

Acibenzolar-S-methyl 防治柑橘潰瘍病之效果 及其誘導抗病機制之探討

林靜宜^{1,*} 林慧如²

摘要

林靜宜、林慧如。2022。Acibenzolar-S-methyl 防治柑橘潰瘍病之效果及其誘導抗病機制之探討。台灣農業研究 71(4):309–319。

由 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 所引起的柑橘潰瘍病為目前世界柑橘生產栽培最具經濟重要性的細菌性病害，銅劑為當前廣泛應用於防治柑桔潰瘍病之藥劑，但過度或長期使用容易誘發病原菌產生抗銅性。本研究調查雲林及嘉義地區之柑橘潰瘍病菌株對銅劑的感受性，於篩選之菌株中發現 2 株抗銅菌株及 46 株耐銅菌株。由於抗銅菌株可導致銅劑防治失效，有鑑於此，開發其他可施用並符合永續農業理念之防治方法有其必要性。本研究利用 acibenzolar-S-methyl (ASM)、4-4 式波爾多液 (Bor) 及兩者同時配合使用 (ASM + Bor)，於溫室條件下進行對柑橘潰瘍病之防治效果評估。種植於盆栽之檸檬幼苗每株分別以土壤澆灌 5 mg a.i. ASM、葉面施用 4-4 式波爾多液或兩者配合同時施用，於處理後 3 d 進行柑橘潰瘍病菌接種。結果顯示 3 種處理之罹病度分別為 19.14%、15.0% 及 15.4%，與無處理之對照組 (39.96%) 具有顯著差異。進一步分析抗病相關酵素活性，結果發現單獨以 ASM 處理之植株，其過氧化物酶 (peroxidase; POD) 及過氧化氫酶 (catalase; CAT) 之活性明顯增加。由以上結果可知，ASM 可有效降低植株對潰瘍病之罹病度，能藉由提高 POD 與 CAT 活性以誘導檸檬植株產生抗性而達到防治效果。

關鍵詞：阿拉酸式苯 -S- 甲基、柑橘、潰瘍病。

前言

柑橘為芸香科 (Rutaceae) 多年生果樹，栽培種類繁多，是世界上產量最大的果樹產業，亦是台灣重要的經濟果樹之一，根據 2020 年行政院農業委員會 (農委會) 資料統計 (<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>)，台灣栽種面積超過 25,000 ha，年產量超過 52 萬公噸，以椪柑、柳橙、文旦柚、桶柑及檸檬等為常見的栽培品種，其中椪柑、柳橙的栽培面積最大，皆超過 5,000 ha。影響柑橘生產之病蟲害種類繁多，台灣有紀錄的柑橘病害即達百餘種 (Tzeng 2019)，其中由 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 引起之柑橘潰瘍病

(citrus canker) 為限制柑橘栽培生產的重要細菌性病害，植株的葉片、果實及枝條皆可受病原菌感染，形成褐色木栓化之病斑，除了造成柑橘落葉、落果導致嚴重減產與降低果品品質外，同時也為果實外銷時重要的檢疫病害。

長期以來國內的柑橘生產者廣泛地使用銅劑以減少柑橘潰瘍病引起之危害，然而銅劑常導致土壤中累積過多的銅，進而產生毒害並影響環境生態系 (Alva *et al.* 1995)。此外，長期使用銅劑會大幅增加病原菌族群產生抗銅菌株之風險 (Behlau *et al.* 2012b)，導致銅劑之防治效果降低甚至失效。柑橘潰瘍病菌之抗銅菌株最早於 1990 年代於阿根廷的柑桔苗圃中被發現 (Behlau *et al.* 2011)，隨後法屬留尼旺島

投稿日期：2022 年 5 月 16 日；接受日期：2022 年 6 月 29 日。

* 通訊作者：eris2024@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

² 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系計畫助理。台灣 嘉義市。

(Reunion) 及馬提尼克島 (Martiniaure) 等地也陸續出現抗銅菌株 (Richard *et al.* 2017)，近來的研究文獻也顯示台灣栽培果園中亦已出現柑橘潰瘍病菌的抗銅菌株 (Lai *et al.* 2021)。目前國內柑橘潰瘍病使用之推薦防治用藥，除了銅劑之外，還有抗生素類藥劑，但於使用上亦有抗藥菌株之生成及影響人體健康與環境生態的潛在風險。有鑑於此，開發其他可施用並符合永續農業理念之防治方法有其必要性。

後天性系統抗性 (systemic acquired resistance; SAR) 為植物藉外來因子誘導啟動之植物體全身性的防禦反應，此抗病性通常具有持久性及廣泛性 (An & Mou 2011; Fu & Dong 2013)，其中水楊酸 (salicylic acid; SA) 被認為扮演重要的訊息傳遞角色 (Zhang *et al.* 2010)。其誘導因子可為生物性之病原菌，亦可為非生物性之化學物質如水楊酸、苯併噻二唑 (benzothiadiazole) 及其衍生物等 (Gorlach *et al.* 1996)。阿拉酸式苯-S-甲基 (acibenzolar-S-methyl; ASM) 為苯併噻二唑的衍生物，可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，以其作為誘導植物抗病性的商品已於歐美地區販售，並廣泛應用於防治多種由真菌、細菌、病毒及線蟲等引起的作物病害 (Cole 1999; Oostendorp *et al.* 2001; Chinnasri *et al.* 2006)。目前國內的相關研究則有應用於防治不結球白菜炭疽病與苗立枯病 (Hsu 2011)，但尚無應用於木本作物上之研究。因此，本研究之目的為 ASM 應用在柑橘上，於溫室進行對柑橘潰瘍病防治之藥效試驗，同時探討其誘導抗病之可能機制。

材料與方法

柑橘潰瘍病菌菌株收集

本試驗利用 2010–2019 年之間自嘉義及雲林地區的柑橘園罹病葉片上分離及純化的柑橘潰瘍病菌菌株作為供試菌株 (表 1)。採集之罹病柑橘葉片洗淨瀝乾後，切取病健部組織，經 0.5% 次氯酸鈉 (NaOCl) 及 70% 酒精表面消毒各 30 s，再以無菌水漂洗 3 次後，將組織切碎置入無菌水中震盪均勻，利用畫線平板方式

表 1. 柑橘潰瘍病菌菌株於含銅培養基上之生長情形。

Table 1. The growth of the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (strains) collected from Yunlin and Chiayi of Taiwan and their sensitivity to copper on mannitol glutamate yeast (MGY) medium.

Location	Year	Total strain number	Growth conditions ^z	Concentration of Cu amended to MGY medium (mg L ⁻¹)							
				0	50	100	150	175	200	300	400
Yunlin	2019	16	Regular growth	16	16	16	16	14	-	-	-
			Weak growth	-	-	-	-	2	-	-	-
Chiayi	2010	7	Regular growth	7	7	7	7	2	2	2	2
			Weak growth	-	-	-	-	-	-	-	-
	2014	2	Regular growth	2	2	2	2	-	-	-	-
			Weak growth	-	-	-	-	-	-	-	-
	2017	3	Regular growth	3	3	3	3	-	-	-	-
			Weak growth	-	-	-	-	-	-	-	-
	2018	9	Regular growth	9	9	9	5	1	-	-	-
			Weak growth	-	-	-	4	-	-	-	-
2019	43	Regular growth	43	43	43	43	25	-	-	-	
		Weak growth	-	-	-	-	4	-	-	-	
Total		80	Regular growth	80	80	80	76	42	2	2	2
			Weak growth	-	-	-	4	6	-	-	-

^z Regular growth indicates a homogenous and thorough coverage of the spot where the bacterial suspension was deposited; weak growth indicates that some growth was observed but not as uniform or strong as the reference (bacterial growth of each strain on medium without copper).

將細菌懸浮液塗於 NA (nutrient agar) (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 平板上，於 27°C 定溫箱中培養 3 d 後，挑選單一菌落至新 NA 培養基培養純化。純化後之分離株經分子鑑定及病原性確認為 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) 後，保存於甘油中以供日後試驗使用。

菌株對銅之感受性分析

將保存之柑橘潰瘍病菌株 (表 1) 於 NA 平板上活化後，利用無菌水配製細菌懸浮液 [濃度約 10^8 colony-forming unit (CFU)mL⁻¹]，取 10 μ L 細菌懸浮液點放至含有硫酸銅 (CuSO₄ · 5H₂O, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 之 MGY 培養基 (mannitol glutamate yeast medium) (Behlau *et al.* 2012a) 上進行銅感受性分析，平板含硫酸銅之濃度分別為 0、50、100、150、175、200、300 及 400 mg L⁻¹。將培養皿置於 27°C 之定溫箱中生長 3 d 後，記錄菌株生長情形。每濃度處理 3 皿，3 重複，本試驗重複進行 2 次。依據菌株生長情形分為：正常生長 (regular growth)，指點放至培養基上的細菌懸浮液可生長並完整覆蓋點放之圓點；微弱生長 (weak growth)，指點放至培養基上的細菌懸浮液可生長但與對照組 (無添加銅之培養基) 相較之下，生長較為微弱 (Marin *et al.* 2019)。

抗銅基因分子檢測

將可生長於銅濃度 150–400 mg L⁻¹ 培養基之菌株進行抗銅基因分子檢測。參考 Wang *et al.* (1993) 之方法並修改後進行核酸萃取，沾取培養於 NA 上之菌株放入 50 μ L 之 0.5 N NaOH，劇烈震盪後短暫離心，再加入 150 μ L 之 1M Tris-HCl (pH 8.0) 混合均勻，取 10 μ L 加入無菌水稀釋 10 \times ，以此製備液 1 μ L 作為模板。利用以抗銅基因 (copper resistance genes) 序列片段設計的專一性引子對 copLF/copLR、copAF/copAR 及 copBF/copBR (Behlau *et al.* 2013) 進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，經電泳分析後以確認菌株基因體中是否具有抗銅基因序列。

ASM 配製與 4-4 式波爾多液 (4-4 Bordeaux mixture) 之製備

取 5 mg ASM (acibenzolar-S-methyl, PESTANAL[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶入 300 mL 無菌水中，即為每株試驗株之施用量，完成配製後於當日施用。4-4 式波爾多液 (1 L 含有 4 g 硫酸銅與 4 g 生石灰)，將所需水量等分為兩桶，分別溶解等重量之硫酸銅 (購於聯合農業資材行，台灣嘉義縣) 與生石灰 (購於聯合農業資材行，台灣嘉義縣)，再將硫酸銅溶液緩緩倒入石灰水中，並於倒入過程中不停攪拌以利兩者充分混合，亦於完成配製後當日施用。

ASM 防治柑橘潰瘍病之溫室試驗評估

本試驗選用四季檸檬 (*Citrus limon*) 作為供試植物，自園藝資材行購得約 2 年生幼株，種植於塑膠盆 (直徑 24 cm，高 29 cm)，並置於溫室中。接種用菌株 (Xcc1954) 為本研究中之嘉義分離株，耐銅劑之特性菌株，可生長於銅濃度 150–175 mg L⁻¹ 培養基。試驗用之接種源製備法如下：將保存之 Xcc1954 培養於 NA 培養基，於 27°C 經 2 d 培養後，以無菌水洗出成為細菌懸浮液，調整菌量濃度約為 10^8 CFU mL⁻¹ 即為接種源。防治效果評估試驗分為下列 4 組，(1) 試驗組為利用土壤澆灌方式施用 1 次 ASM (每株 5 mg a.i.)；另以不同作用機制之銅劑單獨使用及配合 ASM 同時使用之處理作為比較組，分別為 (2) 葉面施用 4-4 式波爾多液 1 次；(3) 同時利用土壤澆灌 ASM (每株 5 mg a.i.) 及葉片噴灑 4-4 式波爾多液；(4) 未處理藥劑之植株作為對照組。於藥劑處理 3 d 後以人工接種柑橘潰瘍病菌，每處理 3 株植株，每株植株選擇 5 枝新梢 (每枝條至少有 5 片新葉)，接種後的植株於溫室中定期觀察其發病情形及記錄其罹病等級。病害指數 (disease index) 分為 8 級：0 級為無病徵、1 級為葉片出現 1–3 個病斑、3 級為葉片出現 4–10 個病斑、5 級為葉片出現 11–20 個病斑及 7 級為葉片出現 > 20 個病斑 (Shiotani *et al.* 2008)，再依下列公式計算罹病度 (disease severity)。

$$\text{罹病度 (\%)} = \frac{\Sigma (\text{指數} \times \text{該指數罹病葉數})}{(7 \times \text{總調查葉數})} \times 100\%$$

酵素活性測定

植株分別於接種後第 0、2、4、8 及 11 d，取接種枝條上之第 6–8 葉約 0.1 g 之葉片組織，並保存於 -20°C 冰箱。酵素分析每樣本為 3 重複，試驗重複 2 次。

- (1) 過氧化氫酶 (catalase, CAT)：依 Kato & Shimizu (1987) 方法進行，以液態氮研磨樣本後，加入 1 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 均勻震盪，於 4°C 冷凍離心機離心 20 min；取 0.2 mL 上清液，加入 2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) 與 0.1 mL H₂O₂ (1 M)，混合均勻後，以分光光度計於 240 nm 測量吸光值 1 min，記錄 0 s 與 60 s 之讀值，酵素活性單位 (unit) 為每分鐘消耗 1 μM H₂O₂。另以 Bradford (1976) 蛋白定量法，測量粗萃取液之總蛋白含量，計算每毫克蛋白質的酵素活性。
- (2) 過氧化物酶 (peroxidase, POD)：參考 Hsieh (2010) 之方法，將樣本以液態氮研磨後加入 1 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 5.8, 內含 0.8 M KCl) 均勻震盪，置 4°C 冷凍離心機離心 20 min，取上清液至新的 1.5 mL 離心管中。將酵素粗萃取液、potassium phosphate buffer (50 mM, pH 5.8)、guaiacol (21.6 mM) 及 H₂O₂ (39 mM) 以 1 : 10 : 10 : 9 的比例均勻混合後，以分光光度計於 470 nm 測量吸光值 1 min，記錄 0 s 與 60 s 之讀值，酵素活性單位為每分鐘產生 1 μM tetraguaiacol。另以 Bradford (1976) 蛋白定量法，測量粗萃取液中總蛋白含量，計算每毫克蛋白質的酵素活性。
- (3) 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase; SOD)：依修正之 Deepak *et al.* (2006) 之方法，將樣本以液態氮研磨後，加入 1 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) 均勻震盪，置 4°C 冷凍離心機離心 20 min，取上清液至新的 1.5 mL 離心管中。再取 100 μL 酵素粗萃取液加入 100 μL 反應液 A [150

mM sodium phosphate buffer, 39 mM methionine, 0.3 mM EDTA, 225 μM nitro blue tetrazolium (NBT), pH 7.8]、30 μL 20 μM riboflavin，最後以無菌水加至 300 μL，以分光光度計於 570 nm 測量吸光值 10 min，記錄 0 s 與 600 s 之讀值，酵素活性單位為抑制 50% NBT 之吸光值變化。另以 Bradford (1976) 蛋白定量法，測量粗萃取液中總蛋白含量，計算每毫克蛋白質的酵素活性。

ASM 對柑橘潰瘍病菌生長抑制能力之影響

採用濾紙圓盤法進行 ASM 對柑橘潰瘍病菌 (*Xcc1954*) 之抑制能力評估，將直徑 0.8 cm 之濾紙圓盤 (TOYO ADVANTEC, Tokyo, Japan) 分別置於 0、100、200、300 及 400 mg L⁻¹ 之 ASM 中，於室溫下浸漬 10 min 後將濾紙圓盤取出陰乾，再放置於已塗布有 0.1 mL 細菌懸浮液 (濃度約為 10⁸ CFU mL⁻¹) 之 NA 平板上 (直徑 9 cm)，每一培養平板放 2 個濾紙圓盤，並以無菌水處理之濾紙圓盤作為對照組。將各處理之培養平板放置於 27°C 無光照定溫箱內，培養 2 d 後，取出測量抑制圈大小。每處理 3 重複，試驗重複 2 次。

統計分析

試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (Fisher's least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

柑橘潰瘍病菌株對銅之感受性分析及抗銅基因分子檢測

本研究於 2010–2019 年間分離保存之柑橘潰瘍病菌株總計 80 株，其中雲林地區為 16 株，嘉義地區為 64 株 (表 1)。將菌株分別於含有不同濃度硫酸銅之 MGY 培養基上進行銅濃度之感受性分析，結果顯示所有供試菌株 (80 株) 皆可於銅濃度 0–100 mg L⁻¹ 之培養基上正常生長。培養基含銅濃度為 150 mg L⁻¹ 時，95.0%

(76 株) 的菌株皆可正常生長，其中 5.0% (4 株) 的菌株生長與無添加銅之培養基上生長之菌落比較則較為微弱，如 2018 年收集之嘉義分離株 Xcc1808 (圖 1A)。當培養基含銅濃度為 175 mg L^{-1} 時，7.5% (6 株) 的菌株可微弱生長，52.5% (42 株) 的菌株可正常生長，如 2019 年收集之嘉義分離株 Xcc1954 (圖 1A)。培養基含銅濃度為 $200\text{--}400 \text{ mg L}^{-1}$ 時，僅餘 2 株 2010 年自嘉義地區分離之菌株 (Xcc1004 與 Xcc1023) 可正常生長 (圖 1A)。

進一步將可生長於銅濃度 $150\text{--}400 \text{ mg L}^{-1}$ 培養基之 80 株菌株，利用抗銅基因專一性引子對 (包括 *copL*、*copA* 與 *copB*) 進行基因片段增幅 (Behlau *et al.* 2013)，結果發現可生長

於含銅濃度 $200\text{--}400 \text{ mg L}^{-1}$ 培養基的 2 株嘉義分離株 Xcc1004 與 Xcc1023 可增幅出預期條帶，分別是 *copL* 基因片段 356 bp (base pair)，*copA* 基因片段為 870 bp 及 *copB* 基因片段為 531 bp，其他菌株如雲林分離株 Xcc1942 與嘉義分離株 Xcc1954、Xcc1808 等則未測得預期條帶 (圖 1B)。

ASM 防治柑橘潰瘍病之溫室試驗評估

本研究利用 ASM 作為主要試驗之防治資材，與 4-4 式波爾多液同時配合使用及單獨使用銅劑之效果進行評估。結果發現於接種 3 wk 後，施用 ASM 之處理組植株罹病度為 19.14%、同時使用 4-4 式波爾多液與 ASM 之

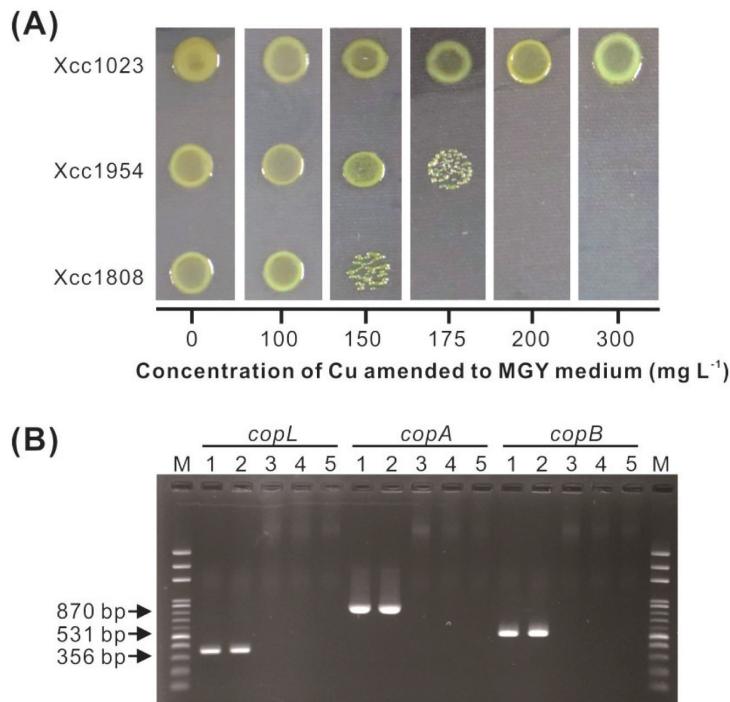


圖 1. 柑橘潰瘍病菌株於含銅培養基上之感受性分析及抗銅基因分子檢測。(A) 抗銅菌株 Xcc1023、耐銅菌株 Xcc1954 與 Xcc1808 於添加不同銅濃度的培養基上之生長情形。(B) 利用聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 檢測抗銅基因 (*copL*: 356 bp、*copA*: 870 bp 及 *copB*: 531 bp) 片段。行 M: 1 kb DNA ladder; 行 1、2: 抗銅菌株 Xcc1004 及 Xcc1023; 行 3、4、5: 耐銅菌株 Xcc1942、Xcc1954 及 Xcc1808。

Fig. 1. Sensitivity to copper on mannitol glutamate yeast (MGY) medium and detection of copper resistant genes from the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains. (A) Growth of copper resistant strain Xcc1023, copper tolerant strains Xcc1954 and Xcc1808 on MGY medium supplemented with different concentrations of copper. (B) PCR amplification of copper resistance gene fragments of *copL* (356 bp), *copA* (870 bp) and *copB* (531 bp) from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains. Lane M: 1 kb DNA ladder; lanes 1 and 2, copper resistant strain Xcc1004 and Xcc1023; lanes 3, 4 and 5, copper tolerant strains Xcc1942, Xcc1954 and Xcc1808.

處理組為 15.4%，僅使用 4-4 式波爾多液時之罹病度為 15.0%，對照組植株罹病度則為 39.96%，前述三種處理皆與對照組之罹病度具有顯著差異，但三者之間則無顯著差異(圖 2)。

酵素活性測定

試驗植株於使用 ASM 或 4-4 式波爾多液處理後 3 d 進行病原菌接種，並於接種後第 0、2、4、8、11 d 分別測定 CAT、POD 及 SOD 之酵素活性。測定結果顯示，CAT 活性於單獨使用 ASM 之處理組，發現於接種後即大幅增加，至第 2 天到達最高峰，於第 2–11 天期間逐漸降低，但於此測定期間之 CAT 活性皆明顯高於其他處理組及接種對照組 0.95–0.3 倍；同時使用 ASM 與 4-4 式波爾多液之處理組與接種對照組呈現相似的活性變化趨勢，於接種後小幅上升，至第 2 天達到最高，之後小幅下降並呈現穩定的趨勢，且兩者之間的 CAT 活性並無顯著差異；單獨使用 4-4 式波爾多液處理組於接種後之酵素活性亦呈上升趨勢，於

第 4 天達最高，但其活性與對照組並無明顯差異，之後呈小幅下降的趨勢(圖 3A)。而 POD 活性測定結果發現，單獨以 ASM 處理之實驗組，其酵素活性於接種後 4 d 內緩慢地增加，第 4 天後增加幅度加大，於第 8 天達最高峰，此時之 POD 活性高於同時時間之對照組 0.2 倍，之後活性呈現降低趨勢，但於第 11 天時之酵素活性仍高於對照組 0.3 倍；使用 4-4 式波爾多液之處理組與接種對照組亦呈現相似的活性變化趨勢，於第 8 天酵素活性達最高峰，其中 4-4 式波爾多液之處理組此時之 POD 活性低於對照組 0.13 倍；而同時使用 ASM 與 4-4 式波爾多液之處理組酵素活性於接種後 2 d 內小幅增加，之後於第 2–11 天期間活性呈現平穩的現象，但於接種後第 4 天前之酵素活性高於其他處理組(圖 3B)。SOD 活性測定結果顯示所有處理組與對照組之趨勢相似，活性於接種後 2 d 內大幅度增加，隨後逐漸降低，第 8–11 天則呈增加的趨勢，但各處理組與接種對照組並無顯著差異(圖 3C)。

ASM 對柑橘潰瘍病菌生長抑制能力之影響

利用濾紙圓盤法進行培養基上之抑制能力試驗，結果發現以 0、100、200、300 及 400 mg L⁻¹ 之 ASM 處理之濾紙圓盤周圍皆無抑制圈之形成 (data not show)，潰瘍病菌 (*Xcc1954*) 正常生長，由此可知，ASM 對潰瘍病菌無直接毒殺效果。

討論

銅劑為目前廣泛應用於防治柑橘潰瘍病之藥劑，長期使用下容易誘發病原菌產生抗銅性，進而降低銅劑之防治效果，然而柑橘潰瘍病菌之抗銅菌株於阿根廷首次發現後 (Behlau *et al.* 2011)，已陸續於其他柑橘產區發現抗銅菌株 (Richard *et al.* 2017; Lai *et al.* 2021)。本研究調查雲林及嘉義地區之柑橘潰瘍病菌株發現，多數可忍受之最高銅濃度為 150–175 mg L⁻¹，僅 2 株分離自嘉義地區的菌株 (*Xcc1004* 及 *Xcc1023*) 可於含銅濃度為 400 mg L⁻¹ 之培養基上生長。依據 Marin *et al.* (2019) 研究報告

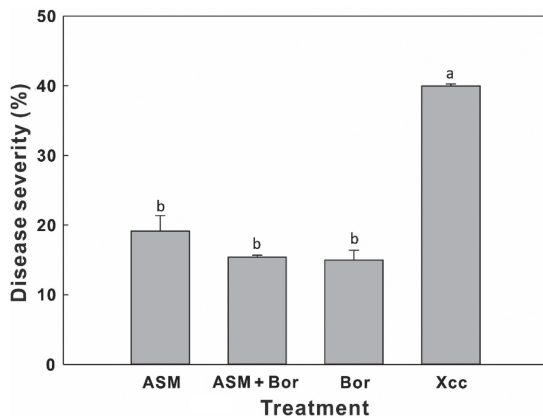


圖 2. 檸檬植株以 acibenzolar-S-methyl (ASM)、4-4 式波爾多液 (Bor) 及兩者同時配合使用 (ASM + Bor) 處理 3 d 後，再接種柑橘潰瘍病菌 (*Xcc*)，經 3 wk 後之發病情形。

Fig. 2. Effects of acibenzolar-S-methyl (ASM), 4-4 bordeaux mixture (Bor) and the combination of ASM + Bor on the disease severity of citrus canker 3 d prior to the inoculation of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) on lemon plants and evaluated after 3 wk of inoculation. Bars indicated the standard deviation. Values with the same letter are not significantly different according to Fisher's least significant difference (LSD) test ($P = 0.05$).

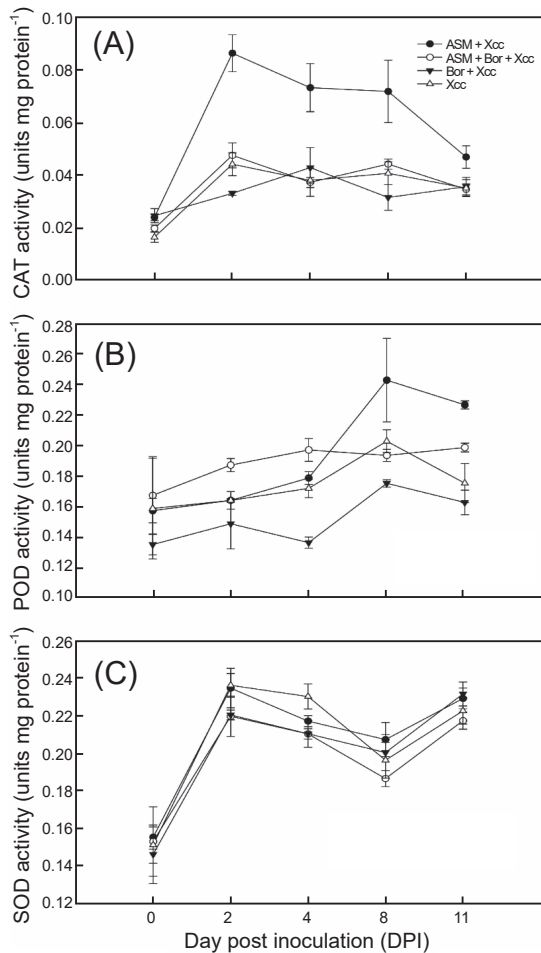


圖3. 植株接種柑橘潰瘍病菌後 0–11 d 內 (A) 過氧化氫酶 (CAT)、(B) 過氧化物酶 (POD) 及 (C) 超氧化物歧化酶 (SOD) 之活性變化。

Fig. 3. (A) Activity of catalase (CAT), (B) peroxidase (POD) and (C) superoxide dismutase (SOD) in lemon leaves from plants with different treatments: (●) drenched with acibenzolar-S-methyl and inoculated with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (ASM + Xcc), (○) drenched with acibenzolar-S-methyl, sprayed 4-4 bordeaux mixture and inoculated with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (ASM + Bor + Xcc), (▼) sprayed 4-4 bordeaux mixture and inoculated with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Bor + Xcc), (△) inoculated with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc, untreated control). Enzyme activities were evaluated at 0, 2, 4, 8 and 11 d after inoculation. Bars indicated the standard deviation.

中將柑橘潰瘍病菌株對銅感受性之分類，可分為3種，分別是敏感菌株 (sensitive strain, Cu^S) (< 150 mg L⁻¹)、耐性菌株 (tolerant strain, Cu^T) (150–200 mg L⁻¹) 及抗性菌株 (resistant strain,

Cu^R) (> 200 mg L⁻¹)，若以上述分類作為標準，顯示本研究中之雲嘉地區菌株多數可歸類為耐性菌株，其中2株嘉義菌株則可歸類為抗性菌株。此外，前人研究發現於 *Xanthomonas* spp. 的抗銅菌株中具有 *cop* 基因組 (如 *copA*、*copB* 及 *copL*) 存在 (Behlau *et al.* 2011)，本研究中篩選出之2株抗銅菌株 (Xcc1004 及 Xcc1023) 亦測得 *copA*、*copB* 及 *copL* 存在，證實此2株嘉義菌株具抗銅性。近年之文獻亦指出台灣之柑橘潰瘍病的抗銅菌株已於台中神岡及嘉義地區發現 (Lai *et al.* 2021)，綜上所述，台灣主要的柑橘產區已出現抗銅性菌株，且分離自雲嘉地區的多數菌株已對銅產生耐性。有鑑於此，本研究利用 ASM 作為防治資材，評估應用於柑橘潰瘍病之防治效果有其必要性。

ASM 為苯併噻二唑的衍生物，被殺菌劑抗藥性行動委員會 (Fungicide Resistance Action Committee; FRAC) 歸類為殺菌劑，但本身並不具殺菌的效果，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)。本研究結果顯示柑橘潰瘍病菌於高濃度 400 mg L⁻¹ ASM 下也能正常生長，由此可知，ASM 對潰瘍病菌並無直接毒殺效果。目前 ASM 已被證實可誘導多種植物產生抗病反應，防治由不同病原菌引起之病害，如日本梨黑星病 (Faize *et al.* 2004)、胡瓜炭疽病 (Cool & Ishii 2002)、番茄青枯病 (Pradhanang *et al.* 2005) 等，於柑橘潰瘍病的防治應用方面，則於枳柚 (Francis *et al.* 2009)、葡萄柚 (Graham & Myers 2011) 及墨西哥萊姆 (Ibrahim *et al.* 2017) 等柑橘作物上證實具有防治的效果，且結果顯示利用土壤澆灌方式較葉片施用法的防治效果更為明顯 (Graham & Myers 2011)。本研究之溫室試驗結果亦顯示於接種前 3 d 以土壤澆灌方式施用 1 次 ASM，可有效降低檸檬發生柑橘潰瘍病之罹病度，且與施用 4-4 式波爾多液之防治效果無顯著差異。進一步分析與抗病相關酵素之關聯性，結果發現接種後於 ASM 處理組葉片內之 POD 與 CAT 之活性明顯增加，POD 活性於接種後 4–8 d 明顯增加，於第 8 天達到高峰；CAT 活性則於接種後即明顯增加，於第 2 天達到高峰；SOD 活性亦於接種後即明

顯增加，於第 2 天達到高峰，然而與接種之對照組無明顯差異。相似之結果也於 Al-Saleh *et al.* (2015) 之研究中發現墨西哥萊姆葉面施用水楊酸，於接種後 1–3 d 內 POD 與 CAT 之活性明顯增加，並於接種後 3–5 d 內達高峰。目前已有相關研究指出，於日本梨 (Faize *et al.* 2004)、胡瓜 (Cools & Ishii 2002) 及番茄 (Soylu *et al.* 2003) 等多種作物內之 POD 活性均可被 ASM 誘導活化，而 POD 可藉由與過氧化氫反應以刺激木質素形成，同時亦降低過氧化氫對植物細胞的氧化傷害 (Thatcher *et al.* 2005)。由此可知，POD 於 ASM 誘導產生之防禦反應中扮演重要的角色。而在感染過程中抗氧化酵素成員中的 SOD 與 CAT 於接種後初期之活性增加，顯示檸檬受柑橘潰瘍病菌感染後會產生大量活性氧化分子 (reactive oxygen species; ROS) 來參與對抗病原菌，其中 AMS 誘導對 CAT 活性影響顯著。參與木質素合成作為抗病機制的 POD 在病原菌感染過程中，其活性隨著感染時間的延長逐漸增加。以上結果顯示，AMS 誘導檸檬產生抗性的可能機制為初期 CAT 活性可快速增加，POD 活性為主要抗病反應，而 SOD 活性則不受 AMS 影響。然而，還有其他可能之抗病反應如 pathogenesis-related (PR) proteins 與總酚化物等於防禦反應中扮演的角色，則有待進一步探討。此外，本研究發現 AMS 與 4-4 式波爾多液一起配合使用時其防治效果與單獨使用時比較並無特別差異之處，且分析酵素活性之結果中，僅 POD 活性於接種後初期 (0–4 d 內) 較其他處理組高。相似的結果也於 AMS 與氫氧化銅一起配合使用之試驗中發現 (Graham & Leite 2004)，惟原因仍需進一步研究探討，因此 AMS 於使用上不建議與銅劑同時使用。

柑橘潰瘍病為影響台灣柑橘生產栽培之重要細菌性病害，銅劑為國內生產者經常使用的防治方法，長期且高頻率的使用銅劑，易造成病原菌對藥劑產生抗藥性，同時也衍生出消費者對農藥殘留及食品安全的顧慮。本研究調查發現嘉義地區已出現柑橘潰瘍病的抗銅菌株，因此，增加可利用並符合永續農業理念之防治藥劑或資材有其必要性。本研究初步證實以土壤澆灌方式施用 ASM，於溫室試驗中可有效

降低檸檬發生柑橘潰瘍病之罹病度，且與施用 4-4 式波爾多液之防治效果無顯著差異。其提供抗性之機制是藉由提高 POD 與 CAT 之活性以誘導檸檬植株產生抗性而達到防治效果。未來可進一步評估於田間施用之劑量、頻率等使用條件及對柑橘植株生長之影響，以提供更有效、安全之使用方法。

誌謝

本研究承行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所林江美華小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Al-Saleh, M. A., A. A. Saleh, and Y. E. Ibrahim. 2015. Integration of *Pseudomonas fluorescens* and salicylic acid improves citrus canker disease management caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*-A. Arch. Phytopathology Plant Prot. 48:863–872. doi:10.1080/003235408.2016.1143573
- Alva, A. K., J. H. Graham, and C. A. Anderson. 1995. Soil pH and copper effects on young 'Hamlin' orange trees. Soil Sci. Soc. Am. J. 59:481–487. doi:10.2136/sssaj1995.03615995005900020031x
- An, C. F. and Z. L. Mou. 2011. Salicylic acid and its function in plant immunity. J. Integr. Plant Biol. 53:412–428. doi:10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x
- Behlau, F., B. I. Canteros, G. V. Minsavage, J. B. Jones, and J. H. Graham. 2011. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. Appl. Environ. Microbiol. 77:4089–4096. doi:10.1128/AEM.03043-10
- Behlau, F., I. C. Blanca, J. H. Graham, and J. B. Jones. 2012a. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Eur. J. Plant Pathol. 133:949–963. doi:10.1007/s10658-012-9966-8
- Behlau, F., J. B. Jones, M. E. Myers, and J. H. Graham. 2012b. Monitoring for resistant populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and epiphytic bacteria on citrus trees treated with copper or streptomycin using a new semi-selective medium. Eur. J. Plant Pathol. 132:259–270. doi:10.1007/s10658-011-9870-7
- Behlau, F., J. C. Hong, J. B. Jones, and J. H. Graham. 2013. Evidence for acquisition of copper resistance

- genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. *Phytopathology* 103:409–418. doi:10.1094/PHYTO-06-12-0134-R
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Chinnasri, B., B. S. Sipes, and D. P. Schmitt. 2006. Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. *J. Nematol.* 38:319–325.
- Cole, D. L. 1999. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Prot.* 18:267–273. doi:10.1016/S0261-2194(99)00026-5
- Cools, H. J. and H. Ishii. 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. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61:273–280. doi:10.1006/pmpp.2003.0439
- Deepak, S. A., H. Ishii, and P. Park. 2006. Acibenzolar-S-methyl primes cell wall strengthening genes and reactive oxygen species forming/scavenging enzymes in cucumber after fungal pathogen attack. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69:52–61. doi:10.1016/j.pmpp.2006.12.006
- Faize, M., L. Faize, N. Koike, M. Ishizaka, and H. Ishii. 2004. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Phytopathology* 94:604–612. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.6.604
- Francis, M. I., A. Redondo, J. K. Burns, and J. H. Graham. 2009. Soil application of imidacloprid and related SAR inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *Eur. J. Plant Pathol.* 124:283–292. doi:10.1007/s10658-008-9415-x
- Fu, Z. Q. and X. N. Dong. 2013. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:839–863. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105606
- Gorlach, J., S. Volrath, G. Knauf-Beiter, G. Hengy, U. Beckhove, K.-H. Kogel, M. Oostendorp, T. Staub, E. Ward, H. Kessmann, and J. Ryals. 1996. Benzo-thiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629–643. doi:10.1105/tpc.8.4.629
- Graham, J. H. and R. P. Leite. 2004. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. *Plant Dis.* 88:745–750. doi:10.1094/PDIS.2004.88.7.745
- Graham, J. H. and M. E. Myers. 2011. Soil application of SAR inducers imidacloprid, thiamethoxam, and acibenzolar-S-methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. *Plant Dis.* 95:725–728. doi:10.1094/PDIS-09-10-0653
- Hsieh, T. Y. 2010. Evaluation for efficacy of total protein extracted from *Alternaria tenuissima* APR01 on inducing Chinese cabbage seedlings resistant to *Rhizoctonia* damping-off. Master Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 47 pp. (in Chinese with English abstract)
- Hsu, T. L. 2011. Application of acibenzolar-S-methyl and its resistance mechanism in controlling disease of Pak-choi. Master Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 63 pp. (in Chinese with English abstract)
- Ibrahim, Y. E., A. A. Saleh, and M. A. Al-Saleh. 2017. Management of Asiatic citrus canker under field condition in Saudi Arabia using bacteriophages and acibenzolar-S-methyl. *Plant Dis.* 101:761–765. doi:10.1094/PDIS-08-16-1213-RE
- Kato, M. and S. Shimizu. 1987. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Can. J. Bot.* 65:729–735. doi:10.1139/b87-097
- Lai, Y. R., C. H. Lin, C. P. Chang, H. F. Ni, W. S. Tsai, and C. J. Huang. 2021. Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Plant Prot. Sci.* 57:206–216. doi:10.17221/160/2020-PPS
- Marin, T. G. S., A. L. Galvanin, F. E. Lanza, and F. Behlau. 2019. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypeic comparison with sensitive and resistant strains. *Plant Pathol.* 68:1088–1098. doi:10.1111/ppa.13026
- Oostendorp, M., W. Kunz, B. Dietrich, and T. Staub. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:19–28. doi:10.1023/A:1008760518772
- Pradhanang, P. M., P. Ji, M. T. Momol, S. M. Olson, J. L. Mayfield, and J. B. Jones. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 89:989–993. doi:10.1094/PD-89-0989
- Richard, D., V. Ravigné, A. Rieux, B. Facon, C. Boyer, K. Boyer, P. Grygiel, S. Javegny, M. Terville, B. I. Canteros, I. Robène, C. Vernière, A. Chabirand, O. Pruvost, and P. Lefeuvre. 2017. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: Evolution of copper

- resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. *Mol. Ecol.* 26:2131–2149. doi:10.1111/mec.14007
- Shiotani, H., T. Yoshioka, M. Yamamoto, and R. Matsu-moto. 2008. Susceptibility to citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* depends on the nuclear genome of the host plant. *J. Gen. Plant Pathol.* 74:133–137. doi:10.1007/s10327-008-0074-8
- Soylu, S., Ö. Baysal, and E. M. Soyly. 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Sci.* 165:1069–1075. doi:10.1016/S0168-9452(03)00302-9
- Thatcher, L. F., J. P. Anderson, and K. B. Singh. 2005. Plant defence responses: What have we learn from *Arabidopsis*? *Funct. Plant Biol.* 32:1–19. doi:10.1071/FP04135
- Tzeng, S. S. 2019. List of Plant Disease in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathology Society Press. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153
- Zhang, X. D., M. I. Francis, W. O. Dawson, J. H. Graham, V. Orbovic, E. W. Triplett, and Z. Mou. 2010. Over-expression of the *Arabidopsis* NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur. J. Plant Pathol.* 128:91–100. doi:10.1007/s10658-010-9633-x

Efficacy of Acibenzolar-S-methyl and Its Induced Resistance Mechanism in Controlling Citrus Canker

Ching-Yi Lin^{1,*} and Hui-Ju Lin²

Abstract

Lin, C. Y. and H. J. Lin. 2022. Efficacy of acibenzolar-S-methyl and its induced resistance mechanism in controlling citrus canker. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(4):309–319.

Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) is one of the most economically important bacterial disease in the international citrus industry. The copper-based bactericides were widely use to or control citrus canker. However, frequent applications of copper-based bactericides induce the development of bacterial strains either resistant or tolerant to copper. In this study, Xcc strains were collected from citrus orchards in Yunlin and Chiayi of Taiwan and used to assess the sensitivity to copper on a solid medium. The tests identified two copper resistant strains and 46 copper tolerant strains. Copper resistance in plant pathogenic bacteria contributes to a failure to control plant bacterial diseases by copper bactericides. In view of this, it is necessary to develop alternative control methods for sustainable agricultural practices. In this study, the individual and combined effects of acibenzolar-S-methyl (ASM) and 4-4 bordeaux mixture (Bor) were investigated in a greenhouse to control citrus canker disease. Three treatments were conducted on potted lemon (*Citrus limon*) seedlings: soil drench with 5 mg a.i. ASM, foliar spray with Bor, and a combination of the above two treatments (ASM + Bor). The lemon seedlings were inoculated with Xcc 3 d post treatments. The results showed that the disease severities of ASM, Bor and ASM + Bor were 19.14%, 15.0%, and 15.4%, respectively, which were significantly different from the untreated control (39.96%). For the defence-related enzyme activity assay, progressive increases in peroxidase and catalase activities were found in lemon seedlings treated with ASM alone. Our results suggested that ASM was effective in reducing canker disease severity, mainly through enhancing the activities of peroxidase and catalase *in planta*.

Key words: Acibenzolar-S-methyl, Citrus, Citrus canker.

Received: May 16, 2022; Accepted: June 29, 2022.

* Corresponding author, e-mail: eris2024@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Project Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.