

# 丁香油與植物營養防治十字花科蔬菜炭疽病之效果評估

林秋琍<sup>1</sup> 林宗俊<sup>1</sup> 黃振文<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 台中市 國立中興大學植物病理學系

<sup>2</sup> 聯絡作者：電子郵件：jwhuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-1676

接受日期：中華民國 99 年 8 月 13 日

## 摘要

林秋琍、林宗俊、黃振文. 2010. 丁香油與植物營養防治十字花科蔬菜炭疽病之效果評估. 植病會刊 19: 167-176.

篩選 8 種藥用植材對十字花科炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum* 之分生孢子發芽與菌絲生長的影響，結果發現丁香具有完全抑制本病原菌的效果。以不同濃度之丁香油處理本病原菌之分生孢子，發現 1250 ppm 丁香油即可以完全抑制分生孢子發芽。利用光學顯微鏡和掃描式電子顯微鏡觀察處理過丁香油的病原菌，發現丁香油會使病原菌之菌絲膨大變形外，亦會造成附著器原生質之滲漏。比較 1% (w/v) 丁香水溶性浸出液、2000 ppm 丁香油及 2000 ppm 丁香酚防治白菜炭疽病的效果，結果顯示丁香油與丁香酚均具有相當好的防治功效，且較丁香水溶性浸出液的防治率高 54% 以上。利用不同濃度之丁香水溶液防治白菜炭疽病，結果發現其濃度於 1500 ppm 時，防治效果可達 79%。在 1000 ppm 丁香油水溶液中分別添加 250 ppm 植物生長的基本元素 N、P、K、Ca 及 Mg 等鹽類，然後噴佈於植齡 25 天的白菜葉片上，結果發現 KNO<sub>3</sub>、H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 及 MgSO<sub>4</sub> 等可顯著地提高丁香油防治白菜炭疽病的效果。

關鍵詞：Colletotrichum higginsianum、十字花科蔬菜炭疽病、白菜、藥用植材、丁香油

## 緒言

利用天然植物資材或其抽出物防治作物病蟲害，是近年來世界各地植物保護工作努力追求的方向之一，西元 1989 年，Thompson 氏<sup>(12)</sup> 發現香芹酚 (carvacrol) 可防治 *Rhizopus* spp.、*Mucor* spp. 及 *Aspergillus* spp. 引起儲藏食物的腐敗。1995 年，Paster 等人<sup>(11)</sup> 以植物精油保護小麥及玉米穀粒免於 *Aspergillus flavus* Link、*A. niger* (Tiegh.) Speg. 和 *A. ochraceus* wilh. 的污染。1998 年，Hao 氏等人<sup>(3)</sup> 利用植物之抽出物抑制冷凍肉品的細菌 (*Aeromonas hydrophila* Chester & *Listeria monocytogenes* Murray et al.) 生長，其中以丁香 (clove) 及燈籠椒 (pimento) 的萃取物最有效果。此外，Lee 氏<sup>(5)</sup> 及 Moleyar 氏<sup>(9)</sup> 等人指出植物精油的主要成分可防阻蔬果食物的腐敗之外，也可抑制有害人體的細菌，如 *Clostridium perfringens* Veillon & Zuber 及 *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers 等。

往昔利用植物資材進行抑菌的研究工作大都偏重於食品安全與保鮮方面的領域。至於利用植物資材防治作物病害的工作，大多侷限於研究室中的測試成果。1959 年，Maruzzella 和 Balter 兩氏<sup>(8)</sup> 利用濾紙圓盤法測試 119 種植物精油對 12 種植物病原真菌生長的影響。1993 年，Northover 和 Schneider 兩者<sup>(10)</sup> 曾在果園中以葵花油、橄欖油、玉米油、大豆油、菜籽油及葡萄籽油等植物油防治蘋果白粉病菌 [*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm.] 與黑星病菌 [*Venturia inaequalis* (Cooke) Winter]，得到良好的防治效果，但對於菠菜白銹病之防治效果並不理想。2002 年，林氏<sup>(7)</sup> 發現肉桂 (*Cinnamomum cassia* Presl) 與丁香 (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) 可以有效防治立枯絲核菌為害甘藍的幼苗；他同時證明丁香酚是丁香防治立枯絲核菌的主要成分。筆者初步試驗，亦發現丁香具有抑制白菜炭疽病的功效。因此，本文主要目的在於評估丁

香防治白菜炭疽病的可行性，進而分析各種植物營養液是否會干擾丁香防治白菜炭疽病的效果，祈有助於丁香植物保護製劑之研發。

## 材料與方法

### 供試菌株來源

西元 1999-2000 年間赴桃園、新竹、苗栗、台中、彰化、雲林、高雄及花蓮等地之蔬菜栽培區採集白菜炭疽病之罹病株，經組織分離並獲得 27 菌株之 *Colletotrichum* spp.。經過柯霍氏法則逐一測試，確定各菌株之病原性後，取致病毒性高且生長穩定的 *Colletotrichum higginsianum* PA-01 與 PA-19 兩菌株作為本研究之供試菌種<sup>(6)</sup>。

### 供試菌之培養與保存

供試之白菜炭疽病菌 PA-01 與 PA-19 菌株以 PDA 斜面培養基培養及保存。為避免菌株產生變異與保持野生型，每隔 30 天進行單胞更新培養，每天並給予 12 小時光照(間接日光或 2 支 40 W 日光燈約 2000~3000 Lux，距培養試管 50 公分)和適當溫度(22~25°C)，使菌株生長保持穩定。

### 供試植株

以白菜 (*Brassica rapa* L. Chinese Group) 鳳山品種作為供試植物，種子係由鳳山熱帶園藝試驗所提供。將種子直播或育苗後移植於 3 吋盆中(盆內盛有大里砂質壤土與 BVB No.4 泥炭苔按 2:1 (v/v) 混合的介質)，培育 3-4 星期，供噴霧接種之用。

### 接種源之製備

刮取培養於 PDA 斜面上生長 14 天之 PA-01 與 PA-19 菌株的分生孢子堆，以無菌水配製成孢子懸浮液，經震盪器震盪約 10 秒，隨後調整分生孢子濃度為  $10^5$  (spores/ml)，作為噴霧接種之用。

### 噴霧接種法

本研究利用空氣壓縮機 (Rich Star Precision Industrial Co., Ltd, Italy) 噴霧接種本菌分生孢子於植株上，壓力設為 2 大氣壓 (atm)，噴霧顆粒直徑約為 0.1-0.3 mm，每葉片約噴 1 秒，供接種之葉片與噴槍的距離約 10-15cm。同時為了計算單位面積內所接種的菌量，將孢子懸浮液系列稀釋至  $10^3$  spores/ml，依上述

方法噴霧接種於 PDA 培養基平板上，於室溫下培養 3 天後，計算菌落出現之數目，再換算單位面積之孢子數。經換算後每平方公分面積的孢子數約為 50-80 個；接種後隨即將白菜植株套袋保濕一天，並移至溫室觀察植株之病勢發展。

### 病害調查法

病害調查係計算白菜植株第三與第四位葉(由上而下)之葉片上病斑的面積，並將其歸納成 5 級，其中無病斑者為 0 級，病斑佔葉片之比例 1-10% 為 1 級，11-25% 為 2 級，26-50% 為 3 級， $\geq 51\%$  為 4 級<sup>(4)</sup>，再以下列公式求得葉片的罹病度：

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

### 不同藥用植材對炭疽病菌分生孢子發芽與菌絲生長的影響

將肉桂 (*Cinnamomum cassia* Presl)、黃芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)、青黛 (*Polygonum tinctorium* Ait)、荷葉 (*Nelumbinis* spp.)、蛇床子 [*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.]、丁香 (*Eugenia caryophyllata* Thunb.)、山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc.) 及五味子 [*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.] 等八種藥用植材粉末，加入水中製備成濃度 2% (w/v) 之懸浮液，或再以高溫高壓 (121°C, 15 lb, 20 min) 滅菌後靜置一天，吸取上層之澄清液 5 $\mu$ l 與等體積的 PA-01 與 PA-19 菌株之分生孢子懸浮液 ( $4 \times 10^4$  spores/ml) 均勻混合於載玻片上，並蓋上蓋玻片，使其最後濃度為 1% (w/v)，將玻片以三角型玻棒支撐並放置於直徑 9 公分之玻璃培養皿內，加水保濕，置於 24 °C 之定溫箱，於 16 小時後取出並計算分生孢子的發芽百分率。此外，將培養於 2% (w/v) WA 培養基一星期之 PA-01 與 PA-19 菌絲圓盤 (6 mm 直徑) 置於含有 1% (w/v) 上述八種藥用植材的 PDA 平板中央，於 24°C 定溫箱培養，第八天觀察並記錄菌絲生長直徑。

### 丁香浸出液、丁香油及丁香酚對白菜炭疽病罹病度之影響

取白菜炭疽病菌 PA-19 菌株之分生孢子製成濃度為  $1 \times 10^5$  spores/ml 之孢子懸浮液，噴霧接種於白菜葉片，待葉片風乾後，再分別噴霧處理 1% (w/v) 丁香水溶性浸出液、2000 ppm 丁香油 (Clove oil, R. C. Treatt & Co. Ltd, England) 水溶液與 2000 ppm 丁香酚水溶液，

經套袋保濕一天並移至溫室觀察植株發病情形並記錄罹病度，每一處理有四重複，每一重複有一株供試植物。

### 丁香油對白菜炭疽病菌分生孢子發芽的影響

將丁香油加入去離子水，利用果汁機 (MX-185V, 國際牌) 均勻攪拌成乳白狀，製備成 500、1000、1500、2000、2500、3000、3500 及 4000 ppm 等不同濃度，然後分別取 5  $\mu$ l 之丁香油水溶液與等體積之 PA-01 和 PA-19 菌株孢子懸浮液 ( $4 \times 10^4$  spores/ml) 於玻片上均勻混合，每一玻片滴 2 滴並蓋上蓋玻片，使丁香油最後濃度為 250、500、750、1000、1250、1500、1750 及 2000 ppm，將玻片以三角形玻棒支撐，並放於直徑 9 cm 之玻璃培養皿內，加水保濕，置於 24°C 之定溫箱，16 小時後取出計算孢子的發芽率。

### 不同濃度丁香油對白菜炭疽病罹病度之影響

依上述之接種方法接種白菜葉片，隨後分別以 500、1000、1500、2000 及 2500 ppm 等不同濃度之丁香油水溶液處理白菜植株，經套袋保濕一天並移至溫室觀察植株發病情形，每一處理有三重複，每一重複有一株供試植物。

### 丁香油處理對白菜炭疽病菌形態的影響

取白菜炭疽病菌 PA-01 和 PA-19 菌株之分生孢子製成濃度約  $4 \times 10^4$  spores/ml 孢子懸浮液，取 20  $\mu$ l 滴於圓形玻片 (10mm, Marienfeld Co. Ltd., Germany) 上，置於三角形玻棒支撐的載玻片上，然後移至 9 cm 的玻璃培養皿中，加水保濕，在 28°C 定溫箱中培養，待分生孢子發芽形成附著器或長出菌絲後，以 10-20  $\mu$ l 丁香油水溶液 (1500 ppm) 處理菌絲約 12 小時，在光學顯微鏡 (Axioskop, Zeiss, Germany) 下觀察並記錄菌絲形態的改變。此外，以液態氮低溫處理附著器後，利用掃描式電子顯微鏡 (JSM-6330F, Field Emission Scanning Electron Microscope) 觀察分生孢子發芽後附著器的形態變化。

### 溫室中丁香油水溶液防治白菜炭疽病的效果測定

依上述方法配製丁香油水溶液，使其濃度為 1500 ppm，然後分別進行：(I) 先在植齡 3-4 星期的白菜植株上噴佈丁香油水溶液一天後，再接種白菜炭疽病菌孢子懸浮液 ( $1 \times 10^4$  spores/ml)；(II) 先將炭疽病菌噴霧接種於白菜葉片上，待葉片風乾後，再將丁香油水溶液噴佈於白菜植株上；(III) 先在白菜植株上接種炭疽病菌一天後，再噴佈丁香油溶液，與 (IV) 不噴佈丁香油溶

液，僅接種炭疽病菌等四種處理，接種後套袋保濕一天並移至溫室觀察植株發病情形，六天後，分別計算罹病度，其中每一處理各有四重複，每一重複有一株供試植物。

### 植物營養對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響

施用 1000 ppm 的丁香油水溶液防治白菜炭疽病的效果可達 50%，故取 1000 ppm 丁香油水溶液進行下列試驗：

氮肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：依前述之接種方法接種白菜葉片後，再分別處理含濃度 250 ppm 不同型態之氮肥，包括硝酸銨 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )、硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )、尿素 ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ )、硫酸銨 [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ]、硝酸鈉 ( $\text{NaNO}_3$ ) 及氯化銨 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 之丁香油水溶液 (1000 ppm)，隨後套袋保濕一天並移至溫室觀察植株的發病情形，在第六天記錄第三與第四位葉的罹病度。

磷肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：同上述方法接種白菜葉片後，再分別處理含濃度 250 ppm 不同型態之磷肥，如磷酸鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、磷酸銨 ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )、亞磷酸 ( $\text{H}_3\text{PO}_3$ )、磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 及磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 等之 1000 ppm 丁香油水溶液，並依上述方式處理與紀錄。

鉀肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：同上述方法接種白菜葉片後，再分別處理含濃度 250 ppm 不同型態之鉀肥，如氯化鉀 (KCl)、硫酸鉀 ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )、硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )、磷酸鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 及醋酸鉀 ( $\text{KHCO}_3$ ) 等鹽類之 1000 ppm 丁香油水溶液，並依上述方式處理與紀錄。

鈣、鎂肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：同上述方法接種白菜葉片後，再分別處理含濃度 250 ppm 不同型態之鈣、鎂肥，如碳酸鈣 ( $\text{CaCO}_3$ )、氯化鈣 ( $\text{CaCl}_2$ )、硝酸鈣 [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ]、硫酸鈣 ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、氯化鎂 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、硝酸鎂 [ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ] 及硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ ) 等鹽類之 1000 ppm 的丁香油水溶液，並依上述方式處理與紀錄。

## 結 果

### 不同藥用植材對白菜炭疽病菌分生孢子發芽與菌絲生長的影響

將肉桂、黃芩、青黛、荷葉、蛇床子、丁香、山茱萸及五味子等八種藥用植材之粉末溶於水中或經高溫高壓滅菌後，測試其水溶性浸出液 (1%, w/v) 對PA-

01 和 PA-19 菌株分生孢子發芽的影響，結果黃芩、丁香、肉桂、五味子、山茱萸等藥用植材對兩菌株之分生孢子發芽有明顯的抑制效果，其中又以黃芩與肉桂二種藥用植材具有 100% 之抑制效果 (表一)。以含有上述八種藥用植材各 1% (w/v) 的 PDA 平板培養基，分別培養 PA-01 和 PA-19 菌株，結果發現其中亦以肉桂、黃芩和丁香具有完全抑制菌絲生長的效果 (圖一)。

### 丁香浸出液、丁香油及丁香酚對白菜炭疽病罹病度之影響

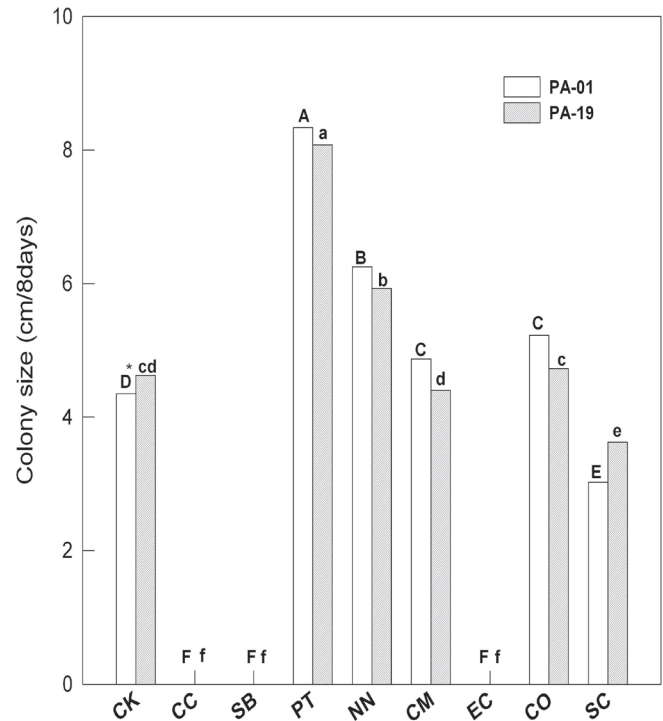
取 PA-19 菌株孢子懸浮液接種白菜植株後，以 1% (w/v) 丁香浸出液、2000 ppm 丁香油與 2000 ppm 丁香酚處理白菜，發現丁香油與丁香酚兩者均具有優異的防治效果；惟 1% (w/v) 丁香水溶性浸出液僅有 10% 左右之防治率 (圖二)。

### 丁香油對白菜炭疽病菌分生孢子發芽的影響

以不同濃度的丁香油溶液處理 PA-01 與 PA-19 菌株分生孢子，發現低濃度之丁香油水溶液 (250 ppm) 對兩菌株之分生孢子發芽率皆無抑制效果，惟隨著丁香油濃度逐漸地提高，分生孢子之發芽率即隨之下降，直到濃度提高至 1250 ppm 時，便可完全抑制分生孢子的發芽 (圖三)。

### 丁香油防治白菜炭疽病之效果

取 PA-19 菌株孢子懸浮液接種白菜植株後，並以不同濃度之丁香油水溶液處理，發現丁香油的防病效果隨其濃度增加而提高，當濃度達 1000 ppm 時即可



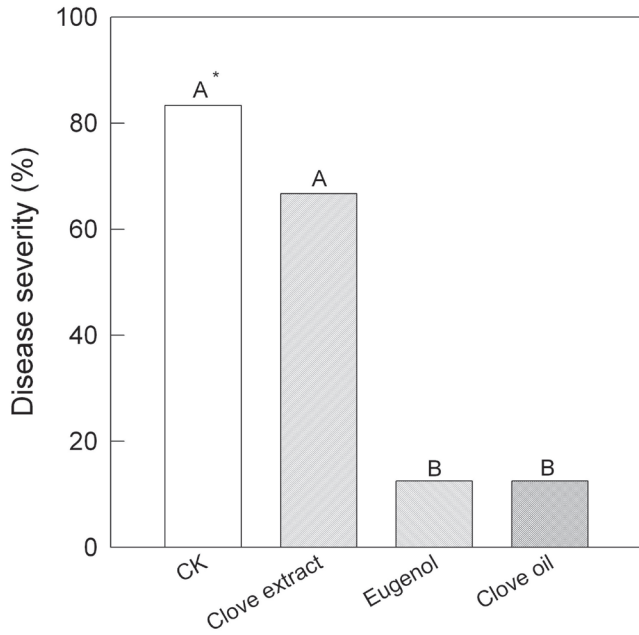
圖一、各種藥用植材 (1%, w/v) 對白菜炭疽病菌菌絲生長之影響。

Fig.1 Effect of 1% water-soluble extracts of medicinal plant materials on mycelial growth of *Colletotrichum higginsianum* isolates PA-01 and PA-19 on PDA plates for 8days. Notes: CC: *Cinnamomum cassia*; SB: *Scutellaria bacicalensis*; PT: *Polygonum tinctorium*; NN: *Nelumbio nucifera*; CM: *Cnidium monnieri*; EC: *Eugenia caryophyllata*; CO: *Cornus officinalis*; SC: *Schizandra chinensis*. \*Columns (n=4) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test (P=0.05).

表一、各種藥用植材水溶性浸出液對白菜炭疽病菌 PA-01 及 PA-19 分生孢子發芽的影響

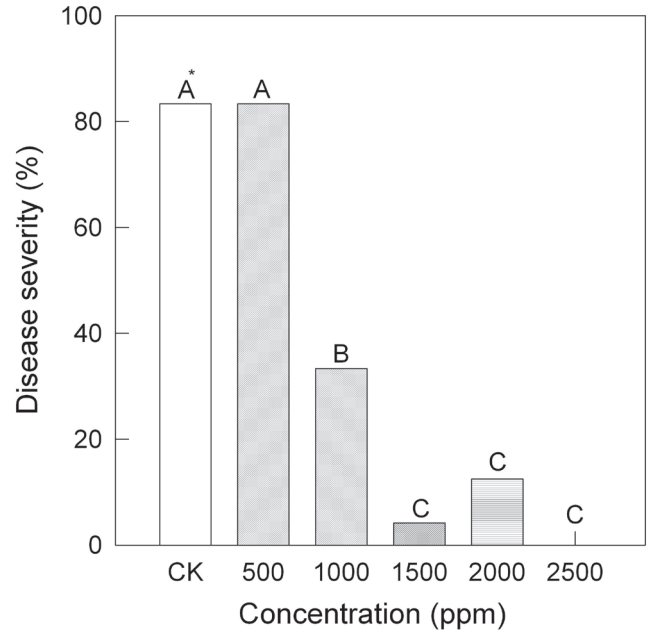
Table 1. Effect of 1% water-soluble extracts of various medicinal plant materials on conidial germination of *Colletotrichum higginsianum* isolates PA-01 and PA-19 at 24 °C for 12 hr

Medicinal plant material (1% w/v)	Germination (%)			
	PA-01		PA-19	
	Nonautoclaved	Autoclaved	Nonautoclaved	Autoclaved
<i>Cinnamomum cassia</i> Presl (肉桂)	0	0	0	0
<i>Scutellaria bacicalensis</i> Georgi (黃芩)	0	0	0	0
<i>Polygonum tinctorium</i> Ait (青黛)	17.68	93.67	71.65	75.38
<i>Nelumbio nucifera</i> Georgi (荷葉)	0	10.42	0	40.43
<i>Cnidium monnieri</i> (L.) Cuss. (蛇床子)	0	84.52	34.50	0
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb. (丁香)	17.68	0	0	0
<i>Cornus officinalis</i> Sieb et Zucc. (山茱萸)	23.23	0	17.25	57.85
<i>Schizandra chinensis</i> (Turcz.) Baill (五味子)	0	0	12.37	0
None (對照組)	88.95	69.87	79.62	91.13



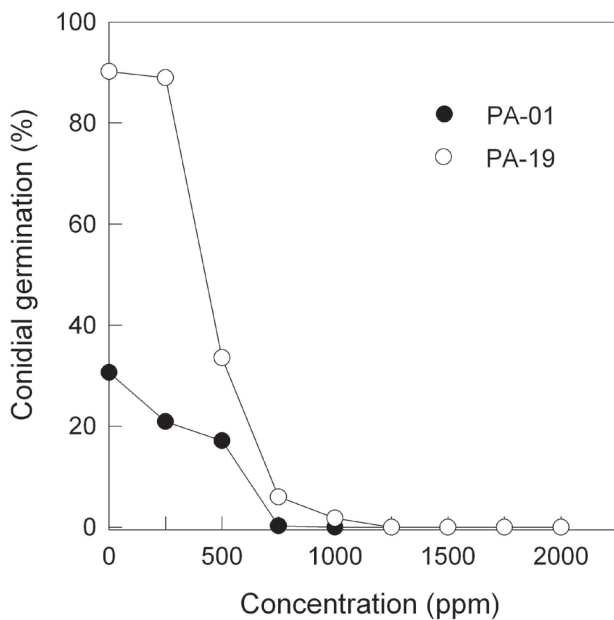
圖二、丁香水溶性浸出液 (1%, w/v)、丁香酚 (2000 ppm) 及丁香油 (2000 ppm) 防治白菜炭疽病的效果 (第六天的結果)。

Fig.2 Effect of clove water-soluble extracts (1%, w/v), eugenol (2000 ppm) and clove oil (2000 ppm) on control of Pak-choi anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum* isolate PA-19. (Data taken 6 days after treatment) \*Columns (n=4) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).



圖四、不同濃度之丁香油防治白菜炭疽病的效果 (第六天的結果)。

Fig.4. Effect of various concentrations of clove oil on control of Pak-choi anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum* isolate PA-19. (Data taken 6 days after treatment) \*Columns (n=4) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).



圖三、丁香油對白菜炭疽病菌分生孢子發芽率的影響。  
Fig.3. Effect of various concentrations of clove oil on conidial germination of *Colletotrichum higginsianum* isolates PA-01 and PA-19 at 24°C for 16 hrs.

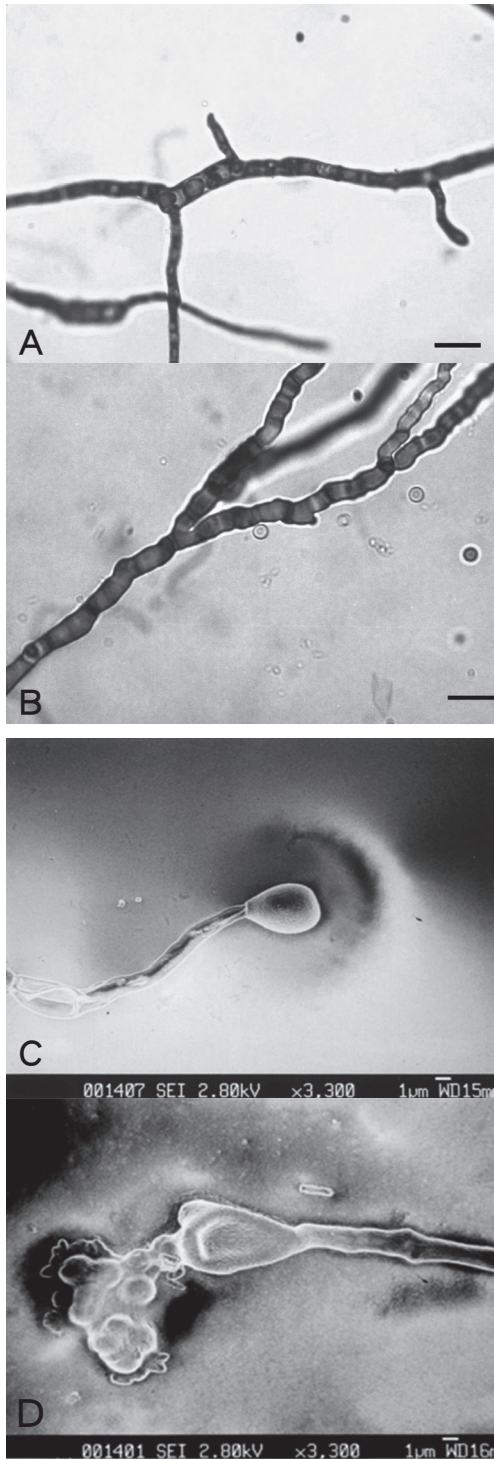
降低50% 的罹病度，達顯著的防治功效。若濃度大於 1500 ppm 時，病害防治效果可達到 70% 以上；惟再提高施用濃度，病害的防治效果並無顯著地提升 (圖四)。

### 丁香油對白菜炭疽病菌形態的影響

以 1500 ppm 丁香油水溶液處理病原菌之分生孢子及其菌絲一天後，以光學顯微鏡或掃描式電子顯微鏡觀察病原菌形態的變化，結果於光學顯微鏡下可清楚地發現未處理丁香油的菌絲表現正常 (圖五 A)；至於丁香油處理過之菌絲則有膨大及變形的現象 (圖五 B)；在掃描式電子顯微鏡下觀察丁香油處理與未處理之白菜炭疽病菌附著器，結果未處理者表現正常 (圖五 C)；至於處理過之附著器的原生質有滲漏外流的跡象 (圖五 D)。

### 溫室中丁香油水溶液防治白菜炭疽病的效果

丁香油與病原菌同時噴佈於白菜，具有優異的防治效果，顯示丁香油具有直接抑菌與殺菌的功效。惟



圖五、利用光學顯微鏡與掃描式電子顯微鏡觀察白菜炭疽病菌處理過丁香油溶液後，其菌絲與附著器的形態變化：(A) & (B) 對照組；(C) & (D) 處理 1500 ppm 丁香油溶液。

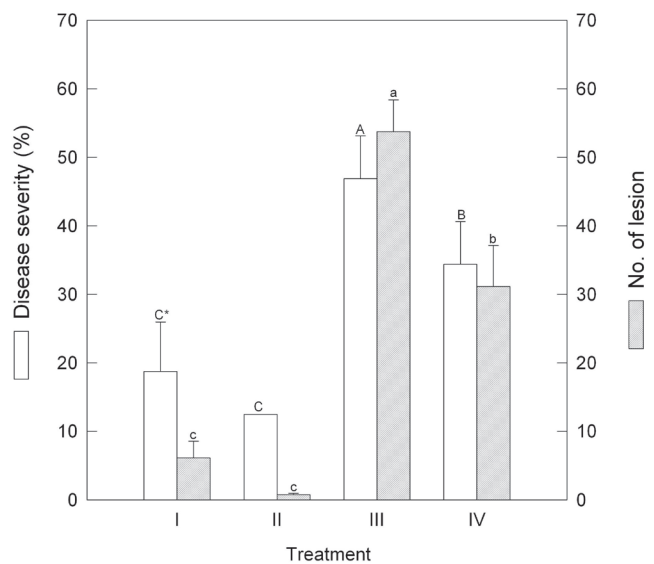
Fig.5. Light and scanning electron micrographs of morphological deformations of *Colletotrichum higginsianum* hyphae and appressorium treated with clove oil [(A) & (B): check (normal), (C) & (D): hyphae were swelled and cytoplasm of appressorium was leaked out after treatment with 1500 ppm of clove oil]. Bars: A, B=30  $\mu$ m.

丁香油也具有預防白菜炭疽病發生的效果，即白菜植株噴佈丁香油後再接種 PA-19 病原菌可以達到顯著的防病功效 (圖六)。若接種病原菌一天後，再噴佈丁香油，則病害發生率反而高於對照組。

### 植物營養對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響

氮肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：於 1000 ppm 的丁香油水溶液中添加 250 ppm 之不同氮肥與不添加者，分別噴佈於同時接種白菜炭疽病菌 ( $1 \times 10^5$  spores/ml) 的白菜植株上，結果發現單獨施用不同氮肥時，除了氯化銨與尿素會降低白菜炭疽病的罹病度外，其餘氮肥對病害發生的影響並不顯著。若將各氮肥添加於丁香油水溶液中混合施用，則發現硝酸鉀可提高丁香油防治白菜炭疽病的效果 (圖七)。

磷肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：於 1000 ppm 的丁香油水溶液中添加 250 ppm 之不同磷肥



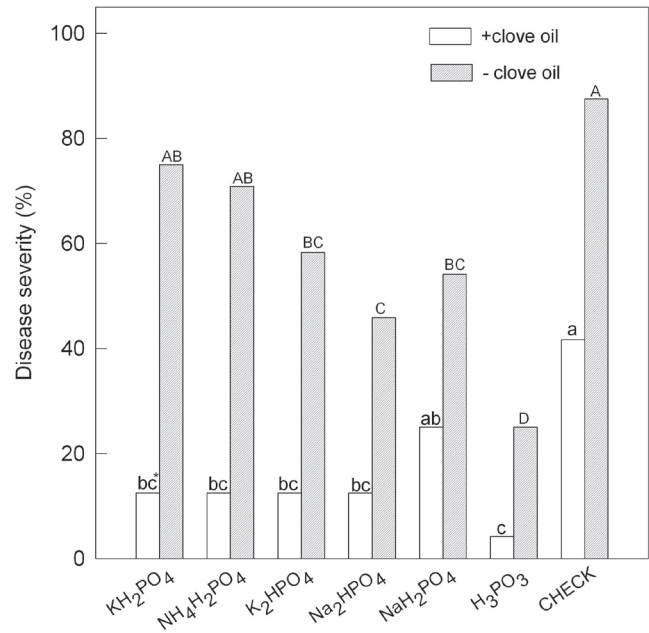
圖六、於接種前後不同時間點施用丁香油 (1500 ppm) 防治白菜炭疽病的效果。(I) 植株噴佈丁香油一天後再接種病原菌，(II) 植株噴佈丁香油同時接種病原菌，(III) 植株接種病原菌後一天再噴佈丁香油及(IV) 植株接種炭疽病菌，但不噴佈丁香油。

Fig.6. Effect of application time-point for clove oil on reducing disease severity and lesion number of Pak-choi anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum* isolate PA-19. Application of clove oil (1500 ppm) was conducted (I) one day before inoculation with the pathogen, (II) at the same time as inoculation with the pathogen, (III) one day after inoculation with the pathogen, and (IV) plants were inoculated without spraying clove oil. \*Columns (n=3) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).

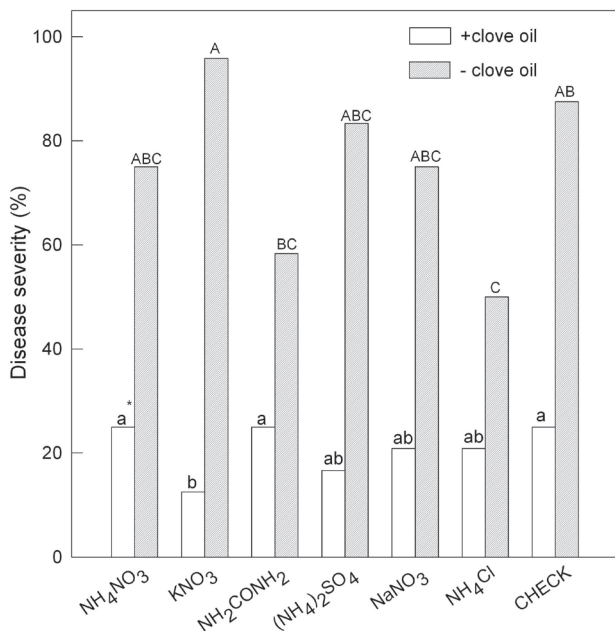
與不添加者，分別噴佈於接種過白菜炭疽病菌 ( $1 \times 10^5$  spores/ml) 的白菜植株，結果發現單獨施用磷肥時，發現亞磷酸 ( $H_3PO_3$ )、磷酸氫二鉀 ( $K_2HPO_4$ )、磷酸氫鈉 ( $NaH_2PO_4$ )及磷酸氫二鈉 ( $Na_2HPO_4$ ) 可顯著地降低白菜炭疽病的罹病度，其中以亞磷酸的效果最好，可降低約60%以上；若將各磷肥添加於丁香油水溶液中混合施用，發現除了磷酸氫鈉 ( $NaH_2PO_4$ ) 之外，所有供試的磷肥皆可提高丁香油防治白菜炭疽病的效果，其中以亞磷酸增進的效果最好，可使白菜炭疽病的罹病度降至 5% 以下 (圖八)。

鉀肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：於 1000 ppm 的丁香油水溶液中添加 250 ppm 之不同鉀肥與不添加者，分別噴佈於接種過白菜炭疽病菌的白菜植株，結果顯示單獨施用鉀肥對白菜炭疽病的發生並無影響；至於添加不同鉀鹽於丁香油水溶液中，發現以硫酸鉀、磷酸鉀、醋酸鉀及硝酸鉀等四者可提高丁香油防治炭疽病的效果 (圖九)。

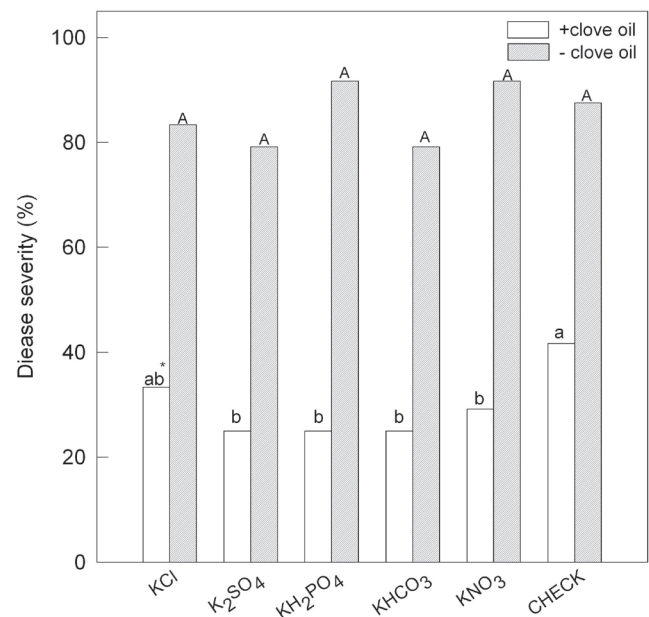
鈣、鎂肥對丁香油防治白菜炭疽病效果的影響：於 1000 ppm 的丁香油水溶液中添加 250 ppm 之不同鈣、鎂肥與不添加者，分別噴佈於接種過白菜炭疽病菌的白菜植株，結果發現碳酸鈣、硫酸鈣及硝酸鎂等



圖八、各種磷肥對丁香油防治白菜炭疽病功效的影響。  
Fig.8. Effect of various phosphorus sources (250 ppm) with or without 1000 ppm of clove oil on control of Pak-choi anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum* isolate PA-19. \*Columns (n=3) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).



圖七、各種氮肥對丁香油防治白菜炭疽病功效的影響。  
Fig.7. Effect of various nitrogen sources (250 ppm) with or without 1000 ppm of clove oil on control of Pak-choi anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum* isolate PA-19. \*Columns (n=3) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).



圖九、各種鉀肥對丁香油防治白菜炭疽病功效的影響。  
Fig.9. Effect of various potassium sources (250 ppm) with or without 1000 ppm of clove oil on control of Pak-choi anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum* isolate PA-19. \*Columns (n=3) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).

鹽類會促進白菜炭疽病的發生，其中以碳酸鈣最為嚴重；若將鎂、鈣鹽添加於丁香油水溶液中混合施用，發現硝酸鈣、硫酸鈣、硝酸鎂、氯化鎂及硫酸鎂等均會顯著提高丁香油防治炭疽病的效果(圖十)。

## 討 論

筆者測試 8 種藥用植材對白菜炭疽病菌分生孢子發芽與菌絲生長的影響，結果發現丁香、肉桂與黃芩三種藥用植材之水溶性浸出液 (1%, w/v) 對分生孢子發芽率及菌絲生長的具有顯著的抑制效果。此外，也嘗試直接將丁香、肉桂與黃芩之浸出液用於防治白菜炭疽病，結果發現丁香與肉桂的防治效果最佳，由於肉桂的價格較丁香昂貴，因此選擇丁香作為防治白菜炭疽病的植材。

本研究發現 1250 ppm 丁香油，即可完全抑制白菜炭疽病菌之分生孢子發芽。1996 年，陳氏<sup>(2)</sup>以不同之植物油抑制植物病原真菌孢子發芽，結果發現 2500 ppm 丁香油可以有效抑制 15 屬 21 種真菌之孢子

發芽。植物油具有靜菌 (fungistatic) 或殺菌 (fungicidal) 的功效。Tombe 等人<sup>(13)</sup>發現丁香酚可促使 21 種 *Fusarium oxysporum* 及其他九種植物病原菌的菌絲產生腫脹及破損等現象。Adams 和 Weidenborner 兩氏<sup>(1)</sup>指出丁香酚可導致 *Cladosporium herbarum* 的菌絲變形。林氏<sup>(7)</sup>也發現丁香酚可以破壞 *Rhizoctonia solani* AG-4 菌絲之細胞壁。由於丁香油含有高量的丁香酚，因此筆者以 1500 ppm 丁香油水溶液處理白菜炭疽病菌後，發現炭疽病菌的菌絲膨大變形外，其附著器的原生質亦會大量滲漏，顯示高濃度丁香油對白菜炭疽病菌具有直接殺菌的功效。

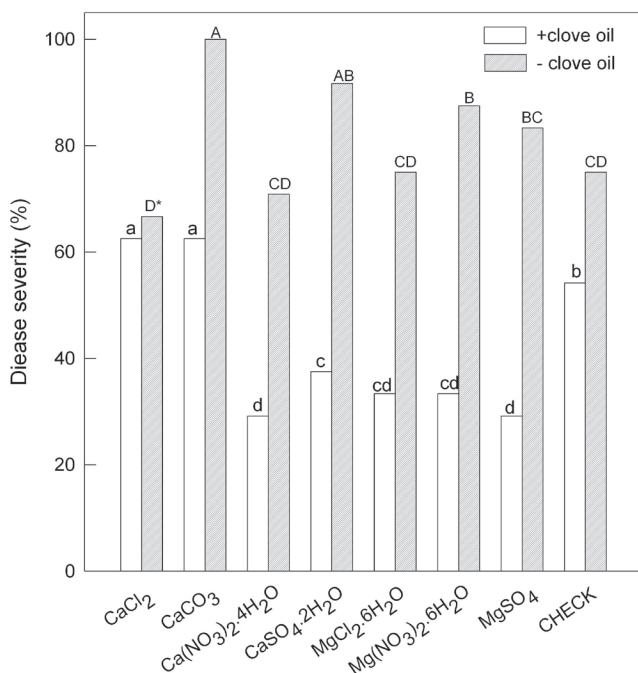
由於丁香油不溶於水，因此施用丁香油前，首先需設法使其處理成微粒化且均勻懸浮於水中。一般油類大多以鹼進行皂化反應；本研究係採用物理均質方法促使丁香油均勻懸浮於水中，但此方法不夠方便，因此需進一步尋找皂化丁香油的物質，並分析研究其防治的功效，將有助於提升丁香油防治白菜炭疽病的實用性。此外，本研究探討丁香油配合植物生長需求的基本要素是否會影響它防治白菜炭疽病的功效，藉以調整丁香植物保護製劑配方。發現不同的氮、磷、鉀、鈣和鎂等來源，會以不同程度影響丁香油防治本病的功效。上述結果顯示硝酸鉀、亞磷酸、硫酸鉀、硫酸鈣及硫酸鎂等具有提升丁香油防治白菜炭疽病的功效，因此嘗試探討皂化技術，配合植物生長要素將可成功開發出丁香油植物保護製劑產品，進而協助永續安全農業的推動。

## 謝 辭

本研究部份工作承農糧署計畫 (96 農科 -4.2.3- 糧 -Z3) 及防檢局計畫 (98 農科 -9.2.4- 檢 -B4) 經費資助完成，特此致謝。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Adams, S., and Weidenborner, M. 1996. Mycelial deformation of *Cladosporium herbarum* due to the application of eugenol or carvacrol. *J. Essent. Oil Res.* 8: 535-540.
2. Chen, C. M. 1996. Effects of plant oils on spore germination of plant pathogenic fungi. *Res. Bull. Hualien Dist. Agric. Res. Ext. Sta.* 12: 71-90. (in Chinese).
3. Hao, Y. Y., Brackett, R. E., and Doyle, M. P. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *J. Food Prot.* 61: 307-312.
4. James, C. 1971. *A Manual of Assessment Keys for Plant*



圖十、各種鈣、鎂肥對丁香油防治白菜炭疽病功效的影響。

Fig.10. Effect of calcium and magnesium sources (250 ppm) with or without 1000 ppm of clove oil on control of Pak-choi anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum* PA-19. \*Columns (n=3) followed by the same letter do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).



- Disease. The American Phytopathological Society. U. S. A. 41 pp.
5. Lee, H. S., and Ahn, Y. J. 1998. Growth-inhibiting effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. *J. Food. Prot.* 61: 616-619.
  6. Lin, C. L., and Huang, J. W. 2002. The occurrence of cruciferous vegetable anthracnose in Taiwan and identification of its pathogen. *Plant Pathol. Bull.* 11: 173-178 (in Chinese with English abstract).
  7. Lin, T. C., Cheng, K. T., and Huang, J. W. 2002. Effect of clove and its major component on control of *Rhizoctonia* damping-off of cabbage seedlings. *Plant Pathol. Bull.* 11: 189-198 (in Chinese with English abstract).
  8. Maruzzella, J. C., and Balter, J. 1959. The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Dis Rep.* 43: 1143-1147.
  9. Moleyar, V., and Narasimham, P. 1986. Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiol.* 3: 331-336.
  10. Northover, J., and Schneider, K. E. 1993. Activity of plant oils on disease caused by *Podosphaera leucotricha*, *Venturia inaequalis*, and *Albugo occidentalis*. *Plant Dis.* 77: 152-157.
  11. Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., and Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oil applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Prot.* 58: 81-85.
  12. Thompson, D. P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil component on food storage fungi. *Mycologia* 81: 151-153.
  13. Tombe, M., Kobayashi, K., Oniki, M., and Ogoshi, A. 1995. Toxicity of clove eugenol against several pathogenic fungi. *Indonesian J. Crop Sci.* 10: 11-18.

## ABSTRACT

Lin, C. L.<sup>1</sup>, Lin, T. C.<sup>1</sup>, and Huang, J. W.<sup>1,2</sup> 2010. Evaluation for efficacy of clove oil and plant nutrients on controlling the cruciferous vegetable anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum*. Plant Pathol. Bull. 19: 167-176 (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, 250 Kuo Kuang Rd., Taichung 402, Taiwan R.O.C.; <sup>2</sup>Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw)

Eight medicinal plant materials were evaluated for their effects on conidial germination and mycelial growth of the anthracnose fungus of cruciferous vegetable, *Colletotrichum higginsianum* isolates PA-01 and PA-19 on potato dextrose agar plates. Among these, clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) completely inhibited the conidial germination and mycelial growth at the concentration of 1% (w/v) whether it was autoclaved. In addition, the clove oil, the major component of clove, was completely effective in inhibiting conidial germination at 1250 ppm. Observations under light and scanning electron microscopes indicated that the hyphae were swelled and cytoplasm of appressoria were leaked out when the fungus was treated with clove oil at 1500 ppm for 12 hours. The clove water-soluble extracts, clove oil, and eugenol were respectively used to control Pak-choi anthracnose. The results showed that clove water-soluble extracts reduced 10% of disease severity of anthracnose, furthermore, clove oil and eugenol were equally effective in reducing more than 70% disease severity compared to the control. In greenhouse tests, clove oil could reduce disease severity of Pak-choi anthracnose when plants were sprayed one day before inoculation of the pathogen or at the same time as the pathogen was inoculated. However there was no effect on controlling this disease when plants were sprayed one day after the inoculation of the pathogen. The efficiency of clove oil on control of Pak-choi anthracnose were markedly increased when it was mixed with chemical fertilizer. It was found that  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , and  $\text{MgSO}_4$  were able to enhance the effect of clove oil on control of this disease.

Key words: Cruciferous vegetable anthracnose, Pak-choi, *Colletotrichum higginsianum*, medicinal plant materials, clove, clove oil