

果樹炭疽病菌對食品防腐劑之感受性

段中漢^{1*}、陳冠穎¹

¹ 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所，臺灣臺中市。

* 聯絡作者，Email: chduan@tactri.gov.tw

摘要

段中漢、陳冠穎。2021。果樹炭疽病菌對食品防腐劑之感受性。植物醫學 63(2): 9-16。

為尋找替代資材防治果樹炭疽病，本研究以安全性較高的食品防腐劑測試其對數種常見果樹炭疽病菌之抑菌作用。食品防腐劑經初步篩選後，選出苯甲酸钠、丙酸鈣及己二烯酸鉀等三種供試。供試菌株則為分離自楊桃、葡萄、印度棗、檸檬、木瓜及蓮霧等六種果樹炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 各2株。藥效試驗是以微量滴定盤 (microtiter plate) 搭配2%洋菜或馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基分別測試食品防腐劑對果樹炭疽病菌孢子發芽及菌絲生長的影響。試驗結果顯示，稀釋500倍 (2 g/L) 之苯甲酸钠、丙酸鈣及己二烯酸鉀水溶液對供試12株炭疽病菌的孢子發芽及菌絲生長均無抑制作用。但以冰醋酸調降其水溶液酸鹼值至4，則己二烯酸鉀及苯甲酸钠水溶液均可完全抑制供試炭疽病菌之孢子發芽與菌絲生長，且為殺菌作用；掃描式電子顯微鏡顯示該等菌株的孢子表面受到嚴重破壞，而菌絲表面所受破壞則較輕微。酸化的丙酸鈣水溶液則僅能完全抑制1株楊桃炭疽病菌之孢子發芽，其餘菌株則為部分或完全不能抑制，且該溶液對各菌株之菌絲生長亦幾無抑制。對照處理之冰醋酸水溶液 (pH 4) 則同於蒸餾水，皆對炭疽病菌之孢子發芽與菌絲生長無抑制。

關鍵詞：炭疽病菌、食品防腐劑、苯甲酸钠、己二烯酸鉀

前言

Colletotrichum spp. 是重要的植物病原真菌，深具學術與經濟重要性⁽⁸⁾。本菌所引起的果樹炭疽病是位於熱帶及亞熱帶台灣普遍發生的作物病害，常造成嚴重的果實腐壞，重損農民收益。台灣常見的果樹炭疽病不勝枚舉，涵蓋大漿果類、小漿果類、核果類、梨果類及柑橘類等各種果樹類別⁽³⁾。本病常以前期施藥配合後期套袋為主要防治方法，因而套袋前施用合成

化學殺菌劑仍為所需，但此亦常引發環境污染、農藥殘留以及病原菌抗藥性等問題。特別是在抗藥性方面，台灣果樹炭疽病菌的抗藥性情況既普遍又嚴重，已成為本病化學防治的主要限制因子^(10, 11, 13, 14)。為減輕使用合成化學農藥所帶來的負面效應，開發安全性較高的生物農藥乃成為植物保護研究與應用的重點。近年來，台灣植病界正積極開發這類資材，例如，拮抗微生物枯草桿菌與木黴菌的開發^(7, 28, 29)，以及植物抽出液及植物(精)油的應用^(20, 21, 22, 24, 25, 42)。但這些製劑在種類與藥效上仍嫌不足，致農民仍常以合成化學藥劑為主要防治方法，實因化學藥劑具效果迅速、品質穩定及使用方便等優點。因此，在開發新的植保資材時，化學製劑仍是應考慮的選項。但為避免使用合成化學藥劑的不安全性，國內外已有學者開始研究一些結構簡單且較無安全顧慮的鹽類化合物，特別是安全性較高的食品防腐劑，嘗試將其應用在植物病害的防治。例如在國內，已實證碳酸氫鉀 (potassium hydrogen carbonate) 能有效防治豌豆白粉病⁽²³⁾；在美國，則有將食品防腐劑己二烯酸鉀 (potassium sorbate) 及苯甲酸钠 (sodium benzoate) 用於防治採收後的馬鈴薯薯塊銀鱗病 (silver scurf)^(19, 35, 36)，而某些食品防腐劑亦已於國內證實其對草莓灰黴病菌具抑菌效果⁽¹²⁾，及對柑橘綠黴病有防治潛力⁽³⁰⁾。上述食品防腐劑雖屬化學品，但因其具廣譜殺菌作用，又價格低廉，且對哺乳動物毒性低^(16, 17, 18)，是頗具潛力的植保資材，惟相關的研究甚少，且其實際應用效果亦未臻理想⁽³⁶⁾。揆其原因，可能與這類製劑在配製時，未能使其充分發揮殺菌效果有關，亦即未能使製劑水溶液酸鹼值 (pH value) 達於最強抑菌效果的酸性 (pH≤4)^(15, 36)。

依據衛生福利部食品藥物管理署公告的第一類食品防腐劑計有20餘種⁽²⁾，我們經初步試驗結果，選定苯甲酸钠、己二烯酸鉀及丙酸鈣 (calcium propionate) 等作為本研究的試驗材料⁽¹⁵⁾。苯甲酸 (benzoic acid) 又稱安息香酸，有抑制微生物生長的作用，苯甲酸及其鈉鹽苯甲酸钠是常用的食品防腐劑⁽¹⁸⁾。由於苯甲酸難溶於水，作為殺菌劑使用有其困難，但苯甲酸钠在水中的溶解度是苯甲酸的150倍以上⁽⁴⁾，惟苯甲酸钠水溶液偏中性而不具良好殺菌效果，它需在酸性環境下才有較強的殺菌作用

10 J. Plant Med.

(1, 15)。為解決這個兩難問題，我們須將苯甲酸鈉的中性水溶液調成酸性，以發揮其殺菌效力。丙酸 (propanoic acid) 與水可混溶，而已二烯酸 (sorbic acid) 則難溶於水^(16, 17)。屬丙酸鹽之丙酸鈣毒性較低，水溶性佳，不易揮發且便於操作，較無腐蝕性又能緩慢釋放羧基 (carboxyl group)，因而比丙酸易於使用⁽¹⁶⁾。己二烯酸鉀屬己二烯酸鹽，有良好的水溶性⁽¹⁷⁾，常見其抑制腐敗真菌，例如，對 *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Eurotium* spp. 孢子發芽與菌絲生長的抑制及對細菌 *Clostridium botulinum* 的抑制^(31, 34)。相關研究顯示，己二烯酸及其鹽類化合物可改變細菌細胞膜結構及細胞的運輸功能，並干擾核醣核酸、去氧核醣核酸及蛋白質合成，以及抑制克氏循環 (Krebs cycle) 相關酵素，亦能解構 (uncouple) 粒線體 (mitochondrion) 中的氧化磷酸化反應 (oxidative phosphorylation reaction)^(35, 38, 39)。同於苯甲酸鈉，使用丙酸鈣及己二烯酸鉀水溶液均需調降其酸鹼值方具較佳殺菌效力^(15, 34, 37)。為探討上述食品防腐劑用於果樹炭疽病防治的可能性，本研究以苯甲酸鈉、丙酸鈣及己二烯酸鉀等三種有機酸金屬鹽類化合物為供試藥劑，藉安全且價廉的冰醋酸 (glacial acetic acid) 調降其酸鹼值，目的在將食品防腐劑調製成具最佳殺菌效力的藥液，以測試其對六種台灣常見果樹炭疽病菌分生孢子發芽及菌絲生長的抑制作用，期供日後田間試驗之參考。此外，並以掃描式電子顯微鏡觀察經不同酸鹼值苯甲酸鈉水溶液處理後之炭疽病菌孢子及菌絲的表面構造，以探討其可能的殺菌機制。

材料與方法

供試果樹炭疽病菌菌株

本研究所用炭疽病菌菌株係源自臺灣地區的六種果樹，分別為楊桃、葡萄、印度棗、檸檬、木瓜及蓮霧等，每種果樹2株，共計12株，採集時間為2014~2016年 (表一)。供試炭疽病菌之分離、培養、鑑定及保存方法等均詳見著者已發表之報告^(13, 14)。其中供試菌株PC9及WC3因其基因序列比對結果尚未見與其較接近的已知菌種 (species)，僅能依其分生孢子形態，將其暫歸為同一複合種 *C. acutatum* species complex (*C. acutatum sensu lato*)。

供試食品防腐劑

為評估食品防腐劑對果樹炭疽病菌之抑制作用，爰依據我國衛生福利部食品藥物管理署公告之食品添加用防腐劑種類⁽²⁾，經初步試驗後，選定苯甲酸鈉 (CAS no. 532-32-1，工業級，天津東大化工)、丙酸鈣 (CAS no. 4075-81-4，工業級，臺灣華祥理化) 及己二烯酸鉀 (CAS no. 24634-61-5，工業級，山東昆達生技) 等三種供試⁽¹⁵⁾，另有用於調整水溶液酸鹼值之冰醋酸 (CAS no. 64-19-7，工業級，臺灣長春化工)，均為購自市

表一、本研究所用果樹炭疽病菌列表

TABLE 1. *Colletotrichum* isolates collected from various fruit crops used in this study

Isolate	Species ¹	Host plant	Location	Date isolated
CC1	<i>C. siamense</i>	Carambola	Juolan, Miaoli	Oct. 2014
CC6	<i>C. siamense</i>	Carambola	Yuanshan, Yilan	Jul. 2015
GC3	<i>C. tropicale</i>	Grape	Erlin, Changhua	Jun. 2015
GC9	<i>C. viniferum</i>	Grape	Erlin, Changhua	Jul. 2015
JC1	<i>C. fructicola</i>	Indian jujube	Yanchao, Kaohsiung	Mar. 2015
JC3	<i>C. siamense</i>	Indian jujube	Liouguei, Kaohsiung	Nov. 2016
MC1	<i>C. asianum</i>	Mango	Caotun, Nantou	Jun. 2014
MC9	<i>C. asianum</i>	Mango	Yujing, Tainan	Jul. 2015
PC1	<i>C. brevisporum</i>	Papaya	Meinong, Kaohsiung	Nov. 2014
PC9	<i>C. acutatum s. l.</i>	Papaya	Jiji, Nantou	Oct. 2015
WC1	<i>C. fructicola</i>	Wax apple	Jiadung, Pingtung	Mar. 2015
WC3	<i>C. acutatum s. l.</i>	Wax apple	Sinyi, Nantou	Oct. 2015

¹ *C. acutatum s. l.* = *C. acutatum sensu lato*.

面的商品。此三種食品防腐劑或為粉狀或為顆粒狀固體，使用時，以每公升無菌蒸餾水添加2克，製成水溶液，其原始酸鹼值分別為7.12 (苯甲酸鈉)、6.88 (丙酸鈣) 及7.16 (己二烯酸鉀)。由於上述供試藥液之酸鹼值均為接近7之中性，經預備試驗證實其幾無殺菌效力。乃以冰醋酸調降此三種食品防腐劑水溶液酸鹼值至4；每公升水溶液之冰醋酸滴定用量分別為3.0 mL (苯甲酸鈉)、5.0 mL (丙酸鈣) 及3.5 mL (己二烯酸鉀)。另以無菌蒸餾水及以冰醋酸調其酸鹼值至4的酸化無菌蒸餾水作為對照處理。

食品防腐劑對炭疽病菌孢子發芽之影響

供試之12株果樹炭疽病菌菌株分別培養於直徑9公分之馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板 (potato dextrose agar, PDA, Difco™, USA)，置24°C 黑暗定溫箱7日作為接種源，而以微量滴定板法進行後續藥效試驗⁽⁹⁾。試驗時，取上述各食品防腐劑之中性及酸性水溶液49 µl分別注入微量滴定板 (microtiter plate) 之盤穴 (well)，再加入1 µl供試菌株分生孢子懸浮液 (1×10⁶ conidia/mL)，均勻混合。處理後之微量滴定板覆以封口膜 (parafilm, PM-996, PARAFILM, Neenah, WI, USA)，以防水分蒸散並靜置於實驗室 (24~28°C)。2小時後，將盤穴內的孢子混合液分別塗布於直徑9公分之洋菜平板 (2% water agar)，靜置於24°C之黑暗定溫箱。24小時後，於光學顯微鏡下計數孢子發芽率。每處理4重複，每重複計數200個孢子，以百分率表示孢子發芽率。未發芽之處理，均持續觀察至第7日，如仍未發芽，則以無菌水洗下孢子至洋菜平板，經24°C，1日後，再觀察其是否發芽。以上試驗菌株在各處理的孢子發芽百分率先進行單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA)，處理間的平均值差異達5%顯著水準，則對處理間的差異進行費雪最小顯著差異測驗 (Fisher's protected least significant difference test, LSD)，

5%)。為得知受苯甲酸鈉水溶液處理之炭疽病菌孢子表面是否受損，乃以低溫場放射掃描式電子顯微鏡 (Cryo-Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-6330F, JOEL Ltd., Japan) 對經不同酸鹼值苯甲酸鈉水溶液處理之蓮霧菌株WC1的分生孢子表面作觀察並記錄⁽²⁷⁾。

食品防腐劑對炭疽病菌菌絲生長之影響

本試驗亦以微量滴定板法進行。先將供試之12株果樹炭疽病菌菌株以同前之條件培養7日，再以直徑5 mm圓形打孔器切取菌落周圍菌絲塊，分別放入注有200 μ l供試食品防腐劑之中性及酸性水溶液的微量滴定板盤穴內。於室溫下 (24~28°C) 靜置2小時。再以移植針將菌絲塊挑出，置於滅菌過的擦手紙吸乾藥液，接著移置於直徑9 cm之馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板中央，於24°C 之黑暗定溫箱培養5日。記錄時，以通過菌落中心點的兩條垂直線為準，量取菌落直徑 (單位：mm)，並以二者之平均值為該菌落的直徑度量，以比較各處理對菌絲生長的抑制效果。每菌株每處理4重複。供試菌株在各處理的菌落直徑度量先進行單因子變異數分析，處理間的平均值差異達5%顯著水準，則對處理間差異進行費雪最小顯著差異測驗。為得知經苯甲酸鈉水溶液處理之菌絲表面是否受損，復以低溫場放

射掃描式電子顯微鏡對經不同酸鹼值苯甲酸鈉水溶液處理的椪果菌株MC1菌絲表面作觀察並記錄。

結 果

食品防腐劑對炭疽病菌孢子發芽之影響

供試三種食品防腐劑水溶液之處理，其未經冰醋酸調降酸鹼值至4者均無抑制果樹炭疽病菌孢子發芽的能力。苯甲酸鈉及己二烯酸鉀酸性水溶液對供試之12株炭疽病菌的孢子發芽具完全抑制作用，且經7日觀察，各處理的孢子均未再發芽；處理後的孢子經無菌水漂洗後亦無發芽。丙酸鈣水溶液雖經調降酸鹼值至4亦僅對菌株CC6的全部孢子及GC9的絕大部分孢子具抑制作用，其對GC3, PC1及WC1等菌株尚有局部的抑制效果；但對其餘菌株則抑菌效果不佳。而蒸餾水及酸鹼值為4之酸化蒸餾水則有一致且極高的孢子發芽率 (表二)。掃描式電子顯微鏡觀察結果顯示，菌株WC1的分生孢子受到酸鹼值為中性的苯甲酸鈉水溶液處理後，孢子表面僅受到輕微破壞，而經調降酸鹼值至4的苯甲酸鈉水溶液處理後，則見其孢子表面有明顯且嚴重的破壞 (圖一 A, B)。

表二、食品防腐劑對果樹炭疽病菌分生孢子發芽之影響

TABLE 2. Effect of food antiseptics on conidial germination of *Colletotrichum* isolates collected from various fruit crops

Food antiseptic ¹	Conidial germination (%) ²						
	pH	CC1	CC6	GC3	GC9	JC1	JC3
Calcium propionate	6.88	91.5±1.0 c	83.5±0.6 c	82.5±1.5 d	90.3±0.6 c	92.8±1.1 bc	90.3±0.9 c
	4	75.0±1.3 d	0.0±0.0 d	54.5±1.7 e	4.3±0.5 d	91.0±0.6 c	94.0±0.4 c
Potassium sorbate	7.16	97.3±0.5 a	83.8±1.7 c	93.8±0.9 b	98.0±0.7 a	92.8±1.1 bc	88.8±1.1 c
	4	0.0±0.0 e	0.0±0.0 d	0.0±0.0 f	0.0±0.0 e	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d
Sodium benzoate	7.12	93.0±1.3 bc	87.5±0.6 b	86.5±0.6 c	89.8±0.6 c	94.0±1.4 b	93.8±0.9 b
	4	0.0±0.0 e	0.0±0.0 d	0.0±0.0 f	0.0±0.0 e	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d
Water (control)	7.03	94.0±0.7 a	94.3±1.7 a	98.0±0.7 a	97.3±0.5 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	4	92.5±1.0 bc	96.0±0.9 a	96.8±0.5 a	94.5±0.6 b	94.8±0.5 b	100.0±0.0 a

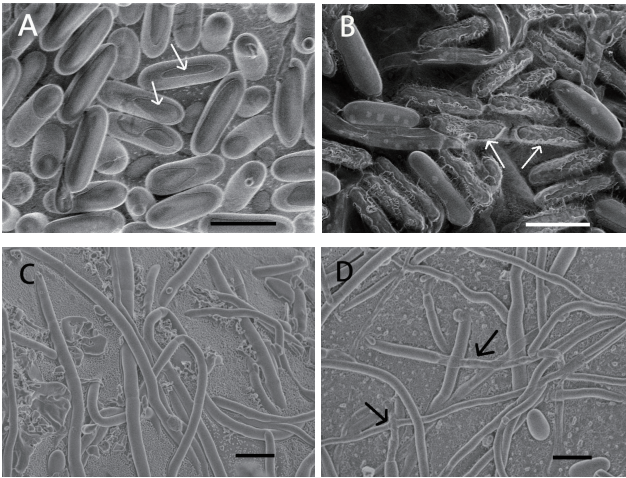
表二、(續)

TABLE 2. (continued)

Food antiseptic ¹	Conidial germination (%) ²						
	pH	MC1	MC9	PC1	PC9	WC1	WC3
Calcium propionate	6.88	100.0±0.0 a	93.5±1.2 b	71.5±1.0 c	100.0±0.0 a	93.5±1.2 c	100.0±0.0 a
	4	81.3±0.9 e	78.8±1.1 c	44.0±1.7 d	95.8±0.9 b	23.0±0.6 e	92.3±1.0 b
Potassium sorbate	7.16	97.3±0.5 b	94.0±1.1 b	75.0±1.3 b	100.0±0.0 a	91.0±0.7 d	100.0±0.0 a
	4	0.0±0.0 f	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e	0.0±0.0 c	0.0±0.0 f	0.0±0.0 c
Sodium benzoate	7.12	92.5±0.9 d	100.0±0.0 a	75.0±1.9 b	100.0±0.0 a	96.3±0.9 b	100.0±0.0 a
	4	0.0±0.0 f	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e	0.0±0.0 c	0.0±0.0 f	0.0±0.0 c
Water (control)	7.03	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	93.0±1.9 a	100.0±0.0 a	93.5±1.2 c	100.0±0.0 a
	4	94.5±1.6 c	100.0±0.0 a	93.8±1.3 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a

¹ The concentration of each food antiseptic solution was set at 2 g/L and its pH value was adjusted to 4 with glacial acetic acid.

² Mean±standard error (n=4). Mean values within a column followed by the same letters were not significantly different at the 5% level according to Fisher's protected least significant difference test. Data were taken 24 h after treatment.



圖一、炭疽病菌孢子及菌絲經不同酸鹼值苯甲酸钠水溶液處理後之掃描式電子顯微鏡影像。

Fig. 1. Cryo-scanning electron microscopy images of conidia and mycelia of *Colletotrichum* spp. after treated with the solution of sodium benzoate (SB). Plates A and B, conidia of isolate WC1, mild conidial damages on plate A and severe conidial damages on plate B. Plates C and D, mycelia of isolate MC1, no damage on mycelia on plate C and partial damages on mycelia on plate D. The solution concentration of SB was 2 g/L, pH 7.12 for plates A and C, and the solution pH value was adjusted to 4 with glacial acetic acid for plates B and D. Arrows indicate the damages on conidia or mycelia. Bars=10 μm.

食品防腐劑對炭疽病菌菌絲生長之影響

供試食品防腐劑水溶液凡未經冰醋酸調降酸鹼值者，其對供試炭疽病菌菌絲均無抑制作用。而有調降酸鹼值者，則苯甲酸钠及己二烯酸鉀的酸性水溶液對供試之12株炭疽病菌菌絲生長均具完全抑制作用，且經持續7日的觀察，亦未見生長；以無菌水漂洗處理後之菌絲塊亦然。丙酸鈣水溶液雖經調降酸鹼值至4，大部分菌株之生長僅略受抑制。各處理在菌株間差異不大；作為對照處理的冰醋酸水溶液甚且有促進菌絲生長之作用(表三)。掃描式電子顯微鏡觀察顯示，檬果菌株MC1的菌絲經中性苯甲酸钠水溶液處理後，其菌絲表面未受破壞，而經酸鹼度為4的苯甲酸钠水溶液處理，則部分菌絲表面可見明顯破壞(圖一C, D)。

討 論

近年來，應用具抗菌功能的有機或無機鹽類化合物於植物真菌性病害的防治試驗正在溫室及田間積極進行^(5, 6, 32, 40, 41)。這些鹽類化合物也具有合成化學殺菌劑的一些優點，且部分已證實對發生於作物生長期或採收後的多種真菌性病害具防治效果^(23, 33, 34, 35, 36, 37)。但由於鹽類化合物種類眾多，要找出確具安全、有效又價廉的鹽類化合物亦屬不易。本研究探討的有機酸類食品防腐劑，具有較為安全的特性及良好的殺菌功能^{(16,}

17, 18)，但這些化合物又因不易溶於水或其他問題而難有實用價值；如改用其金屬鹽類化合物，雖易溶於水及較為安全卻又殺菌效果不佳。當我們以價廉且安全的冰醋酸調降其酸鹼值，即可恢復其殺菌效力，因而大幅提高這一類食品防腐劑對病害防治的應用潛力。

降低酸鹼值已證實對苯甲酸鹽或己二烯酸鹽的抑菌效果有顯著提升作用^(1, 34, 39)。其原因與酸性環境下，真菌將增加對苯甲酸鹽的吸收⁽¹⁾，或因氫離子濃度增加並配合己二烯酸鹽的作用可提升殺菌效果⁽³⁴⁾。但在馬鈴薯儲藏期防治試驗的實際案例中，卻見調降酸鹼值的己二烯酸鉀水溶液(pH=5.7)及丙酸鈣水溶液(pH=5.2)，雖對病原菌產孢具抑制效果，且調降酸鹼值前後確有差異，但對薯塊銀鱗病的防治效果並未因改變酸鹼值而呈顯著差異⁽³⁶⁾。推測這可能與水溶液酸鹼值未低於4有關，如能進一步調降其酸鹼值至4或以下，或可提高其對病害的防治效果，因而，調降酸鹼值的材料與方法具關鍵影響。除酸鹼值之影響外，食品防腐劑的種類也有很大的差別。即在上述馬鈴薯試驗中，己二烯酸鉀有著優於其他供試鹽類化合物(如丙酸鈣)的防治效果⁽³⁶⁾，此亦在本研究及其他相關試驗中得到類似的結論，且我們發現苯甲酸钠的效果更佳且價格更低廉⁽¹²⁾。

苯甲酸钠是酸性防腐劑，在酸性條件下能轉化為有活性的苯甲酸，因此其殺菌防腐的機理同於苯甲酸，它的殺菌功能可在酸鹼值4.0以下最佳^(1, 26)。在水溶液中，苯甲酸親油性強，容易穿透細胞膜進入細胞內，干擾細菌和真菌等微生物細胞膜的通透性，抑制細胞膜對胺基酸的吸收⁽³⁸⁾。進入細胞內的苯甲酸分子可抑制微生物細胞呼吸酶系的活性，使磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase)催化的反應速率下降95%，以達殺菌作用⁽²⁶⁾，這些研究結果均足以說明苯甲酸钠水溶液在酸性條件下的殺菌機制。由於苯甲酸钠的水溶性遠大於苯甲酸，在水介體系中更容易溶解和分散，且在空氣中穩定，因此較苯甲酸更具應用價值。本研究所用食品防腐劑均屬有機酸金屬鹽類化合物，均需在酸性環境下才能表現較強的殺菌力，是否因在酸性水溶液中會有大量有機酸離子解離，而提高其殺菌效果，值得探討。由於鹽類化合物水溶液的電導度(electrical conductivity)是測量水中含離子成分的重要指標，因鹽類化合物的電導度與解離常數(dissociation constant)成正相關，即電導度高低與內含溶質鹽的濃度或其它能分解為電解質的化學物質有關。著者曾測試三種食品防腐劑在調降酸鹼值前後的電導度數值，發現彼此差異僅在4~8%之間(著者，未發表)。因食品防腐劑調降酸鹼值後對溶質離子濃度改變不大，尚難認定這是大幅提高殺菌效果的主因。

本研究所用食品防腐劑水溶液的劑量均為每公升2克，以分子莫耳濃度計算僅約0.01M，與相關報告所用莫耳濃度達0.2M相較，差異達20倍^(19, 35, 36)，但在本研究中的抑菌效果在調降其酸鹼值後，可能較其更優。此表示當我們改變此等食品防腐劑水溶液的酸鹼值達到適於其發揮殺菌效果時(pH ≤ 4)，即

表三、食品防腐劑對果樹炭疽病菌菌絲生長之影響

TABLE 3. Effect of food antiseptics on mycelial growth of *Colletotrichum* isolates collected from various fruit crops

Food antiseptic ¹	Colony diameter (mm) ²						
	pH	CC1	CC6	GC3	GC9	JC1	JC3
Calcium propionate	6.88	60.8±1.6 bc	65.5±3.1 a	59.5±3.3 a	35.3±0.9 ab	57.3±1.5 b	60.5±0.6 b
	4	54.3±0.5 d	52.3±1.4 b	46.8±3.4 b	34.3±2.1 bc	50.3±2.2 c	61.0±1.9 c
Potassium sorbate	7.16	59.8±2.1 c	62.5±0.9 a	56.5±1.9 a	30.8±1.8 d	56.5±1.2 b	63.5±1.8 bc
	4	5.0±0.0 e	5.0±0.0 c	5.0±0.0 c	5.0±0.0 e	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d
Sodium benzoate	7.12	64.0±3.2 ab	62.5±0.6 a	55.5±4.3 a	37.5±0.9 a	57.8±2.1 b	65.3±1.6 b
	4	5.0±0.0 e	5.0±0.0 c	5.0±0.0 c	5.0±0.0 e	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d
Water (control)	7.03	58.3±0.6 c	63.0±2.7 a	58.0±1.7 a	31.3±0.8 cd	57.3±1.3 b	61.5±1.2 bc
	4	66.5±0.6 a	61.5±1.3 a	59.3±1.3 a	30.3±1.7 d	63.8±1.5 a	72.0±2.4 a

表三、(續)

TABLE 3. (continued)

Food antiseptic ¹	Colony diameter (mm) ²						
	pH	MC1	MC9	PC1	PC9	WC1	WC3
Calcium propionate	6.88	48.3±0.9 a	55.3±1.1 b	36.0±0.7 b	32.5±1.0 b	58.0±1.4 b	33.8±2.1 ab
	4	44.0±1.2 b	43.0±2.0 c	31.8±2.2 c	29.0±1.3 c	53.8±0.9 c	29.8±1.7 c
Potassium sorbate	7.16	47.3±1.1 a	51.5±2.0 b	39.3±2.1 b	31.5±0.6 bc	56.0±1.7 bc	33.3±1.2 abc
	4	5.0±0.0 c	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d
Sodium benzoate	7.12	49.8±1.5 a	53.3±2.3 b	38.3±1.1 b	32.3±1.4 b	57.8±2.8 b	31.8±2.5 bc
	4	5.0±0.0 c	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d	5.0±0.0 d
Water (control)	7.03	47.5±0.5 a	52.3±1.1 b	37.8±0.9 b	34.0±1.6 ab	55.3±0.9 bc	34.3±1.3 ab
	4	49.8±1.8 a	62.5±1.0 a	46.5±2.8 a	35.5±1.2 a	63.5±1.4 a	36.3±0.5 a

¹ The concentration of each food antiseptic solution was set at 2 g/L and its pH value was adjusted to 4 with glacial acetic acid.² Mean±standard error (n=4). Diameter of colony was measured after 5-day-growth on potato dextrose agar plate. "5.0±0.0" is the size of inoculating mycelial disc and thus indicates no growth. Mean values within a column followed by the same letters were not significantly different at the 5% level according to Fisher's protected least significant difference test.

便在低劑量下亦能展現良好的殺菌作用，這對病害防治成本及環境影響均可大幅降低。三種供試食品防腐劑中的苯甲酸鈉及己二烯酸鉀，其酸性水溶液對炭疽病菌均有良好的殺菌效果，丙酸鈣則效果不佳，此與草莓灰黴病菌的情況類同⁽¹²⁾。丙酸鈣對供試炭疽病菌的局部抑制作用，似與菌株的寄主及地理分布無關，而為個別菌株對藥劑感受性的差異所致。這種抗感性差異是否為炭疽病菌對丙酸鈣存有抗藥性且這種狀況正在發展中，是一值得關注的問題。又，比較分生孢子與菌絲對此等食品防腐劑的感受性可知，菌絲較孢子有較高的耐受性，此亦類同於其對合成化學殺菌劑的反應^(11, 12)。我們曾將上述二種有效食品防腐劑酸化水溶液的劑量降為1 g/L，尚可抑制供試炭疽病菌的孢子發芽，但對菌絲生長則否，此亦佐證菌絲對食品防腐劑的耐受性較孢子為強(著者，未發表)。

根據本研究所作掃描式電子顯微鏡觀察，炭疽病菌的孢子受苯甲酸鈉酸性水溶液作用後，其孢子表面有嚴重破壞且無法發芽，但中性水溶液則僅有輕微的表面破壞，也未影響孢子發芽，此可具體證明酸鹼值對苯甲酸的殺菌效果有著極大的增強作用，此種證據尚屬首見。但酸化苯甲酸鈉水溶液對炭疽病菌孢子內部的影響為何，則未知。日後，或可利用穿透式電

子顯微鏡或分子生物學技術作進一步的探討。至於菌絲，則經酸性苯甲酸鈉水溶液處理後，僅見局部菌絲表面受損，但這已足以造成菌絲生長停頓甚或死亡，推測應有未知的干擾效應發生，此亦待進一步的研究加以釐清。而菌絲在中性苯甲酸鈉水溶液之處理則未見任何損傷，亦未影響其生長。以上事證均以直接證據證實菌絲較孢子對鹽類化合物有較強的抗性。由於上述酸化鹽類水溶液對真菌孢子及菌絲表面有著不同程度的破壞作用，田間實際應用是否會對作物表皮細胞造成破壞，是一值得關注的問題。推測不同作物的不同部位(葉片、花器、果實)在不同生長期對上述水溶液可能有不同反應，但這有待實際試驗予以驗證。

總結來說，苯甲酸鈉及己二烯酸鉀作為果樹炭疽病的防治資材是深具潛力的，因其擁有安全、有效、價廉及易於施用等優點。今後勢需進行更多的試驗，包括對施用技術、藥效、藥害乃至毒理等各層面作完整的評估，以期這類化合物能用於田間病害之防治。

謝 辭

本研究承行政院農業委員會106農科-9.5.1-藥-P3及107農科-8.4.1-藥-P2計畫經費補助，復蒙農業藥物毒物試驗所李祈益先生協助掃描式電子顯微鏡觀察及照相，謹誌謝忱。

引用文獻

1. Amorabé, B.-E., Fleurat-Lessard, P., Chollet, J.-F., and Roblin, G. 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure - activity relationship. *Plant Physiol. Biochem.* 40(12):1051-1060.
2. Anonymous, 2017. Standards for specification, scope, application and limitation of food additives. Food and Drug Administration, Ministry of Health and Welfare. Taipei. Retrieved from <https://www.mohw.gov.tw/cp-3568-38112-1.html> (March 25, 2021). (In Chinese).
3. Anonymous, 2020. Sodium Benzoate SDS/MSDS. Retrieved from https://www.cdhfinechemical.com/images/product/msds/19_808246934_SodiumBenzoate-CASNO-532-32-1-MSDS.pdf (March 25, 2021).
4. Anonymous, 2021. Plant Protection Information System. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taichung. Retrieved from <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/> (March 25, 2021). (In Chinese).
5. Avis, T. J., Rioux, D., Simad, M., and Tweddell, R. J. 2009. Ultrastructural alterations in *Fusarium sambucinum* and *Heterobasidion annosum* treated with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Phytopathology* 99:167-175.
6. BouDeliopoulos, T., Kettlewell, P. S., Martin, C., and Hare, M. C. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Prot.* 29:1059-1075.
7. Chen, C. W., Teng, Y. C., and Tsai, Y. F. 2014. Research and application of *Trichoderma* spp. on crop diseases control. Pages 87-115 in: Proceedings of the conference on the development of agricultural biological materials industry. C. T. Liao, K. F. Pai, and C. S. Chang eds. Taichung District Agricultural Research and Extension Station Special Issue No. 121, Taichung, 175 pp.
8. Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414-430.
9. Duan, C. H. 2015. Microtiter plate for evaluation of plant extracts and oils against *Uromyces appendiculatus* and *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol. Bull.* 24:67-75. (In Chinese).
10. Duan, C. H., Chang, C. K., and Wang, C. C. 2017. Fungicides and postharvest heat treatment to control anthracnose disease of mango. *Taiwan Pestic. Sci.* 3:65-78. (In Chinese).
11. Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2020 a. Molecular identification and fungicides sensitivity of *Colletotrichum* isolates from grape in Taiwan. *J. Plant Med.* 62 (4):23-32. (In Chinese).
12. Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2020 b. Sensitivity to fungicides and food antiseptics in *Botrytis cinerea* from strawberry in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 9:99-116. (In Chinese).
13. Duan, C. H., Pang, H. R., and Wang, C. C. 2018. Identification, pathogenicity and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from five fruit crops in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 5: 91-111. (In Chinese).
14. Duan, C. H., Pan, H. R., and Wang, C. C. 2019. Molecular identification and fungicides sensitivity of *Colletotrichum* isolates from various fruit crops in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 6:71-104. (In Chinese).
15. Duan, C. H., and Wang, C. C. 2019. Preliminary evaluation of food antiseptics as alternatives to control plant fungal diseases. *J. Plant Med.* 61(2/3):38. (In Chinese).
16. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food). 2014. Scientific opinion on the re-evaluation of propionic acid (E 280), sodium propionate (E 281), calcium propionate (E 282) and potassium propionate (E 283) as food additives. *EFSA Journal* 12(7):3779, 45 pp.
17. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food). 2015. Scientific opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal* 13(6):4144, 91 pp.
18. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food). 2016. Scientific opinion on the re-evaluation of benzoic acid (E 210), sodium benzoate (E 211), potassium benzoate (E 212) and calcium benzoate (E 213) as food additives. *EFSA Journal* 14(3):4433, 110 pp.
19. Hervieux, V., Yaganza, E. S., Arul, J., and Tweddell, R. J. 2002. Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Plant Dis.* 86: 1014-1018.
20. Hsieh, T. F. 2018. Effect of leaf extract of hydnocarpus on control of anthracnose of Chinese cabbage caused by *Colletotrichum higginsianum*. *Acad. J. Med. Plants* 6(9):255-261.
21. Hsieh, T. F., Chen, C. H., and Chang, J. Y. 2016. Screening

- model of plant extracts for control of cruciferous vegetable anthracnose caused by *Colletotrichum higginsianum*. J. Plant Med. 58(2):59-68. (In Chinese).
22. 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).
23. Hsieh, T. F., Huang, J. H., and Hsieh, L. J. 2005. Control of powdery mildew with potassium bicarbonate and polyelectrolyte. Plant Pathol. Bull. 14:125-132. (In Chinese).
24. Hsieh, T. F., Huang, J. H., Hsieh, L. J., and Hu, M. F., and Ko, W. H. 2005. Antifungal effect of plant extracts on phytopathogenic fungi. Plant Pathol. Bull. 14:59-66. (In Chinese).
25. Ko, W. H., Wang, S. Y., Hsieh, T. F., and Ann, P. J. 2003. Effects of sunflower oil on tomato powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici*. J. Phytopathol. 151(3):144-148.
26. Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., and Bedoya, F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. Biochem. J. 214 (3):657 - 663.
27. Kuo, K. C., and Li, C. Y. 2000. The application of cryo-field emission scanning electron microscopy in biology. Instruments Today 21(6):60-65. (In Chinese).
28. Lin, H. C., Huang, W. D., Yang, S. S., and Tzeng, D. S. 2008. Growth promotion and reduced *Sclerotium rolfsii* seedling blight of rice by *Bacillus subtilis* WG6-14. Plant Pathol. Bull. 17:53-64. (In Chinese).
29. Lo, C. T. 2001. Development and application of *Trichoderma* spp. for plant disease control in Taiwan. Pages 85-96 In: Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century-Mode of Action and Application Technology. D. D.-S. Tzeng and J. W. Huang eds. Council of Agriculture, Taichung, Taiwan, 250 pp.
30. Lo, P.-H., Wang, C.-J., Lai, Y.-T., and Chen, M.-S. 2020. Analysis of the characteristics of *Penicillium digitatum* and evaluation the efficacy of non-pesticide materials and yeasts on controlling green mold of citrus. Bulletin of Taichung District Agricultural Research and Extension Station 147:59-73. (In Chinese).
31. Lund, B. M., George, S. M., and Franklin, J. G. 1987. Inhibition of type A and type B (proteolytic) *Clostridium botulinum* by sorbic acid. Appl. Environ. Microbiol. 53:935-941.
32. Mecteau, M. R., Arul, J., and Tweddell, R. J. 2002. Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum*, a causal agent of potato dry rot. Mycol. Res. 106(6):688-696.
33. Mills, A. A. S., Platt, H. W., and Hurta, R. A. R. 2004. Effect of salt compounds on mycelial growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. Postharvest Biol. Technol. 34:341-350.
34. Mutasa, E. S., Magan, N., and Seal, K. J. 1990. Effects of potassium sorbate and environmental factors on growth of tobacco spoilage fungi. Mycol. Res. 94:971-978.
35. Olivier, C., Halseth, D. E., Mizubuti, E. S. G., and Loria, R. 1998. Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. Plant Dis. 82:213-217.
36. Olivier, C., MacNeil, C. R., and Loria, R. 1999. Application of organic and inorganic salts to field-grown potato tubers can suppress silver scurf during potato storage. Plant Dis. 83:814-818.
37. Punja, Z. K., and Gaye, M. M. 1993. Influence of postharvest handling practices and dip treatments on development of black root rot on fresh market carrots. Plant Dis. 77:989-995.
38. Russell, N. J., and Gould, G. W. 2003. Food Preservatives, 2nd ed. Springer, Boston, USA. 396 pp.
39. Sofos, J. N., Pierson, M. D., Blocher, J. C., and Busta, F. F. 1986. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. Int. J. Food Microbiol. 3:1-18.
40. Turkkan, M. 2013. Antifungal effect of various salts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the causal agent of Fusarium basal rot of onion. J. Agric. Sci. 19: 178-187.
41. Zaker, M. 2014. Antifungal evaluation of some inorganic salts against three phytopathogenic fungi. Intl. J. Agri. Sci. 7(14):1352-1358.
42. Zeng, S. T., Chen, H. R., and Hsieh, T. F. 2016. Inhibitory effect of plant essential oils against *Fusarium proliferatum*, the causal agent of Cymbidium black spot. J. Plant Med. 62 (4):33-38. (In Chinese).

ABSTRACT

Duan, C. H.* and Chen, G. Y. 2021. Sensitivity to food antiseptics among *Colletotrichum* isolates collected from various fruit crops in Taiwan. J. Plant Med. 63(2): 9-16.

*Corresponding author, E-mail: chduan@tactri.gov.tw

For seeking alternatives to synthetic chemical fungicides against plant fungal pathogens, we found some food antiseptics could be cheaper, safer and more effective to be fungicidal agents. In this study, we conducted a lab experiment to evaluate three food

16 J. Plant Med.

antiseptics for their inhibitory effects on *Colletotrichum* isolates collected from various fruit crops. By using microtiter plate method, it was indicated that glacial acetic acid-adjusted solutions (pH 4) of 2 g/L of potassium sorbate and sodium benzoate, respectively, were able to inhibit conidial germination and mycelial growth of all the tested isolates with damages on their cell walls. However, the acidified solution of calcium propionate could not inhibit conidial germination of the majority of isolates and mycelial growth of all the isolates. Non-acidified solutions of the three aforementioned food antiseptics and the acidified water (pH 4) had no inhibitory effect on the pathogens.

Keywords: *Colletotrichum*, food antiseptic, potassium sorbate, sodium benzoate