

兩種植物萃取液對茄科植物細菌性斑點病病原菌(*Xanthomonas axonopodis*)之生長抑制效果

姚國山^{1,*} 曾國欽²

¹ 明道管理學院精緻農業學系

² 國立中興大學植物病理學系

摘要

評估分析無患子(*Sapindus mukorossi* Gaertn.)、穿心蓮(*Andrographis paniculata* Nees.)等兩種植物之萃取液、及 81.3%嘉賜銅可濕性粉劑對茄科植物細菌性斑點病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40)之抗菌活性。結果顯示無患子(*Sapindus mukorossi*)萃取液(100 倍, v/v)對引起茄科植物細菌性斑點病之病原菌株(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40)及其他 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1 菌株的抗菌活性, 顯著地較 81.3%嘉賜銅(Kasugamycin and Copper Oxochloride) 化學藥劑在推薦濃度下之抗菌活性為佳; 而穿心蓮之甲醇萃取液(50 mg/ml)對茄科植物細菌性斑點病之菌株(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40)抗菌活性則與化學藥劑之抗菌活性相近。無患子及穿心蓮萃取液對 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. XVT40 生長的最低抑制濃度(MIC)分別為 5 mg/mL 及 10 mg/mL。

關鍵詞：茄科植物細菌性斑點病、無患子、穿心蓮、植物萃取液

*通訊作者. Tel. : 04-8876660-1100

Fax : 04-8783783

E-mail address : ksyao@mdu.edu.tw

前 言

化學農藥使用近半個世紀以來，在作物病蟲害防治，以及保證糧食作物的生產和推動農業的發展上做出了很大的貢獻，但長期大量地使用化學農藥，其衍生之問題逐漸浮現，如害蟲疫病菌產生抗藥性，造成環境污染危害人類健康。此外，農藥殺死害蟲疫病菌的同時也大量殺死天敵，使害蟲疫病菌失去了自然控制。

為解決化學農藥帶來的各種問題，各國紛紛尋求非化學防治方法的新途徑，其中以植物萃取液作為非農藥配方則引起了廣泛的關注。例如 Singh 及 Sharma (1978) 曾報告野芋葉片及蘿蔔葉片萃取液可抑制鐮胞菌孢子發芽，Jagadish 及 Reddy (1986) 則指出檸檬桉葉片、曼陀蘿葉片及月桔葉片萃取液可抑制炭疽病孢子發芽及菌絲生長等。另外如大蒜、辣椒、苦楝、艾草、薄荷、除蟲菊、萬壽菊、苦茶粕、菸葉、九層塔（羅勒）、蔥、韭、薑、芙蓉（蘼艾）、決明、臭杏、百部、樟腦油、蓖麻油、肉桂油等天然資材或其萃取物或加工製成之製劑亦可用來防治香草等植物之病蟲害（徐等, 2002），Konstantinidou-Doltsinis 及 Schmitt (1998) 則利用 *Reynoutria sachalinesis* (F. Schmidt) Nakai 植物萃取液防治瓜類白粉病，其防治效果高達 90%。另外，將 0.5% (w/v) 之丁香粉未添加於溫室的帶菌栽培介質中，則可有效降低甘藍立枯病的發病率達 52-60 % (林氏, 2002)。

茄科細菌性斑點病(Bacterial spot)是由植物病原細菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 所引起，近年來普遍發生於

溫暖潮濕季節栽培之番茄、甜椒、辣椒等作物，病原細菌可危害果實，對品質影響很大，常成為番茄、甜椒栽培成敗的關鍵因素。目前推薦的化學藥劑有 81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑、27.12% 三元硫酸銅水懸劑或 83% 氫氧化銅可濕性粉劑與 80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑混合液等(陳氏, 1987)，此些化學藥劑長期使用後常衍生病原細菌之抗藥性及藥劑殘留等問題，尤其藥劑殘留更是消費者心中最大的疑慮。

為解決此問題，除優良抗病品種(系)的選拔外，篩選拮抗微生物或可抑制病原細菌生長之植物成份並將其研發利用作為病害防治之用(黃氏, 2002. 羅氏, 2002, Hiltunen, 1995, Gerhardson, 2002)，已成為防範植物細菌性病害重要的研究方向。穿心蓮 (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) 為爵床科(Acanthaceae)植物，別名苦心蓮，屬於一年生草本，高 30~80cm。全草含 14-去氧-11,12-氧代穿心蓮內酯(14-deoxy-11,12-oxoandrographolide)，14-去氧-11,12-二去氫穿心蓮內酯(14-deoxy-11,12-didehydro- andrographolide)。依文獻記載，全草有抗菌，抗病毒，解熱，驅蟲等作用(Kanniappan *et al.*, 1991., Shukla, *et al.*, 1992., Visen *et al.*, 1993)，且穿心蓮之萃取液於試管內(*in vitro*)具有抑制 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, 及 *Proteus vulgaris* 等微生物之生長作用(Nakanishi, *et al.*, 1966)。無患子(*Sapindus mukorossi* Gaertn.)屬於無患子科(Sapindaceae)，別稱黃日子，在早期社會除可用來當清潔劑外，在農業上又可用來做展著劑，更可用於治療狗的癩皮病，對人或大鼠的潰瘍及脂漏性皮膚炎等

亦具有效果(Albieo, *et al.*,2003)；另外近來有報告指出其萃取液經與葵花油混合乳化後，對瓜類白粉病害具有防治效果(黃氏,2003)。

因此本研究主要目的是評估穿心蓮與無患子萃取液對防治茄科植物細菌性斑點病菌 (*Xanthomonas* spp.) 生長之抑制情形，以作為研發本病害非農藥防治配方之參考。

材料與方法

1. 植物萃取液之製備

參照 Kelmanson *et al.*(2000)之方法進行穿心蓮(*Andrographis paniculata*) 植株之萃取液製備，其步驟如下，首先將穿心蓮全株洗淨後置於 50°C 48 小時烘乾，磨成粉末狀儲存於瓶中備用。秤取 1 g 粉末加入 10 ml 蒸餾水或甲醇溶劑，置於超音波清洗機 30 分鐘，萃取液再經過濾頭 (disposable syringe filter, 0.45 μ m) 過濾除菌，調整萃取粗汁液濃度為 100 mg/mL 供為試驗用。

無患子(*Sapindus mukorossi*)商品化之萃取濃縮液購自中壢市家寶公司，取濃縮液進行適當稀釋之後，作為供試無患子植物萃取液。

2. 供試植物病原細菌之培養與製備

甜椒細菌性斑點病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40) 或其他植物病原細菌菌株 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1)，由國立中興大學植物病理學系曾國欽教授研究室提供。將 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 病原細菌株培養在 YPDA 培養基

(Difco)，30° C。於進行 disc-diffusion 抑制分析前，先將菌株移植入 4 mL 的 NB 培養液內，培養 6 小時，再將病原細菌濃度稀釋約為 10⁸ cfu/mL，其 optical density(620 nm) 吸收值為 0.3。

3. 細菌對植物萃取液敏感度之測試

參考 Bauer *et al.*(1966) 與 Alzoreky and Nakahara (2002) 等方法，取上述製備之病原細菌 250 μ l 塗抹於 YPDA 培養基上，再將直徑 6 mm 之濾紙圓盤 (paper disc, Whatman No.3) 置入培養基，取不同供試植物萃取液 20 μ l 滴於濾紙圓盤上，於 30°C 培養後，觀察記錄抑制圈之大小。利用 81.3 % 嘉賜銅 (Kasugamycin and Copper Oxchloride) 可濕性粉劑作為對照組。

4. 植物萃取液對細菌最小(低)抑制濃度之分析

參照 Sahm and Washington (1991) 等之方法，取上述穿心蓮萃取液及無患子萃取液，進行 2 倍系列稀釋，接種植物病原細菌在 30° C 培養後，測試其植物萃取液抑制茄科植物病原細菌生長之最小(低)濃度。

5. 植物萃取液對其他 *Xanthomonas* 菌株之生長抑制效果

取 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1 菌株重覆進行上述濾紙圓盤 (disc diffusion) 敏感性測試，以進一步瞭解植物萃取液對不同 *Xanthomonas* 菌株之生長抑菌效果。

結果

1. 細菌對植物萃取液敏感度之測試

分別比較無患子及穿心蓮等植物之不

同萃取液對甜椒細菌性斑點病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 及 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 之抑制效果，結果(表一)顯示市售商品之無患子萃取液 10 倍稀釋液(V/V)對 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 菌株之抑制圈直徑為 49.3±6.28 mm(圖一)，100 倍稀釋液(V/V) 之抑制圈

直徑則為 34.8±4.82 mm，顯著地較 81.3% 嘉賜銅(Kasugamycin and Copper Oxchloride) 化學藥劑在推薦濃度(1000 倍)之抗菌活性(15.0±2.45 mm)為佳。而穿心蓮之甲醇萃取液(50 mg/mL)對茄科細菌性斑點病之菌株 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40) 抗菌效果則與化學藥劑之抗菌活性相近(圖二)。

Table 1. Antibacterial activity of plant extracts against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 using 6 mm (dia) disc diffusion assay.

Plant name	Concentration/ dilution	Inhibition Zone(mm)	
		W. E ^a	M. E
<i>Andrographis paniculata</i>	100 mg/ml	11.5±0.71	21.8±3.66
	50 mg/ml	8.3±1.15	14.8±2.64
	10 mg/ml	7.0±0.82	13.5±0.58
<i>Sapindus mukorossi</i>	10×(V/V) ^c	49.3±6.28	— ^b
	100×(V/V)	34.8±4.82	—
81.3% Kasugamycin + Copper Oxchloride	1000×(V/V)	15.0±2.45	—

^a W.E: water extract; M.E: Methanol extract. Values are mean ± S.D.(mm) of three separate experiments.

^b —, Not tested.

^c commercial crude sap extracted from *Sapindus mukorossi* used as stock solution.

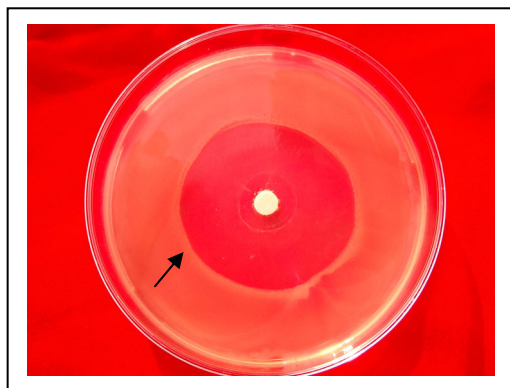


Fig. 1. Inhibition effect of plant extract from *Sapindus mukorossi* on the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40.

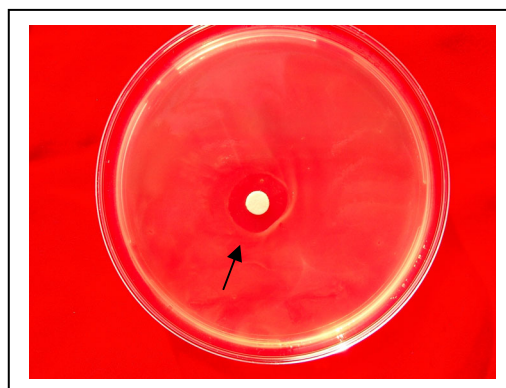


Fig. 2. Inhibition effect of plant extract from *Andrographis paniculata* on the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40.

2. 植物萃取液對細菌最小(低)抑制濃度之分析

無患子及穿心蓮等植物萃取液其最小(低)抑制濃度(Mimimal inhibitory concentration)之分析，結果(表二)顯示穿心蓮萃取液之最小抑制濃度約為 10 mg/mL，無患子萃取液之最小抑制濃度約為 5 mg/mL。

3. 植物萃取液對其他 *Xanthomonas* 菌株

之抑制活性

利用其他菌株(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1)進行敏感性測試，市售商品之無患子濃縮液及穿心蓮甲醇萃取液仍具有良好之抑制效果，其抑制圈大小分別為 42.5 ± 3.23 mm 及 17.5 ± 3.53 mm (表三)。

Table 2. Minimum inhibitory concentration(MIC) of plant extracts on the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. XVT40.

Plant name	Concentration (mg/ml)	Inhibition Zone(mm) ^a
<i>Andrographis paniculata</i>	20	7.3±0.57
	10	7.0±0.82
	5	6.0±0
<i>Sapindus mukorossi</i>	10	10.3±3.05
	5	8.0±1.73
	2.5	6.3±0.57

^aValues are mean ± S.D. (mm) of three separate experiments.

Table 3. Antibacterial activity of plant extracts against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1 using 6mm(dia) disc diffusion assay.

Plant name	Concentration/dilution fold	Inhibition Zone(mm)	
		W. E ^a	M. E
<i>Andrographis paniculata</i>	50 mg/ml	8.3±1.50	17.5±3.53
	10 mg/ml	7.5±0.70	14.0±1.41
<i>Sapindus mukorossi</i>	10×(V/V) ^c	42.5±3.23	— ^b
81.3% Kasugamycin + Copper Oxchloride	1000× (V/V)	17.0±2.00	—

^aW. E, water extract; M. E, Methanol extract. Values are mean ± S.D. (mm) of three separate experiments.

^b —, Not tested.

^c commercial crude sap extracted from *Sapindus mukorossi* used as stock solution.

討 論

在健康植物體內固存著一些抗菌物質，當病原菌侵入時，能產生具抗菌活性的產物，而以適當的方法萃取抗菌物質，可用於抑制植物病原菌的研究(譚氏，2003)。

國外利用植物萃取液抑制植物病原菌方面的研究上著墨甚多，在病原真菌方面，如苦楝葉萃取液對數種真菌孢子均有抑制發芽或靜菌作用(Conventry and Allan, 2001)，丁香羅勒油與香茅油在 250 ppm 下可完全抑制白粉病菌(*Erysiphe polygoni* DC.)發芽(Raj and Shukla, 1996)。在細菌病害方面，Krebs and Jäggi (1999)利用大麻花萃取液可有效抑制 *Erwinia carotovora* 引起之馬鈴薯軟腐病。Satish, et al.(1999)利用 *Prosopis juliflora*, *Oxalis corniculata*, *Lawsonia inermis* 等植物之萃取液能有效抑制 *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 等病原細菌。

而在國內對植物萃取液的抑菌能力研究報告中，大多數仍以植物病原真菌試驗為主(黃氏，2002；黃氏，2003；陳氏，2004；謝氏，2003；謝氏，2005)，並且發現具有良好之效果，而利用萃取液對植物病原細

菌的抑菌研究則相對較少，如 Muto et al.(2005)利用 14 種藥用植物對 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* GL1, *Pseudomonas syringae* PA5, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* XVT40 等病原細菌進行抑菌篩選，有 *Gonostegia hirta* 等 11 種植物萃取液只對 *P. s.* PA5 具有良好的抑制效果，而對 *E.c.c.*GL1 和 *X.c.v.*XVT40 則無明顯抑制作用。

本研究證實無患子萃取液對引起茄科植物細菌性斑點病之菌株(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40)及其他 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1 菌株的抗菌活性，較 81.3% 嘉賜銅(Kasugamycin and Copper Oxychloride)化學藥劑在推薦濃度下之抗菌活性為佳；而穿心蓮之甲醇萃取液對茄科植物細菌性斑點病之菌株(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40)抗菌活性則與化學藥劑之抗菌效果相近，未來應可進一步作為研發茄科植物細菌性斑點病害之非農藥防治配方的參考。

誌 謝

本研究感謝行政院農委會動植物防疫檢疫局經費支持，研究編號：92 農科-1.8.1-檢-BE。

參考文獻

- 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。
- 徐華盛、蔡永暉、林富雄.2002,「香草植物—有機栽培與利用」,高雄區農業專訊 41:10-12。
- 陳文雄、鄭安秀、林義雄、陳紹崇,1987. 番椒病蟲害防治. 台南區農業改良場技術專刊 71:86-5。
- 陳俊宏、謝廷芳、謝麗娟.2004.大風子萃取液對白菜炭疽病菌孢子黏著的影響. 植病會刊 13:344-345. (摘要)
- 黃鴻章、Erickson, R. S.2002. 扁豆莖與花灰黴病的生物防治. 植病會刊 11:7-14。
- 黃晉興、王毓華、羅朝村.2002.利用葉片圓盤接種法測定甜瓜抗白粉病品種.中華農業研究 51:49-56.
- 黃晉興、謝廷芳、胡敏夫.2003.利用離葉接種法測定植物萃取液防治甜瓜白粉病. 植病會刊 12:278.(摘要)
- 黃晉興、柯文雄,2003. 92 年度第一次非農藥方法防治病蟲草害研究工作討論會,農委會農業試驗所(工作報告)。
- 羅朝村.2002.木黴菌與植物病害防治.農業試驗所特刊第 102 號 p77-87。
- 謝廷芳、黃晉興、謝麗娟、胡敏夫、柯文雄.2005. 植物萃取液對植物病原真菌之抑制效果. 植病會刊 14:59-66.
- 譚仁祥、王劍文、徐琛、崔桂友.2003.植物成分功能.科學出版社.中國北京.744 頁.
- Albiero, A.L.M., Sertie, J.A.A., and Bacchi, E.M. 2002. Antiulcer activity of *Sapindus saponria* L. in the rat. J. Ethnopharmacology 82:41-44.
- Alzoreky, N.S., and Nakahara, K. 2003. *Antibacterial* activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. J. Ethnopharmacology 80:223-230.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 36:493-496.
- Coventry, E.,and Allan, E.J. 2001. Microbiological and chemical analysis of neem(*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica* 29:441-450.
- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. Trends in Biotechnology 20:338-343.
- Hiltunen, L.H., Linfield, C.A., and White, J. G. 1995. The potential for the *biological* control of basal rot of Narcissus by *Streptomyces* sp. Crop Prot. 14:539-542.
- Jagadish , B.K. , and Reddy, S.M . 1986 . Efficacy of some indigenous plant extracts in the control of lemon rot by the path kt ogenic fungi . Nat. Acad . Sci. Letters 9 (5): 133-134.
- Kanniappan, M., Mathuram, L.N., and Natarajan, R., 1991. A study on the anti-pyretic effect of Chietta (*Andro-*

- graphis paniculata*). Indian Veterinary J. 68:314-316.
- Kelmanson, J.E., Jager, A.K., and van Staden, J. 2000. Zulu medical plants with antibacterial activity. J. Ethnopharmacol. 69:241-246.
- Konstantinidou-Doltsinis, K., and Schmitt, A. 1998. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. Crop Prot. 17:649-656.
- Krebs H., and Jäggi W. 1999. Effect of plant extracts against the bacterial soft rot of potatoes: *Erwinia carotovora* Flora and Fauna n industrial crops. Agrarforschung 6: 17-20.
- Muto, M., Takahashi, H., Ishihara, K., and Huang, J.W. 2005. Antimicrobial activity of medicinal plants used by indigenous people in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14:13-24.
- Nakanishi, et al., 1966. Phytochemical survey of Malaysian plants: preliminary chemical and pharmacological screening. Chemical and Pharmaceutical Bull. 13:882-890.
- Raj, K., and Shukla, D.S. 1996. Evaluation of some innovatives vis-à-vis powdery mildew of opium poppy incited by *Erysiphe polygoni*. J. Living World 3:12-17.
- Sahm, D. F., and Washington, J. A. 1991. Antibacterial susceptibility tests: *dilution* methods. In: Balows, A. (Ed.), Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp.1105-1116.
- Satish, S., Raveesha, K.A., and Janardhana, G.R. 1999. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. Letters in Applied Microbiology 28:145-147.
- Shukla, B., Visen, P.K.S., Patnaik, G.K., and Dhawan, B.N. 1992. Choleric effect of andrographolide in rats and guinea pigs. Planta Medica 58:146-149.
- Singh, L ., and Sharma, M . 1978 . *Antifungal* properties of some plant extracts. Geobios 5(2) :49-53 .
- Visen, P.K.S., Shukla, B., Patnaik, G.K., and Dhawan, B.N. 1993. Andrographolide protects rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. J. Ethnopharmacol. 40:131-136.

F Antibacterial effect of two plant extracts on
bacterial spot disease of Solanaceae caused by
Xanthomonas axonopodis

Yao, K.S¹ Tzeng, K.C²

¹ Department of Post-Modern Agriculture, MingDao University, Taiwan

² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan

Abstract

Plant extracts from *Sapindus mukorossi* and *Andrographis paniculata* were evaluated for their antibacterial activity against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1, respectively. The results showed that the extract (100 V/V) of *Sapindus mukorossi* had greater antibacterial activity on the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XL1 than that of Kasugamycin and Copper Oxychloride. The effect of methanol extract(50 mg/mL) of *Andrographis paniculata* on the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 was similar to that of Kasugamycin and Copper Oxychloride. The minimal inhibitory concentration(MIC) of plant extracts from *Sapindus mukorossi* and *Andrographis paniculata* on the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 was 5 mg/mL and 10 mg/mL, respectively.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis*; *Sapindus mukorossi*; *Andrographis paniculata*; plant extracts.