

# 微量滴定板篩選植物萃取液與植物(精)油 抑制菜豆銹病菌及草莓灰黴病菌

段中漢<sup>1,2</sup>

1. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。
  2. 通訊作者·電子郵件信箱: chduan@tactri.gov.tw
- 接受日期: 中華民國 104 年 3 月 13 日

## 摘要

段中漢。2015。微量滴定板篩選植物萃取液與植物(精)油抑制菜豆銹病菌及草莓灰黴病菌。植病會刊 24: 67-75。

為尋找自然界潛在的植物源植物保護資材，本研究以微量滴定板 (microtiter plate) 搭配水瓊脂平板建立一套快速、精確的方法以供篩選對植物病原真菌具抑制效果的植物萃取液或植物(精)油。將供試之植物源資材與待測之草莓灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*) 分生孢子或菜豆銹病菌 (*Uromyces appendiculatus*) 夏孢子均勻混入微量滴定板之盤穴中，覆以封口膜，靜置於 24°C 定溫箱中 2 小時。再將盤穴中的混合物分別塗佈於 2% 水瓊脂平板上，復於 24°C 定溫箱培養 12 小時，計數孢子發芽率以測定植物源植保資材的抑菌效果。試驗結果顯示，供試之 85 種植物萃取液之原液對草莓灰黴病菌均不具抑菌作用；但烏心石、台灣假黃楊、台灣光臘樹、菲律賓厚殼桂及翼柄決明等 5 種植物萃取液於稀釋 10 倍濃度下，對菜豆銹病菌尚具抑菌效果。供試之 23 種植物(精)油原液則有部份對上述兩種病原菌表現良好的抑菌能力。將這些初試有效的植物(精)油原液分別與無患子果實發酵液以等體積比例混合調製再加水稀釋，依上述方法測定其對這兩種植物病原菌之抑菌效果。結果顯示，稀釋 1000 倍之肉桂油及百里香精油製劑可完全抑制草莓灰黴病菌孢子發芽；單獨無患子果實發酵液於稀釋 10 倍即對該菌不具抑制作用。相同之試驗處理，稀釋 1000 倍之肉桂油、丁香油及百里香精油製劑可完全抑制菜豆銹病菌孢子發芽；單獨無患子果實發酵液於稀釋 100 倍即對該菌孢子發芽不具抑制作用。

**關鍵詞：** 生物防治、微量滴定板、植物萃取液、植物(精)油、草莓灰黴病菌、菜豆銹病菌。

## 緒言

近年來，食品安全受到全民重視，而合成化學農藥不當使用所造成的不合格農產品一直是大眾關注的焦點。不當使用化學農藥不只以農藥殘毒危害人體健康，亦對環境造成汙染；並且因不斷施用農藥而可能使病原菌產生抗藥性，進一步導致農民提高劑量與施用頻率而衍生更嚴重的汙染問題。強調不施用化學農藥，而代之以生物性植物保護資材防治病蟲害的有機農產品則深受消費者歡迎。即使依慣行農法栽培之作物亦希望於採收前施用生物性植保資材，以避免農藥殘留問題。生物性植保資材依其來源可分為微生物、生化及天然素材等三類，其中又以天然素材來源最為廣泛且對環境最為友善。已知植物性天然素材用於植物保護者如菸鹼、除蟲菊精、魚藤精、藜蘆鹼、印楝素及皂素等植物萃取物 (plant extracts) 及肉桂油、丁香油及百里香精油等植物油 (plant oils) 或植物精油 (plant essential oils) 製劑。植物萃取物及植物(精)油製劑用於植物真菌性病害之防治，近年來在國內外均有許多研究報告，略分述如下。以有機溶劑萃取金佛草 (*Inula viscosa*) 葉片可用於防

治胡瓜露菌 (*Pseudoperonospora cubensis*)、番茄及馬鈴薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*)、小麥白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) 及向日葵銹病菌 (*Puccinia helianthi*) 等引起的病害<sup>(15)</sup>。台灣原住民常用之藥用植物如新鮮龍葵 (*Solanum nigrum*) 的酒精萃取液可防治十字花科蔬菜黑斑病 (*Alternaria brassicicola* 引起)、新鮮山葛 (*Pueraria montana*) 水萃取液亦可防治十字花科蔬菜黑斑病 (*A. brassicicola* 引起) 及炭疽病 (*Colletotrichum higginsianum* 引起)、新鮮或乾燥的琉球鐵線蓮 (*Clematis tashiroi*) 水萃取液則可抑制番茄晚疫病的發生<sup>(13,14)</sup>。多種唇形花科 (Lamiaceae) 或菊科 (Asteraceae) 植物的莖或葉的水或酒精萃取液可有效抑制數種真菌性植物病害；其中尤以虎杖 (*Reynoutria japonica*) 酒精萃取液經水稀釋 1000 倍仍可顯著降低甜瓜白粉病 (病原菌: *Podosphaera xanthii*) 的發病率<sup>(8)</sup>。中草藥馬蹄大黃 (*Rheum officinale*) 水萃取液可抑制七里香白粉病菌 (*Oidium murrayae*) 的孢子發芽，並有效防治胡瓜、南瓜及茄子的白粉病<sup>(5)</sup>。中草藥扛板歸 (*Polygonum perfoliatum*) 的酒精萃取液則可抑制甘藍黑斑病菌 (*A.*

*brassicicola*) 孢子發芽<sup>(7)</sup>。而丁香之正己烷萃取液可完全抑制 *Rhizoctonia solani* AG-4 菌絲生長，其有效成份經核磁共振光譜儀及薄層色層分析確定為具揮發性之丁香酚 (eugenol) <sup>(11)</sup>。

在植物(精)油方面，天竺葵 (*Pelargonium* sp.) 及依蘭 (*Cananga odorata*) 等植物精油加水稀釋 1000 倍對灰黴病菌具顯著之抑制作用，施用於盆栽試驗亦顯示其具防治蝴蝶蘭灰黴病的效果<sup>(4)</sup>。丁香油的水稀釋液對白菜炭疽病 (*C. higginsianum* 引起) 已證實具良好的防治效果<sup>(12)</sup>。肉桂、丁香及檸檬桉等三種植物精油對兩種果樹炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*、*C. musae*) 孢子發芽率具優良的抑制效果<sup>(9)</sup>。美國薄荷屬 (*Monarda* spp.) 植物可產製不同化學組成之精油，有些種類的精油能有效抑制番茄猝倒病菌 (*Rhizoctonia solani*)，使番茄有較高的存活率及較優的株高及株徑<sup>(6)</sup>。丁香油加肉桂萃取液混合辣椒萃取液再加芥末精油的配方 (chili pepper extract-mustard essential oil formulations) 亦能有效降低萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*) 及疫病菌 (*P. nicotianae*) 的族群數量及溫室植栽的發病率<sup>(2,3)</sup>。紅百里香 (red thyme)、牛至 (oregano) 及玫瑰草 (palmarosa) 的精油可防治一種可為害豆科、葫蘆科及茄科作物的疫病菌 (*P. capsici*) <sup>(1)</sup>。

由於植物萃取液及植物(精)油種類繁多，施用濃度亦有極大差異。這一類資材在進入盆栽或田間防治試驗之前，必須先在實驗室內進行快速且大量的篩選；目的在選出針對植物病害具防治潛力的資材，以供後續盆栽或田間防治試驗之用。植物真菌病害防治資材之篩選，一般是以防治資材對病原真菌之菌絲生長或孢子發芽的抑制作用作為指標。具體實例包括利用微量滴定板 (microtiter plate) 搭配微量盤分析儀 (microplate reader)，以記錄吸光值變化作為植物萃取物或植物(精)油抑制灰黴病菌生長之依據<sup>(16)</sup>；亦有以濾紙圓盤洋菜擴散法 (paper disc agar diffusion assay) 測定植物(精)油對多種植物病原真菌之抑菌作用<sup>(10)</sup>；或將植物(精)油混入洋菜平板測定其對疫病菌生長之抑制<sup>(1)</sup>；亦有以真菌孢子混以植物萃取液滴在 8 孔載玻片上直接觀察其抑菌作用<sup>(8)</sup>。但這些方法或需搭配儀器使用、或操作繁瑣、或難以切合實際應用狀況，尚有改善空間。本研究擬以微量滴定板搭配洋菜平板及光學顯微鏡建立一套篩選植物萃取液與植物(精)油抑制草莓灰黴病菌 [*Botrytis cinerea* (Pers.:Fr.)] 及菜豆銹病菌 [*Uromyces appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger] 孢子發芽的方法。本方法將能精確地為植物病原真菌選出具有抑制潛力的植物萃取物或植物(精)油以供後續應用。

## 材料與方法

### 供試植物病原菌

於 2014 年 2 月以單孢分離技術自南投縣國姓鄉之草莓(品種：豐香)獲得灰黴病菌 (*B. cinerea*) 菌株 BC-1。將 BC-1 培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜 (potato dextrose agar, PDA) 培養基，置 24°C 無光照之培養箱 2 週，以產生大量分生孢子 (conidia) 供試。供試之菜豆銹病菌係於 2014 年 3 至 6 月，採自台中市霧峰區零星種植之菜豆田 (品種：圓粉)，其以不噴灑化學農藥之方式栽培管理。採取自然感染銹病菌 (*U. appendiculatus*) 之葉片，以移植環刮取葉背之大量銹病菌夏孢子 (urediniospores) 供試。

### 供試植物抽出液及植物(精)油

供試之植物源資材包括植物之水萃取液及外購之植物(精)油等二類。植物水萃液得自行政院農業委員會苗栗區農業改良場生物防治分場生物資材園提供之 85 種 (species) 植物葉片 (表 1)。將摘取之新鮮葉片攜回實驗室後，稱取 0.5 g 葉片加入 2 ml 無菌蒸餾水以研磨機將葉片磨碎，置桌上型離心機以 15,000 rpm 高速離心 3 分鐘，取上清液供試。植物(精)油則自廠商 (敬荃公司、台中市) 購得月見草油 (evening primrose oil)、荷荷芭油 (jojoba oil)、橄欖油 (olive oil)、蘆薈油 (aloe oil)、葵花籽油 (canola oil)、樟腦油 (camphor oil)、冬青油 (winter green oil)、丁香油 (clove oil)、檸檬油 (lemon oil)、檀香油 (sandalwood oil)、尤加利油 (eucalyptus oil)、松節油 (turpentine oil)、蓖麻油 (castor oil)、肉桂油 (cinnamon oil)、香茅油 (citronella oil)、薄荷油 (pepper mint oil)、薰衣草油 (lavender oil)、茶樹精油 (tea essential oil)、檸檬精油 (lemon essential oil)、薰衣草精油 (lavender essential oil)、迷迭香精油 (rosemary essential oil)、百里香精油 (thyme essential oil) 及尤加利精油 (eucalyptus essential oil) 等 23 種未乳化植物油或植物精油。植物(精)油原液經初步篩選有效者分別與相同體積比之無患子果實發酵液均勻混合以達乳化效果，並以水作 10 倍系列稀釋液供試。

### 微量滴定板篩選法

用人工培養之草莓灰黴病菌 (*B. cinerea*) 菌株 BC-1 之分生孢子及採取自然感染之菜豆葉片銹病菌 (*U. appendiculatus*) 夏孢子為供試病原菌，以微量滴定板測定植物源資材對上述兩種植物病原菌孢子發芽的抑制效果。測定方法如下，先取 50 μl 植物萃取液或植物(精)油之未乳化原液或乳化之稀釋液滴入微量滴定板之盤穴，再酌量挑取灰黴病菌分生孢子或銹病菌夏孢子均勻混入。並以無菌蒸餾水之處理為對照。處理後之微量滴定板以封口膜 (parafilm, PM-996) 覆蓋以防蒸散，並

避免植物源資材之揮發性物質交互污染。處理完畢，靜置於無光照之 24°C 定溫箱 2 小時。取出後，將盤穴內之菌液分別均勻塗佈於直徑 9 公分之 2% 水瓊脂 (water

agar) 平板上。復將平板靜置於 24°C 定溫箱，12 小時後，於光學顯微鏡下計數孢子發芽率，每處理 4 重覆，每重覆計數 200 個孢子。以百分率表示孢子發芽率。

表 1 本研究用於製備萃取液之植物名錄

Table 1 Plant extracts used in this study<sup>1</sup>

Common name	Scientific name	Family
Ailanthus prickly ash	<i>Zanthoxylum ailanthoides</i>	Rutaceae
Apamate	<i>Tabebuia pentaphylla</i>	Bignoniaceae
Autumn maple tree	<i>Bischofia javanica</i>	Phyllanthaceae
Beautiful galangal	<i>Alpinia zerumbet</i>	Zingiberaceae
Bird's-nest fern	<i>Asplenium nidus</i>	Aspleniaceae
Butterfly ginger	<i>Hedychium coronarium</i>	Zingiberaceae
China berry	<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae
Chinese cinnamon	<i>Cinnamomum cassia</i>	Lauraceae
Chinese parasol	<i>Firmiana simplex</i>	Malvaceae
Chinese prickly ash	<i>Zanthoxylum simulans</i>	Rutaceae
Chinese tallow tree	<i>Sapium sebiferum</i>	Euphorbiaceae
Cochin grass	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Poaceae
Coffee	<i>Coffea arabica</i>	Rubiaceae
Common elaeocarpus	<i>Elaeocarpus decipiens</i>	Elaeocarpaceae
Corkleaf snowbell	<i>Styrax suberifolia</i>	Styracaceae
Evergreen ash	<i>Fraxinus formosana</i>	Oleaceae
Flame goldrain tree	<i>Koelreuteria formosana</i>	Sapindaceae
Formosan beauty berry	<i>Callicarpa formosana</i>	Lamiaceae
Formosan michelia	<i>Michelia compressa</i>	Magnoliaceae
Formosan nato tree	<i>Palaquium formosanum</i>	Sapotaceae
Formosan osmosia	<i>Ormosia formosana</i>	Fabaceae
Formosan turpinia	<i>Turpinia formosana</i>	Staphyleaceae
Fountain tree	<i>Spathodea campanulata</i>	Bignoniaceae
Fragrant pittosporum	<i>Pittosporum pentandrum</i>	Pittosporaceae
Golden trumpet tree	<i>Tabebuia chrysantha</i>	Bignoniaceae
Golden-cupule oak	<i>Cyclobalanopsis pachyloma</i>	Fagaceae
Green-leaf ardisia	<i>Ardisia arborescens</i>	Primulaceae
Guava 'Odorata'	<i>Psidium guajava</i> 'Odorata'	Myrtaceae
Guava 'Ruby'	<i>Psidium guajava</i> 'Ruby'	Myrtaceae
Hairy jujube	<i>Zizyphus mauritiana</i>	Rhamnaceae
Happy tree	<i>Camptotheca acuminata</i>	Cornaceae
Hauil fig tree	<i>Ficus septica</i>	Moraceae
Incense machilus	<i>Machilus zuihoensis</i>	Lauraceae
Indian almond	<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae
Indian coral tree	<i>Erythrina variegata</i> var. <i>orientalis</i>	Fabaceae
Indonesian cinnamon	<i>Cinnamomum burmannii</i>	Lauraceae
Japanese podocarp	<i>Nageia nagi</i>	Podocarpaceae
Konishi tanoak	<i>Pasania konishii</i>	Fagaceae
Koshun galangal	<i>Alpinia koshunensis</i>	Zingiberaceae

<sup>1</sup> The plants were provided by Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan.

Table 1 (continued from preceding page)

Common name	Scientific name	Family
LanYi cryptocarya	<i>Cryptocarya elliptifolia</i>	Lauraceae
Large-leaved machilus	<i>Machilus kusanoi</i>	Lauraceae
Linden hibiscus	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Malvales
Liodendron	<i>Liodendron formosanum</i>	Euphorbiaceae
Little-leaf tree millettia	<i>Millettia pulchra var. microphylla</i>	Fabaceae
Looking-glass tree	<i>Heritiera littoralis</i>	Malvaceae
Manila leea	<i>Leea guineensis</i>	Vitaceae
Nansho daidai	<i>Citrus taiwanica</i>	Rutaceae
Odour-bark cinnamon	<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Lauraceae
Oriental cudrania	<i>Cudrania cochinchinensis</i>	Moraceae
Philippine drypetes	<i>Drypetes littoralis</i>	Euphorbiaceae
Physic nut	<i>Jatropha curcas</i>	Euphorbiaceae
Poongaoil pongamia	<i>Pongamia pinnata</i>	Fabaceae
Red bark oak	<i>Cyclobalanopsis gilva</i>	Fagaceae
Ringworm senna	<i>Senna alata</i>	Fabaceae
Rough-leaved holly	<i>Ilex asprella</i>	Aquifoliaceae
Rusty-leaf mucuna	<i>Mucuna macrocarpa</i>	Fabaceae
Sasakii symplocos	<i>Symplocos sasakii</i>	Symplocaceae
Sea mango	<i>Cebera mamghas</i>	Apocynaceae
Siebold ardisia	<i>Ardisia sieboldii</i>	Primulaceae
Silk oak	<i>Grevillea robusta</i>	Proteaceae
Simpleleaf chastetree	<i>Vitex trifolia</i>	Lamiaceae
Slender amaranth	<i>Amaranthus viridis</i>	Amaranthaceae
Southern magnolia	<i>Magnolia grandiflora</i>	Magnoliaceae
Swamp gelonium	<i>Gelonium aequoreum</i>	Euphorbiaceae
Sweet viburnum	<i>Viburnum odoratissimum</i>	Adoxaceae
Tachibana orange	<i>Citrus tachibana</i>	Rutaceae
Taiwan acacia	<i>Acacia confuse</i>	Fabaceae
Taiwan camphor tree	<i>Cinnamomum reticulatum</i>	Lauraceae
Taiwan cinnamon	<i>Cinnamomum insularimontanum</i>	Lauraceae
Taiwan cotton rose	<i>Hibiscus taiwanensis</i>	Malvaceae
Taiwan ebony	<i>Diospyros discolor</i>	Ebenaceae
Taiwan eugenia	<i>Eugenia formosana</i>	Myrtaceae
Taiwan photinia	<i>Photinia lucida</i>	Rosaceae
Taiwan reevesia	<i>Reevesia formosana</i>	Malvaceae
Taiwan roseapple	<i>Syzygium tripinnatum</i>	Myrtaceae
Taiwan sapium	<i>Sapium discolor</i>	Euphorbiaceae
Taiwan trident maple	<i>Acer buergerianum var. formosanum</i>	Sapindaceae
Taiwan wampee	<i>Clausena lunulata</i>	Rutaceae
Tashiro euonymus	<i>Euonymus acutorhombifolia</i>	Celastraceae
Thick-fruited sloanea	<i>Sloanea dasycarpa</i>	Elaeocarpaceae
Tobira pittosporum	<i>Pittosporum tobira</i>	Pittosporaceae
White mulberry	<i>Morus alba</i>	Moraceae
Wild coffee	<i>Psychotria rubra</i>	Rubiaceae
Wood oil tree	<i>Aleurites montana</i>	Euphorbiaceae
Yew podocarp	<i>Podocarpus fasciculus</i>	Podocarpaceae

## 結 果

### 植物源防治資材對草莓灰黴病菌孢子發芽之影響

依微量滴定板法測試各種植物源防治資材對草莓灰黴病菌 (*B. cinerea*) 分生孢子發芽之抑制率得知。苗栗區農業改良場生物防治分場提供之 85 種植物葉片水萃取液之原液對草莓灰黴病菌分生孢子發芽均無抑制作用。各處理之孢子平均發芽率為 80~100%。自廠商購得之樟腦油等 23 種植物(精)油，當以其未乳化之原液測試其對草莓灰黴病菌分生孢子發芽之抑制作用，結果得知月見草油、荷荷芭油、橄欖油、蘆薈油、葵花籽油、檀香油及蓖麻油等 7 種油之原液對草莓灰黴病菌孢子發芽完全不具抑制作用，即該處理之孢子發芽率與水處理之對照相近，幾達 100%。其他 16 種植物(精)油之原液則可完全抑制草莓灰黴病菌之孢子發芽，即發芽率為 0%。將這 16 種油分別與無患子果實發酵液以等量體積均勻混合後，再以無菌蒸餾水稀釋 10 倍、100 倍及 1000 倍供試。各種油劑在稀釋 10 倍及 100 倍濃度下則有不

同程度的抑菌效果；在稀釋 1000 倍後，僅肉桂油及百里香精油對草莓灰黴病菌孢子發芽具完全抑制作用 (表 2)。此結果顯示，肉桂油及百里香精油對抑制草莓灰黴病菌具有最優之效果。單獨無患子果實發酵液於稀釋 10 倍即對草莓灰黴病菌分生孢子發芽不具抑制作用 (表 2)。

### 植物源防治資材對菜豆銹病菌夏孢子發芽之影響

依微量滴定板法測試採自苗栗區農業改良場生物防治分場之 85 種植物葉片水萃液對菜豆銹病菌 (*U. appendiculatus*) 夏孢子發芽之抑制作用，結果發現上述未經稀釋之植物水萃液中僅有烏心石 (*Michelia compressa*)、台灣假黃楊 (*Liodendron formosanum*)、台灣光臘樹 (*Fraxinus formosana*)、菲律賓厚殼桂 (*Cryptocarya elliptifolia*) 及翼柄決明 (*Senna alata*) 對菜豆銹病菌具抑制作用。此 5 種植物水萃液加水稀釋 10 倍對菜豆銹病菌仍有抑制作用，加水稀釋 100 倍則不具顯著之抑制作用 (表 3)。自廠商購得之樟腦油等 23 種植物(精)油以微量滴定板法測試其原液對菜豆銹病菌夏孢子發芽之抑制作用，結果得知

表 2 植物油劑對草莓灰黴病菌分生孢子發芽之影響

Table 2 Effect of plant (essential) oils on conidial germination of *Botrytis cinerea*<sup>1</sup>

Plant (essential) oil <sup>2</sup>	Dilution factor <sup>3</sup>		
	10	100	1000
Lemon oil	55.0±9.5 c	97.8±1.9 bc	99.3±0.5 c
Turpentine oil	85.3±4.5 b	97.3±1.0 bc	100.0±0.0 a
Lavender oil	0.0±0.0 f	95.8±1.0 c	100.0±0.0 a
Eucalyptus oil	0.0±0.0 f	97.0±2.4 bc	99.8±0.5 ab
Winter green oil	54.3±4.3 c	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Camphor oil	4.5±1.3 e	98.0±0.8 bc	100.0±0.0 a
Clove oil	0.0±0.0 f	0.0±0.0 e	95.0±1.4 d
Pepper mint oil	0.0±0.0 f	99.8±0.5 a	99.5±0.6 bc
Rosemary essential oil	0.0±0.0 f	95.3±1.9 c	100.0±0.0 a
Lemon essential oil	20.3±4.9 d	97.8±1.3 bc	99.8±0.5 ab
Lavender essential oil	0.0±0.0 f	98.0±1.6 b	100.0±0.0 a
Tea essential oil	0.0±0.0 f	97.5±2.6 bc	100.0±0.0 a
Eucalyptus essential oil	0.0±0.0 f	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Thyme essential oil	0.0±0.0 f	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e
Citronella oil	0.0±0.0 f	15.5±2.1 d	100.0±0.0 a
Cinnamon oil	0.0±0.0 f	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e
Chinese soap berry extract	99.8±0.5 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Water (control)	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a

<sup>1</sup> Values were averages of percentages of spore germination.

<sup>2</sup> Plant (essential) oils were mixed with fruit fermentation fluid of Chinese soap berry in 1:1 volume/ volume ratio and then diluted with water to 10, 100 and 1000 folds before use.

<sup>3</sup> Mean±standard error (n=4). Mean values within a column followed by the same letters were not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significant difference test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.

見草油、荷荷芭油、橄欖油、蘆薈油、葵花籽油等 5 種油之原液對菜豆銹病菌夏孢子發芽完全不具抑制作用，即該處理之孢子發芽率與水處理之對照相近；而樟腦油等其他 18 種植物(精)油之原液對菜豆銹病菌夏孢子發芽均具完全之抑制作用，即銹病菌夏孢子發芽率為 0。這 18 種油與無患子果實發酵液以等量體積均勻混合後，再以無菌蒸餾水稀釋 10 倍、100 倍及 1000 倍供試。各種油劑在稀釋 10 倍下尚能完全抑制銹病菌夏孢子之發芽；但在 100 倍濃度下則有不同程度的抑菌效果；在稀釋 1000 倍後，僅肉桂油、丁香油及百里香精油劑對菜豆銹病菌夏孢子發芽具完全抑制作用，顯示其具有最優之抑菌效果 (表 4)。

### 討 論

植物性天然素材是一龐大的天然殺菌劑寶庫，因具安全與環保之特性，可以作為化學合成農藥的替代品。在植物源植保資材的開發過程中，首要工作就是資材的蒐集與篩選。資材的來源至為重要，它必須易於取得，價格低廉，且效用顯著，才有可能成為商品化之植保資材。篩選方法則必須能簡易而有效的處理大量資材，篩選過程且須符合田間實際狀況，才能選出真正有效的資材。針對植保資材殺菌效果之測定，最常用的抑菌指標就是菌絲生長及孢子發芽。兩種試驗皆可以量化，試驗數據經過統計分析後可以得到符合科學性的結果。菌絲生長必須獲得營養份的供應，但營養份卻可能干擾待測物質的抑菌效果，且菌絲生長尚有稀疏與稠密之別，當以菌落直徑為指標時即有可能誤判。如為測定菌絲生長量而使用液體培養基則須考慮通氣問題，且有些真菌不適於液體培養。孢子發芽率是比較精準的指標，但此類病原真菌須易於大量產孢且有較高的孢子發芽率。草莓灰黴病菌 (*B. cinerea*) 及菜豆銹病菌 (*U. appendiculatus*) 均能產生大量孢子且有很高的發芽率，因此適於以孢子發芽率作為抑菌指標。以凹槽載玻

片 (cavity slide) 滴上植物萃取液及植物病原真菌孢子以測其抑菌效果是一簡易而直接的測定方法 (4,5,7,8,10)。但為等待孢子發芽，使其浸泡處理時間須長達 8 至 15 小時，而與田間實際狀況有別，因田間藥液維持時間多不會超過 2 小時即乾涸。亦有利用微量滴定板搭配微量盤分析儀記錄吸光值變化以作為篩選植物萃取液或植物(精)油抑制灰黴病菌生長之方法。但此種方法須搭配儀器使用，操作時又可能受植物萃取物色素之干擾而必須使用雙盤法 (double-plate method) (16)。本研究參考前人使用之各種方法，在兼顧簡便、經濟且精確的要求下，以微量滴定板搭配洋菜平板即可獲得以孢子發芽率為指標的抑菌結果。這項方法不唯可用於植物天然素材之篩選，亦適用於合成化學農藥的藥效篩選。運用本研究所以建立的微量滴定板法篩選植物源植保資材將有助於大量資材之處理。

直接萃取植物成分進行病害防治資材篩選是開發植物源植保資材的基本方法。但依本研究之結果觀之，植物萃取液具防治植物病害效果者，其有效比例不高，且常須於高濃度下施用，此與前人之報告類同，即植物萃取液僅稀釋 10 倍供試 (8,16)。但因植物物種資源龐大，仍具開發潛力，但在開發過程中，快速、有效的篩選方法則益顯其重要性。相較於植物萃取液之來源廣泛，植物(精)油的種類則相對較少。但相關的研究證實，植物(精)油可能是植物病害防治資材的一個重要來源，且能效用廣泛地抑制多種植物病原菌 (1, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 16)。本研究在 23 種價格較低廉的植物(精)油中，即已篩選獲得 2 至 3 種有效抑制菜豆銹病菌或草莓灰黴病菌之植物(精)油，國內外的研究亦獲類似的結果 (1, 9, 10, 12, 16)。本研究更發現，乳化後的肉桂油經稀釋 5000 倍仍可完全抑制菜豆銹病菌夏孢子發芽 (著者，未發表資料)，更增其應用潛力。這些有效植物(精)油可於低濃度下即具抑菌效果，又易於大量獲得，使其成為商品化植保資材的可能性大增。據前人研究，丁香萃取液之主成分丁香酚經稀釋 2500

表 3 苗栗農改場五種植物葉片萃取液對菜豆銹病菌夏孢子發芽率之影響

Table 3 Effect of plant extracts on urediniospore germination of *Uromyces appendiculatus*<sup>1</sup>

Plant species	Dilution factor <sup>2</sup>		
	1	10	100
<i>Michelia compressa</i>	0.0±0.0 f	0.3±0.5 ef	49.3±1.9 b
<i>Liodendron formosanum</i>	4.5±1.7 e	14.5±2.1 d	41.0±6.1 c
<i>Fraxinus formosana</i>	1.3±0.5 ef	0.5±0.6 ef	49.5±7.1 b
<i>Cryptocarya elliptifolia</i>	1.0±0.0 ef	1.3±0.5 ef	47.3±4.1 b
<i>Senna alata</i>	0.0±0.0 f	1.3±0.5 ef	41.8±3.4 c
Water (control)	53.8±4.5 a		

<sup>1</sup> This was a single-factor experiment and values were averages of percentages of spore germination.

<sup>2</sup> Plant extracts were undiluted (dilution factor =1) or diluted with water to 10 and 100 folds before use. Mean±standard error (n=4). Mean values followed by the same letters were not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significant difference test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.

倍仍可完全抑制 *R. solani*AG-4 之菌絲生長<sup>(11)</sup>，而本研究亦證實丁香油製劑 1000 倍稀釋液可有效抑制菜豆銹病菌夏孢子發芽。兩項結果互證植物萃取液與其(精)油之共通性，推測兩者因同源自丁香，可能具有相同的抑菌成分。惟丁香油製劑 1000 倍稀釋液雖可有效抑制菜豆銹病菌但對草莓灰黴病菌則無效；可知一種植物抑菌物質在不同濃度下對不同植物病原菌，有些具有共同的抑菌效果，有些則否；這是否與不同病原菌之生理特性或細胞構造組成有關，是一值得探討的課題。

## 謝 辭

本研究承行政院農業委員會科技研究計畫經費補助及苗栗區農業改良場提供該場生物防治分場生物資材園之植物供試，謹誌謝忱。

## 引用文獻

1. Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K. and Hao, J. J.

2012. Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant Dis.* 96: 797-803.
2. 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.
3. Bowers, J. H. and Locke, J. C. 2004. Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of Phytophthora blight in the greenhouse. *Plant Dis.* 88: 11-16.
4. Chen, C. H. and Hsieh, T. F. 2005. Effects of plant essential oils on *Botrytis cinerea* spore germination and gray mold incidence in Phalaenopsis. *Plant Pathol. Bull.* 14: 257-264.

表 4 植物油劑對菜豆銹病菌夏孢子發芽之影響

Table 4 Effect of plant (essential) oils on urediniospore germination of *Uromyces appendiculatus*<sup>1</sup>

Plant (essential) oil <sup>2</sup>	Dilution factor <sup>3</sup>		
	10	100	1000
Lemon oil	0.0±0.0 b	32.8±3.4 c	59.3±2.5 efg
Sandalwood oil	0.0±0.0 b	50.8±1.7 b	61.0±2.2 def
Turpentine oil	0.0±0.0 b	6.3±1.7 f	37.3±6.6 j
Lavender oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	42.0±2.2 j
Eucalyptus oil	0.0±0.0 b	35.8±6.6 c	53.3±3.6 hi
Winter green oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	70.5±1.3 ab
Camphor oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	50.5±5.1 i
Castor oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	65.0±4.1 cd
Clove oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	0.0±0.0 k
Pepper mint oil	0.0±0.0 b	4.3±0.5 f	50.3±3.0 i
Rosemary essential oil	0.0±0.0 b	25.0±3.7 d	54.3±7.3 ghi
Lemon essential oil	0.0±0.0 b	20.5±7.4 d	63.8±4.6 cde
Lavender essential oil	0.0±0.0 b	10.0±0.8 e	58.3±1.7 fgh
Tea essential oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	64.0±3.7 cde
Eucalyptus essential oil	0.0±0.0 b	49.8±3.5 b	71.5±4.5 ab
Thyme essential oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	0.0±0.0 k
Citronella oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	67.3±4.0 bc
Cinnamon oil	0.0±0.0 b	0.0±0.0 g	0.0±0.0 k
Chinese soap berry extract	0.0±0.0 b	44.5±1.9 b	73.0±2.2 a
Water (control)	74.3±3.3 a	64.3±7.2 a	73.3±5.4 a

<sup>1</sup> Values were averages of percentages of spore germination.

<sup>2</sup> Plant (essential) oils were mixed with fruit fermentation fluid of Chinese soap berry in 1:1 volume/ volume ratio and then diluted with water to 10, 100 and 1000 folds before use.

<sup>3</sup> Mean±standard error (n=4). Mean values within a column followed by the same letters were not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significant difference test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.

- (in Chinese with English abstract)
5. Chu, Y. L., Ho, W. C. and Ko, W. H. 2006. Effect of Chinese herb extracts on spore germination of *Oidium murrayae* and nature of inhibitory substance from Chinese rhubarb. *Plant Dis.* 90: 858-861.
  6. Gwinn, K. D., Ownley, B. H., Greene, S. E., Clark, M. M., Taylor, C. L., Springfield, T. N., Trently, D. J., Green, J. F., Reed, A. and Hamilton, S. L. 2010. Role of essential oils in control of *Rhizoctonia* damping-off in tomato with bioactive monarda herbage. *Phytopathology* 100: 493-501.
  7. Ho, W. C., Wu, T. Y., Su, H. J. and Ko, W. H. 2007. Effect of oriental medicinal plant extracts on spore germination of *Alternaria brassicicola* and nature of inhibitory substances from speedweed. *Plant Dis.* 91: 1621-1624.
  8. Hsieh, T. F., Huang, J. H., Hsieh, L. J., Hu, M. F. and Ko, W. H. 2005. Antifungal effect of plant extracts on phytopathogenic fungi. *Plant Pathol. Bull.* 14: 59-66. (in Chinese with English abstract)
  9. Hsieh, T. F., Chen, C. H. and Tsai, J. N. 2014. Effects of plant essential oils on spore germination of several fruit anthracnose pathogens. *Plant Pathol. Bull.* 23: 31-41. (in Chinese with English abstract)
  10. Kishore, G. K., Pande, S. and Harish, S. 2007. Evaluation of essential oils and their components for broad spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. *Plant Dis.* 91: 375-379.
  11. 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)
  12. Lin, C. L., Lin, T. C. and Huang, J. W. 2010. Evaluation for efficacy of clove oil and plant nutrients on controlling the cruciferous vegetables anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum*. *Plant Pathol. Bull.* 19: 167-176. (in Chinese with English abstract)
  13. Muto, M., Takahashi, H., Ishihara, K., Yuasa, H. and Huang, J. W. 2005. Antimicrobial activity of medicinal plants used by indigenous people in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 14: 13-24.
  14. Muto, M., Takahashi, H., Ishihara, K., Yuasa, H. and Huang, J. W. 2005. Control of black leaf spot (*Alternaria brassicicola*) of crucifers by extracts of black nightshade (*Solanum nigrum*). *Plant Pathol. Bull.* 14: 25-34.
  15. Wang, W., Ben-Daniel, B. H. and Cohen, Y. 2004. Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology* 94: 1042-1047.
  16. Wilson, C. L., Solar, J. M., Ghaouth, A. El and Wisniewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81: 204-210.



## ABSTRACT

Duan, Chung-hang <sup>1</sup>. 2015. Microtiter plate for evaluation of plant extracts and oils against *Uromyces appendiculatus* and *Botrytis cinerea*. Plant Pathol. Bull. 24: 67-75. (<sup>1</sup>Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan; E-mail: chduan@tactri.gov.tw)

A rapid and precise assay to determine antifungal activity in plant extracts and plant (essential) oils by using microtiter plate is described. This method would provide a very useful tool to screen numerous naturally antifungal materials against plant pathogens. Wells in microtiter plate were loaded with a mixture of spore suspension of *Uromyces appendiculatus* or *Botrytis cinerea* and plant extract or plant (essential) oil. The microtiter plate was then sealed with parafilm membrane and placed in 24°C incubator for 2 hr. After that, the mixture in each well was spread on 2% water agar and incubated for another 12 hr at 24°C. The spore germination of the fungus was measured under microscope. Among 85 undiluted plant extracts evaluated, none of them possessed antifungal activity on *B. cinerea*, while 10-fold dilutions of plant extracts of *Michelia compressa*, *Liodendron formosanum*, *Fraxinus formosana*, *Cryptocarya elliptifolia* and *Senna alata* indicated antifungal activity well against *U. appendiculatus*. Among 23 plant (essential) oils tested, thyme essential oil and cinnamon oil demonstrated completely antifungal activity against both fungal pathogens when applying 1000-fold dilution of the formulation of the each oil and Chinese soap berry extract in 1:1 volume ratio. However, the same dilution of the formulated clove oil could only inhibit the spore germination of *U. appendiculatus* but not *B. cinerea*.

Keywords: microtiter plate, biocontrol, plant extracts, plant (essential) oils, *Botrytis cinerea*, *Uromyces appendiculatus*.

