

# 丁香及其主成分防治甘藍苗立枯病的功效

林宗俊<sup>1</sup> 鄭可大<sup>2</sup> 黃振文<sup>1,3</sup>

1 台中市 國立中興大學植物病理學系

2 台北市 台北醫學大學生化學科

3 聯絡作者：電子郵件 jwhuang@nchu.edu.tw，傳真：+886-4-22851676

接受日期：中華民國91年10月15日

## 摘要

林宗俊、鄭可大、黃振文. 2002. 丁香及其主成分防治甘藍苗立枯病的功效. 植病會刊11:189-198.

甘藍立枯病菌 (*Rhizoctonia solani* AG-4) 引起甘藍幼苗猝倒與死亡的現象，是甘藍幼苗栽培的主要限制因子之一。在溫室的帶菌栽培介質中，添加0.5% (w/v) 丁香可有效降低甘藍立枯病的發病率達52-60%。將丁香粉末利用不同溶劑萃取，並進行抑菌的生物分析，結果證明由正己烷萃出之萃出物可完全抑制 *R. solani* AG-4 菌絲生長。進一步，以管柱層析法純化正己烷萃出物並做活性測試，結果發現管柱層析純化之主要成分的2500倍稀釋液可完全抑制 *R. solani* AG-4 菌絲的生長。此主要成分經核磁共振光譜儀 NMR 300MHz 分析，確定為丁香酚 (eugenol)，其化學分子式為  $C_{10}H_{12}O_2$ 。此外，丁香的抑菌物質具有揮發的煙蒸特性，在光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡下觀察，發現丁香煙蒸處理過之菌絲表面出現皺縮，細胞壁穿孔、原生質滲漏，菌絲或菌絲尖端腫脹破裂及菌絲分枝出現異常等現象。利用薄層色層分析檢測，發現丁香抑菌與殺菌的揮發性物質亦為丁香酚。綜合上述諸研究證明丁香添加於介質中防治甘藍立枯病的主要有效成分為丁香酚。

關鍵詞：甘藍、甘藍立枯病、丁香、丁香酚、栽培介質

## 緒言

甘藍苗期的主要根部病害有兩種，即立枯病與猝倒病。當立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 感染甘藍種子或幼苗後，可造成種子腐爛，植株猝倒、根腐、莖腐、葉斑或萎凋等病徵，是甘藍幼苗培育過程的主要限制因子之一。雖然施行化學藥劑如噴佈殺紋寧 (Hymexazol)、福拉比 (Furametpyr)、賓克隆 (Pencycuron) 及福多寧 (Flutolanil) 等可快速有效的防治種苗病害，但過度施用化學藥劑，卻會污染環境與傷及非標的生物<sup>(6)</sup>，且會誘使抗藥性菌株的出現<sup>(15)</sup>。因此，設法尋找藥用植物資材，藉以替代化學藥劑，作為防治植物病害的手段，成為今後努力的方向之一。

往昔，有關植物性資材與精油用於食品防腐及保存的研究頗多<sup>(8,9,12,13)</sup>，同時亦有許多用於防治害蟲的報告<sup>(4,10,11)</sup>。然而卻少有利用藥用植物資材防治作物病害的研究；即使有，亦僅侷限於室內培養皿的測試結果<sup>(7)</sup>。近年來，筆者初步由一百餘種的植物藥材中，測試它們抑制 *R. solani* AG-4 的效果，結果發現丁香的抑菌功效相當良好。因此，本文的主要目的在於評估丁香防治甘藍立枯病的功效，進而探討它的主要抑菌成分為何？祈有助於建立藥用植物保護製劑，用於防治作物病害的研發基礎。

## 材料與方法

### 供試植物與菌株

以甘藍 (*Brassica oleracea* L.) 高峰品種作為供試植物，所使用之試驗種子均自農友種苗公司購買。甘藍種子經1% (v/v) 次氯酸鈉 (NaOCl) 消毒3分鐘後，直播於介質 (BVB No.4 泥碳苔，荷蘭) 中，深度均不超過0.5公分。供試菌株係採用保存於興大植病系病害管理研究室的 *Rhizoctonia solani* AG-4 RST-02 與 RST-04 菌株，兩者分別由甘藍立枯病的罹病植株分離獲得。

### 接種源之製備

取100g馬鈴薯切成絲狀的小片段後，裝填於250ml三角燒杯內，經高溫高壓 (121°C, 15 lb, 15 min) 滅菌後，待溫度降至30°C以下時，隨即接種在PDA (potato dextrose agar) 平板生長三天之 *R. solani* RST-02 與 RST-04 菌絲塊各乙片 (直徑6mm)。在室溫下培養七天後，將長滿菌絲的馬鈴薯基質與滅菌過的BVB No.4 泥碳苔按1:10的比例 (w/w) 均勻拌合，調整介質水份含量在40-45% (w/v) 左右，隨後每二天混拌一次，並定期加水保持濕潤，兩星期後即製成帶菌介質接種源。

## 不同濃度之丁香對甘藍立枯病發生的影響

將 0、0.25、0.5、0.75 及 1% (w/v) 的丁香分別添加於帶菌的 BVB No.4 泥碳苔介質中，均勻拌合後，於處理當天及一星期後，每盆介質直播甘藍種子 10 粒，每一處理有三重複，隨後移置於 28°C 之植物生長箱或溫室中，二十一天後記錄植株發病百分率。

## 丁香防治甘藍立枯病的主要有效成分分析

丁香抑菌有效成分的萃取：稱取 50 公克丁香粉末置於 500 ml 三角瓶中，注入 300 ml 甲醇 (methanol) 後，將三角瓶移置 55°C 水浴槽中，每 5 分鐘振盪 1 次，1 小時後將甲醇萃取液過濾，移入 500 ml 圓底燒瓶中在減壓濃縮機 (Rotavapor R-124, BÜCHI) 進行濃縮 (300 mbar, 55°C, 72 rpm)，除去甲醇。隨後在原來的 500 ml 三角瓶內再加入 300 ml 甲醇，重複上述步驟萃取二至三次，即得甲醇可溶性之丁香粗萃取物。

將 200 ml 正己烷 (hexane) 加入含有上述丁香粗萃取物之 500 ml 圓底燒瓶中於減壓濃縮機旋轉萃取 (1010 mbar, 55°C, 72 rpm)，1 小時後將正己烷萃取液過濾，置入另一 500 ml 圓底燒瓶中於減壓濃縮機濃縮 (220 mbar, 55°C, 72 rpm)。隨後原來的 500 ml 圓底燒瓶內再加入 200 ml 正己烷，重複上述步驟萃取數次，可得到正己烷可溶性物質、不溶性物質與甲醇可溶性之丁香粗萃取液，再以薄層色層分析 (TLC developing solution : 20 % ethyl acetate in hexane) 之，確定是否萃取完全。

將上述不溶性物質取一小部分，以乙酸乙酯 (ethyl acetate) 測試，發現仍有少部分物質可溶於乙酸乙酯中，因此進一步以乙酸乙酯萃取。取 150 ml 乙酸乙酯加入含有不溶性物質之 500 ml 圓底燒瓶中，於減壓濃縮機旋轉萃取 (1010 mbar, 55°C, 72 rpm)，1 小時後將乙酸乙酯萃取液過濾置入另一 500 ml 圓底燒瓶中於減壓濃縮機濃縮 (220 mbar, 55°C, 72 rpm)。原來的 500 ml 圓底燒瓶再加入 150 ml 乙酸乙酯重複上述步驟萃取數次，所得到之乙酸乙酯可溶性物質、不溶性物質與甲醇可溶性之丁香粗萃取液，再以薄層色層分析 (TLC developing solution : 10 % chloroform in methanol) 之，確定萃取完全。經上述萃取後，剩餘之物質為甲醇可溶性物質。另外第一次以甲醇萃取剩下之粉末，同時也以水萃取可溶性物質。

丁香不同分配層萃出物對立枯絲核菌菌絲生長的影響：將 *R. solani* AG-4 RST-02 與 RST-04 菌株之菌絲塊，移植在添加有正己烷、乙酸乙酯、甲醇及水層萃出物 (B1, B2, B3 及 B4) 分別稀釋 500 及 1000 倍 (即 2000 及 1000 ppm) 之 2%WA 平板上，並以未添加萃出物及助溶劑 (dimethyl sulfoxide 及 9.5% ethanol) 之 2%WA 平板作為對照。在室溫 (25-28°C) 下，48 小時後量取各處理之菌落大小，並以下列公式求取萃出物的抑菌百分率。

$$\text{抑菌百分率} = \frac{(\text{對照組菌落大小}) - (\text{處理組菌落大小})}{(\text{對照組菌落大小})} \times 100$$

丁香有效抑菌成分之進一步純化分離：比較不同分配層萃出物對 *R. solani* AG-4 菌絲生長的抑制生物活性分析後，將具有強抑制生物活性之萃出物 B1 進一步利用管柱層析 (column chromatography) 純化之，管柱層析所使用填充的材質為 silica gel (0.063-0.200 mm, Merck)。將欲分析之 B1 樣品倒入管柱中，然後以溶劑【將正己烷與乙酸乙酯以不同比例 (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 等五種) 分別混合，調製成低極性到高極性的溶劑】依序注入管柱中，並以玻璃管收集層析後之溶液。再以薄層色層分析法 (TLC developing solution : 5 % ethyl acetate in hexane and 10 % ethyl acetate in hexane) 檢測管柱層析分離的結果。

丁香有效抑菌成分的鑑定：比較管柱層析分離純化之成分對 *R. solani* AG-4 菌絲生長的抑制生物活性測試後，將具有抑制 *R. solani* AG-4 菌絲生長效果的主要成分，再以核磁共振光譜儀 NMR 300MHz (Varian, VXR 300) 分析確定其結構。

介質中添加丁香的抑菌成分鑑定：將帶菌的 BVB No.4 泥碳苔介質，添加 0 及 0.5% (w/w) 的丁香，在溫室進行防治試驗 7 天後，將各處理之介質陰乾，隨後按上述方法萃取抑菌成分，即利用甲醇熱迴流萃取介質中的抑菌成分後，於減壓濃縮機濃縮 (220 mbar, 55°C, 72 rpm) 除去溶劑，再加入正己烷萃取，進而以薄層色層分析 (TLC developing solution : 20 % ethyl acetate in hexane) 進行比對測試。

## 丁香揮發物對立枯絲核菌菌絲生長的影響

切取 *R. solani* AG-4 RST-02 及 RST-04 菌株之菌絲塊，移植到 2%WA 平板上，然後將培養皿 (90 x 15 mm Petri Dish, Alpha plus scientific corp., Taiwan) 底皿 (含有接種過病原菌的 2%WA 平板) 倒置於另一盛有 0.25、0.5、0.75 及 1% (w/v) 丁香水溶液 (10 ml) 之培養皿上，隨即裹以石臘膜 (parafilm, American National Can) 密封之。此外，以純水 (10 ml) 作為對照。在室溫 (25-28°C) 下，48 小時後量取各處理之菌落大小，並以前述公式求取丁香揮發物的抑菌百分率。

## 丁香揮發物對立枯絲核菌菌絲形態的影響

將 *R. solani* AG-4 RST-02 菌株之菌絲塊，移植於 PDA 平板上，24 小時後將圓形蓋玻片 (10 mm  $\phi$ , MARIENFELD Co. Ltd., Germany) 放置於菌絲邊緣，8 小時後，當菌絲長至圓形蓋玻片中央時，將培養本菌菌絲之培養皿底皿倒置於另一盛有 1% (w/v) 丁香水溶液 (10 ml) 之培養皿上，隨即裹以石臘膜 (parafilm, American National

Can) 密封之。此外，以純水 (10 ml) 作為對照。在室溫 (25-28 °C) 下，24 小時後觀察丁香揮發物對立枯絲核菌菌絲形態的影響。

在光學顯微鏡下觀察：將覆蓋有 *R. solani* AG-4 菌絲之圓形蓋玻片放置於載玻片上，於光學顯微鏡 (Axioskop, Zeiss, Germany) 下，觀察丁香揮發物對立枯絲核菌菌絲形態的影響。

在掃描式電子顯微鏡下觀察：將覆蓋有 *R. solani* AG-4 菌絲之圓形蓋玻片，以 1% 鉍酸 (1% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer) 燻蒸固定 12 小時後，以雙面膠粘貼於鋁製的載物台上，於離子覆被機 (ion coater, IB-2, Giko Engineering Co. Ltd., Japan) 上裹覆一層厚約 15 nm 的金膜，隨後在 15 kV 電壓之日立 S-570 掃描式電子顯微鏡 (Hitachi S-570, Hitachi Co. Ltd., Tokyo Japan) 下，觀察丁香揮發物對立枯絲核菌菌絲形態的影響。

### 丁香揮發物的成分鑑定

切取 *R. solani* AG-4 RST-02 及 RST-04 菌株之菌絲塊，移植到 2% WA 平板上，然後將培養皿底皿倒置於另一盛有 1% (w/v) 丁香水溶液 (10 ml) 之培養皿上，隨即裹以石臘膜密封之。此外，以丁香酚標準品 (eugenol, Sigma) 及純水作為對照。在室溫 (25-28 °C) 下，48 小時後分別切取菌落周圍之培養基移入酒精 (95%) 中萃取後，以薄層色層分析法 (TLC developing solution : 20 % ethyl acetate in hexane) 進行比對測試。

## 結果

### 不同濃度之丁香對甘藍立枯病發生的影響



將 0、0.25、0.5、0.75 及 1% (w/v) 的丁香添加於含有 1% (v/v) RST-02 或 RST-04 菌株的帶菌介質中，於處理當天及 7 天後播種甘藍種子，結果發現隨著帶菌介質中添加丁香濃度的增加，兩菌株造成甘藍植株猝倒的百分率顯著地減少。當帶菌介質中添加丁香的濃度大於 0.5% (w/v) 時，即可顯著降低植株罹病率。帶菌介質中混入丁香後，不管在當天或 7 天後種植甘藍種子，兩者均有相似之防病趨勢與功效。隨後在溫室設施中連續進行三次的試驗，發現在帶菌介質中添加 0.5% (w/v) 丁香，均可有效降低甘藍立枯病的發生率達 52-60% (圖一與二)。

### 丁香防治甘藍立枯病的主要有效成分

在 2% WA 培養基中分別添加稀釋 500 倍及 1000 倍 (即 2000 及 1000 ppm) 丁香之正己烷萃取物 (B1)、乙酸乙酯萃取物 (B2)、甲醇萃取物 (B3) 及水萃取物 (B4)，然後將 *R. solani* AG-4 RST-02 與 RST-04 菌株的菌絲塊移植到培養基

上。結果顯示由正己烷萃取出之物質 (B1) 對 RST-02 與 RST-04 兩菌株菌絲生長具有完全抑制的效果 (圖三)。進一步，將不同濃度的丁香之正己烷萃取物 (B1) 添加在 2% 水瓊脂培養基中，發現丁香之正己烷萃取物稀釋 2000 倍 (500 ppm) 後對 RST-02 與 RST-04 菌株菌絲生長仍有 82.29% 與 95.49% 的抑制效果，當稀釋倍數小於 1500 倍時即可完全抑制兩菌株之生長。

測試不同分配層萃出物對 *R. solani* AG-4 菌絲生長之抑菌生物活性後，證實丁香抑制 *R. solani* AG-4 菌絲生長之主要成分在正己烷層萃出物 B1 中。進一步，將丁香之正己烷層萃出物以管柱層析純化，得到一個主要成分 (major compound) B1c 及兩個次要成分 (minor compounds) B1a 與 B1b。將此三成分進行抑菌生物活性測試，結果發現管柱層析純化之主要成分 B1c 對 *R. solani* AG-4 菌絲生長有完全抑制的效果 (圖四)。將不同濃度的主要成分 B1c 添加在 2% 水瓊脂培養基中，發現丁香之抑菌之主要成分 B1c 稀釋 2500 倍液 (400 ppm) 可完全抑制 RST-02 菌株菌絲的生長。

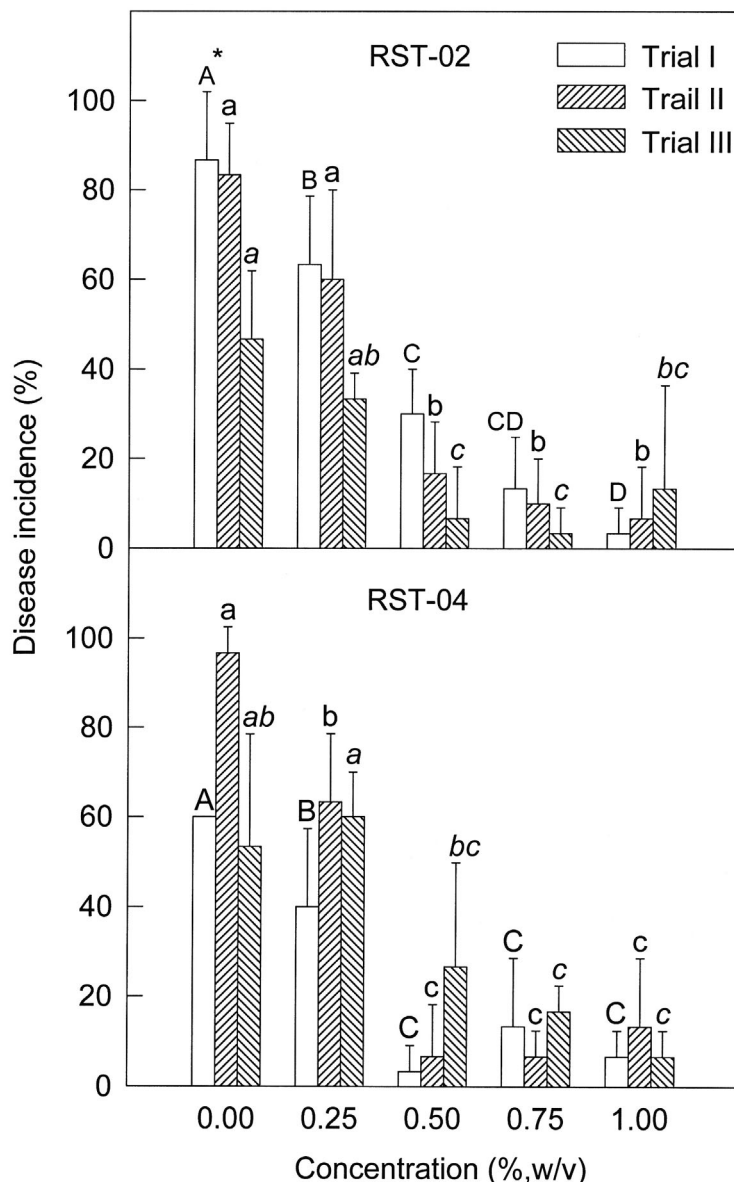
將具有抑制 *R. solani* AG-4 菌絲生長效果之主要成分 (B1c)，以核磁共振光譜儀 NMR 300MHz (Varian, VXR 300) 分析，判讀分析主要成分之氫核磁共振光譜，確定其結構為 ，即為丁香酚 (eugenol, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>)。此外，取  Sigma 公司購得之丁香酚標準品，亦經核磁共振光譜儀 NMR 300MHz 分析，發現標準品與丁香抑菌的主要成分 (B1c) 之氫核磁共振光譜相符，即丁香抑菌的主要成分 (B1c) 係為丁香酚。將溫室試驗中帶菌介質添加 0.5% (w/v) 丁香者，利用甲醇與正己烷萃取後，經薄層色層分析比對，證明處理過丁香之介質中存在有丁香酚的成分 (圖五 A)；至於未添加丁香之介質，並無法測得丁香酚的存在。

### 丁香揮發物對立枯絲核菌菌絲生長的影響

丁香水溶液可以產生抑菌的揮發物質，隨丁香水溶液濃度之增加，*R. solani* AG-4 RST-02 與 RST-04 菌株生長受丁香揮發物抑制之效果愈明顯 (圖六)，其中丁香水溶液的濃度與抑制 RST-02 菌株間的相關方程式為  $Y = -178.18x^2 + 263.50x + 4.69$  ( $r^2 = 0.96$ )；至於抑制 RST-04 菌株間的相關方程式則為  $Y = -180.11x^2 + 262.05x + 3.18$  ( $r^2 = 0.98$ )。

### 丁香揮發物影響立枯絲核菌菌絲形態的觀察

當 *R. solani* AG-4 菌絲經過丁香揮發物燻蒸處理後，在掃描式電子顯微鏡下可觀察到處理過之菌絲表面皺縮、不平整，細胞壁穿孔、原生質於菌絲周圍滲漏，菌絲或菌絲尖端腫大，細胞壁偶而有破裂致原生質外漏，菌絲出現分枝異常等現象 (圖七)。此外，在菌絲上或其滲漏物中常有多角形結晶物累積 (圖七 G)。利用光學顯微鏡觀察到的情形與掃描式電子顯微鏡下觀察到的現象一致。



圖一、溫室中，不同濃度丁香對甘藍立枯病發生的影響。

**Fig. 1.** Effect of clove at various concentrations on disease incidence of damping-off of cabbage seedlings caused by *Rhizoctonia solani* AG-4 ( isolates RST-02 & RST-04 ) in the greenhouse.

\* Means (n=3) among treatments for each trial followed by the same letter are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

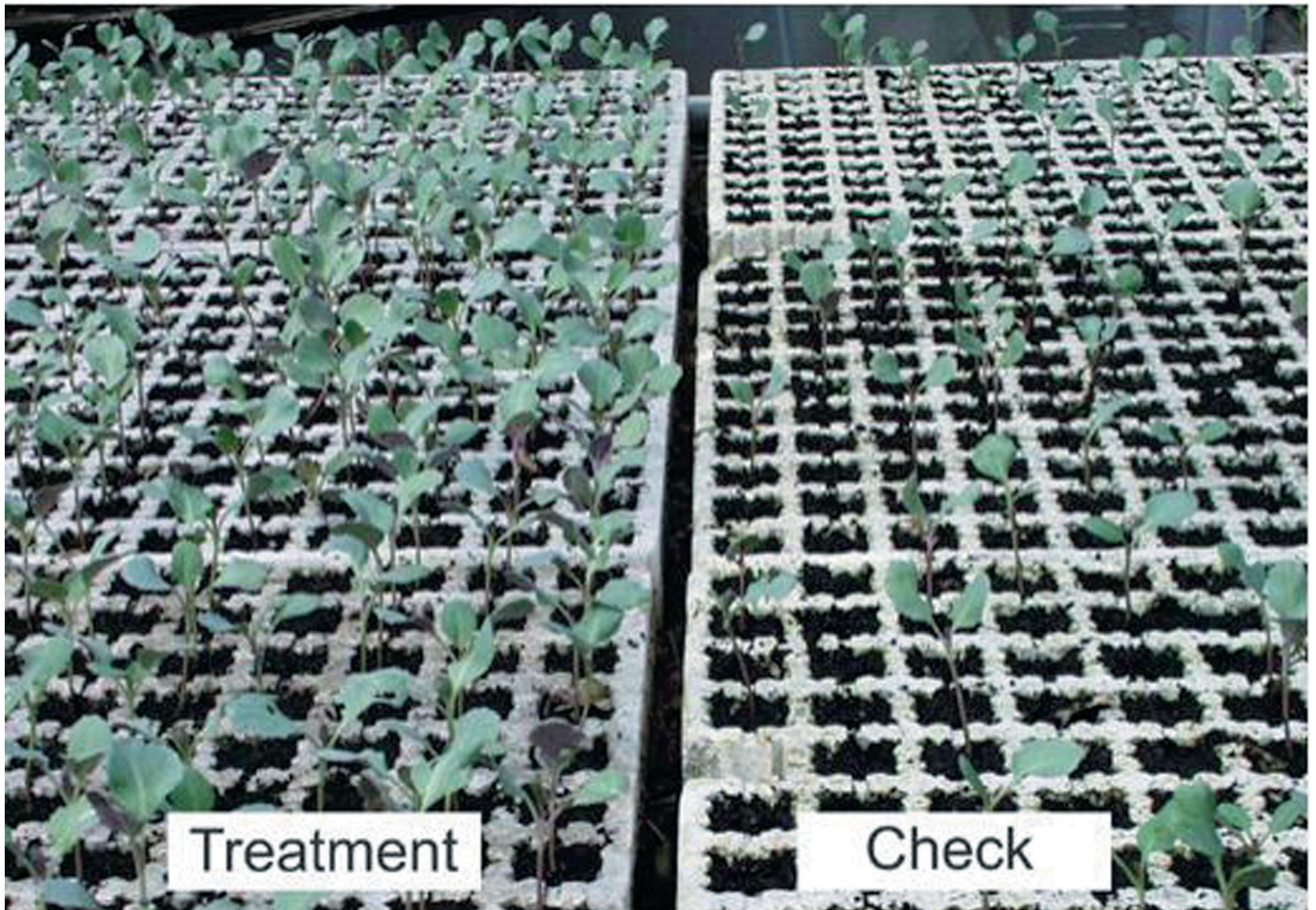
### 丁香揮發物的成分鑑定

利用 1% (w/v) 丁香水溶液及丁香酚標準品 (eugenol, Sigma) 燻蒸處理 *R. solani* AG-4 RST-02 及 RST-04 菌株，發現兩者均可有效抑制兩菌株菌絲的生長與引起相似的菌絲傷害病徵。此外，經兩者處理的菌絲四周均有多角形結晶物累積形成。切取菌落周圍的培養基移入酒精 (95%, v/v) 中萃取，然後利用薄層色層分析比對，發現以 1% (w/v) 丁香水溶液及丁香酚標準品處理過之培養基中均有丁香酚的累積 (圖五B)，惟對照組純水並無此現象。

### 討 論

自 1940 年代起化學農藥蓬勃發展，成為防治植物病蟲害的主流，惟農藥殘毒及無選擇性的殺滅非標的生物，逐步破壞自然生態，因此研發天然植物保護製劑及非農藥防治植物病蟲害的方法，成為當前吾輩努力的主要方向。本研究證明在栽培介質中添加 0.5% (w/v) 以上的丁香，具有顯著防治甘藍立枯病的功效。至於如何延長與增強丁香防治 *R. solani* AG-4 的功效，則有待進一步的研究。

介質中添加丁香防治甘藍立枯病的原理，屬於接觸性與揮發性抑菌與殺菌作用。將丁香粉末配成不同濃度的水



圖二、在溫室中，大面積利用丁香防治甘藍立枯病的效果(右邊：對照組；左邊：處理組)。

**Fig. 2.** A large-scale test on amendment of BVB No.4 peat moss medium with 0.5% (w/v) clove for control of *Rhizoctonia* damping-off of cabbage seedlings in the greenhouse.

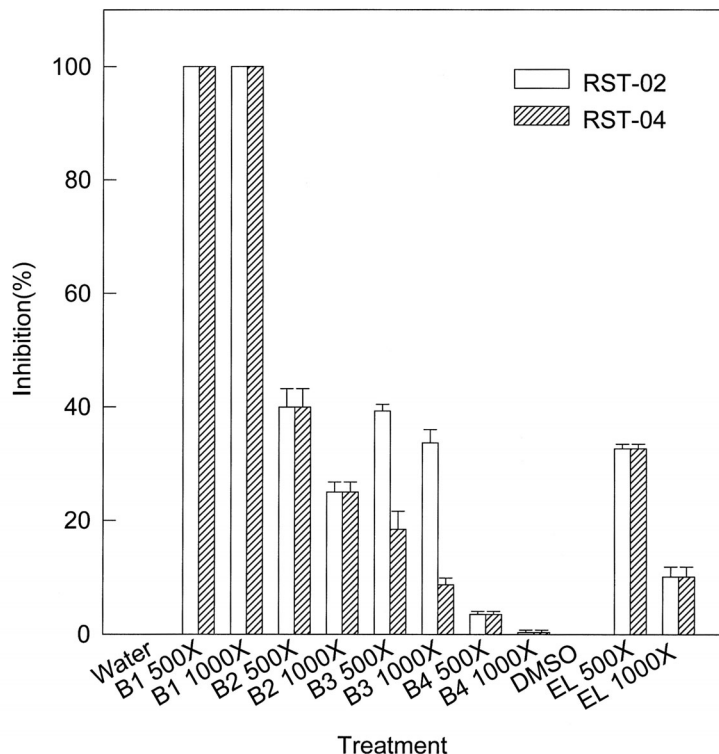
溶液，採用 Benjilali 等人 (1984)<sup>(2)</sup> 的 micro-atmosphere method 改良方法測試其對 *R. solani* AG-4 菌絲生長的影響，結果發現水溶液含丁香粉末濃度大於 0.5% (w/v) 時，即對菌絲生長有 88% 以上的抑制率。此外丁香抑制 *R. solani* AG-4 的主要成分為丁香酚，沸點為 255°C，是故丁香的抑菌成分具有熱穩定性的特性。丁香的主要抑菌成分尚具有揮發性，因此可透過燻蒸的方式抑制藥劑未接觸的植物病原菌<sup>(5,15)</sup>。2000 年 Bowers 和 Locke<sup>(3)</sup> 在溫室病菌土中添加 5-10% 的芥菜油、肉桂油及丁香油，可有效防治洋香瓜萎凋病；惟他倆採用的丁香油劑量約為筆者試驗過程採用劑量的 25-50 倍。這種現象或許與丁香油防治的對象不一致有關外，亦有可能係 Bowers 和 Locke 兩氏直接將丁香油添加在蘊含豐富微生物的土壤中，導致微生物參與分解作用與遭到土壤的固定效應，因而降低丁香油的抑菌活性

Tombe 等人 (1995)<sup>(14)</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

脹及破損的現象。Adams 和 Weidenborner (1996)<sup>(1)</sup> 指出丁香酚可破壞 *Cladosporium herbarum* 菌絲形態。筆者利用光學鏡微鏡及電子顯微鏡觀察丁香揮發物對立枯絲核菌菌絲形態的影響，亦發現處理過之菌絲表面皺縮，細胞壁穿孔、原生質滲漏於菌絲周圍，菌絲或菌絲尖端腫脹且原生質外漏及菌絲分枝出現異常等現象。顯然丁香的主要抑菌成分丁香酚 (eugenol, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) 具有揮發特性外，亦有廣泛性的抑菌與殺菌功效，頗具有深入研發丁香植保製劑作為溴化甲烷燻蒸劑替代品的潛力。至於丁香酚如何破壞病原菌細胞壁及改變細胞膜通透性的抑菌機制，則有待進一步研究。再者如何進一步降低丁香的用量，或是搭配其他資材與微生物，藉以增強丁香的防病效益，均是今後須加強努力研究的方向。

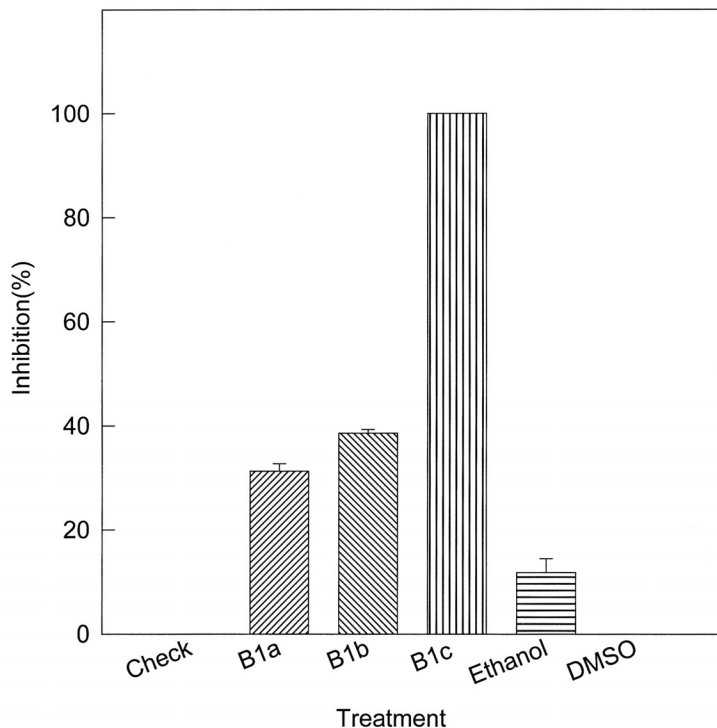
## 謝 辭

本研究承 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計劃經費補助，特誌謝忱。



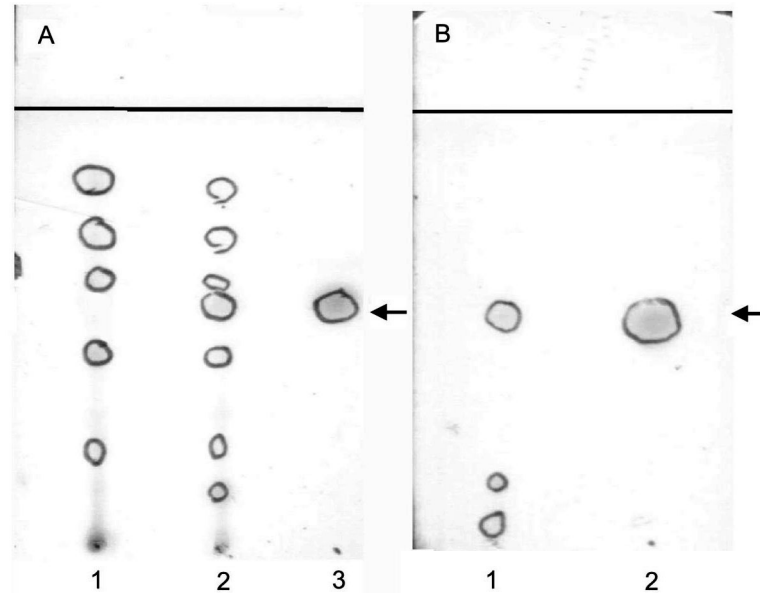
圖三、丁香粉末之正己烷，乙酸乙酯、甲醇及水萃出物B1，B2，B3 及 B4 對 *Rhizoctonia solani* AG-4 (RST-02 及RST-04 菌株) 菌絲生長的影响。

**Fig. 3.** Effect of hexane-extractive (B1), ethyl acetate-extractive (B2), methanol-extractive (B3) and water-extractive (B4) from clove powder with 500-fold and 1000-fold dilutions on mycelial growth of *Rhizoctonia solani* AG-4 (isolates RST-02 & RST-04).  
 Note : DMSO=250 ppm dimethyl sulfoxide; EL=9.5% ethanol as compatibility agents.



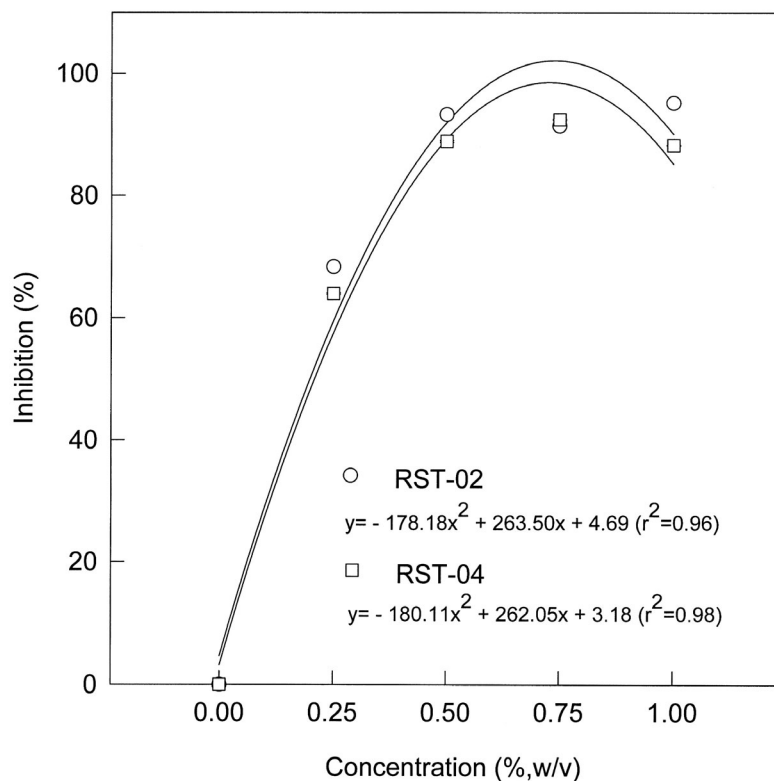
圖四、丁香粉末的三種正己烷萃出物B1a，B1b 及 B1c 對 *Rhizoctonia solani* AG-4 (RST-02 菌株) 菌絲生長的影响。

**Fig. 4.** Effect of three kinds of hexane-extractives ( B1a,B1b, and B1c ) from clove powder with 1500-fold dilution on mycelial growth of *Rhizoctonia solani* AG-4 (isolate RST-02).  
 Note: DMSO = dimethyl sulfoxide (1500X); Ethanol = 9.5% ethanol (1500X) as compatibility agents.



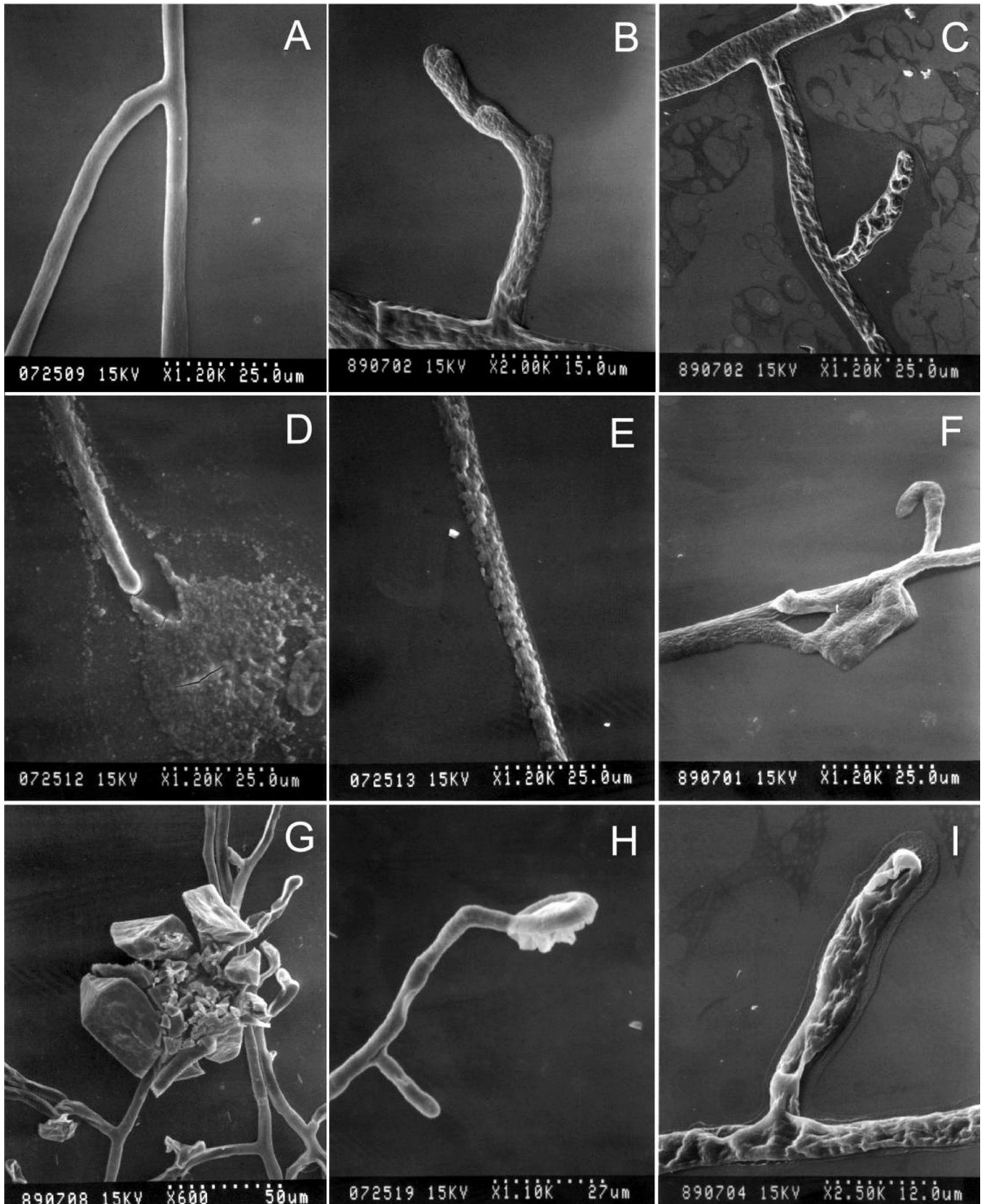
圖五、利用薄層色層分析法檢測丁香酚：(A)栽培介質添加丁香粉末後測得丁香酚的存在；(B)利用丁香燻蒸處理過的培養基質測得丁香酚存在的情形。

**Fig. 5.** Eugenol was identified in (A) culture medium amended with clove powder and (B) water agar fumigated with clove water solution by thin layer chromatography. A-1: BVB No.4 peat moss medium, A-2: amendment of BVB No.4 peat moss medium with 0.5% (w/v) clove powder, A-3: eugenol (arrowed); B-1: ethanol-extractives of water agar for culturing *R. solani* AG-4 fumigated with clove powder solution, B-2: eugenol (arrowed).



圖六、不同濃度丁香水溶液對 *Rhizoctonia solani* AG-4 (RST-02 & RST-04 菌株) 菌絲生長的燻蒸效應。

**Fig. 6.** Fumigation effect of clove water solution on mycelial growth of *Rhizoctonia solani* AG-4 (isolates RST-02 & RST-04).



圖七、利用掃描式電子顯微鏡觀察丁香處理過之*Rhizoctonia solani* AG-4 菌絲形態的變化。

**Fig. 7.** Scanning electron micrographs of deformations of *Rhizoctonia solani* AG-4 hyphae treated with clove ( A : normal, B : hyphae or hyphal tips swelled, C : plasma seeped around the hyphae, D : plasma leaked out, E : cell wall distorted, F : branched abnormal or fused with main hypha, G : formation of some crystals, H : hyphal tips warped or looped, I : surface of hypha wrinkled).



## 引用文獻

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. Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ayadi, A., and Ihli, M. 1984. Method to study antimicrobial effects of essential oils: application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *J. Food Prot.* 47:748-752.
3. Bowers, J. H., and Locke, J. C. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of Fusarium wilt in the greenhouse. *Plant Dis.* 84:300-305.
4. Cobbinah, J.R., and Osei-Owusu, K. 1988. Effects of neem seed extracts on insect pests of eggplant, okra and cowpea. *Insect Sci. Appl.* 9: 601-607.
5. Hao, Y. Y., Brackett, R. E., and Doyle, M. P. 1998. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiol.* 15:367-378.
6. Herr, L. J. 1995. Biological control of *Rhizoctonia solani* by binucleate *Rhizoctonia* spp. and hypovirulent *R. solani* agents. *Crop Prot.* 14:179-186.
7. Maruzzella, J. C., and Balter, J. 1959. The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Dis. Rep.* 43:1143-1147.
8. Montes-Belmont, R., and Carvajal, M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J. Food Prot.* 61:616-619.
9. Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., and Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Prot.* 58:81-85.
10. Puterka, G. J., and Severson, R.F. 1995. Activity of sugar esters isolated from leaf trichomes of *Nicotiana glauca* to pear psylla (Homoptera: Psyllidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 615-619.
11. Rajapakse, R., and Van-Emden, H. F. 1997. Potential of four vegetable oils and ten botanical powders for reducing infestation of cowpeas by *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis* and *C. rhodesianus*. *J. Stored Prod. Res.* 33:59-68.
12. Ryu, D., and Holt, D. L. 1993. Growth inhibition of *Penicillium expansum* by several commonly used food ingredients. *J. Food Prot.* 56:862-867.
13. Thompson, D. P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia* 81:151-153.
14. Tombe, M., Kobayashi, K., Oniki, M., and Ogoshi, A. 1995. Toxicity of clove eugenol against several pathogenic fungi. *Indones. J. Crop Sci.* 10:11-18.
15. Vaughn, S. F., and Spencer, G. F. 1994. Antifungal activity of nature compound against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum* strains. *J. Agric. Food Chem.* 42:200-203

## ABSTRACT

Lin, T. C.<sup>1</sup>, Cheng, K. T.<sup>2</sup>, and Huang, J. W.<sup>1,3</sup> 2002. Effect of Clove and Its Major Component on Control of *Rhizoctonia* Damping-off of Cabbage Seedlings. *Plant Pathol. Bull.* 11:189-198. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup> Department of Biochemistry, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan, R.O.C.; <sup>3</sup> Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw, Fax: +886-4-22851676)

Damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* AG-4 is a serious disease of cabbage, especially in seedlings grown in culture medium. The treatment of peat moss medium, BVB No.4, infested by the pathogen with 0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1% (w/v) of clove was significantly effective in reducing the disease incidence of seedling damping-off. It showed markedly 52-60% reduction in the disease incidence at the rate of 0.5% (w/v) compared to non-treatment as a control. The similar results were also confirmed in three-time large-scale experiments in the greenhouse. The powders of clove flower buds were extracted with methanol for three times. The combination of extractives was partitioned with n-hexane and ethyl acetate. Finally, the rest was extracted with water. The extractives from different solvents were tested for their bioactivity on mycelial growth of the pathogen. The n-hexane extractives showed significant effect on suppression of mycelial growth of *R. solani* AG-4. The n-hexane-soluble extractive was subjected to systemic separation and purification by column chromatography and thin layer chromatography. One major compound and two minor compounds were obtained and used to test their bioactivity. The mycelial growth of the pathogen was completely inhibited by 2500-fold dilution of the major compound of n-hexane-soluble extractive. In advance, this major compound was characterized by <sup>1</sup>H NMR spectrum as eugenol. For fumigation effect of clove powder solution on mycelial growth of the pathogen, the inhibition of mycelial growth by clove-fumigant was increased with increasing the concentrations of clove in water solution. Observations under light microscope and scanning electron microscope indicated that the hyphae or hyphal tips of *R. solani* AG-4 swelled, plasma seeped around the hyphae, plasma leaked out, cell wall distorted, branched abnormal or fused with main hypha, hyphal tips warped or looped, and surface of hyphae wrinkled were caused by clove-fumigant treatment for 24hr. The clove-fumigant was also identified as eugenol by bioassay method and thin layer chromatography. The results suggest that the major component of clove inhibiting damping-off of cabbage seedlings is eugenol.

Keywords: Cabbage, *Rhizoctonia* damping-off, Clove, Eugenol, and Culture medium