

植物精油對果樹炭疽病菌 孢子發芽之抑制效果

謝廷芳^{1,3} 陳俊宏² 蔡志濃²

¹雲林縣古坑鄉 行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心

²台中市霧峰區 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組 (陳君現任職興農公司生技部門)

³聯絡作者, E-mail: tfhsieh@tari.gov.tw; 傳真: +886-5-5820834

接受日期: 中華民國 103 年 2 月 10 日

摘要

謝廷芳、陳俊宏、蔡志濃. 2014. 植物精油對果樹炭疽病菌孢子發芽之抑制效果. 植病會刊 23:31-41.

蒐集肉桂、丁香、桉樹、茴香、香茅、檸檬桉及百里香等七種植物精油, 經稀釋為 62.5、125、250、500、1000 及 2000 $\mu\text{L/L}$ 後, 於水瓊脂培養基平板上分別測試其對印度棗、木瓜、芒果、文旦、蘋果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 及香蕉炭疽病菌 *Colletotrichum musae* 等孢子發芽之抑制效果, 再換算植物精油對各種果樹炭疽病菌之 50% 抑制濃度 (Concentration required for 50% inhibition, IC_{50})。結果七種精油中以肉桂、丁香及檸檬桉三種植物精油抑制六種果樹炭疽病菌孢子發芽之效果最佳, 其中肉桂精油的 IC_{50} 小於 98.7 $\mu\text{L/L}$ 、丁香精油的 IC_{50} 小於 155.7 $\mu\text{L/L}$, 而檸檬桉精油的 IC_{50} 小於 190.5 $\mu\text{L/L}$ 。另外, 以市面上購得之香蕉果實分別浸漬於肉桂和丁香精油 500 $\mu\text{L/L}$ 稀釋液中, 發現肉桂油具有預防香蕉炭疽病發生之效果, 而丁香精油反而會促使香蕉炭疽病嚴重發病, 所得結果可作為日後研發天然植物保護製劑防治作物炭疽病之參考。

關鍵詞: 植物精油、炭疽病菌、孢子發芽、香蕉、炭疽病、防治

緒言

2011 年統計顯示, 各類果樹栽培總計約 19 萬公頃, 總產量超過 266 萬公噸, 產值約新台幣 791 億元⁽³⁾。果樹炭疽

病是果樹栽培收穫後與儲架期的重要病害之一^(5,13)，具有潛伏感染 (latent infection) 之特性^(7,9)，在果實收穫後貯存、運輸、販賣時才會表現嚴重病徵，造成台灣果樹產業上的一大損害，也是我國許多果品外銷的限制因子之一⁽⁵⁾。雖然果樹在小果期可利用套袋⁽⁶⁾或選用化學藥劑^(16,26)等方式防治，但炭疽病菌在果樹開花期即可侵入感染，並潛伏於幼果表皮，此時期無法以套袋方式防治之，然而施用化學藥劑常導致藥害發生，且有病原菌易於產生抗藥性、污染環境及對人體造成傷害之虞。因此，尋求更安全、對環境更友善的防治方法成為當前重要的課題。

為落實永續農業之目標，積極研發對環境及人體危險性較低之植物保護資材是重要選項，以減少化學藥劑之施用，生產出無化學藥劑殘留，且對環境無害之安全農產品。目前研究顯示利用植物成分以防治植物病害是較具安全性的途徑之一^(10,14,17,18,28)，可利用植物先天固存之抑菌成分或後天經刺激產生之抗菌物質，以抵禦植物病原菌之攻擊^(8,12,14,17)。許多報告指出經提煉萃取後之植物精油，富含某些抑菌或抗菌物質^(8,11,14,18,27)，故本研究嘗試篩選市面上常見且宣稱具殺菌效果之植物精油，以六種常見果樹炭疽病菌為對象，測試其抑菌的功效，並以香蕉果實測試其防治病害的效果，期能作為往後開發天然植物保護製劑之參考依據。

材料與方法

植物精油之蒐集與母液之製備

由市面上購買常見之七種植物精油 (振詠興業有限公司, Zhen Yong Co., LTD., Taichung)，如肉桂 (Cassia,

Cinnamomum cassia Blume)、丁香 (Clove, *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry)、桉樹 (*Eucalyptus, Eucalyptus tereticornis* Smith)、茴香 (Anise, *Foeniculum vulgare* Mill.)、香茅 (Lemongrass, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)、檸檬桉 (Lemon Eucaly, *Eucalyptus citriodora* Hook) 及百里香 (Thyme, *Thymus vulgaris* L.) 等精油，取各種植物精油原液與 Tween 20 以 9:1 之體積比例混合即成為母液，震盪均勻後置於褐色玻璃瓶中，於室溫下儲存備用。

病原菌接種源之製備

取農業試驗所植物病理組真菌病害研究室保存之各種果樹炭疽病菌菌株，如印度棗炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、木瓜炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、芒果炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、文旦炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、蘋果炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) 和香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*) 等，經兩次單孢分離培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) 試管斜面中，並置於 24±2°C、每日 12 小時植物燈 (Fluorescent lamp • FL30BR Joint venture with Mitsubishi Electric corp. of Japan) 光照下培養約三星期。每一試管加入 10 毫升無菌水，經震盪後以兩層紗布過濾，以血球計數器 (hemocytometer) 計算孢子濃度，並以無菌水調整孢子懸浮液濃度為每毫升約含 10⁵ 個孢子。

植物精油對果樹炭疽病菌孢子發芽的抑制效果

μL 的肉桂精油、丁香油、檸檬桉精油及 $1000 \mu\text{L}$ 的香茅精油、百里香精油均可完全抑制其孢子發芽；對文旦炭疽病菌孢子而言，不含精油時發芽率為 78.35% ，而 $500 \mu\text{L}$ 的肉桂精油、丁香精油、香茅精油、檸檬桉精油及百里香精油均可完全抑制其孢子發芽；對蘋果炭疽病菌孢子而言，不含精油時發芽率為 97.25% ，而同樣地 $500 \mu\text{L}$ 的肉桂、丁香、香茅、百里香等精油及 $1000 \mu\text{L}$ 的檸檬桉精油均可完全抑制炭疽病菌孢子發芽。

以非線性迴歸 (nonlinear regression) 方式求得七種植物精油對炭疽病菌孢子發芽的半數抑制濃度 (IC_{50})，結果以肉桂精油的 IC_{50} 最低，亦即抑菌的效果最佳， IC_{50} 均低於 $98.7 \mu\text{L}$ ，其中又以對木瓜炭疽病菌的抑菌能力最強， IC_{50} 為 $39.1 \mu\text{L}$ ；而檸檬桉精油的抑菌能力次之，除對芒果與印度棗炭疽病菌的 IC_{50} 略高於丁香精油的 IC_{50} 外，對其他炭疽病菌的 IC_{50} 均低於丁香精油 (表一)。在七種植物精油之中，對六種炭疽病菌的孢子發芽抑菌能力最差者為桉樹精油， IC_{50} 高於 $2100 \mu\text{L}$ ；而百里香精油對印度棗炭疽病菌的 IC_{50} 為 $100.6 \mu\text{L}$ ，僅次於肉桂油，顯見炭疽病菌對精油的感受性亦有所不同 (表一)。以 IC_{50} 的數據而言，七種精油對香蕉與木瓜炭疽病菌的抑菌能力由高而低依次為肉桂、檸檬桉、丁香、香茅、百里香、茴香及桉樹精油，而對芒果、文旦及蘋果的抑菌能力依次為肉桂、檸檬桉、丁香、百里香、香茅、茴香及桉樹精油，而對印度棗炭疽病菌的抑菌能力則為肉桂、百里香、丁香、檸檬桉、香茅、茴香及桉樹精油。肉桂精油對六種炭疽病菌的抑菌能力最強，而桉樹精油的抑菌能力最差。反過來說，六種果樹炭疽病菌對不同精油的感受性不一。例如，

芒果、文旦及蘋果炭疽病菌對香茅精油的感受性低於其他炭疽病菌，而香蕉炭疽病菌對茴香精油的感受性高於其他炭疽病菌 (表一)。

另外，檢視七種植物精油對炭疽病菌孢子發芽的 99% 抑制濃度 (IC_{99})，其抑菌的趨勢與 IC_{50} 的情形類似。以肉桂精油對六種炭疽病菌的抑菌能力而言，其 IC_{99} 低於 $156.3 \mu\text{L}$ ，其中對蘋果炭疽病菌的 IC_{99} 為 $106.6 \mu\text{L}$ 最低 (表二)。

植物精油對香蕉果實炭疽病之抑制效果

以尚未完全成熟之香蕉果實浸漬於 $500 \mu\text{L}$ 之肉桂及丁香精油稀釋液中，測試兩種精油抑制香蕉炭疽病發生之效果。結果顯示肉桂精油能有效降低香蕉果實上炭疽病之罹病斑面積率，與不處理或以水處理的對照組呈現顯著性 ($P < 0.05$) 差異，而丁香精油則於處理後隔天即有促進香蕉產生炭疽病斑的現象，至第六天已嚴重發病，並較對照組之香蕉展現嚴重之炭疽病病徵 (表三)。一般而言，以 $500 \mu\text{L}$ 肉桂精油稀釋液浸漬處理效果最佳，具有明顯抑制香蕉炭疽病之效果。而對照組不論浸泡無菌水與否，在第三天皆可觀察到出現明顯病斑，至第六天則病斑增多且趨嚴重。

討論

果樹炭疽病是影響台灣水果樹架壽命的限制因子之一⁽⁵⁾，而目前水果外銷產業日漸蓬勃，更需要積極開發病害防治技術^(5, 13)。農民防治果樹炭疽病的主要方法為果實套袋與化學藥劑防治^(6, 15, 26)，但許多果樹在開花期及幼果

期不適合套袋，參考植物保護手冊選用推薦的化學藥劑時，又常產生藥劑種類繁多⁽¹⁶⁾，使農民面臨選擇上的困擾，某些藥劑更面臨病原菌產生抗藥性或防治效果不佳的問題而需重新篩選⁽²⁶⁾。為實現農業永續與農產品安全的目標，積極尋找對自然環境友好及人體健康低危險性之天然資材，進一步研製植物保護製劑，以減少或取代化學藥劑之施用，生產無化學藥劑殘留之安全農產品，成為當前重要的課題之一^(9, 17)。植物抑菌成分分為五大類：萜類與精油、酚類與多酚、生物鹼、多肽及混合物(粗萃物)⁽²⁸⁾，其中植物精油富含某些殺菌或抑菌成分之物質，具有一定的抑菌與防病能力^(1, 10, 11, 14, 18, 27, 28)。本研究測試七種植物精油對六種常見果樹炭疽病菌孢子發芽之抑制效果。結果七種精油之中以肉桂、丁香及檸檬桉三種精油的抑菌能力最佳， IC_{50} 分別小於 98.7、155.7 及 190.5 $\mu\text{L/L}$ 。而就炭疽病菌對精油之敏感性而言，各炭疽病菌對同一種精油的反應不一，如芒果、文旦及蘋果炭疽病菌對香茅精油的感受性低於其他炭疽病菌，而香蕉炭疽病菌對茴香精油的感受性高於其他炭疽病菌。蔡氏等(2006)測試殺菌劑對三種果樹炭疽病菌的抑制效果，發現菌株間對殺菌劑的反應不一，表明菌株抗藥性是主因⁽²⁶⁾。而本研究中除香蕉炭疽病菌為 *C. musae* 外，其他果樹炭疽病菌均為 *C. gloeosporioides*，但不同來源之 *C. gloeosporioides* 對精油的感受性不一，其原因是否為菌株已有寄主分化性或其他原因，則尚待進一步研究。另外，以肉桂精油、丁香精油 500 $\mu\text{L/L}$ 稀釋液處理香蕉果實後，發現肉桂油具有降低香蕉炭疽病發生之效果，而丁香精油則促進病害，推測丁香精油促進病徵表現之因，可能與精油造成香蕉果皮表面灼傷而利於病勢進展有

關。

大多數研究植物精油對植物病原真菌抑菌能力的報告都以測定菌絲生長與孢子發芽之抑制作用為主。在抑制菌絲生長方面，如 Ranasinghe 氏等 (2002) 指出肉桂及丁香油在 0.03 - 0.11% (v/v) 下可抑制 *Fusarium proliferatum*、*Lasioidiplodia theobromae* 和 *Colletotrichum musae* 等引起香蕉冠腐及炭疽病的病原菌菌絲生長⁽²³⁾；百里香精油在 0.06% 下可讓 *C. gloeosporioides* 和 *Rhizopus stolonifer* 二者的菌絲停止生長⁽¹⁰⁾，而 0.05% 的香茅精油和 0.4% 的肉桂精油對香蕉炭疽病菌 *C. musae* 和木瓜炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 具有殺菌效果 (fungicidal effect)⁽²⁰⁾。植物精油包括 *Lippia sidoides*、丁香羅勒 (*Ocimum gratissimum*)、馬鞭草檸檬桉 (*Lippia citriodora*) 和香茅在 1000 $\mu\text{L/L}$ 下可完全抑制炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) 菌絲生長⁽²⁵⁾，而柑桔油在 150 mg/L 可完全抑制芒果炭疽病菌菌絲生長⁽¹⁾。亦有一些報告利用精油的揮發性物質來達到抑菌的功效，如百里香精油在 76 $\mu\text{L/L}$ 下的揮發氣體可完全抑制炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* 的菌絲生長，同樣的效果下，肉桂與丁香精油的使用濃度需為 107 $\mu\text{L/L}$ ，而百里香與肉桂精油在濃度分別為 107 和 153 $\mu\text{L/L}$ 時具有殺菌效果⁽¹⁵⁾。亞香茅 (*Cymbopogon nardus* L.)、羅勒 (*Ocimum basilicum* L.)、檸檬桉和白豆蔻 (*Elettaria cardamomum* Maton) 等精油在 0.03-0.66% (v/v) 下對 *L. theobromae*、*F. proliferatum* 和 *C. musae* 具靜菌作用 (fungistatic effect)，而在 0.05-0.66% (v/v) 下有殺菌效果⁽²⁾。

在抑制孢子發芽方面，50 mg/L 的芥子精油(mustard oil) 抑制 70.8 % 炭疽病菌孢子發芽，而羅勒精油則抑制

64.7%孢子發芽⁽¹⁾。Midhila 和 Janardhana (2012)測試七種植物精油抑制咖哩樹炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) 孢子發芽與發芽管長度，發現不同精油的抑菌濃度不一，柑桔油在 1360 mg/L 時達最大抑制量，其次為 1720 mg/L 的香茅油和 2260 mg/L 的薄荷精油⁽²¹⁾。而 Souza Júnior 氏等 (2009)以 1000 µl/L 的精油包括 *Lippia sidoides*、丁香羅勒、馬鞭草檸檬桉、香茅和番石榴 (*Psidium guayava* var. *pomifera*) 等具有完全抑制 *C. gloeosporioides* 孢子發芽的效果⁽²⁵⁾。肉桂與丁香精油對黑胡椒 (*Piper nigrum* L.) 炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) 孢子發芽的半致死濃度小於 650 mg/L⁽²⁹⁾。Rozwalka 等 (2010)指出精油對炭疽病菌 (*C. gloeosporioides* 和 *C. musae*) 孢子的殺菌作用主要是使細胞解體或退化而導致孢子無法發芽⁽²⁴⁾。

據許多文獻報導，在果樹開花結果期時，炭疽病菌可能就已經侵入而潛伏^(7,9)，在以香蕉果實為對象的防治試驗中，直接從市面上購買尚未成熟、外表青黃但沒有明顯傷口或炭疽病斑的香蕉果實，由於推測購買的香蕉果實在尚未採收前就極有可能被炭疽病菌侵入潛伏，因此本試驗中不再接種炭疽病菌，直接將香蕉浸泡於篩選出的肉桂及丁香精油的 500 µl/L 水溶液中 10 分鐘，取出後觀察發病情形。結果香蕉在處理丁香精油後隔天即產生疑似炭疽病病斑，至第六天發病情形較對照組嚴重，而罹病組織經分離後，確定該病斑皆為炭疽病菌 (*C. musae*) 所致。而處理肉桂精油的香蕉果實至第六天，除果實外表轉黃成熟外，病斑數日與病斑面積的進展均十分緩慢，顯示在浸泡肉桂精油後，炭疽病菌在果實上的進展與危害受到限制而達到防治

效果；而處理丁香精油則可能造成香蕉果實受傷，反而使炭疽病發病更加嚴重。

純粹利用植物精油防治果樹炭疽病之報告不多，如黃色百香果 (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) 浸於 120 mg/L 香茅油溶液中 2 分鐘可防治由 *C. gloeosporioides* 引起的炭疽病⁽⁴⁾，木瓜果實浸於 0.12% (w/w) 百里香精油和 0.1% (w/w) 墨西哥萊姆精油溶液中可預防炭疽病危害達 50%⁽¹⁰⁾，而 250 µl/L 芥子精油和羅勒精油分別降低芒果果實炭疽病達 79.9% 和 66.7%⁽¹¹⁾。多數報告利用精油處理果實時都輔以佐劑配方或配合其他措施，以加強精油的防病效力，如木瓜浸於分別含 0.1% 百里香或 0.5% 墨西哥萊姆精油的牧豆樹膠乳劑 (mesquite gum emulsion) 中，可完全防治炭疽病的發生⁽¹⁰⁾；以 10% 阿拉伯膠 (gum arabic) 混合 0.4% 肉桂油作為生物農藥可防治香蕉和木瓜果實炭疽病⁽²⁰⁾；另外以 150 MPa 高靜水壓 (high hydrostatic pressure) 配合 750 mg/L 植物精油 (柑桔與香茅) 可作為木瓜果實炭疽病的防治方法⁽²²⁾。然而，使用精油防治果實炭疽病常會造成藥害的發生，Yulia 氏等 (2006) 測試多種植物精油發現高濃度下可抑制炭疽病菌的生長，但會造成辣椒切離葉產生藥害的情形，如由丁香芽和葉片萃取的精油造成中度毒害，而由肉桂樹皮和葉片萃取的精油則產生嚴重毒害⁽²⁹⁾。百香果果實浸泡於 120 mg/L 香茅油中造成 33.3 % 果實之果皮發生褐變，250 mg/L 時引起 76.6 % 果實褐變，而 500 mg/L 時則發生 100 % 褐變，嚴重影響外觀與品質，且高濃度精油處理之下使果皮褐變而罹病化，導致罹病指數偏高⁽⁴⁾。

Table 3. Effect of clove and cassia essential oils on control of banana anthracnose disease naturally infected by

Colletotrichum musae

Treatment	Lesion area per fruit (%)			
	0 d ¹	2 d	4 d	6 d
CK- (No treatment)	1.04 a ²	1.04 a	2.60 ab	4.17 b
CK+ (Water)	1.30 a	1.56 a	4.17 a	5.21 b
Clove oil (500 µl/L)	0.78 a	1.30 a	4.17 a	8.33 a
Cassia oil (500 µl/L)	0.78 a	0.78 a	1.04 b	1.04 c

¹ Days after banana fruit soaking in each essential oil for 10 min.² Data were combined the results from two trials. Means followed by the same letter in each column are not significant difference at 5% level by LSD test.

(2000倍)

綜合本研究結果發現，肉桂精油在 500 µl/L 時具有防治香蕉果實炭疽病發生之功效，試驗期間亦無發生藥害之現象，顯示具有發展為天然植物保護製劑之潛力。日後可進一步進行大範圍之溫室試驗或更大量的果實試驗，以檢驗肉桂精油可否應用於天然植物保護製劑之研發與製作，甚至普遍應用於實際田間栽培管理，或是果實採收後儲存或運輸時施行之浸藥措施。

427-429.

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Abd-Alla, M. A., and Haggag, W. M. 2013. Use of some plant essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of anthracnose disease of mango fruits (*Mangifera indica* L.) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). Intl. J. Agri. Forestry 3 (1): 1-6.
2. Abeywickrama, K., Anthony, S., and Watawala, R. 2003. Fumigant action of selected essential oils against banana fruit pathogens. J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka 31: 427-429.
3. AFA. 2012. Agriculture Statistics Yearbook 2012. Agriculture and Food Agency, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan. http://www.afa.gov.tw/GrainStatistics_index.asp?CatID=352
4. Anaruma, N. D., Schmidt, F. L., Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Delarmelina, C., Benato, E. A., and Sartoratto, A. 2010. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. In yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. Braz. J. Microbiol. 41: 66-73.
5. Ann, P. J. 1992. Mango diseases. Pages 86-95 in: Workshop on Fruit Tree Disease. Taiwan Phytopathol. Soc. Taichung, Taiwan. (in Chinese)
6. Ann, P. J., Leu, L. S., Chuang, T. Y., and Ko, C. W. 1998. Effect of fruit bagging and mulching on control of mango fruit anthracnose disease. Plant Pathol. Bull. 7: