的真菌性病害—葉枯病 (由 *Neopestalotiopsis rosae* 造成)，對香水品種威脅性極高^(3,4)，但豐香則屬於抗病品種⁽⁵⁾。葉枯病會造成植株葉枯、冠腐、根腐及果腐等徵狀，除了感染幼苗之外，移入本田時若環境適合則發病會更加嚴重，可造成高達 30% 的損失，甚至有逐年加劇的趨勢⁽⁴⁾，是現今草莓產業急需解決的病害問題之一。此外，草莓產業另一棘手的新興病害為細菌性角斑病，其病原菌為 *Xanthomonas fragariae*，是被歐洲和地中海植物保護組織 (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) 列為 A2 類的有害生物，已在世界各國造成嚴重損失。此病發病初期葉背會出現角狀的水浸狀病斑，後期變為紅褐色、不規則且融合的壞疽病斑。在臺灣草莓栽種地區，此病的發生並無品種偏好性，好發於冬至早春時期，以噴灌方式澆水的田區，尤其在迎風面或河邊的區域會更加嚴重⁽⁶⁾。

施用化學藥劑仍是解決病害問題最快速且主流的方式，在臺灣，目前針對草莓葉枯病的緊急防治用藥包括稀釋 3,000 倍的 23.6% 百克敏乳劑或水懸劑、稀釋 1,000 倍的 23.7% 依普同水懸劑或稀釋 1,500 倍的 50% 依普同可溼性粉劑、稀釋 3,000 倍的 24.9% 待克利乳劑或水懸劑或稀釋 1,200 倍的 10% 待克利水分散性粒劑、稀釋 2,000 倍的 25% 普克利乳劑、稀釋 1,200 倍的 53% 腐絕快得寧可溼性粉劑，以及稀釋 2,000 倍的 62.5% 賽普護汰寧水分散性粒劑等藥劑，均建議在病害發生初期，即葉片出現病斑時進行施藥 (農藥資訊服務網 <https://pesticide.baphiq.gov.tw/>)。而於 2022 年 5 月公告的細菌性角斑病緊急防治用藥則包括稀釋 800 倍的 27.12% 三元硫酸銅水懸劑和 53.8% 氫氧化銅水分散性粒劑，以及稀釋 500 倍的 85% 鹼性氮氧化銅可溼性粉劑等，搭配盡量減少將病株帶入田區及即時拔除病葉等栽培管理方式，來降低病害發生率⁽⁷⁾。隨著消費者對環境保護與食安問題日趨重視，化學農藥減量已然成為大眾普遍關注的議題；此外，長期施用化學藥劑可能會提高病

原菌產生抗藥性的機率⁽⁸⁾，造成殺菌劑失去效用而徒增農民種植成本外，若施用不當亦會對生態環境及食品安全（例如：農藥殘留）造成威脅⁽⁹⁾，因此，採用相對安全且對環境友善的資材或策略成為病蟲害防治的趨勢。然而草莓葉枯病及細菌性角斑病是近幾年才發現的草莓新興病害，相關研究還在起步中，包括有機可用、安全性較佳的防治資材至今仍頗為欠缺。

幾丁質 (Chitin) 是自然界中含量僅次於纖維素的天然生物聚合物，主要存在於甲殼類外殼、節肢動物的外骨骼、軟體動物的外殼和內骨骼（如：烏賊的軟骨），以及真菌的細胞壁中^(10, 11)。幾丁質經幾丁質去乙酰基酶 (Chitin deacetylase) 作用後，便會產生以 β -1,4-linked D-glucosamine 組成的幾丁聚醣 (Chitosan)；高分子的幾丁聚醣再經幾丁聚醣酶 (Chitosanase) 降解後，會得到分子較小 (< 5,000 Dalton) 的幾丁寡醣 (Chitosan oligosaccharide, COS; 又稱為 Chitooligosaccharide)^(12, 13)。文獻搜尋後發現，對環境及人體無害的幾丁寡醣，相較於研究成果較多的幾丁質和幾丁聚醣，有更佳的生理活性⁽¹⁴⁾，加上其不需酸性溶液助溶即可均勻分散於水溶液中，且溶液 pH 值呈中性等特性，使其使用時更為便利^(15, 16)。幾丁寡醣對木瓜、芒果和柑橘的炭疽病有防治效果外，且其抑菌作用有助於延長這些果實的儲架壽命⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。此外，幾丁寡醣可誘導作物提高防禦酵素之活性，施用於水稻葉片上可有效降低水稻秧苗立枯病 (Rice seedling blight) 發病率及發病嚴重度⁽²⁰⁾ 及提高水稻對南方水稻黑條矮縮病毒 (Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) 的抗性⁽²¹⁾，對於油菜的菌核病和黃瓜的灰黴病亦有顯著的抑菌和誘導抗性效果^(22, 23)。此外，幾丁寡醣可以藉由啟動水楊酸與茉莉酸的訊息傳導路徑來誘導阿拉伯芥抵抗病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 的能力⁽²⁴⁾。

基於幾丁寡醣在防治真菌性及細菌性病害上的效果，或許對於草莓產業的新興病害—葉枯病和細菌性角斑病也能有防治效果。因此，本研究欲探討施用幾丁寡醣是否能有效提升香水品種草莓對抗葉枯病與細菌性角斑病之能力，並評估其應用於防治病害的最低有效濃度及效期。希望未來能將幾丁寡醣導入草莓田間栽培管理中，使農民有更多友善環境與人體健康的病害防治資材得以選擇。

材料與方法

供試植物及栽培條件

本研究使用的草莓品種為香水。栽培介質為泥炭土 (Jiffy Group, 荷蘭) 和根基旺 (丁蘭園藝, 臺灣) 以 9 : 1 比例混合均勻而成。草莓苗為組織培養苗，由行政院農業委員會種苗改良繁殖場或格園社會企業有限公司 (屏東, 臺灣) 提供，出瓶後種植於 25°C、光照 16 小時、黑暗 8 小時的恆溫生長箱中進行馴化，待其生長 5 週後，即可進行試驗。

草莓葉枯病菌之製備

草莓葉枯病菌 (*Neopestalotiopsis rosae* ML2411) 由行政院農業委員會苗栗區農業改良場生物防治分場鐘珮哲分場長提供。葉枯病菌先培養於 1/4 potato dextrose agar (PDA) 上，置於 25°C 光週期設為 16 小時光照、8 小時黑暗的培養箱培養 14 天後取出。於每皿 1/4 PDA 中加入 3 mL 無菌水，用三角玻棒刮破黑色柄子殼，收集孢子懸浮液後以滅菌過之 Miracloth (Merck Millipore, MA, USA) 過濾掉菌絲及其他雜質。以血球計數器計算孢子濃度並調整至後續實驗所需之濃度備用。另外，供試菌株保存係將收集的孢子懸浮液或是生長於 1/4 PDA 上的菌落邊緣新鮮菌絲塊切下，保存於含有 25% 甘油及 5% lactose 的無菌水中，置於 -80°C 冰箱內備用。

草莓細菌性角斑病菌之製備

草莓細菌性角斑病菌 (*Xanthomonas fragariae* B001) 由行政院農業委員會苗栗區農業改良場賴巧娟助理研究員提供，細菌性角斑病菌培養於蔗糖蛋白胰瓊脂固態培養基 (Sucrose peptone agar, SPA) 上，置於 22°C 培養箱中培養 5 天，待其菌落長出後用接種環將菌落刮下並移入無菌水中，將細菌懸浮液濃度調整為所需濃度 (OD₆₀₀ = 1 時，菌數約為 1x10⁹ CFU/mL) 後，保存於 30% 甘油中，置於 -80°C 冰箱內備用。

幾丁寡醣對草莓葉枯病菌孢子發芽抑制效果

幾丁寡醣購自誠麗實業股份有限公司，分子式為 C₅₆H₁₀₃N₉O₃₉ 的農工級純物質粉末 (純度為 100 %)，脫乙酰基 (Deacetylation) 程度為 87.3%，數均分子量 (Number-average molecular weight) 為 1,310 Dalton。幾丁寡醣可溶於水，使用前將其溶於無菌水中，配製成 2 g/mL 幾丁寡醣溶液，再以無菌水將幾丁寡醣稀釋至所需濃度進行後續各項測試。為了測試幾丁寡醣是否有抑制草莓葉枯病菌孢子發芽的能力，先將幾丁寡醣水溶液分別稀釋成 200 mg/L、2,000 mg/L、10,000 mg/L 以及 20,000 mg/L，各滴 5 μ L 在玻片上並以無菌水作為對照組。草莓葉枯病菌孢子懸浮液濃度調整至 1 x10⁵ spores/mL 後，取 5 μ L 與滴於玻片上各濃度之幾丁寡醣水溶液混合，使各處理組幾丁寡醣最終濃度為 100 mg/L、1,000 mg/L、5,000 mg/L 以及 10,000 mg/L，每處理三重複。將玻片置於 25°C 生長箱中，保持濕度與在黑暗下 24 小時後，於光學顯微鏡下觀察孢子發芽情形。每樣本均觀察 200 顆孢子，當發芽管長度大於孢子寬度時視為發芽孢子。此為一獨立試驗，每一試驗均進行三次獨立試驗。

幾丁寡醣對草莓葉枯病菌菌絲生長抑制效果

為了測試幾丁寡醣是否具有抑制草莓葉枯病菌菌絲生長的能力，先利用 PDA 培養基活化保存於 -80°C 中的草莓葉枯病

菌絲塊，於 25°C、黑暗下培養 14 天後，以直徑 0.75 cm 打洞器在菌落周圍的菌絲上打洞，將菌絲塊放置於含有 100 mg/L、1,000 mg/L、5,000 mg/L 以及 10,000 mg/L 等濃度幾丁寡醣的 PDA 培養基中央，置於 25°C 生長箱中黑暗培養，以不含幾丁寡醣之 PDA 作為對照組，每處理四重複。每兩天記錄一次菌落直徑，至第八天為止。此為一次獨立試驗，每個試驗均進行三次獨立試驗。

幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌抑制效果

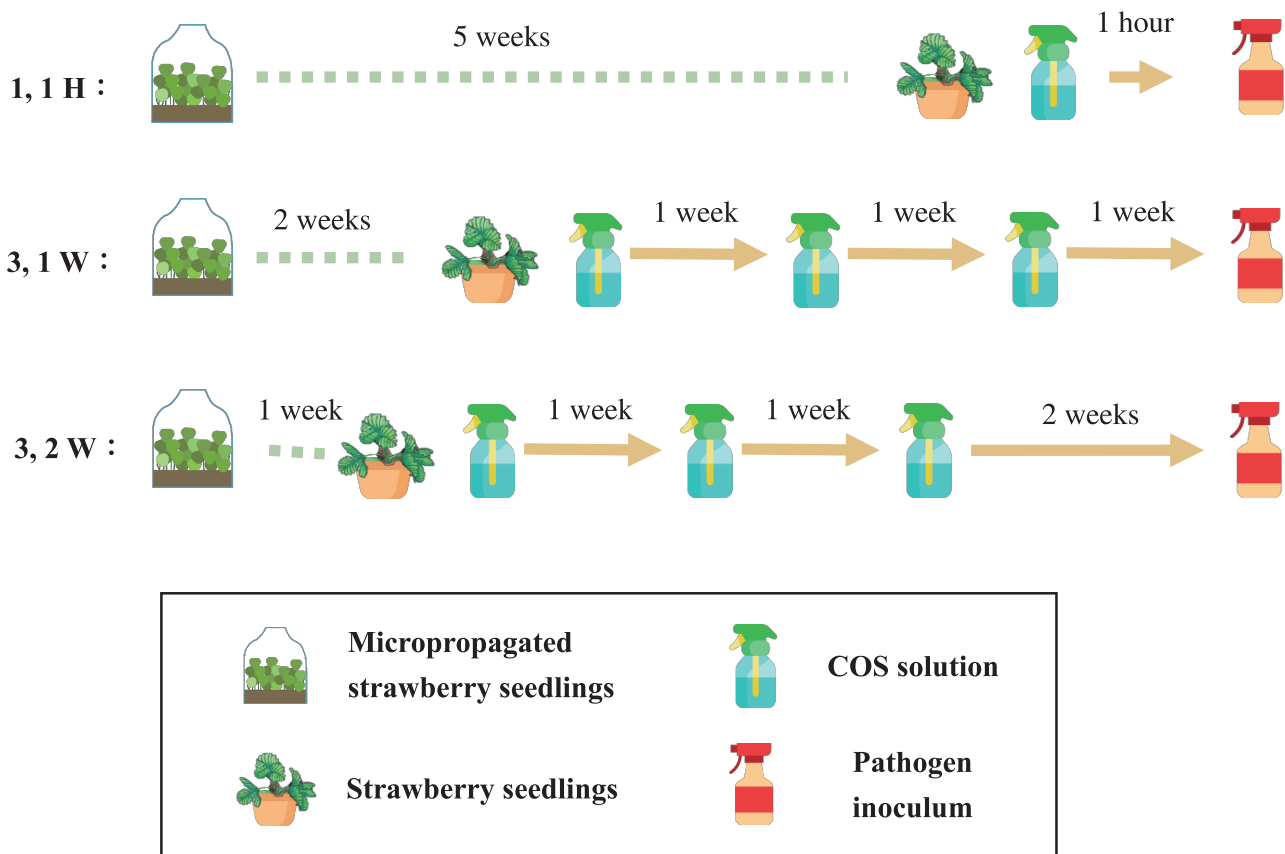
幾丁寡醣對細菌性角斑病菌生長影響的測試，則是將 2X 液態 Wilbrink's medium with nitrate (Wilbrink-N or WBN)⁽²⁵⁾ 分別與濃度為 200 mg/L、2,000 mg/L、10,000 mg/L 以及 20,000 mg/L 的幾丁寡醣水溶液以 1:1 混合，使處理組培養基中幾丁寡醣最後濃度為 100 mg/L、1,000 mg/L、5,000 mg/L 以及 10,000 mg/L，並以不含幾丁寡醣的 1X WBN 作為對照組。將隔夜培養於 WBN 培養基的細菌性角斑病菌以 1,200 xg 離心五分鐘收集菌體、以 WBN 培養基潤洗菌體後，調整成 OD₆₀₀ = 3 的細菌懸浮液。接著以 1:100 比例稀釋接種於上述含幾丁寡醣的 WBN

培養基中，放置於 22°C 黑暗生長箱中培養 24 小時 (以 200 rpm 震盪培養)。每處理十倍序列稀釋後，培養於 WBN agar 上，置於 22°C 生長箱中，於第五天記錄每處理菌數。每處理三重複，此為一獨立試驗，此試驗共重複三次。

幾丁寡醣於草莓葉枯病及細菌性角斑病之防治效果測試

以手壓式噴瓶用噴灑的方式將 100 mg/L、1,000 mg/L、5,000 mg/L 以及 10,000 mg/L 之幾丁寡醣水溶液均勻施用於草莓苗之葉表與葉背上，每株噴施約 10 mL 幾丁寡醣水溶液後，待其風乾，並以噴灑無菌水的植株作為對照組，每處理五株草莓植株。

幾丁寡醣對草莓病害防治效果測試之試驗設計如圖一所示。幾丁寡醣對草莓葉枯病及細菌性角斑病之預防效果測試以兩種試驗方式進行，分別為：一、於馴化五週大的植株上噴施一次幾丁寡醣，一小時後接種病原菌 (1, 1H)；二、於馴化兩週大的植株上連續三週，每週噴施幾丁寡醣一次，再間隔一週後接種病原菌 (3, 1W)。利用空氣壓力機以 20 psi 定壓噴灑的方式接種葉枯病菌 (孢子懸浮液濃度為 1×10^6 spores/mL) 或細



圖一、幾丁寡醣對草莓病害防治效果盆栽試驗設計示意圖。

Fig. 1. The schematic diagram of the experimental design for the pot assay on the effect of chitosan oligosaccharide (COS) on controlling strawberry diseases. Five-week-old micropropagated strawberry seedlings were pretreated with COS one hour (1, 1H), one week (3, 1W), and two weeks (3, 2W) before spray-inoculation of *N. rosae* or *X. fragariae*. Different concentrations (100, 1,000, 5,000, and 10,000 mg/L) of COS were sprayed once (1, 1H) or 3 times with 1-week intervals (3, 1W and 3, 2W) on the micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O, instead of COS solution, was used as a control (CK).

菌性角斑病菌 (細菌懸浮液濃度為 1×10^9 CFU/mL)，持續噴施至菌液由葉緣滴落。接種葉枯病菌過程中為了避免孢子懸浮液噴到根冠部，會將葉片夾在手指間，並以手掌遮擋，盡量避免菌液順著葉柄流至冠部。待其風乾後，將植株放入由透明收納箱製成的濕度箱 (moisture chamber) 中，在盒子底部貼上以無菌水潤濕的擦手紙，蓋上蓋子後，製造出高相對濕度的環境。將接種葉枯病菌或細菌性角斑病菌的植株分別置於 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 或 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 及光週期設為 16 小時光照、8 小時黑暗的植物生長箱中，於 14 天後記錄罹病指數。此為一獨立試驗，各試驗均重複三次獨立試驗。

為了評估幾丁寡醣預防草莓葉枯病的效期，則是於馴化一週大的植株上，每週噴施幾丁寡醣一次，連續三週再間隔兩週後接種病原菌 (3, 2W)，培養條件同上，以了解噴施幾丁寡醣兩週後是否還對草莓植株有保護效果。

病害嚴重度依植株葉部的病斑面積分級，每個病害均分為 6 級：無病徵為 0 級；輕微 (植株葉片病斑面積 $<10\%$) 為 1 級；輕度 (植株葉片病斑面積占 $10\text{--}25\%$) 為 2 級；中度病徵 (病斑面

積占 $26\text{--}50\%$) 為 3 級；重度病徵 (病斑面積占 $50\text{--}75\%$) 為 4 級；嚴重病徵 (病斑面積占 75% 以上、死亡植株) 為 5 級 (表一及表二)。記錄每株草莓植株中每片展開葉之罹病等級，再將其平均，為該植株之病害嚴重度級數，並配合以下公式計算該處理的罹病指數。




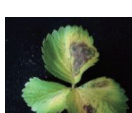
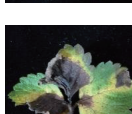
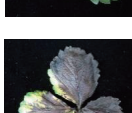
罹病指數 (Disease index, %) = 該處理病害嚴重度總和 / (最高級數 \times 總調查株數) $\times 100$ 。

統計分析

將以上試驗所得的數據資料於 Microsoft Excel 進行記錄與整理後，以 GraphPad Prism 8 軟體製圖。利用 SAS 9.4 檢定變方分析之前提，再進行單向變異數分析 (One-way Analysis of variance, ANOVA)。若分析結果顯示各組間具有差異，則以 Tukey's honestly significant difference (HSD) test 進行統計分析，檢驗各處理組間或與對照組間差異的顯著性。在結果呈現的柱狀圖中，會以 “*” 和 “**” 分別表示該處理組與對照組間







表一、馴化草莓組織培養苗之葉枯病害嚴重度分級表

TABLE 1. Symptoms of each severity scale in a 6-scale scoring system used for assessment of disease severity of leaf blight on the micropropagated strawberry seedlings.

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

表二、馴化草莓組織培養苗之細菌性角斑病害嚴重度分級表

TABLE 2. Symptoms of each severity scale in a 6-scale scoring system used for assessment of disease severity of bacterial angular leaf spot of the micropropagated strawberry seedlings.

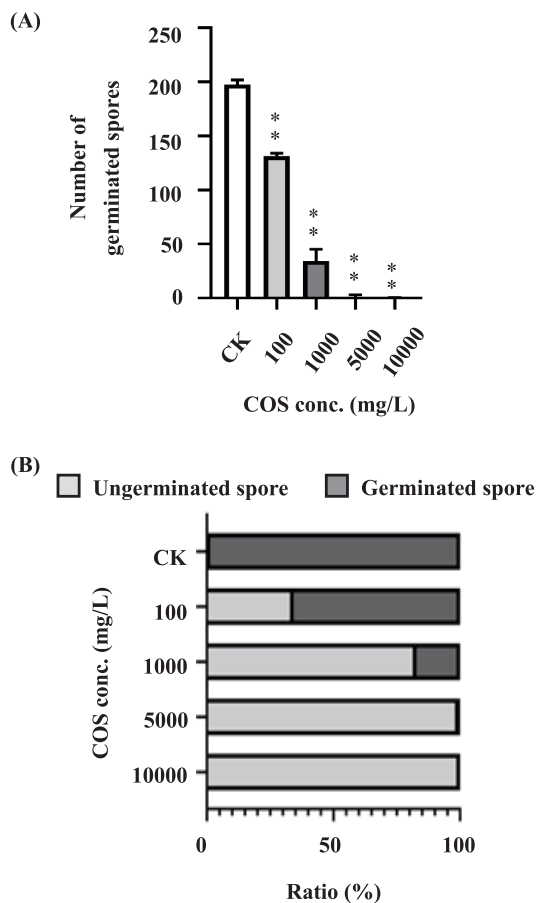
Scale	Symptom	Severity
	Bacterial angular leaf spot	% of lesion
0		Healthy
1		1~10% leaf area with lesions
2		11~25% leaf area with lesions
3		25~50% leaf area with lesions
4		50~75% leaf area with lesions
5		75~100% leaf area with lesions

有顯著 ($P < 0.05$) 和極顯著差異 ($P < 0.01$)，或是以不同英文字母表示各組間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

結果

幾丁寡醣對草莓葉枯病菌孢子發芽抑制效果

為了瞭解幾丁寡醣是否能應用於草莓葉枯病的防治上，首先進行不同濃度幾丁寡醣溶液對草莓葉枯病菌孢子發芽之抑制能力試驗。結果顯示，無論是使用 100、1,000、5,000 或 10,000 mg/L 幾丁寡醣溶液，處理組之發芽孢子數量皆低於未處理幾丁寡醣的對照組 (CK)，且有極顯著差異 ($P < 0.01$) [圖二 (A)]。對照組的孢子發芽率高達 98.8%，而隨著處理的幾丁



圖二、不同濃度幾丁寡醣對草莓葉枯病菌孢子發芽之影響。

Fig. 2. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on spore germination of *Neopestalotiopsis rosae* ML2411. The number (A) and the percentage (B) of germinated spores of *N. rosae* ML2411 in 200 randomly-picked spores after incubation with different concentrations of COS for 24 hours. Each data represent mean SD ($n=3$), and One-way ANOVA followed by Tukey's HSD test was performed for data analysis. "*" and "***" indicate significant difference between the treatment and CK groups at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

寡醣濃度越高，葉枯病菌的孢子發芽率越低，即處理 100、1,000、5,000 和 10,000 mg/L 幾丁寡醣後，孢子發芽率分別降為 65.7%、17.3%、0.58% 和 0.08% [圖二 (B)]。

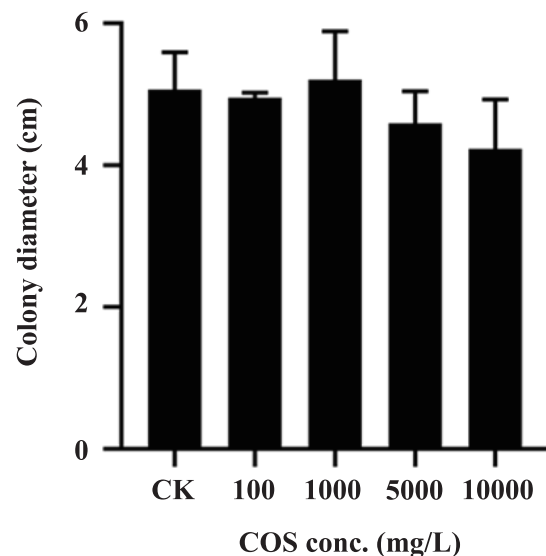
幾丁寡醣對草莓葉枯病菌菌絲生長抑制效果

接著，為了測試幾丁寡醣是否具有抑制草莓葉枯病菌菌絲生長的能力，將葉枯病菌培養於含有 100、1,000、5,000 或 10,000 mg/L 幾丁寡醣的 PDA 培養基上，每二天量測一次菌落直徑的結果，並未觀察到菌絲生長受抑制的情形。直至第八天，對照組與各處理組的菌落直徑間並沒有差異 (圖三)。

此兩種抑制能力試驗結果顯示，幾丁寡醣溶液具有抑制草莓葉枯病菌孢子發芽的能力，但卻無法抑制葉枯病菌菌絲生長。

幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌之抑菌試驗

同樣地，在實際進行幾丁寡醣施用對草莓細菌性角斑病的防治效果評估前，先對幾丁寡醣是否會影響草莓細菌性角斑病菌生長進行探討。以含有不同濃度幾丁寡醣的培養基培養細菌性角斑病菌 24 小時後，培養於含有濃度 2,000 mg/L 以上幾丁寡醣的 WBN 培養基中的菌數顯著較對照組低 (圖四)，顯示濃度高於 2,000 mg/L 的幾丁寡醣可以抑制細菌性角斑病菌之生長。



圖三、不同濃度幾丁寡醣對草莓葉枯病菌菌絲生長之影響。

Fig. 3. Effect of chitosan oligosaccharide at different concentrations on hyphal growth of *Neopestalotiopsis rosae* ML2411. The hyphal growth inhibition assay of COS was performed on potato dextrose agar (PDA) supplemented with different concentrations of COS. Colony diameters shown here were measured at day 8 post inoculation. Data represent mean \pm SD ($n=5$), and one-way ANOVA was carried out for data analysis.

幾丁寡醣防治草莓葉枯病之效果評估

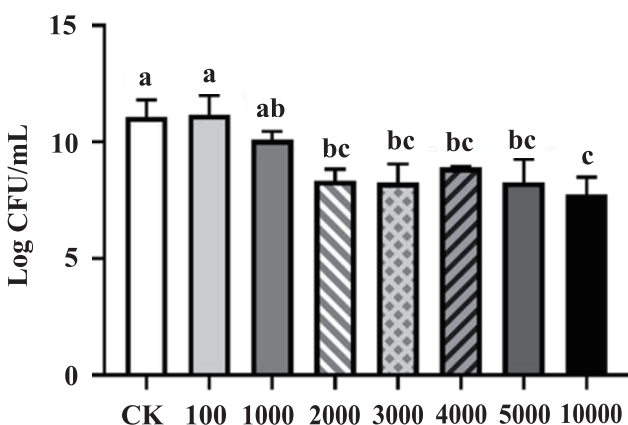
由上述結果得知，幾丁寡醣可有效抑制草莓葉枯病菌孢子發芽，卻無法抑制其菌絲生長，推測幾丁寡醣可能適用於預防葉枯病發生。為了測試此可能性，分別採用三種預處理幾丁寡醣的方式來評估幾丁寡醣預防葉枯病的效果。我們使用出瓶後馴化五週大的草莓組織培養苗進行病原菌接種試驗，分別於接種葉枯病菌一小時前施用一次幾丁寡醣（“1, 1H”試驗組），或是於接種病原菌一週前（“3, 1W”試驗組）及兩週前（“3, 2W”試驗組），每週施用一次幾丁寡醣溶液，共施用三次的方式，觀察各試驗組中草莓植株葉枯病的發病嚴重度。

1. 接種葉枯病菌一小時前施用一次幾丁寡醣（“1, 1H”試驗組）

與未施用幾丁寡醣的對照組相比，處理 5,000 與 10,000 mg/L 幾丁寡醣植株之病害嚴重度有顯著 ($P < 0.05$) 及極顯著 ($P < 0.01$) 差異；從病徵明顯較對照組輕微的結果來看，於接種葉枯病菌一小時前施用高濃度幾丁寡醣確實能降低草莓葉枯病之發病情形。對照組的罹病指數為 93.5%，而處理 100、1,000、5,000 和 10,000 mg/L 幾丁寡醣的植株，三次獨立試驗的罹病指數平均值分別是 91.0%、77.1%、52.6% 和 38.1%。與對照組相比，施用 5,000 和 10,000 mg/L 幾丁寡醣後，可以分別減少 40.9% 與 55.4% 的罹病指數 [圖五 (A)]。

2. 連噴三次幾丁寡醣，隔一週接種（“3, 1W”試驗組）

接下來模擬保護性藥劑於病害發生前每週噴施一次的施



圖四、不同濃度幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病菌生長之影響。

Fig. 4. Effect of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on bacterial growth of *Xanthomonas fragariae* B001. Cells of the overnight cultures of *X. fragariae* B001 were collected, washed with ddH₂O and adjusted to OD₆₀₀=3, which was then subcultured in WNB containing different concentrations (100, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, and 10,000 mg/L) of COS at a 1:100 ratio. Bacterial numbers were counted 5 days after growing at 22°C, shaking, in the dark. Each data represent mean±SD (n=3), and One-way ANOVA followed by Tukey's HSD test was performed for data analysis. Bars with different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

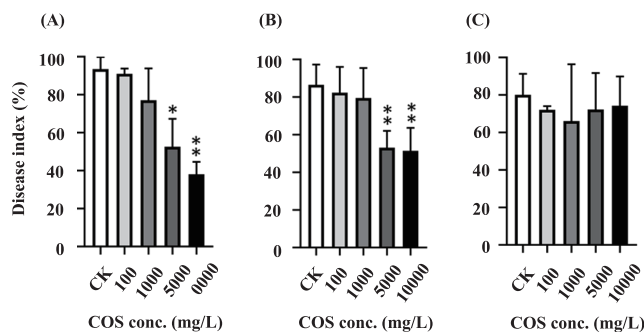
用方式，來評估幾丁寡醣對預防草莓葉枯病的效果。結果顯示，與對照組相比，幾丁寡醣施用濃度為 5,000 與 10,000 mg/L 時，罹病指數有極顯著差異 ($P < 0.01$)。處理 100、1,000、5,000 和 10,000 mg/L 幾丁寡醣的植株，其草莓葉枯病的罹病指數三次獨立試驗平均值分別是 82.4%、79.6%、53.1% 和 51.5%，而對照組為 86.5%。其中，施用 5,000 與 10,000 mg/L 幾丁寡醣的處理組與對照組的罹病指數相比，分別減少了 33.4% 與 35.0% [圖五 (B)]。

3. 連噴三次幾丁寡醣，隔兩週接種（“3, 2W”試驗組）

由圖五 (A) 和 (B) 的結果可知，施用 5,000 和 10,000 mg/L 幾丁寡醣可降低草莓葉枯病的罹病指數，且效期至少有一週。為了瞭解幾丁寡醣的保護效期是否能夠更長，以於未來得以降低施用頻率，我們在連續施用三次幾丁寡醣兩週後才接種葉枯病菌。從圖五 (C) 可見，任一處理組之罹病指數與對照組相比皆無顯著差異，顯示施用幾丁寡醣兩週後就會失去對草莓葉枯病的保護效果。

綜合上述結果得知，幾丁寡醣可用來預防草莓葉枯病的發生，濃度以 5,000 mg/L 和 10,000 mg/L 為佳，此二濃度於施用一小時後便有保護效果。連續三週，每週噴施一次的情況下，於一週後，防治草莓葉枯病的效用仍在；然而，經過兩週後，則無法看到保護效果。

幾丁寡醣防治草莓細菌性角斑病之效果評估



圖五、草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓葉枯病抗性之影響。

Fig. 5. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Neopestalotiopsis rosae* ML2411 using micropropagated strawberry seedlings. Disease severity caused by *N. rosae* ML2411 on 5-week-old strawberry plants pretreated with COS one hour (A), one week (B), and two weeks (C) before spray inoculation of *N. rosae* ML2411. Different concentrations (100, 1,000, 5,000, and 10,000 mg/L) of COS were sprayed once (A) or 3 times with 1-week intervals (B and C) on micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as a control (CK). Each data represent mean±SD (n=5), and One-way ANOVA followed by Tukey's HSD test was performed for data analysis. "*" and "**" indicate significant difference between the treatment and CK groups at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

先前研究顯示幾丁寡醣可以透過誘導植物防禦反應以對抗細菌性病害(24)，加上培養基試驗顯示幾丁寡醣可抑制細菌性角斑病菌之生長，因此接下來便將幾丁寡醣施用於草莓植株上，測試幾丁寡醣是否對細菌性角斑病有防治效果。與防治草莓葉枯病之試驗方式相同，分別採用接種細菌性角斑病菌一小時前施用一次幾丁寡醣（“1, 1H” 試驗組），以及於馴化兩週的組織培養苗上連續三週每週施用一次幾丁寡醣，一週後接種病原菌（“3, 1W” 試驗組）等兩種方式進行評估。

1. 接種細菌性角斑病菌一小時前施用一次幾丁寡醣（“1, 1H” 試驗組）

將不同濃度的幾丁寡醣施用於馴化五週的草莓組織培養苗，隔一小時後接種 1×10^9 CFU/mL 細菌性角斑病菌 *X. fragariae* B001。結果顯示，對照組與各處理組的罹病指數在統計上均無顯著差異 [圖六 (A)]。

2. 連噴三次幾丁寡醣，隔一週後接種細菌性角斑病菌（“3, 1W” 試驗組）

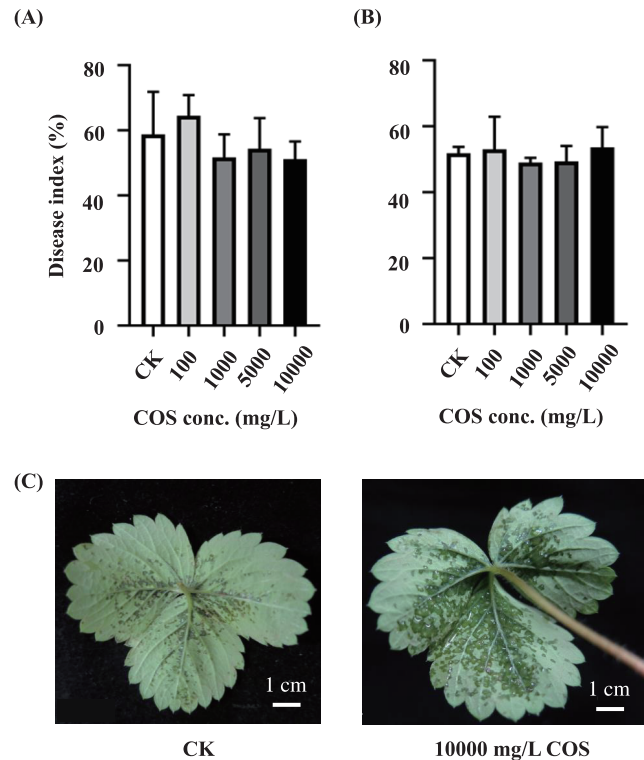
接下來採用每週噴施一次，連續施用三週不同濃度的幾丁寡醣後，隔一週接種病原菌的方式。由罹病指數來看，對照組與各處理組間亦無顯著差異 [圖六 (B)]。

綜合以上結果得知，施用幾丁寡醣對於草莓細菌性角斑病並無防治效果。此外，試驗過程中發現，以 10,000 mg/L 幾丁寡醣溶液連續施用三週，一週後再接種細菌性角斑病菌的植株，於接種後兩週，其葉背除了與對照組相同有明顯透化病斑之外，病斑處可觀察到大量乳白色黏稠菌液湧出 [圖六 (C)]。

討 論

幾丁質和其衍生物，包括幾丁聚醣和幾丁寡醣，可作為病原相關分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 誘導植物產生抗性以減輕病害發生^(26, 27)；此外，幾丁寡醣亦具有直接抑菌的功效⁽²⁸⁻³⁰⁾。據此，本研究推論幾丁寡醣誘導植物產生抗性或是直接抑制病原菌的特性，可能可以用來防治草莓新興病害。結果顯示，幾丁寡醣可以抑制葉枯病菌的孢子發芽與細菌性角斑病菌的生長，但無法抑制葉枯病菌的菌絲生長。盆栽試驗結果發現，預先施用幾丁寡醣可以降低草莓葉枯病之發病嚴重度，但對細菌性角斑病沒有防治效果。

幾丁寡醣是透過 β -(1 \rightarrow 4) 鍵結將 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose (GlcNAc) 和 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose (GlcN) 連結在一起的短鏈、帶正電荷的聚合物，與幾丁聚醣主要是聚合度不同，但常被放在一起討論其抑菌活性與作用機制。幾丁聚醣和幾丁寡醣可能是透過其多價陽離子 (polycationic) 的特性，與帶負電的細胞膜結合而改變其通透性或破壞內膜系統，亦或是藉由螯合離子等機制來抑制細菌



圖六、草莓組織培養苗預施用不同濃度幾丁寡醣對草莓細菌性角斑病抗性之影響。

Fig. 6. Effect of pretreatment of chitosan oligosaccharide (COS) at different concentrations on strawberry resistance against *Xanthomonas fragariae* B001 using micropropagated strawberry seedlings. Disease severity caused by *X. fragariae* B001 on 5-week-old strawberry plants pretreated with COS one hour (A) and one week (B) before spray inoculation of *X. fragariae* B001. Different concentrations (100, 1,000, 5,000, and 10,000 mg/L) of COS were sprayed once (A) or 3 times with 1-week intervals (B) on micropropagated strawberry seedlings. ddH₂O was used as a control (CK). Data represent mean SD (n=5), and One-way ANOVA was carried out for data analysis. (C) Symptoms of strawberry leaves pretreated with 10,000 mg/L chitosan oligosaccharide (COS) three times fourteen days after inoculation of *Xanthomonas fragariae* B001.

或真菌生長⁽³¹⁻³³⁾；因此，幾丁聚醣和幾丁寡醣的分子量、去乙酰化程度及作用環境的 pH 值等會影響此特性的因子，均會影響其抗菌活性^(34, 35)。本研究發現，隨幾丁寡醣濃度提高，葉枯病菌的孢子發芽率雖明顯下降，但菌絲生長並不受影響，此與 Palma-Guerrero 等人 (2008) 的研究結果相似。此研究中發現幾丁聚醣對不同真菌孢子發芽和菌絲生長的影響，與各真菌分解幾丁聚醣的能力有關，因而推測影響真菌對幾丁聚醣的敏感度高低可能是因為 chitinase 或相關酵素活性的差異所致，若有更高的 chitinase 活性，則對幾丁聚醣的抑制越不敏感。此外，他們也觀察到約 70 kDa 大小的幾丁聚醣可以在 15 分鐘內進入 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* 及 *Pochonia chlamydosporia* 的孢子中⁽³⁶⁾。本研究中觀察到葉枯病

菌孢子對幾丁寡醣敏感度較菌絲高，是否是因幾丁寡醣的分子量較小，更容易進入孢子中作用，還是因為菌絲有較孢子更高的 chitinase 活性，都有待後續探討。未來可以利用螢光標定的幾丁寡醣來觀察其進入葉枯病菌孢子和菌絲的情形與作用位點，以及測定葉枯病菌孢子及菌絲的 chitinase 活性，來深入了解幾丁寡醣抑制葉枯病菌生長的作用機制。

相較於抑制真菌孢子發芽效果顯著，幾丁聚醣對細菌的抗菌作用通常較不敏感⁽³¹⁾。本研究結果也有類似的情形，在以培養基測試不同濃度幾丁寡醣對細菌性角斑病菌生長抑制的活性試驗中，雖然也觀察到其對細菌性角斑病菌生長的抑制作用，然而濃度 2,000 mg/L 以上的幾丁寡醣之抑制效果卻未隨著幾丁寡醣濃度增加而提高。幾丁聚醣和幾丁寡醣抑制細菌生長的機制尚未釐清，但目標微生物種類和生長期，以及幾丁聚醣或寡醣的物化特性等因子，均會影響其抑菌效果。例如 No 等人 (2002) 的研究指出，幾丁聚醣抑制細菌的效果比幾丁寡醣強，尤其是對革蘭氏陽性菌效果更明顯；幾丁寡醣的效果雖較差，但抑制革蘭氏陰性菌的效果會隨分子量降低而增加，而此現象在革蘭氏陽性菌上則未看到⁽³⁷⁾。然而 Zhong 等人 (2008) 的研究持不同的結果，即幾丁聚醣對革蘭氏陰性菌的抑菌效果較革蘭氏陽性菌強。由以上結果得知，藉由調整幾丁寡醣分子量、作用時的 pH 值 (會影響幾丁寡醣帶正電荷情形)，或者是細菌性角斑病菌的生長期，可能得以找出抑制效果更好的條件⁽³⁸⁾。

由於幾丁寡醣可以抑制葉枯病菌孢子的發芽，但無法抑制其菌絲生長，推測幾丁寡醣在農業上較適合作為預防病害的保護劑施用，而結果顯示預施用 5,000 mg/L 和 10,000 mg/L 幾丁寡醣三次確實可有效降低葉枯病的發病嚴重度。幾丁聚醣可以誘導作物產生細胞壁增強分子 (如木栓質素，黑色素和木質素)，進而形成物理屏障⁽³⁹⁾，因此多次施用幾丁寡醣除了可能因此產生保護屏障，亦可能因為幾丁寡醣附著於葉面的直接抑菌效果，降低病原菌侵入的機會。許多研究也都發現在接種病原菌前預先施用幾丁寡醣，可以預防病害嚴重發生⁽²⁰⁻²⁴⁾。

本研究中發現，幾丁寡醣施用濃度為 100 mg/L 時，葉枯病菌孢子發芽抑制率為 35 %，此較多數前人研究所使用的濃度低。例如 Yang 等人 (2010) 使用 500 mg/Kg 幾丁寡醣 (聚合度 DP_n=20) 時，才可觀察到約 20 % *Monilinia fructicola* 的孢子發芽受到抑制的情形⁽⁴⁰⁾；而 100 mg/L DP_n=37 之幾丁寡醣於酸性環境下 (pH=5.2~5.3) 對 *Botrytis cinerea*、*Alternaria brassicicola* 和 *Mucor piriformis* 孢子發芽的抑制率分別約為 5 %、7 % 和 55%⁽²⁹⁾。然而在進行病害防治效果評估時，前人研究施用的幾丁寡醣濃度則較本研究所使用的 5,000 mg/L 低。例如 Sun 等人 (2018) 施用 400 mg/L 幾丁寡醣三天後於番茄植株上接種灰黴病菌菌絲塊 (直徑 0.5 cm)，壞疽病斑大小可降低 13.79 %⁽⁴¹⁾；Ma 等人 (2019) 噴施 100 mg/L 幾丁寡醣於二葉齡水稻植株上，2 天後將根部以浸泡法接種 *Fusarium oxysporum*，七天後控制組已 100 % 發病 (嚴重度約 80%)，但幾丁寡醣處理組發病率

僅 50 % 左右 (嚴重度約 25%)⁽²⁰⁾。值得注意的是，這些研究均是在處理幾丁寡醣後較短時間內即接種病原菌。本研究也觀察到若施用幾丁寡醣後一小時馬上接種葉枯病菌，1,000 mg/L 幾丁寡醣有些許防治效果，然而我們希望能參照農民常用的施藥頻率且搭配在下次施藥前，病原菌最晚可能接觸到植物的時間 (第七天) 來進行試驗，因此另外選擇了每週噴施植株地上部一次，連續施用三週後，再隔一週才進行接種。結果此施用條件下反而需要噴施 5,000 mg/L 幾丁寡醣才能看到顯著降低葉枯病發生嚴重度。幾丁寡醣除了可以直接抑制病原菌生長之外，也可透過誘導植物產生抗性反應來降低病害發^(42, 43)，因此推測施用幾丁寡醣一週後，被誘導的抗性基因表現量逐漸降低，因此本研究僅能在施用較高濃度 (>5,000 mg/L) 幾丁寡醣時還能看到抗病的效果。未來可嘗試施用 1,000~5,000 mg/L 區間不同濃度的幾丁寡醣，並搭配不同施用間隔期，應可找到一個施用濃度較低但仍能具有防治效果的條件。

Khairy 等人 (2022) 的研究結果發現，100 及 200 µg/mL 的奈米幾丁聚醣酸性水溶液在拮抗試驗中可以有效抑制青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 的生長，電子顯微鏡下也觀察到經過處理的菌體破裂且奈米顆粒聚集於細胞表面；以葉部噴灑或澆灌根部時，無論是預防或治療馬鈴薯和番茄青枯病，均能有效降低 50% 以上的罹病指數或病害嚴重度⁽⁴⁴⁾。Siriwong 等人 (2021) 針對泰國 Green Innovative Biotechnology Co., Ltd 產品 BIG[®] (有效成分為幾丁寡醣) 防治水稻白葉枯病的效果進行評估，從 BIG[®] 處理的水稻葉肉細胞中半纖維素、纖維素、果膠及木質素的含量提高，推測幾丁寡醣可能是透過誘導抗性增加細胞壁強度而使病原菌造成的破壞降低⁽⁴⁵⁾。然而在本研究中草莓細菌性角斑病的防治試驗中，結果卻不如預期，所有測試的幾丁寡醣濃度均對細菌性角斑病菌的防治沒有明顯效果。從 10,000 mg/L 幾丁寡醣連三週施用後再接種細菌性角斑病菌的植株，於接種後兩週病斑湧出大量菌液 [圖六 (C)] 的現象推測，高濃度幾丁寡醣可能是因對植株造成藥害 (圖七)，使細菌更容易從傷口進入，反而造成病害更加嚴重，但較低濃度幾丁寡醣的施用是否也因造成傷口而導致效果不彰，還是因為幾丁寡醣誘導的抗性反應不足以抵抗細菌性角斑病菌的攻擊，仍須進一步地研究才得以了解。此外，本研究之草莓植株放置於生長箱中，即便施用四次 5,000 mg/L 幾丁寡醣均未見藥害情形，然而在田間光照強度較高且溫度變動大的情況下，是否會有藥害問題，也需另行評估。

本研究中購自誠麗實業股份有限公司的幾丁寡醣粉末 1 公斤約新台幣 2,600 元，若以每分地種植 5,000 株草莓，每株約需 10 mL 5,000 mg/L 幾丁寡醣溶液來計算，一分地草莓園每週施用成本約為新台幣 650 元。而根據草莓臺灣良好農業規範，以施用稀釋 3,000 倍待克利 (例如：先正達的「炭剋」) 作為緊急防治用藥防治葉枯病時，每分地藥劑約需新台幣 140 元。雖然待克利的價格比幾丁寡醣低廉許多，但幾丁寡醣可用於有機



10000 mg/L COS

圖七、馴化草莓組織培養苗多次施用高濃度幾丁寡醣後出現之焦枯病徵。

Fig. 7. Scorch-like symptoms on leaves of the micropropagated strawberry seedlings pretreated with 10,000 mg/L chitosan oligosaccharide (COS) once a week for three times. This photograph was taken 7 days after the last application of COS.

驗證與友善環境耕作，亦可結合害物整合管理 (Integrated pest management, IPM) 策略與化學藥劑交錯使用，或用於避免使用化學藥劑的連續採收期等，因此仍有其發展潛力。目前幾丁寡醣的生產量低，未來或許可透過擴大產線，並嘗試降低噴施濃度或頻率，也有機會能減少施用成本。

綜言之，以目前普遍栽種的草莓品種香水而言，施用幾丁寡醣可以預防對其危害嚴重的新興病害—葉枯病，且在考量效果、效期以及成本等因素，建議在葉枯病好發季節可以每週預先施用濃度約為 5,000 mg/L 的幾丁寡醣水溶液作為保護劑。然而，由於幾丁寡醣對另一新興病害—細菌性角斑病的防治效果不明顯，且噴施濃度過高時甚至會因藥害使病情更嚴重，因此若同時有葉枯病和細菌性角斑病複合感染的田區，則應謹慎施用幾丁寡醣，以免適得其反。若保護成效卓著，應可減少化學藥劑的施用，降低病原菌抗藥性產生與農藥殘留問題。

引用文獻

1. Wu, D. R. 2018. Overviews and marketing opportunities of the strawberry nursing industry. *Farmer's Friend Monthly* 69: 22-25. (in Chinese)
2. Wu, D. R. 2021. Strawberry Cultivars and 'Miaoli No. 1' in Taiwan. In D. Wu, S.-C. Chu & H. Y. Lu (Eds.) 2021 *Proceedings of Research Achievements and Industrial Applications of Strawberry* (pp. 114-117). (in Chinese)
3. Chung, P. C., and Wu, H. Y. 2020. Disease management strategies during the strawberry nursing period. *Miaoli Dist. Agric. Spec. Bull.* 89: 9-11. (in Chinese)
4. Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., and Chung, P. C. 2021. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Dis.* 105:487.
5. Hsu, C. F., Cheng, T. W., Chen, K. H., Lien, Y. T., Lin, C. K., Huang, C. C., Xia, K., and Wang, H. L. 2020. Studies of a new disease on strawberry caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Taiwan. *J. Plant Med.* 62:39-48. (in Chinese)
6. Wu, H. Y., Lai, Q. J., Wu, Y. M., Chung, C. L., Chung, P. C., and Lin N. C. 2021. First report of *Xanthomonas fragariae* causing angular leaf spot on strawberry (*Fragaria × ananassa*) in Taiwan. *Plant Dis.* 105:1187.
7. van der Wolf, J. M., Evenhuis, A., Kastelein, P., Krijger, M. C., Funke, V. Z., van den Berg, W., and Moene, A. F. 2018. Risks for infection of strawberry plants with an aerosolized inoculum of *Xanthomonas fragariae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 152:711-722.
8. Hawkins, N. J., Bass, C. Dixon, A., and Neve, P. 2019. The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biol. Rev.* 94:135-155.
9. Kim, K.-H., Kabir, E., and Jahan, S. A. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575:525-535.
10. Muzzarelli, R. A. A. 1977. Chitin. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
11. Khoushab, F., and Yamabhai, M. 2010. Chitin research revisited. *Mar. Drugs*, 8:1988-2012.
12. Kim, S. K., and Rajapakse, N. 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. *Carbohydr. Polym.* 62:357-368.
13. Jung, W. J., and Park, R. D. 2014. Bioproduction of chitoooligosaccharides: present and perspectives. *Mar. Drugs* 12:5328-5356.
14. Naveed, M., Phil, L., Sohail, M., Hasnat, M., Baig, M., Ihsan, A. U., Shumzaid, M., Kakar, M. U., Khan, T. M., Akabar, M., Hussain, M. I., and Zhou, Q. G. 2019. Chitosan oligosaccharide (COS): an overview. *Int. J. Biol. Macromol.* 129:827-843.
15. Guo, X., Sun, T., Zhong, R., Ma, L., You, C., Tian, M., and Wang, C. W. 2018. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components. *Front. Pharmacol.* 9:1-10.
16. Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., and Kumar, N. S. 2020. Chitosan as an environment friendly biomaterial - a review on recent modifications and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 150:1072-1083.
17. Bautista-Banos, S., Hernandez-Lopez, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on

- growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Prot.* 22:1087-1092.
18. Zhu, X., Wang, Q. M., Cao, J. K., and Jiang, W. B. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *Food Process. Preserv.* 32:770-784.
 19. Zhou, Y. H., Zhang, L., and Zeng, K. F. 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biol. Control* 96:39-47.
 20. Ma, B., Wang, J. H., Liu, C. Z., Hu, J. F., Tan, K. F., Zhao, F. Y., Yuan, M., Zhang J. H., and Gai, Z. J. 2019. Preventive effects of fluoro-substituted benzothiadiazole derivatives and chitosan oligosaccharide against the rice seedling blight induced by *Fusarium oxysporum*. *Plants* 8:1-18.
 21. Yang, A. M., Yu, L., Chen, Z., Zhang, S. X., Shi, J., Zhao, X. Z., Yang, Y. Y., Hu, D. Y., and Song, B. A. 2017. Label-free quantitative proteomic analysis of chitosan oligosaccharide-treated rice infected with southern rice black-streaked dwarf virus. *Viruses* 9:1-16.
 22. Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., and Fallik, E. 2003. Controlling gray mold caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protect.* 22:285-290.
 23. Yin, H., Li, Y., Zhang, H. Y., Wang, W. X., Lu, H., Grevsen, K., Zhao, X., and Du, Y. G. 2013. Chitosan oligosaccharides-triggered innate immunity contributes to oilseed rape resistance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Int. J. Plant Sci.* 174:722-732.
 24. Jia, X. C., Zeng, H. H., Wang, W. X., Zhang, F. Y., and Yin, H. 2018. Chitosan oligosaccharide induces resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis thaliana* by activating both salicylic acid- and jasmonic acid-mediated pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31:1271-1279.
 25. Koike H. 1965. The aluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* 55:317-319.
 26. Sharp, R. G. 2013. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy* 3:757-793.
 27. De Tender, C., Vandecasteele, B., Verstraeten, B., Ommeslag, S., De Meyer, T., De Visscher, J., Dawyndt, P., Clement, L., Kyndt, T., and Debode, J. 2021. Chitin in strawberry cultivation: foliar growth and defense response promotion, but reduced fruit yield and disease resistance by nutrient imbalances. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 34:227-239.
 28. Alburquenque, C., Bucarey, S.A., Neira-Carrillo, A., Urzúa, B., Hermosilla, G., and Tapia, C.V. 2010. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Med. Mycol.* 48:1018-1023.
 29. Rahman, M.H., Hjeljord, L.G., Aam, B.B., Sørli, M., and Tronsmo, A. 2015. Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *Eur. J. Plant Pathol.* 141:147-158.
 30. Goya, R. C., Moraisb, S. T. B., and Assis, O. B. G. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev. Bras. Farmacogn.* 26:122-127.
 31. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., and Park, H. J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144:51-63.
 32. Liu, H., Du, Y., Wang, X., and Sun, L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.* 95:147-155.
 33. Xu, J. Zhao, X., Han, X., and Du, Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 87:220-228.
 34. Ganan, M., Lorentzen, S. B., Agger, J. W., Heyward, C. A., Bakke, O., Knutsen, S. H., Aam, B. B., Eijsink, V. G. H., Gaustad, P., and Sørli, M. 2019. Antifungal activity of well-defined chito-oligosaccharide preparations against medically relevant yeasts. *PLoS One* 14:e0210208.
 35. Mellegard, H., Strand, S. P., Christensen, B. E., Granum, P. E., Hardy, S. P. 2011. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. *Int. J. Food Microbiol.* 148:48-54.
 36. Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J., and Lopez-Llorca, L. V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J. Appl. Microbiol.* 104:541-553.
 37. No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., and Meyers, S. P. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74:65-72.
 38. Zhong, Z. M., Xing, R. G., Liu, S., Wang, L., Cai, S. B., Li, P. C. 2008. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities *in vitro*. *Carbohydr. Res* 343:566-570.
 39. Kumaraswamy, R.V., Kumaria, S., Choudharya, R. C. Palb, A., Raliyac, R., Biswasc, P., and Saharan, V. 2018. Engineered chitosan based nanomaterials: bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. *Int. J. Biol. Macromol.* 113:494-506.
 40. Yang, L., Zhao, P., Wang, L., Filippus, I., and Meng, X. 2010. Synergistic effect of oligochitosan and silicon on inhibition of *Monilinia fructicola* infections. *J. Sci. Food Agric.* 90:630-634.

41. Sun, G., Yang, Q., Zhang, A., Guo, J., Liu, X., Wang, Y., and Ma, Q. 2018. Synergistic effect of the combined bio-fungicides ϵ -poly-l-lysine and chitooligosaccharide in controlling grey mould (*Botrytis cinerea*) in tomatoes. *Int. J. Food Microbiol.* 276:46-53.
42. Pusztahelyi, T. 2018. Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions. *Mycology* 9:189-201.
43. Qiu, D., Dong, Y., Zhang, Y., Li, S. and Shi, F. 2017. Plant immunity inducer development and application. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30:355-360.
44. Khairy, A. M., Tohamy, M. R. A., Zayed, M. A., Mahmoud, S. F., El-Tahan, A. M., El-Saadony, M. T., and Mesiha, P. K. 2022. Eco-friendly application of nano-chitosan for controlling potato and tomato bacterial wilt. *Saudi J. Biol. Sci.* 29: 2199-2209.
45. Siritwong, S., Thepbandit, W., Hoang, N.H., Papatthoti, N.K., Teeranitayatar, K., Saardng, T., Thumanu, K., Bhavaniramya, S., Baskaralingam, V., Le Thanh, T., Phansak, P., and Buensanteai, N. 2021. Identification of a chitooligosaccharide mechanism against bacterial leaf blight on rice by *in vitro* and *in silico* studies. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 7990.

ABSTRACT

Hsiao-Chun Lo and Nai-Chun Lin*. 2023. Assessment of chitosan oligosaccharide efficacy on control of leaf blight and angular leaf spot diseases of strawberry. *J. Plant Med.* 65(2): 53-64.

*Corresponding author, E-mail: nlin@ntu.edu.tw

Strawberry is an important cash crop in Taiwan. Recently, the alternation of cultivars has resulted in the emergence of two diseases, leaf blight and bacterial angular leaf spot of strawberry. Xiang-Shui, the most cultivated variety in Taiwan, is highly susceptible to leaf blight, which results in enormous economic loss for farmers and aggravates the disease problem in the strawberry industry. Searching for natural products for disease control applicable to the strawberry industry in Taiwan, we assessed the efficacy of chitosan oligosaccharide (COS) in controlling these two diseases. The antimicrobial activity of COS on *Neopestalotiopsis rosae* and *Xanthomonas fragariae* and its control efficacy were thus evaluated. The results showed that COS could inhibit spore germination of *N. rosae* ML2411 but not the growth of *X. fragariae* B001. Weekly application of 5,000 mg/L COS onto strawberry plants resulted in a better control effect on reducing the severity of leaf blight disease. However, it is ineffective in controlling bacterial angular leaf spot

disease. Weekly, but not biweekly, application of COS could control *Neopestalotiopsis* leaf blight of strawberry. This study provides data on the potential of COS application for the control of strawberry leaf blight and the appropriate application frequency and concentration. We hope that COS can be introduced into the integrated pest management (IPM) program for strawberries in the future to reduce the amount and frequency of chemical applications.

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

