

評估兩種精油抑制病原真菌生長及防治草莓灰黴病之效果

黃建睿¹、鍾文全²、鍾文鑫^{1,3*}

¹ 國立中興大學植物病理學系

² 行政院農業委員會種苗改良繁殖場

³ 國立中興大學永續農業創新發展中心(IDCSA)

* 聯絡作者, Email: wenchung@nchu.edu.tw

摘要

黃建睿、鍾文全、鍾文鑫。2021。評估兩種精油抑制病原真菌生長及防治草莓灰黴病之效果。植物醫學63(3): 19-30。

評估柚子與檸檬桉精油對八種植物病原真菌菌絲生長的抑制效果, 得知未稀釋之柚子精油透過燻蒸方式, 可分別抑制草莓灰黴病菌GBS3-93與GBS1-104菌株菌絲生長達92.7%與100.0%, 然對綠黴病菌Cmep1-3菌株則有促進生長效果; 而檸檬桉精油在稀釋低於10倍時, 可抑制八種植物病原真菌菌絲生長達96.6%-100.0%。在PDA培養基添加精油試驗中, 顯示稀釋100倍柚子精油對小白菜炭疽病菌PA01菌株與草莓灰黴病菌GBS1-104和GBS3-93菌株之生長抑制率較佳, 分別有89.8%、81.1%及73.4%, 然對綠黴病菌Cmep1-3菌株有促進生長現象; 而添加檸檬桉精油結果得知, 稀釋1,000倍檸檬桉精油時, 可抑制多數供試植物病原菌生長。評估柚子與檸檬桉精油對七種植物病原真菌孢子發芽的抑制效果, 結果顯示稀釋50倍以下的柚子精油, 對其中5種病原真菌抑制效果達92.6%以上, 然對綠黴病菌Cmep1-3菌株則具有促進孢子發芽效果(>65.4%); 而檸檬桉精油稀釋至500倍時, 仍對所有供試病原菌孢子發芽具有80.1%以上的抑制效果。評估兩種精油防治草莓灰黴病之效果, 結果得知於接種病原後1小時再施用兩種精油之防治效果表現較佳。以氣相層析質譜聯用技術分析上述兩種精油主要成份, 證實柚子精油中的主要成分為檸檬烯, 約含96.27%; 而檸檬桉精油之主要成分為香茅醛與香茅醇, 含量分別約為43.69%與17.06%。

關鍵詞: 精油、柚子、檸檬桉、防治

緒言

植物不具有自由移動的能力, 為了抵抗外來的威脅與各種

環境逆境, 許多植物演化出可產生多種具生物活性之二次代謝物的能力⁽⁷⁾; 而這些植物常被人們當作藥材、香料或飲料, 如枸杞(Chinese wolfberry, *Lycium barbarum* L.)、人參(ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer)、蔥(welsh onion, *Allium fistulosum* L.)、蒜(garlic, *Allium sativum* L.)、茶葉(tea tree, *Camellia sinensis* L.)等⁽⁸⁾。植物萃取液(plant extracts)是透過水、乙醇、甲醇、乙酸乙酯或正己烷等溶劑將有效成分萃取出來, 在植物病害防治上的應用非常廣泛⁽⁹⁾。Hsieh氏等人(2005)曾報導67種植物的水或50%乙醇萃取液對4種常見病原菌生長具抑制效果, 其中4種萃取液對蕁蘭細斑病菌(*Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg ex Gerlach et Nirenberg F801)、19種萃取液對小白菜炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum* Saccardo PA01)、7種萃取液對十字花科黑斑病菌(*Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire ABA31)、5種萃取液對百合灰黴病菌(*Botrytis elliptica* (Berkeley) Cooke B066)之孢子發芽有顯著抑制效果⁽¹³⁾。此外, 野生龍葵(garden nightshade, *Solanum nigrum* Linn.)粗萃取液亦可抑制*A. brassicicola* (ABA31與ABB 16)菌株之孢子發芽率達33-42%⁽⁹⁾。另植物萃取液中, 有部分成分由於沸點較低, 易揮發, 因此可以用成本低, 操作簡易的水蒸氣蒸餾法加以萃取, 而這類的物質, 被稱為植物精油(essential oil)⁽²³⁾。

植物精油為一類由植物本身製造的揮發性化合物, 具有特殊的氣味, 目前已有報導指出, 精油在植物的防禦反應過程中可能扮演重要角色⁽²⁾, 且某些精油具有殺真菌^(28, 35)、殺細菌⁽¹⁷⁾及抗蟲⁽⁸⁾等功效。此外, 精油也常被應用在日常生活, 如食品保鮮劑、驅蟲劑及抗菌劑等⁽¹⁰⁾; 而在醫學上亦可被用作止痛劑、鎮靜劑⁽²⁾、消炎藥⁽²⁹⁾及抗氧化劑⁽³⁰⁾。目前大部分被使用的精油皆來自於香草植物, 這些植物由於葉片、枝條、樹皮等, 經過搓揉後會散發出特別的氣味, 如: 唇形花科的迷迭香(rosemary, *Rosmarinus officinalis* L.)、薰衣草(lavender, *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* L.)、牛至

(*Origanum*, *Origanum syriacum* var. *bevanii* L.)⁽³¹⁾、菊科的洋甘菊(chamomile, *Matricaria chamomilla* L.)、桃金娘科的檸檬桉(*lemon eucalyptus*, *Eucalyptus citriodora* Hook.)及芸香科的芸香(*ruta*, *Ruta graveolens* Linn.)與柚子(pomelo, *Citrus maxima* Burm.)⁽¹⁶⁾等。其中, 芸香科柑橘屬與桃金娘科桉屬植物的精油, 近年來在植物保護上的應用逐漸被重視, 且部分精油已被開發成保護製劑^(3, 4, 11, 16, 25)。

依前人研究得知, 柑橘屬的精油對34種以上的植物病原菌生長有抑制效果, 主要的抑菌成分為檸檬烯, 且依柑橘種類不同, 含量介於31%至97%之間, 而以柚子精油中的檸檬烯含量最高, 可達96.62%⁽¹⁶⁾。在台灣, 柚子種植面積約有4,271公頃, 每年產量可達60,000~70,000公噸(102年農業統計年報, <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>), 且柚子精油已被報導對11種植物病原菌有抑制效果⁽¹⁶⁾。檸檬桉為桃金娘科桉屬的植物, 因其枝葉會散發檸檬般的香氣而得名, 且樹勢高大, 葉多, 枝幹光滑, 生長快速, 具有脫落性的樹皮為其重要特徵⁽⁴⁾; 而在世界各地亦常被作為紙漿與香水的原料使用⁽¹⁾。於應用方面, 檸檬桉精油被報導可用於輔助治療人類後天免疫缺乏症候群(AIDS)所併發的結核菌(*tuberculosis*)感染⁽²⁶⁾; 在動物醫學上可利用微膠囊的形式, 作為治療綿羊腸胃線蟲(*sheep gastrointestinal nematodes*)感染的藥劑⁽²⁷⁾。農業應用方面, 亦證實檸檬桉精油可當作殺真菌劑⁽²⁵⁾或殺蟲劑⁽³⁾。Tripathi 氏等人(2008)曾指出, 500 mg/L檸檬桉精油可完全抑制葡萄灰黴病菌(*Botrytis cinerea* Persoon)的生長達100%⁽³³⁾; 另亦有報告指出, 檸檬桉精油對*Aspergillus terreus* Thom. & A. *nidulans* (Eidam) G. Winter, *A. fumigatus* Fresenius及*A. flavus* Link等四種*Aspergillus*屬的真菌生長有抑制的效果, 被認為具防治儲藏期病害的潛力⁽¹⁵⁾。此外, 由於檸檬桉具有明顯的毒他效應(allelopathy), 而此效應被認為與其精油成分有明顯關係, 故檸檬桉精油也被認為是一類有潛力的天然殺草劑⁽⁴⁾。檸檬桉精油的主成分為香茅醛(Citronellal), 可作為防蚊液的成分使用⁽¹⁸⁾, 且具抗真菌的效果⁽²⁴⁾, 更被認為是檸檬桉精油中主要具有殺草效果的成分⁽⁴⁾。

芸香科柑橘屬的柚子為臺灣重要作物, 生產季在每年中秋前後, 為廣受消費者喜愛的季節農產品, 但卻有大量柚子皮之農業廢棄物產生; 而桃金娘科桉屬的檸檬桉是校園或公園常見之樹種, 常有大量落葉或枝條, 亦為常見之廢棄物。本研究目的為, 1)自柚子果皮與檸檬桉落葉等農業廢棄物所萃取的精油, 進行其對八種常見植物病原真菌菌絲生長與孢子發芽的抑制效果; 2)評估柚子與檸檬桉精油對草莓灰黴病的防治效果; 3)分析兩種植物精油之成份。

材料與方法

一、供試菌株與植株

本研究供試菌株由國立中興大學植物寄生菌暨菌類抗藥性分子診斷研究室與中興大學植物病害管理研究室提供, 包括小白菜炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*, PA01)、胡瓜炭疽病菌(*C. orbiculare*, CO-51)、草莓炭疽病菌(*C. gloeosporioides* species complex, CSG 7-3)、草莓灰黴病菌(*Botrytis cinerea*, GBS3-93和GBS1-104)、茄科疫病菌(*Phytophthora capsici*, PC)、番石榴瘡痂病菌(*Pestalotiopsis* sp., PG6-3)、蘭花黃葉病菌(*Fusarium solani* f. sp. *phalaenopsis*, CPY-01A)及香水檸檬(*Citrus medica* L. var. *medica*)綠黴菌(*Penicillium digitatum*, Cmpc1-3)。另實驗中供試草莓(*Fragaria × ananassa* Duchesne)植株品種為香水, 果實品種為豐香。

本研究中精油萃取材料為柚子果皮與檸檬桉葉片, 柚子品種為文旦(*C. maxima* Burm. f. *buntan* Hayata), 購自台中市南區的水果商場; 而檸檬桉葉片則蒐集自國立中興大學校園內種植之檸檬桉樹。

二、精油萃取量

本研究萃取精油之方法修改自Charles與Simon兩氏(1990)所發表的蒸餾萃取法⁽⁷⁾。使用之柚子皮為新鮮材料, 而檸檬桉則為掉落之枯葉, 上述兩種材料各秤取100 g以磨碎機打碎, 裝入1 L錐形瓶中, 加入800 mL的一次逆滲透過濾水與攪拌子, 將裝置管線組合後以陶瓷加熱攪拌器攪拌並加熱, 冷卻管通以0°C-4°C之冷水, 於收集處置放250 mL錐形瓶, 並置於冷卻槽中。持續加熱2小時後, 將收集瓶取下, 置於4°C冰箱中靜置, 待分層後收集上層精油至乾淨樣本瓶中秤重, 並計算回收率。透過該萃取法, 可分別自100 g文旦柚子皮與100 g檸檬桉葉片中, 萃出約7.20 g柚子精油和約0.74 g檸檬桉精油, 兩種精油作為本研究後續試驗之用。

三、柚子與檸檬桉精油對植物病原真菌菌絲生長與孢子發芽之抑制效果

(一) 精油燻蒸處理對植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

將八種植物病原真菌先培養在馬鈴薯蔗糖瓊脂培養基(potato sugar agar, PSA)1-2天後, 以直徑3 mm的圓形打孔器切取菌落邊緣菌絲塊, 移至新的PSA培養基中央, 倒置培養基, 在培養基蓋中央放置直徑8 mm圓形濾紙片, 分別滴上100 μ L未稀釋之柚子精油(揮發後濃度約為1,176 mg/L air), 或以tween 20 (濃度0.01%, v/v)乳化後, 稀釋10、20、50及100倍的柚子精油(揮發後濃度約為118 mg/L air、59 mg/L air、24 mg/L air及12 mg/L air)、稀釋10、50及100倍的檸檬桉精油(揮發後濃度約為118 mg/L air、24 mg/L air及12 mg/L air), 及tween 20 (濃度0.01%), 然後以封口蠟膜(parafilm)將各處理培養基密封, 每處

理3重複。灰黴病菌*B. cinerea* (GBS3-93、GBS1-104)置於20°C，其餘病原菌則置於25°C，於每日照光12小時之定溫生長箱中培養，經2天後測量各處理菌落生長大小。本試驗重複2次。

(二) 培養基添加精油對植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

柚子精油與檸檬桉精油以tween 20 (0.01%)乳化後，加入已滅菌且溫度約為40°C之馬鈴薯瓊脂葡萄糖培養基(potato dextrose agar, PDA)中，分別配成柚子精油100、1,000及10,000倍(濃度約為10,000 mg/L、1,000 mg/L及100 mg/L)、檸檬桉精油1,000、10,000及100,000倍(濃度約為1,000 mg/L、100 mg/L及10 mg/L)及tween 20 (濃度0.01%)培養基。將八種植物病原真菌之3 mm菌絲塊接種至各處理培養基上，然後以封口蠟膜(parafilm)將培養基密封，每處理4重複。*B. cinerea* (GBS3-93、GBS1-104)菌株置於20°C，其餘菌株則置於25°C，於每日照光12小時之定溫生長箱中培養，經2天後測量各處理菌落生長大小。本試驗重複2次。

(三) 精油對植物病原真菌孢子發芽之抑制效果

將培養7天之*C. higginsianum* PA01、*F. solani* f. sp. *phalaenopsis* CPY-01A及*P. digitatum* Cmp1-3菌株，與培養14天*C. gloeosporioides* CSG 7-3、*C. orbiculare* CO-51、*B. cinerea* (GBS3-93、GBS1-104)及*Pestalotiopsis* sp. PG6-3的孢子分別以含6%蔗糖(sucrose)之無菌水洗下，配成 10^5 - 10^6 spores/mL的孢子懸浮液，於1.5 mL微量離心管中與以tween 20 (濃度0.01%)稀釋5、10、25及50倍的柚子精油或稀釋250、500、750及1,000倍的檸檬桉精油混合(V:V=1:1)，調整容器中柚子精油的最終濃度為10、20、50及100倍；檸檬桉精油最終濃度為500、1,000、1,500及2,000倍；tween 20 (濃度0.01%)。均勻混合後將含精油之孢子懸浮液滴於乾淨載玻片上，蓋上蓋玻片，放入置有三角玻璃棒的培養皿中，每處理3重複。*B. cinerea* (GBS3-93、GBS1-104)置於20°C，其餘菌株則置於25°C，於每日照光12小時之定溫生長箱中，經24小時後記錄各處理間孢子的發芽率，每處理鏡檢三個視野，每視野鏡檢50顆孢子，並計算抑制率。本試驗重複2次。

四、評估精油防治草莓灰黴病之效果

(一) 精油防治草莓葉部灰黴病之效果

將生長於溫室，氣溫約20-25°C，每日照光12小時，已有4-5片真葉的草莓香水品種植株(株齡約30天)，接種3 ml灰黴病菌*B. cinerea* GBS1-104的孢子懸浮液(10^6 spores/mL)。草莓植株葉片經接種病原菌前1小時與後1小時，分別噴灑3 ml稀釋50與100倍的柚子精油，或稀釋500與1,000倍的檸檬桉精油。接種後將植株置於透明塑膠箱(35x20x15 cm)中，以黑色塑膠袋套住避光48小時後拆袋，實驗進行時氣溫約20-25°C，塑膠箱中相對

濕度保持在95%-100%，以接種病原菌而不處理精油者當作對照組，每處理為3株，並於14天後記錄各處理間植株發病的情形，本試驗重複2次。罹病度的調查依據Konishi氏等人(2010)將發病程度分為0-4級⁽²⁰⁾，0級為無可見病斑；1級為病斑面積佔葉面積1-5%；2級為病斑面積介於5%-25%；3級為病斑面積佔葉面積介於25%-50%；4級為病斑面積大於50%，計算公式如下：

$$\text{罹病度 (\%)} = \frac{\sum(\text{罹病級數} \times \text{該罹病級數之葉片數})}{\text{採計葉片總數} \times 4} \times 100$$

(二) 精油防治草莓果實灰黴病之效果

參考Zhang氏等人(2007)接種草莓果實灰黴病之方法⁽³⁷⁾，選用重量4-10 g，果直徑2-3 cm，果長2.5-3.5 cm之草莓豐香品種果實，以3 mm打孔器於果實側面製造2 mm深的傷口，滴入15 μ L的草莓灰黴病菌*B. cinerea* GBS1-104孢子懸浮液(10^6 spores/mL)。草莓果實經接種病原菌前1小時與後1小時，分別對果實傷口處噴灑1 mL稀釋50與100倍的柚子精油，或稀釋500與1,000倍的檸檬桉精油。接種後將果實置於相對濕度為95%-100%的透明塑膠袋中，置於20°C無光照的定溫生長箱中，以不處理精油者當作對照組，每處理為3顆，並於3天後記錄各處理間發病的情形，本試驗重複2次。將發病程度分為0-4級，0級為無可見病斑；1級為病斑直徑小於0.5 cm；2級為病斑直徑介於0.5-0.75 cm；3級為病斑直徑介於0.75-1 cm；4級為病斑直徑大於1 cm，計算公式如下：

$$\text{罹病度 (\%)} = \frac{\sum(\text{罹病級數} \times \text{該罹病級數之果數})}{\text{總採計果數} \times 4} \times 100$$

五、利用氣相層析質譜聯用技術(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)分析柚子精油與檸檬桉精油中之成分

精油成分的分析是於中興大學森林系林木代謝學暨天然藥物開發研究室中之氣相層析質譜儀(gas chromatograph mass spectrometer, GC-MS) (型號: TRACE GC ULTRA-ITQ 900)進行。分析條件為管柱DB-5MS(長度30 m、內徑0.25 μ m)、載送氣體為氮氣、流速為1 mL/min，分流比為1:60，起始溫度為50°C、維持1分鐘，接下來以每分鐘4°C的速率加溫至180°C，再改為每分鐘15°C的速率加熱至280°C，並維持10分鐘。將成分分析結果與National Institute of Standards and Technology (NIST)資料庫進行質譜比對，並和現有文獻比較，以找出可能的有效物質。

統計分析

本研究所得之實驗數據以SPSS Statistics統計軟體進行分析，並以Tukey's HSD (Honestly Significant Difference)法分析比較各處理間之差異。

結果

一、柚子與檸檬桉精油對植物病原真菌菌絲生長與孢子發芽之抑制效果

(一) 精油燻蒸處理對植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

柚子與檸檬桉精油透過燻蒸方式處理八種植物病原真菌菌絲之生長，經2天後觀察精油抑制病原菌生長情形。柚子精油抑制真菌生長結果得知，除對*P. digitatum* Cmepl-3菌株不具抑制能力且促進該菌生長外，對其餘供試菌株菌絲之生長抑制效果與處理濃度成正相關性(表一)。未稀釋柚子精油100 μ L對*B. cinerea* GBS3-93與GBS1-104菌株菌絲生長抑制率，分別為92.7%與100.0%；對*C. higginsianum* PA01菌株菌絲生長抑制率為75.9%；而對其他病原真菌生長抑制率則介於0%-47.0%。稀釋10倍之柚子精油對*B. cinerea* GBS3-93、GBS1-104菌株及*C. higginsianum* PA01菌株菌絲生長抑制率皆明顯降低，分別為53.0%、43.0%及30.9%；而對其他病原真菌之抑制率則介於0.0%-10.0%。稀釋20倍柚子精油對所有供試病原菌之抑制率介於0.0%-21.0%，當柚子精油稀釋50倍後，對所有供試病原真菌之生長抑制皆無顯著效果。

檸檬桉精油抑制真菌菌絲生長效果如表二所示，稀釋10倍之檸檬桉精油，對所有供試植物病原真菌生長抑制效果佳，其中對*B. cinerea* (GBS3-93、GBS1-104)、*C. higginsianum* PA01、*C. orbiculare* CO-51、*P. capsici* PC、*P. digitatum* Cmepl-3及*F. solani* CPY-01A等菌株之生長抑制率達100.0%，而對*C. gloeosporioides* CSG7-3與*Pestalotiopsis* sp. PG6-3兩菌株生長抑制率稍低，分別為96.6%與96.8%。稀釋50倍檸檬桉精油對*B. cinerea* GBS1-104菌株生長抑制率仍有100.0%，然對*P. digitatum* Cmepl-3、*F. solani* CPY-01A、*C. orbiculare* CO-51、*P. capsici* PC、*C. higginsianum* PA01及*B. cinerea* GBS3-93等菌株生長抑制率則介於51.0%-93.3%；另對*C. gloeosporioides*

CSG7-3與*Pestalotiopsis* sp. PG6-3兩菌株生長抑制率分別為29.6%與45.0%。稀釋100倍檸檬桉精油，對*B. cinerea* GBS1-104與GBS3-93兩菌株生長抑制率仍有76.8%與89.0%，然對其他病原菌之生長抑制率則介於0.0%-39.8%。

(二) 培養基添加精油對植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

將八種植物病原真菌培養在添加不同濃度柚子與檸檬桉精油的PDA培養基中，經2天後觀察精油抑制病原菌菌絲生長情形。柚子精油抑制真菌生長結果如表三所示。稀釋100倍柚子精油對*C. higginsianum* PA01、*B. cinerea* (GBS1-104、GBS3-93)、*P. capsici* PC、*Pestalotiopsis* sp. PG6-3及*C. gloeosporioides* CSG7-3等菌株生長抑制效果較佳，分別為89.8%、81.1%、73.4%、77.9%、69.1%及55.8%，而對*F. solani* CPY-01A與*C. orbiculare* CO-51兩菌株僅有35.5%與17.2%的抑制效果；當柚子精油稀釋1,000倍及10,000倍後，對所有供試病原真菌生長抑制率介於0.0%-38.7%，抑制效果不顯著。另柚子精油對*P. digitatum* Cmepl-3菌株之生長抑制無效果，且可促進其生長，各稀釋濃度之促進率介於17.5%-48.6%。

檸檬桉精油抑制真菌菌絲生長效果如表四所示。稀釋1,000倍檸檬桉精油對八種植物病原真菌之生長抑制率介於72.2%-100.0%，對*B. cinerea* (GBS1-104、GBS3-93)、*C. gloeosporioides* CSG7-3、*C. higginsianum* PA01、*C. orbiculare* CO-51、*P. capsici* PC及*F. solani* CPY-01A菌株之生長抑制率可達100.0%；然稀釋10,000倍檸檬桉精油對八種植物病原真菌生長抑制效果明顯降低，除對*C. gloeosporioides* CSG7-3與*P. capsici* PC兩菌株仍有82.5%及56.3%外，其餘菌株生長抑制率介於0.0%-33.6%；另稀釋100,000倍檸檬桉精油對八種植物病原真菌生長抑制率介於0.0%-43.0%，效果不顯著。

表一、柚子精油燻蒸對八種植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

TABLE 1. Effect of fumigant toxicity from *Citrus maxima* essential oil on inhibiting mycelial growth of 8 plant fungal pathogens

Diluted folds of essential oil ¹	Inhibition rate (%) ²								
	GBS1-104 ³	GBS3-93 ³	CSG7-3 ³	PA01 ³	CO-51 ³	PC ³	PG6-3 ³	Cmepl-3 ³	CPY-01A ³
1	100.0±0.0 d ⁴	92.7±6.4 d	28.7±2.7 a	75.9±4.4 d	28.3±19.3 a	37.7±3.9 a	25.2±1.7 a	-32.8±24.6 a	46.9±3.8 b
10	43.0±8.0 c	53.0±9.7 c	8.4±2.5 ab	30.9±5.7 c	0.8±3.2 ab	-10.0±3.1 d	8.9±2.5b c	-6.9±20.8 a	5.7±4.4 a
20	20.3±6.0 b	20.0±3.0 b	6.5±0.4 c	20.7±3.0 b	7.7±4.0 ab	-3.3±1.0 cd	10.0±5.0 b	0.3±5.0 a	8.8±8.7 a
50	-0.1±4.4 a	-2.3±3.7 ab	-2.1±3.2 c	-10.4±4.4 a	-9.7±22.5 b	-5.4±2.2 cd	-5.3±3.8 d	-8.3±8.2 a	-2.6±2.8 a
100	4.4±3.2 a	-1.8±4.8 ab	2.5±10.8 c	-3.2±3.1 a	-8.0±5.7 b	-17.3±1.1 c	0.1±1.7 bc	-5.9±4.6 a	4.6±3.9 a
Tween 20	4.2±1.4 a	-11.4±2.4 a	-1.5±2.8 c	-3.2±3.1 a	-5.5±4.5 b	-1.1±3.0 b	0.6±1.7 bc	-17.3±12.5 a	0.9±1.8 a

¹ Essential oils from *C. maxima* were serially diluted with tween 20 (0.01%).² Inhibition rate (%) = (CK-Treatment) / CK × 100.³ Plant pathogen isolates used in this experiment. GBS1-104, GBS3-93: *Botrytis cinerea*; CSG7-3: *Colletotrichum gloeosporioides*; PA01: *C. higginsianum*; CO-51: *C. orbiculare*; PC: *Phytophthora capsici*; PG6-3 *Pestalotiopsis* sp.; Cmepl-3: *Penicillium digitatum*; CPY-01A: *Fusarium solani*.⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

表二、檸檬桉精油燻蒸對八種植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

TABLE 2. Effect of fumigant toxicity from *Eucalyptus citriodora* essential oil on inhibiting mycelial growth of 8 plant fungal pathogens

Diluted folds of essential oil ¹	Inhibition rate (%) ²								
	GBS1-104 ³	GBS3-93 ³	CSG7-3 ³	PA01 ³	CO-51 ³	PC ³	PG6-3 ³	Cmep1-3 ³	CPY-01A ³
10	100.0±0.0 c ⁴	100.0±0.0 b	96.6±3.3 d	100.0±0.0 c	100.0±0.0 d	100.0±0.0 c	96.8±5.5 d	100.0±0.0 c	100.0±0.0 c
50	100.0±0.0 c	93.3±8.3 b	29.6±5.4 c	88.4±10.5 c	68.7±9.9 c	88.0±16.1 c	45.0±2.0 c	51.0±10.6 b	68.7±9.9 b
100	76.8±10.8 b	89.0±4.4 b	15.2±2.4 b	39.8±12.2 b	29.6±5.7 b	29.2±7.1 b	28.6±8.9 b	-18.2±8.9 a	29.6±5.7 a
Tween 20	-6.2±7.4 a	-6.8±5.0 a	-1.2±2.6 a	4.5±12.2 a	-5.2±9.2 a	-0.6±4.1 a	11.2±7.1 a	-29.5±8.7 a	0.9±1.8 a

¹ Essential oils from *E. citriodora* were serially diluted with tween 20 (0.01%).² Inhibition rate (%) = (CK-Treatment) / CK × 100.³ Plant pathogen isolates used in this experiment. GBS1-104, GBS3-93: *Botrytis cinerea*; CSG7-3: *Colletotrichum gloeosporioides*; PA01: *C. higginsianum*; CO-51: *C. orbiculare*; PC: *Phytophthora capsici*; PG6-3 *Pestalotiopsis* sp.; Cmep1-3: *Penicillium digitatum*; CPY-01A: *Fusarium solani*.⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

表三、培養基添加柚子精油對八種植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

TABLE 3. Effect of PDA medium added with *Cirus maxima* essential oil on inhibiting mycelial growth of 8 plant fungal pathogens

Diluted folds of essential oil ¹	Inhibition rate (%) ²								
	GBS1-104 ³	GBS3-93 ³	CSG7-3 ³	PA01 ³	CO-51 ³	PC ³	PG6-3 ³	Cmep1-3 ³	CPY-01A ³
100	81.1±1.5 b ⁴	73.4±1.1 b	55.8±2.8 c	89.8±5.1 b	17.2±5.1 b	77.9±3.4 b	69.1±4.0 b	-48.6±17.7 c	35.5±1.9 c
1,000	38.7±0.9 ab	34.8±6.5 a	10.2±5.4 b	28.7±9.7a	5.2±1.4 a	30.1±6.9 a	25.3±2.9 a	-33.3±3.2 bc	7.9±2.2 ab
10,000	19.1±3.7 a	34.2±7.5 a	8.4±4.3 a	26.7±8.8 a	9.8±4.0 ab	37.5±2.8 a	28.5±0.2 a	-17.5±8.1 ab	8.0±6.0 b
Tween 20	17.1±6.5 a	29.5±5.0 a	3.7±3.5 a	8.4±6.8 a	3.1±4.0 a	42.8±5.8 a	31.8±0.9 a	-6.4±1.9 a	-3.5±7.7 a

¹ Essential oils from *C. maxima* were serially diluted with tween 20 (0.01%).² Inhibition rate (%) = (CK-Treatment) / CK × 100.³ Plant pathogen isolates used in this experiment. GBS1-104, GBS3-93: *Botrytis cinerea*; CSG7-3: *Colletotrichum gloeosporioides*; PA01: *C. higginsianum*; CO-51: *C. orbiculare*; PC: *Phytophthora capsici*; PG6-3 *Pestalotiopsis* sp.; Cmep1-3: *Penicillium digitatum*; CPY-01A: *Fusarium solani*.⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

表四、培養基添加檸檬桉精油對八種植物病原真菌菌絲生長之抑制效果

TABLE 4. Effect of PDA medium added with *Eucalyptus citriodora* essential oil on inhibiting mycelial growth of 8 plant fungal pathogens

Diluted folds of essential oil ¹	Inhibition rate (%) ²								
	GBS1-104 ³	GBS3-93 ³	CSG7-3 ³	PA01 ³	CO-51 ³	PC ³	PG6-3 ³	Cmep1-3 ³	CPY-01A ³
1,000	100.0±0.0 c ⁴	100.0±0.0 b	100.0±0.0 b	100.0±0.0 c	100.0±0.0 b	100.0±0.0 b	84.2±12.2 c	72.2±14.3 b	100.0±0.0 b
10,000	31.6±1.7 b	33.6±5.7 a	82.5±2.3 a	26.9±11.5 b	5.2±8.2 a	56.3±14.1 a	17.0±6.7 a	-18.2±8.0 a	-1.9±2.1 a
100,000	20.2±1.3 a	31.5±3.2 a	9.5±3.1 a	10.0±4.6 a	3.6±2.3 a	43.6±4.8 a	27.7±1.2 ab	-8.7±8.0 a	-0.2±7.3 a
Tween 20	17.1±6.5 a	29.5±5.0 a	3.7±3.5 a	8.4±6.8 a	12.6±12.3 a	42.8±5.8 a	31.8±0.9 b	-6.4±1.9 a	-3.5±7.7 a

¹ Essential oils from *E. citriodora* were serially diluted with tween 20 (0.01%).² Inhibition rate (%) = (CK-Treatment) / CK × 100.³ Plant pathogen isolates used in this experiment. GBS1-104, GBS3-93: *Botrytis cinerea*; CSG7-3: *Colletotrichum gloeosporioides*; PA01: *C. higginsianum*; CO-51: *C. orbiculare*; PC: *Phytophthora capsici*; PG6-3 *Pestalotiopsis* sp.; Cmep1-3: *Penicillium digitatum*; CPY-01A: *Fusarium solani*.⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

(三) 精油對植物病原真菌孢子發芽之抑制效果

將孢子懸浮液與柚子精油混合於玻片上，經24小時後觀察柚子與檸檬桉精油對七種植物病原真菌孢子發芽之抑制效果。柚子精油抑制孢子發芽效果如表五所示。稀釋10倍與20倍柚子精油可抑制*C. higginsianum* PA01、*B. cinerea* GBS1-104、*C. gloeosporioides* CSG7-3、*F. solani* CPY-01A及*Pestalotiopsis* sp. PG6-3等菌株孢子發芽，抑制率介於98.2%-100.0%。稀釋50倍柚子精油可抑制*C. higginsianum* PA01、*B. cinerea* GBS1-104、*C. gloeosporioides* CSG7-3、*F. solani* CPY-01A及*Pestalotiopsis* sp. PG6-3菌株孢子發芽，抑制率介於92.6%-99.7%。稀釋100倍柚子精油可抑制*C. higginsianum* PA01、*B. cinerea* GBS1-104、*C. gloeosporioides* CSG7-3及*Pestalotiopsis* sp. PG6-3等菌株孢子發芽，抑制率介於70.9%-98.6%。另本研究得知，柚子精油對*P. digitatum* Cmepl-3菌株孢子發芽無抑制效果，反而有促進發芽的效果。

檸檬桉精油抑制孢子發芽效果如表六所示。稀釋500倍

檸檬桉精油可抑制*B. cinerea* GBS1-104、*F. solani* CPY-01A、*Pestalotiopsis* sp. PG6-3及*C. gloeosporioides* CSG7-3等菌株孢子發芽達98.2%、98.3%、99.0%及100.0%；對*P. digitatum* Cmepl-3與*C. higginsianum* PA01菌株孢子發芽抑制率則為80.1%與82.7%。稀釋1,000倍檸檬桉精油可抑制*B. cinerea* GBS1-104與*C. gloeosporioides* CSG7-3兩菌株孢子發芽達99.6%與100.0%；對*F. solani* CPY-01A、*P. digitatum* Cmepl-3、*C. higginsianum* PA01及*Pestalotiopsis* sp. PG6-3等菌株孢子發芽抑制率則為83.5%、83.3%、68.2%及59.8%。稀釋1,500倍檸檬桉精油可抑制*B. cinerea* GBS1-104與*C. gloeosporioides* CSG7-3菌株孢子發芽，抑制率達98.6%與88.4%；對*F. solani* CPY-01A、*P. digitatum* Cmepl-3、*C. higginsianum* PA01及*Pestalotiopsis* sp. PG6-3菌株孢子發芽抑制率為84.9%、74.5%、72.1%及59.0%。稀釋2,000倍檸檬桉精油可抑制*B. cinerea* GBS1-104、*F. solani* CPY-01A及*C. gloeosporioides* CSG7-3菌株孢子發芽達97.3%、78.5%及78.5%；對*P. digitatum* Cmepl-3、*F. solani* PA01及

表五、柚子精油對七種植物病原真菌孢子發芽之抑制效果

TABLE 5. Effect of *Citrus maxima* essential oil on inhibiting spore germination of 7 plant pathogens

Diluted folds of essential oil ¹	Inhibition rate (%) ²						
	GBS1-104 ³	CSG7-3 ³	PA01 ³	CO-51 ³	PG6-3 ³	Cmepl-3 ³	CPY-01A ³
10	98.9±1.1 c ⁴	98.2±1.1 b	100.0±0.0 c	100.0±0.0 b	99.5±0.9 b	-70.3±7.5 a	100.0±0.0 d
20	98.6±0.6 c	98.3±1.5 b	100.0±0.0 c	97.6±3.0 b	100.0±0.0 b	-84.6±5.4 a	98.7±1.5 cd
50	93.3±3.4 c	98.1±2.1 b	99.7±0.6 c	99.4±1.0 b	97.5±2.8 b	-65.4±12.3 a	92.6±1.2 bc
100	70.9±14.3 b	98.6±1.6 b	75.2±17.4 b	50.6±21.8 a	97.5±4.4 b	-21.6±29.5 b	87.5±5.6 b
Tween 20	-2.5±1.6 a	0.1±2.0 a	2.0±1.2 a	32.7±4.2 a	1.4±7.6 a	5.2±3.0 b	2.0±1.8 a

¹ Essential oils from *C. maxima* were serially diluted with tween 20 (0.01%).

² Inhibition rate (%) = (CK-Treatment) / CK × 100.

³ Plant pathogen isolates used in this experiment. GBS1-104: *Botrytis cinerea*; CSG7-3: *Colletotrichum gloeosporioides*; PA01: *C. higginsianum*; CO-51: *C. orbiculare*; PG6-3 *Pestalotiopsis* sp.; Cmepl-3: *Penicillium digitatum*; CPY-01A: *Fusarium solani*.

⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

表六、檸檬桉精油對七種植物病原真菌孢子發芽之抑制效果

TABLE 6. Effect of *Eucalyptus citriodora* essential oil on inhibiting spore germination of 7 plant pathogens

Diluted folds of essential oil ¹	Inhibition rate (%) ²						
	GBS1-104 ³	CSG7-3 ³	PA01 ³	CO-51 ³	PG6-3 ³	Cmepl-3 ³	CPY-01A ³
50	100.0±0.0 b ⁴	98.2±0.4 d	82.7±7.0 c	100.0±0.0 d	99.0±1.7 c	80.1±6.3 b	98.3±1.5 d
1,000	100.0±0.0 b	99.6±0.7 d	68.2±12.5 bc	100.0±0.0 d	59.8±1.0 b	83.3±7.9 b	83.5±1.2 cd
1,500	98.6±1.2 b	88.4±1.2 c	72.1±9.1b c	90.3±3.9 c	59.0±2.5 b	74.5±5.1 b	84.9±4.4 bc
2,000	97.3±0.5 b	78.5±2.5 b	51.8±3.1 b	67.0±1.6 b	45.3±12.9 b	68.7±15.2 b	78.5±4.8 ab
Tween 20	-2.5±1.6 a	0.1±2.0 a	-3.3±3.1 a	32.7±4.2 a	1.4±7.6 a	5.2±3.0 b	2.0±1.8 a

¹ Essential oils from *E. citriodora* were serially diluted with tween 20 (0.01%).

² Inhibition rate (%) = (CK-Treatment) / CK × 100.

³ Plant pathogen isolates used in this experiment. GBS1-104: *Botrytis cinerea*; CSG7-3: *Colletotrichum gloeosporioides*; PA01: *C. higginsianum*; CO-51: *C. orbiculare*; PG6-3 *Pestalotiopsis* sp.; Cmepl-3: *Penicillium digitatum*; CPY-01A: *Fusarium solani*.

⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

Pestalotiopsis sp. PG6-3菌株孢子發芽抑制率分別為68.7%、51.8%及45.3%。

二、評估精油防治草莓灰黴病之效果

(一) 精油防治草莓葉部灰黴病之效果

草莓香水品種植株於接種病原菌1小時前，噴灑不同濃度兩種精油防治草莓葉部灰黴病之結果，得知草莓植株處理稀釋50倍與100倍柚子精油後，罹病度分別為72.2%與77.8%；另草莓植株處理稀釋500倍與1,000倍檸檬桉精油後，罹病度分別為66.7%與69.4% (表七)。本研究中草莓葉部接種病原菌1小時前處理0.01% tween 20，罹病度為72.2%。比較處理組與對照組結果，顯示接種草莓灰黴病菌前1小時施用精油時，草莓葉部灰黴病之罹病度與對照施用0.01% tween 20之植株罹病度無顯著差異。

草莓植株接種病原菌1小時後，噴灑精油防治草莓葉部灰黴病之結果，得知草莓植株處理稀釋50倍與100倍柚子精油，罹病度分別為30.6%與50.0%；草莓植株處理稀釋500倍與1,000倍檸檬桉精油後，罹病度分別為25.0%與16.7%。本研究中草莓植株接種病原菌1小時後處理0.01% tween 20，罹病度為77.8% (表七)。比較處理組與對照組結果，顯示接種草莓灰黴病菌後1小時施用精油，可降低草莓葉部灰黴病之罹病度，然與對照施用0.01% tween 20之植株罹病度比較時，僅施用稀釋1,000倍檸檬桉精油之結果與對照組有顯著差異。

(二) 精油防治草莓果實灰黴病之效果

草莓豐香品種果實於接種病原菌1小時前，噴灑不同濃度

表七、兩種精油對草莓葉部灰黴病的防治效果

TABLE 7. Efficacy of two essential oils on control of strawberry leaves gray mold caused by *Botrytis cinerea* GB1-104

Essential oil	Diluted fold ¹	Disease severity (%) ²	
		1 hr before inoculation	1 hr before inoculation
<i>C. maxima</i>	50	72.2±29.3 bc ⁴	30.6±12.7 abc
	100	77.8±9.6 c	50.0±25.0 abc
<i>E. citriodora</i>	500	66.7±22.1 bc	25.0±16.7 abc
	1,000	69.4±29.3 bc	16.7±8.3 ab
Tween 20		72.2±29.3 bc	77.8±17.4 c
CK ³		0.0±0.0 a	0.0±0.0 a

¹ Essential oils from *C. maxima* and *E. citriodora* were serially diluted with tween 20 (0.01%).

² Disease severity (%)=(\sum number of leaves in each scale \times scale number) / (total leaves \times max scale)

³ CK: Not inoculated.

⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

表八、兩種精油對草莓果實灰黴病的防治效果

TABLE 8. Efficacy of essential oils on control of strawberry fruit gray mold caused by *Botrytis cinerea* GB1-104

Essential oil	Diluted fold ¹	Disease severity (%) ²	
		1 hr before inoculation	1 hr before inoculation
<i>C. maxima</i>	50	79.2±14.4 d ⁴	41.7±14.4 bc
	100	54.2±19.1b cd	33.3±14.4 abc
<i>E. citriodora</i>	500	83.3±19.1 d	25.0±0.0 ab
	1,000	41.7±14.4 bc	29.2±7.2 abc
Tween 20		62.5±12.5 cd	87.5±12.5 d
CK ³		0.0±0.0 a	0.0±0.0 a

¹ Essential oils from *C. maxima* and *E. citriodora* were serially diluted with tween 20 (0.01%).

² Disease severity (%)=(\sum number of leaves in each scale \times scale number) / (total leaves \times max scale)

³ CK: Not inoculated.

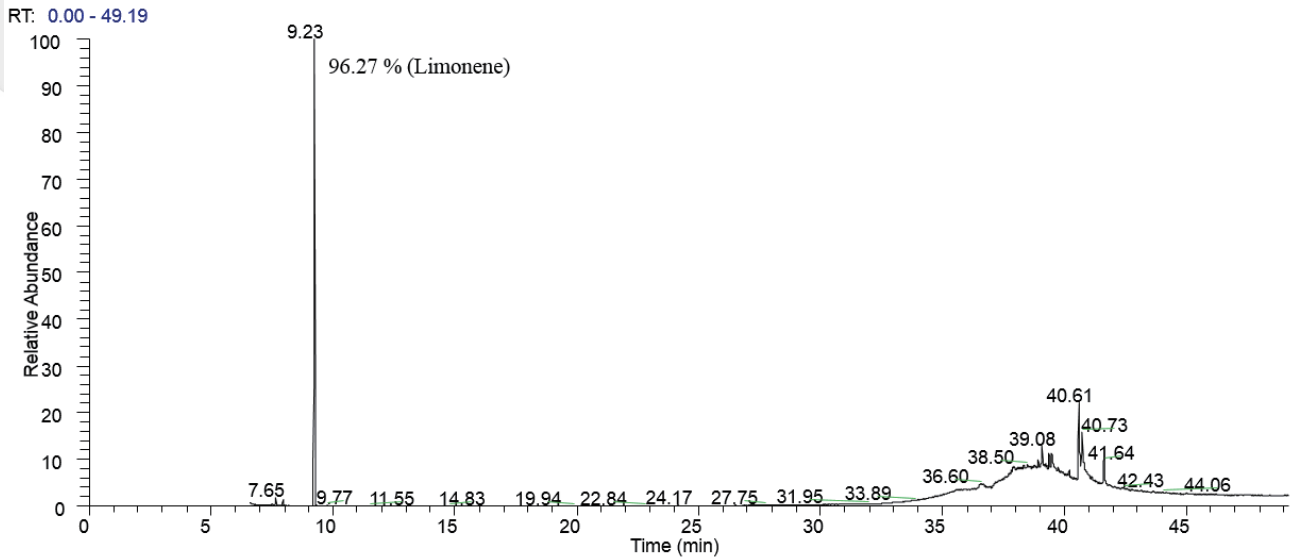
⁴ Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05) according to Tukey's HSD (Honestly Significant Difference).

兩種精油防治草莓果實灰黴病之結果，得知草莓果實於接種1小時前處理稀釋50倍與100倍柚子精油後，罹病度分別為79.2%與54.2%；草莓果實處理稀釋500倍與1,000倍之檸檬桉精油後，罹病度分別為83.3%與41.7% (表八)。本研究中草莓果實接種病原菌1小時前處理0.01% tween 20，罹病度為62.5%。比較處理組與對照組結果，顯示接種草莓灰黴病菌前1小時施用精油時，草莓果實灰黴病之罹病度與對照施用0.01% tween 20之果實罹病度無顯著差異。

草莓果實於接種病原菌1小時後，噴灑精油防治草莓果實灰黴病之結果，得知草莓果實處理稀釋50倍與100倍柚子精油後，罹病度分別為41.7%與33.3%；草莓果實處理稀釋500倍與1,000倍之檸檬桉精油後，罹病度分別為25.0%與29.2% (表八)。本研究中草莓果實接種病原菌1小時後處理0.01% tween 20，罹病度為87.5%。比較處理組與對照組結果，顯示接種草莓灰黴病菌後1小時施用精油，可降低草莓果實灰黴病之罹病度，且皆較對照施用0.01% tween 20之果實罹病度有顯著差異。

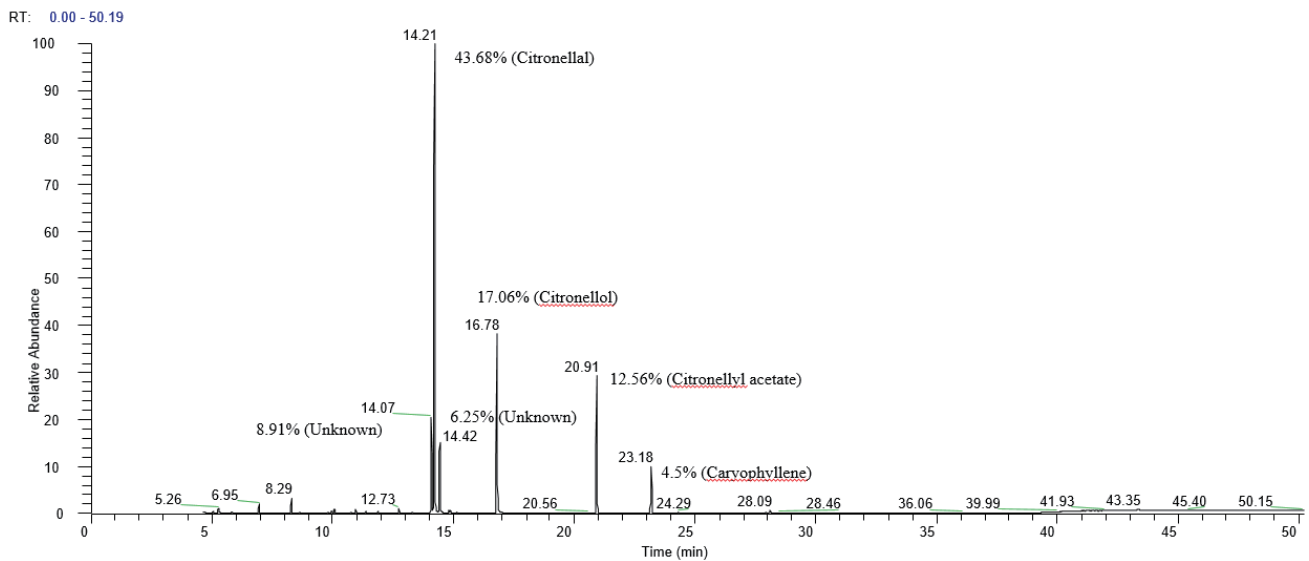
三、柚子精油與檸檬桉精油成分分析

透過GC-MS分析兩種精油成分的結果，證實於柚子精油之氣相層析圖譜的流洗時間9.23 min處有一明顯的訊號，占總積分面積約96.27% (圖一)，比對其質譜圖與分子量，判斷該化合物為檸檬烯(limonene)。於檸檬桉精油之氣相層析圖譜之流洗時間14.07、14.21、14.42、16.78、20.91及23.18 min處有6個明顯的訊號，此六種化合物分別占總積分面積約8.91%、43.69%、6.25%、17.06%、12.56%及4.50% (圖二)，其中佔43.69%、17.06%、12.56%及4.5%之化合物透過比對其質譜圖與分子量，判斷這些化合物分別為香茅醛(citronellal)、



圖一、柚子精油之氣象層析圖譜，含量最高為檸檬烯(Limonene)，佔96.27%。

Fig. 1. GC spectrum of *C. maxima*. The limonene (96.27%) is major compound of pomelo essential oil.



圖二、檸檬桉精油之氣象層析圖譜，含量較高成份分別為香茅醛(Citronellal, 43.63%)、香茅醇(Citronellol, 17.06%)、乙酸香葉酯(Citronellyl acetate, 12.56%)、石竹烯(Caryophyllene, 4.5%)及兩種未知化合物(Unknown, 8.91%與6.25%)。

Fig. 2. GC spectrum of *E. citriodora*. The main compounds include Citronellal (43.63%), Citronellol (17.06%), Citronellyl acetate (12.56%), Caryophyllene (4.5%) and unknown (8.91% and 6.25%) in *E. citriodora* essential oil.

香茅醇(citronellol)、乙酸香葉酯(citronellyl acetate)及石竹烯(caryophyllene)，而另兩種化合物(佔8.91%與6.25%)則無法透過比對其質譜圖與分子量來判定為何種化合物。

討 論

利用蒸餾萃取法，萃取新鮮文旦柚皮和檸檬桉落葉中的

精油，得知文旦柚皮和檸檬桉落葉中精油含量分別為7.20%與0.74%。Tsai氏曾報告，新鮮的文旦柚果皮以蒸餾法萃取，可萃得1.62%的精油，較本研究之回收率低⁽³⁴⁾。比較本研究使用的方法與Tsai氏之方式，得知Tsai氏未將材料打碎，且使用常溫水作為冷卻水。前人研究指出，精油屬高揮發性的化合物⁽²³⁾，且儲存在果皮中的油囊細胞內⁽²²⁾。本研究中使用之柚子皮於蒸餾前先以均質機打碎，可破壞植物組織，使精油釋出量增加；且研究中之萃取裝置使用0°C-4°C冷卻水，可增加精油凝結

效率，降低蒸餾時的逸散，導致精油之萃取效率較Tsai氏佳。檸檬桉精油萃取方面，根據Batish氏等人的報導，100 g檸檬桉枯葉所含精油量約2.36 ml，較本研究中所萃得的量(約0.82 ml)高⁽⁴⁾。前人研究曾指出，植物精油含量會因環境逆境而增加，如藿香薷⁽¹⁹⁾；另根據Jing氏等人之報告指出，檸檬桉葉與果皮中的精油量與成分，會隨栽培區域與氣候不同而改變，指出環境會影響植物精油含量⁽¹⁶⁾。比較Batish氏等人所萃取檸檬桉精油量與本研究萃取之檸檬桉精油量之差異，得知該氏等人之檸檬桉葉片取自印度的昌迪加爾(Chandigarh)，當地年雨量約為979 mm/yr，且降雨之76%集中於6-9月，其餘月分降雨皆低於50 mm (<http://sdwebx.worldbank.org/climateportal/>)⁽⁴⁾；而台灣台中地區年雨量約為1642 mm/yr，於2-9月降雨皆高於80 mm (http://content.edu.tw/senior/earth/yl_ld/content/rain/4/41.htm)，顯示兩地區之氣候環境有明顯差異，推測兩地區檸檬桉葉片中的精油含量與成分可能因此產生差異性。此外，Batish氏等人之研究亦指出，100 g檸檬桉成熟葉所含精油量約4.80 ml，為落葉中精油含量的2倍以上，且香茅醛(citronellal)含量為落葉中精油之1.5倍，故未來可以新鮮檸檬桉葉片作為萃取材料，以提升萃取效率，並降低成本⁽⁴⁾。

本研究將柚子精油以燻蒸方式處理，得知對供試菌株的生長抑制效果隨使用濃度增加而提昇，但對*P. digitatum* Cmepl-3菌株則會促進生長，證實在高濃度下，精油對抑制病原真菌菌絲生長有較佳效果，且效果會因菌株不同而有差異。根據前人研究指出，當精油未達抑制濃度時，可能會有促進部分病原菌生長或孢子發芽的現象⁽²¹⁾，此現象於本研究中以稀釋50倍以上之柚子精油燻蒸處理的結果中亦可觀察到。另柚子精油對卵菌綱的*P. capsici* PC菌株無抑制效果，顯示柚子精油對卵菌類病原的抑制效果不佳，然實驗中只針對單一菌株，未來需測試更多卵菌類病原以確定其有效性。柚子精油添加於培養基對供試菌株的生長抑制效果與燻蒸效果類似，當濃度增加時，可促進菌株生長抑制效果，但效果會因菌株不同而有差異；而當培養基添加稀釋1,000倍以上的柚子精油後，會有促進部分病原菌生長的效果。比較精油以燻蒸或加入培養基之處理結果，本研究使用之塑膠培養皿容量約為100 mL(直徑8.925 cm、高1.6 cm)，各皿培養基量約為12.5 mL-15 mL，若精油於培養皿中完全揮發，則精油燻蒸試驗中稀釋1倍至100倍的柚子精油於培養皿中的濃度約為1,176 mg/L至12 mg/L；而含稀釋100、1,000及10,000倍柚子精油培養基中所含柚子精油濃度則分別為10,000 mg/L、1,000 mg/L及100 mg/L。將燻蒸稀釋1倍之柚子精油與含稀釋1,000倍柚子精油培養基對病原真菌生長抑制結果進行比較，顯示當濃度接近1,000 mg/L時，柚子精油以燻蒸的方式，較能有效抑制病原真菌生長。前人研究曾比較燻蒸與培養基添加柳橙精油，對*Aspergillus*屬植物病原菌之生長抑制效果，亦顯示當柳橙精油以燻蒸的方式較能有效抑制病原真菌生長^(16, 28)，指出使用方法的不同，會影響精油的效果。另Fisher

與Phillips兩氏亦指出，培養基之結構會影響培養基中揮發性物質的釋放，導致精油對病原真菌的抑制效果降低⁽¹¹⁾。在孢子發芽的抑制效果上，得知稀釋100倍之柚子精油(約10,000 mg/L)，能夠抑制CSG7-3與PG6-3孢子發芽達約100%，然對菌絲生長抑制率低於80%，顯示柚子精油對孢子之毒性可能較高。另根據Sharma與Tripathi兩氏研究結果指出，100%抑制病原真菌孢子發芽所需之柳橙精油濃度較100%抑制病原菌生長之濃度低，應顯示柳橙精油對真菌孢子之毒性亦較高⁽²⁸⁾；比較兩精油之差異後得知，柳橙精油之主成分為檸檬烯(約84.2%)，證實檸檬烯對真菌孢子之毒性可能較強，未來可進一步了解檸檬烯影響孢子發芽之作用機制。

於檸檬桉精油測試結果指出，檸檬桉精油抑制供試菌株菌絲生長效果的情形與柚子精油相似，抑制效果隨使用濃度增加而提昇，於高濃度時對真菌之生長抑制效果較佳，且效果會因菌株不同而有差異；此外，當精油未達抑制濃度時，可能會有促進部分病原菌生長或孢子發芽的現象。比較檸檬桉精油與柚子精油之抑制效果，顯示檸檬桉精油抑制供試病原真菌菌株之生長效果較柚子精油佳，推測其原因應與所含成分有關。檸檬桉精油之主要有效成分則為香茅醛與香茅醇，而柚子精油之主要成分為檸檬烯。依三種物質之毒性資料指出，香茅醛與香茅醇對大鼠之LD₅₀分別為2,420 mg/kg (<http://www.sciencelab.com/>)與3,450 mg/kg (<https://www.sigmaaldrich.com/>)，而檸檬烯對大鼠之半數致死濃度(LD50)為4,400 mg/kg (<https://www.sigmaaldrich.com/>)，顯示檸檬桉精油中的香茅醛與香茅醇之毒性皆較文旦柚精油中的檸檬烯高。比較檸檬桉精油以燻蒸或加入培養基之處理結果，將燻蒸試驗中稀釋10倍(濃度約118 mg/L)之檸檬桉精油，與含稀釋10,000倍檸檬桉精油培養基(濃度約100 mg/L)對供試菌株的生長抑制效果進行比較，可知於同樣濃度下，檸檬桉精油與柚子精油相同，以燻蒸的方式較能抑制病原菌之生長。另於檸檬桉精油抑制菌絲生長與孢子發芽的結果，顯示1,000 mg/L檸檬桉精油對8種供試病原菌中7種菌株之菌絲生長抑制率可達100%，然對孢子發芽抑制率則不佳，僅對其中2種孢子發芽抑制率有較明顯效果約100%，顯示檸檬桉精油對真菌菌絲之毒性較強，此結果與柚子精油處理不同；由於兩種精油的成分相異，推測此現象可能是因作用機制不同造成，未來可比較處理兩種精油後對孢子與菌絲之細胞結構破壞性。

本研究得知，柚子精油對自香水檸檬分得的*P. digitatum* Cmepl-3菌株有促進菌絲生長與孢子發芽之效果。前人研究曾分析各種柑橘屬精油之主要成分，並測試對*P. digitatum*與*P. italicum*病原真菌的生長抑制效果，得知各種柑橘精油中非檸檬烯的單萜類(monoterpene)與倍半萜類(sesquiterpene)含量與抑制*P. digitatum*和*P. italicum*生長能力成正相關⁽⁵⁾。本研究萃取之柚子精油含約96.27%的檸檬烯，非檸檬烯的單萜類與倍半萜類含量低，故可能導致無法有效抑制*P. digitatum*。另Tan與Day兩氏亦報告*P. digitatum* NRRL1202菌株具有檸檬烯轉

化為 α -terpineol 的能力⁽³²⁾，顯示某些 *P. digitatum* 菌株對檸檬烯之感受性低，且能夠將其代謝，本實驗所使用的 *P. digitatum* Cmp1-3 是否屬於此類菌株，未來需進一步測定對檸檬烯的代謝能力。

利用柚子精油與檸檬桉精油防治草莓葉部與果實灰黴病，結果顯示精油於接種病原菌後1小時施用，對灰黴病防治效果較佳，推測此差異可能是由於精油本身屬高揮發性物質⁽¹⁴⁾，於提前施用兩種精油條件下，無法在草莓葉部或果實上長時間保持其效果；而接種病原後再施用，精油可直接接觸病原，進而出現較佳防治效果。本研究中也觀察到施用高濃度柚子精油(稀釋50倍)與檸檬桉精油(稀釋500倍)，對植株可能會有藥害產生之現象(結果未顯示)。Hsieh 氏等人曾指出，丁香精油可能會對植物表面造成傷害，加重香蕉炭疽病之發病嚴重度，推論本研究使用兩種精油對草莓果實與幼葉等脆弱的組織仍可能造成傷害，若於病原菌接種前施用過高濃度的精油，可能會造成植物表面蠟質的減損或細微的傷口，增加病原菌侵染的機率；而接種病原後再施用高濃度精油可能仍會對植株造成傷害，唯精油同時抑制了病原發芽或菌絲生長，故降低了病原侵染機率，然未來仍需進一步透過顯微觀察，確定精油對果表或葉表是否會造成傷害⁽¹²⁾。

本研究分析文旦柚精油與檸檬桉精油成分，得知文旦柚精油含96.27%檸檬烯，與Tsai 氏(2005)報導文旦柚精油含95.85%檸檬烯相似。另得知柚子精油之檸檬烯含量會隨栽培環境不同而改變，約介於31%-97%，顯示植物中精油的成分比例，可能隨著作物栽培環境或作物品種等而有大幅度的差異⁽¹⁶⁾。此外，分析檸檬桉落葉精油中，指出其主要成分為香茅醛與香茅醇，含量分別為43.69%與17.06%⁽¹⁷⁾，與前人結果所述，檸檬桉落葉中精油含香茅醛與香茅醇含量分別為53.87%與7.81%有差異⁽⁴⁾；推測此差異亦可能是因栽培環境不同所造成^(16, 28)。

文旦柚皮與檸檬桉落葉分別為台灣本土與國外造紙業於農業和工業生產時製造的農業廢棄物，本研究結果顯示，此兩種材料皆可作為精油萃取來源，並具有應用於防治植物病害的潛力。未來仍可繼續測試精油於溫室或田間是否也有防治草莓灰黴病或其他作物病害的能力，並篩選適當的施用方法或劑型，來降低精油可能造成的藥害和其於開放空間的散失，開發成更具植物病害防治效果的資材。

誌 謝

本研究承蒙教育部高教深耕計畫特色領域研究中心計畫永續農業創新發展中心計畫經費補助得以順利完成，謹此致謝。

參考文獻

1. Akhtar, M. M., Srivastava, S., Sinha, P., Singh, D. K., Luqman, S., Tandon, S. and Yadav, N. P. 2014. Antimicrobial potential of topical formulation containing essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook. Ann. Phytomedicine 3: 37-42.
2. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.
3. Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K. and Kaur, S. 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol. Manag. 256: 2166-2174.
4. Batish, D. R., Singh, H. P., Setia, N., Kaur, S. and Kohli, R. K. 2006. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. Z. Naturforsch. C. 61: 465-471.
5. Caccioni, D. R., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A. and Ruberto, G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. Int. J. Food Microbiol. 43: 73-79.
6. Charles, D. J. and Simon, J. E. 1990. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 458-462.
7. Chiang, Y. J. 2011. Plant application and regulation against environmental stresses. Agri. Politics Sentiment 231: 78-85. (In Chinese)
8. Choi, W. S., Park, B. S., Lee, Y. H., Jang, D. Y., Yoon, H. Y. and Lee, S. E. 2006. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. Crop Prot. 25: 398-401.
9. Fan, M. C. 2008. Effect of black nightshade extracts on spore germination of *Alternaria brassicicola* and identification of its antifungal compounds. Department of Plant Pathology (National Chung Hsing University), pp. 1-26.
10. Fisher, K. and Phillips, C. A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. J Appl. Microbiol. 101: 1232-1240.
11. Fisher, K. and Phillips, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends Food Sci. Tech. 19: 156-164.
12. 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)
13. 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)
 14. Lin, C. T., Lai, W. C., Hsiao, W. F. and Wang, S. Y. 2007. Repellency and killing activities of essential oil from *Cryptomeria japonica* heartwood against silver fish (*Lepisma saccharina*). *Q. J. Chinese Forest.* 40: 251-260.
 15. Javed, S., Shoab, A., Mahmood, Z., Mushtaq, S. and Iftikhar, S. 2012. Analysis of phytochemical constituents of *Eucalyptus citriodora* L. responsible for antifungal activity against post-harvest fungi. *Nat. Prod. Res.* 26: 1732-1736.
 16. Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., Sumner, L.W. and Zhou, Z. 2014. Antifungal activity of citrus essential oils. *J. Agr. Food Chem.* 62: 3011-3033.
 17. Kim, J., Marshall, M. R. and Wei, C. I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agr. Food Chem.* 43: 2839-2845.
 18. Kim, J. K., Kang, C. S., Lee, J. K., Kim, Y. R., Han, H. Y. and Yun, H. K. 2005. Evaluation of repellency effect of two natural aroma mosquito repellent compounds, citronella and citronellal. *Entomol. Res.* 35: 117-120.
 19. Kong, C., Hu, F. and Xu, X. 2002. Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles from *Ageratum conyzoides* under stress. *J. Chem. Ecol.* 28: 1173-1182.
 20. Konishi, H., Ogawara, T., Keisuke, S. and Yasunori, T. 2010. Hot water spraying for the control of anthracnose and gray mold on strawberry. *Bull. Hort. Institute* 17: 43-46.
 21. Kuate, J., Foko, J., Ndingeng, S. A., Jazet-Dongmo, P. M., Fouré, E., Damesse, F. and Ducelier, D. 2006. Effect of essential oils from citrus varieties on in vitro growth and sporulation of *Phaeoramularia angolensis* causing citrus leaf and fruit spot disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 151-161.
 22. Ladaniya, M. S. 2008. Fruit morphology, anatomy, and physiology. Pages 103-124 in: *Citrus Fruit*, M.S. Ladaniya, ed. Academic Press, San Diego.
 23. Lin, C. T., Lai, W. C., Hsiao, W. F. and Wang, S. Y. 2007. Repellency and killing activities of essential oil from *Cryptomeria japonica* Heartwood against Silver Fish (*Lepisma saccharina*). *Q. J. Chinese Forest.* 40: 251-260.
 24. Nakahara, K., Alzoreky, N. S., Yoshihashi, T., Nguyen, H. T. and Trakoontivakorn, G. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). *Jap. Agr. Res. Q.* 37: 249-252.
 25. Ramezani, H., Singh, H., Batish, D. and Kohli, R. 2002. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia* 73: 261-262.
 26. Ramos Alvarenga, R. F., Wan, B., Inui, T., Franzblau, S. G., Pauli, G. F. and Jaki, B. U. 2014. Airborne antituberculosis activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *J Nat. Prod.* 77: 603-610.
 27. Ribeiro, J., Ribeiro, W., Camurça-Vasconcelos, A., Macedo, I., Santos, J., Paula, H., Magalhães, R. and Bevilacqua, C. 2014. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. *Vet. Parasitol.* 204: 243-248.
 28. Sharma, N. and Tripathi, A. 2006. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World J. Microb. Biot.* 22: 587-593.
 29. Silva, J., Abebe, W., Sousa, S., Duarte, V., Machado, M. and Matos, F. 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* 89: 277-283.
 30. Singh, H. P., Kaur, S., Negi, K., Kumari, S., Saini, V., Batish, D. R. and Kohli, R. K. 2012. Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT-Food Sci. Technol.* 48: 237-241.
 31. Soyulu, E. M., Kurt, Ş. and Soyulu, S. 2010. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food Microbiol.* 143: 183-189.
 32. Tan, Q. and Day, D. F. 1998. Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 96-101.
 33. Tripathi, P., Dubey, N. and Shukla, A. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J. Microb. Biot.* 24: 39-46.
 34. Tsai, J. J. 2005. Processing and utilizing of citrus peel. *Research and Development of Citrus Industry in Taiwan* 1:249-259. (In Chinese)
 35. Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A. and Efthimiadou, A. 2013. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Not. Bot. Horti Agrobi.* 41: 86-92.
 36. Yeh, M. S. 1998. Application of special crops in mountains. *Special Publication of TARI* 68:125-141. (In Chinese)
 37. Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Cao, J. and Meng,

R. 2007. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. Biol. Control 40: 287-292.

ABSTRACT

Huang, C. J., Chung, W. C., Chung, W. H. 2021. Evaluation of two essential oils on mycelial inhibition of fungal pathogens and control of gray mold in strawberry in Taiwan. J. Plant. 63(3): 19-30.

*Corresponding author, E-mail: wenchung@nchu.edu.tw

Two essential oils extracted from pomelo (*Citrus maxima*) and lemon eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) were evaluated their inhibitory effects on mycelial growth of 8 plant fungal pathogens. The fumigation test showed that the pomelo essential oils (PEO) without dilution had best inhibitory ability to mycelial growth of *Botrytis cinerea* by 92.7% for isolate GBS3-93 and by 100% for isolate GBS1-104, whereas mycelial growth of *Penicillium digitatum* isolate Cmep1-3 was induced. The lemon eucalyptus essential oil (LEEO) with 10-fold dilution could inhibit mycelial growth of all fungal pathogens by 96.6~100.0%. In PDA medium added with essential oil test, 100-fold dilution PEO showed the best growth inhibition by 81.1% for isolate GBS3-93, by 89.8% for isolate GBS1-104 and by 73.4% for *Colletotrichum higginsianum* isolate PA01, respectively, while mycelial growth of Cmep1-3 was induced. All of fungal pathogens were inhibited by 1,000-fold dilution LEEO. In spore germination test, the 50-fold dilution PEO could inhibit 5 fungal pathogens more than 92.6% and induce spore germination of Cmep1-3 more than 65.4%; meanwhile, LEEO could inhibit the germination more than 80.1% under 500-fold dilution. Spraying PEO and LEEO at 1 hr after *B. cinerea* pathogen inoculation in a greenhouse showed significantly control efficacy compared with pathogen inoculation only. The GC-MS analyses demonstrated that major compounds were limonene (96.27%) for PEO and citronellal (43.139%) and citronellol (17.06%) for LEEO, respectively.

Keywords: essential oil, pomelo, lemon eucalyptus, control