

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

第三名

052202

尋找木瓜病原菌的天然抑菌劑與抑菌機制

學校名稱：國立臺南第一高級中學

| | |
|-----------------------------------|---------------------|
| 作者： 高二 劉子熊 高二 黃昱凱 高二 陳明杉 | 指導老師： 鄭楷騰 江芝韻 |
|-----------------------------------|---------------------|

關鍵詞：薰衣草、黑色素、天然抑菌劑

摘要


我們在潰爛的木瓜中純化出 *Lasiodiplodia theobromae* 與 *Neofusicoccum parvum* 兩種真菌，會使木瓜組織產生軟腐之現象，容易造成水果採收及運送時的大量損失。研究結果顯示，兩菌亦會感染其他植物，但部分具濃烈氣味的植物有較高的耐受性，且薰衣草氣味可使該二菌種的菌絲與黑色素含量下降，藉以降低致病力。其中，薰衣草氣味中的芳樟醇是抑菌的關鍵成分。此外，我們發現無光環境會誘導病原菌的黑色素累積，並提升其致病力。綜上所述，未來在木瓜運送與保存上，若能透過照光並配合薰蒸微量薰衣草精油或芳樟醇氣味，應可有效降低病原菌感染機率，以此減少農損。

壹、前言

在清理廚房時，觀察到木瓜上有幾片黴斑。經查詢資料，得知在木瓜採收後，瓜萼切口處常常出現此類症狀並進一步導致果肉腐爛並造成嚴重損失。我們好奇是何種菌種致使木瓜組織腐爛，且欲了解這些菌種是否只感染特定植物？其生長條件與致病機制又是什麼？為了解答上述疑問，我們進行了一系列的實驗，並欲嘗試找到可減緩感染之方法，藉以減少農損。我們針對以下內容深入研究：

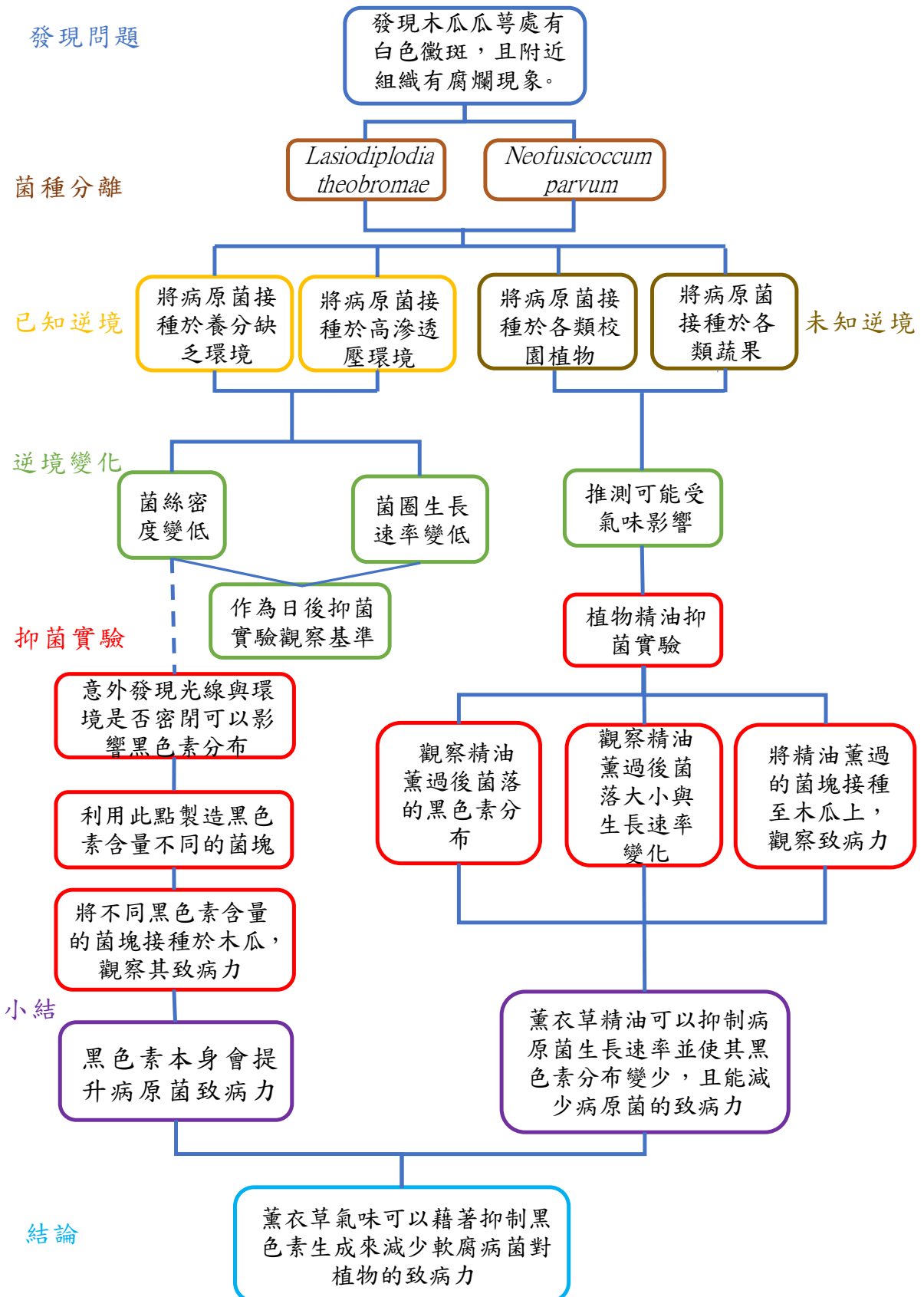
- 一、尋找並分離可能造成木瓜腐爛的菌種
- 二、探討不同環境對菌種生長速率影響
- 三、比較光線與通氣與否對其黑色素生成之差異
- 四、觀察菌種在不同種植物上的感染差異
- 五、研究不同精油對菌種生長狀況的影響
- 六、研究不同精油對其黑色素生成之差異
- 七、探討精油處理後對真菌感染力影響
- 八、探討薰衣草不同氣味濃度對菌種生長的影響
- 九、探討芳樟醇氣味對菌種生長的影響
- 十、探討黑色素對真菌感染力的影響

貳、研究設備及器材

| | |
|---|--|
|  |  |
| 一、直徑 90mm 培養皿 | 二、3mm disc 環 |
|  |  |
| 三、PDA 粉末 | 四、磅秤(最小刻度為 0.1g) |
|  |  |
| 五、解剖顯微鏡 | 六、無菌瓶(50ml) |
|  |  |
| 七、微量吸管(最大吸取量 10 μ l) | 八、植物精油 |
|  |  |
| 九、石蠟封膜 | 十、芳樟醇 |

參、研究過程或方法

一、研究流程



二、研究方法

(一) 培養基配置

(1) 一般培養基

15.6g 的 PDA 粉末與 400mL 的蒸餾水製成培養液，每盤 20mL 培養液。

(2) 鹽分培養基

成分同上，另加 5g 或 10g 的食鹽，NaCl 莫爾濃度為 0.21M 與 0.42M 之培養基，以製造鹽分逆境。

(3) 半養分培養基

7.8g 的 PDA 粉末與 400mL 的水製成培養液，以製造缺乏養分的環境。

(二) 菌落大小測定

因菌落生長不成正圓形，在五個方向測定後取平均作為半徑大小。

(三) 黑色素量化

將菌落置於同光源下，利用 Image J 測量，作為黑色素的量化標準。

(四) 植物接種

(1) 校園植物

從活植株上剪下較新鮮的枝條，將莖刮去部分表皮，將菌塊放置於傷口處，使菌絲面與傷口處相接合。放於培養皿中，放置於恆溫箱。

(2) 蔬菜類

作法同上，但蔬菜類葉片較大無法放入培養皿，故直接置於恆溫箱中。

(3) 水果類

在水果打出空洞，再將菌塊菌絲面朝內放入，放入恆溫箱。

(五) 氣味抑菌實驗

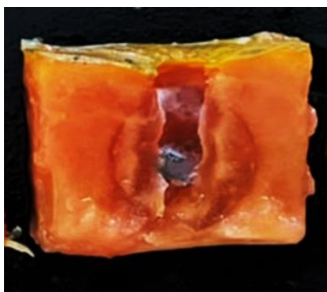
在培養皿中滴入精油或氣味物質，作為氣味來源。另將菌接在培養基上，並與精油培養皿接合，置於恆溫箱，並記錄菌圈大小。

(六) 光照與通氣實驗

做法與上述精油培養皿相同，但不加任何物質。光照組將培養皿置於燈光下；黑暗組置於不透光容器，放入恆溫箱中。培養皿側面封條接合處戳洞，作為通氣組。未開洞為不通氣組。利用此兩變因觀察菌落黑色素分布。

(七) 致病力實驗

為探討菌塊在活體中生長的真實狀況。在紅灰木瓜上打入空洞，並放入經不同處理的菌塊，接種 Lt 菌與 Np 菌後，隔一段時間後將木瓜切開，觀察其切面。已知 Lt 菌和 Np 菌皆會使組織軟腐，進而於健康組織之間出現一明顯的邊界（如下圖）。藉著測量此腐爛圈的大小將致病力量化。



(圖 1-1) 木瓜腐爛邊界示意圖

(八) 菌絲分布觀察

利用解剖顯微鏡分別以上光源與下光源，以菌塊接種處拍照。上光源觀察菌絲生長型態，下光源則觀察菌絲厚度。

肆、研究結果

一、菌種發現與柯霍氏假說

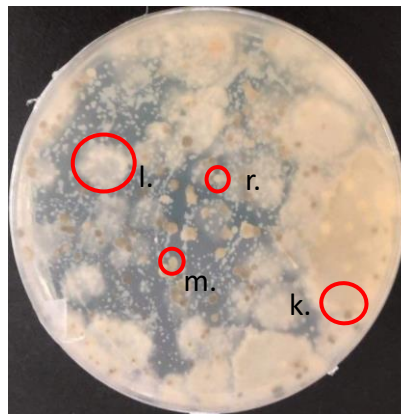
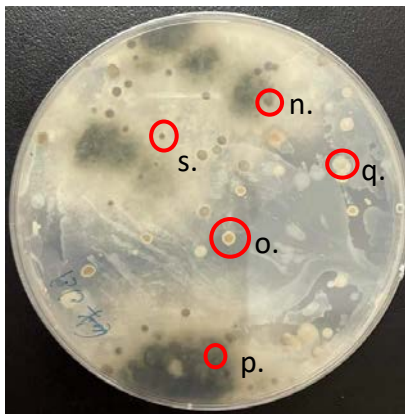
在清理廚房時，我們找到一顆腐爛的木瓜（如 a.所示），其中 b.處可見黑色筍狀凹陷，

c.處可見白色霉斑。為了得知是什麼菌種造成此病癥，因此取出此兩處之組織液進行了柯霍氏假說的驗證。



(圖 1-2) 木瓜腐爛情形

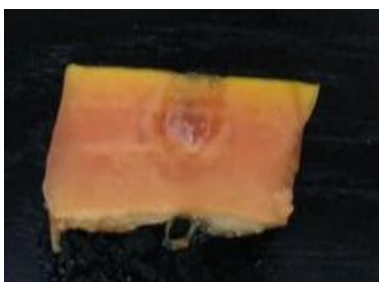
經由將組織液塗抹培養皿，我們觀察出如圖 1-2 之狀況，便從中隨機選取不同菌落，再接再種回健康木瓜。觀察後，得知只有 k、n、p 處出現明顯腐爛 (圖 1-3)，經送菌種鑑定後，得知 n 和 p 為 *Lasiodiplodia theobromae* (Lt)，而 k 為 *Neofusicoccum parvum* (Np)。



(圖 1-3) 木瓜發霉處組織液塗盤情形之一

(圖 1-4) 木瓜發霉處組織液塗盤情形之二

(圖 1-5) 空洞組



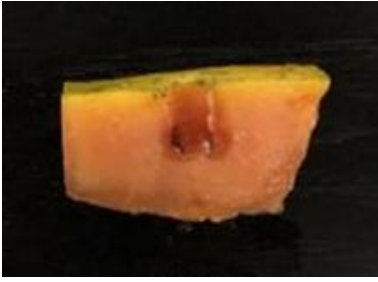
(圖 1-6) p.處菌感染狀況



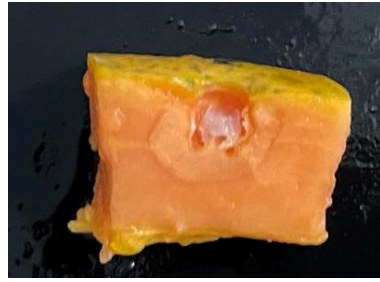
(圖 1-7) o.處菌感染狀況



(圖 1-8) q.處菌感染狀況



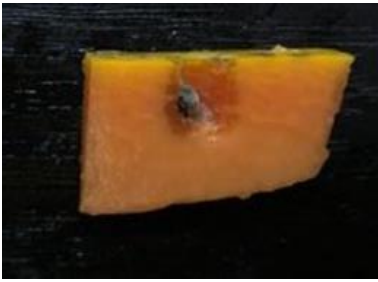
(圖 1-9) s.處菌感染狀況



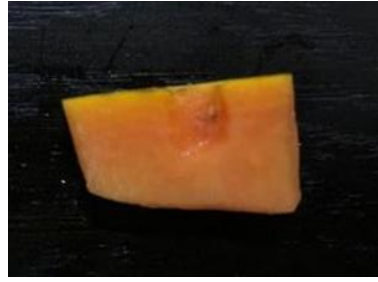
(圖 1-10) n.處菌感染狀況



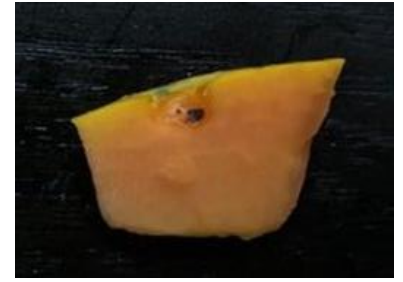
(圖 1-11) k.處菌感染狀況



(圖 1-12) l.處菌感染狀況



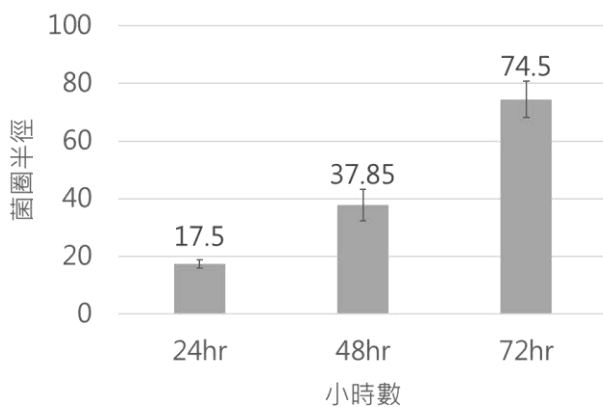
(圖 1-13) r.處菌感染狀況



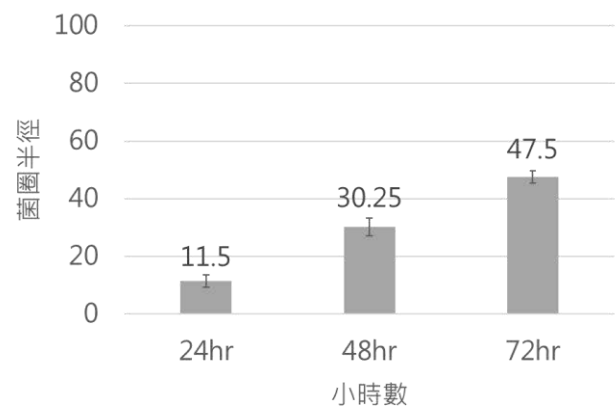
(圖 1-14) m.處菌感染狀況

(圖 1-6~1-14) 選定菌落接種回去情形

找出可能致病的菌種後，我們便對其每日半徑總長測量，並藉此瞭解未來觀察所需之時間，以利設計實驗。由數據顯示，於 72 小時，Lt 生長速率較 Np 快了 50%。



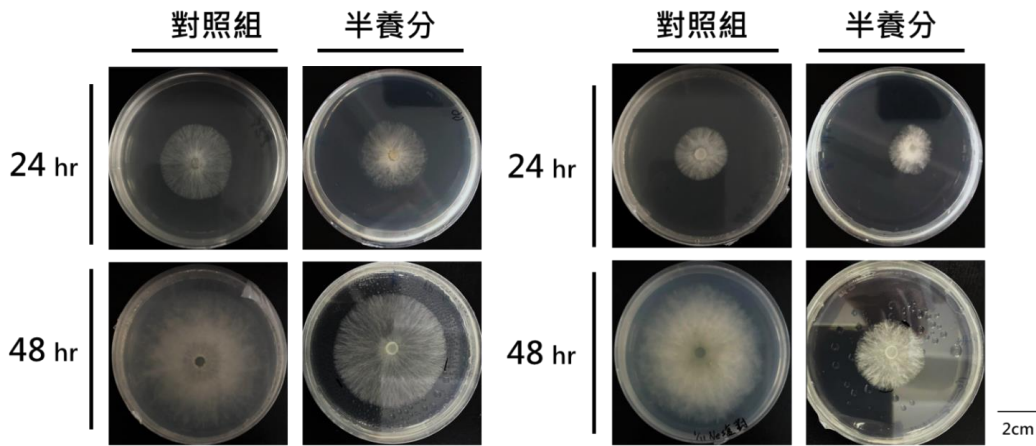
(圖 1-15) Lt 每日半徑總長測量結果



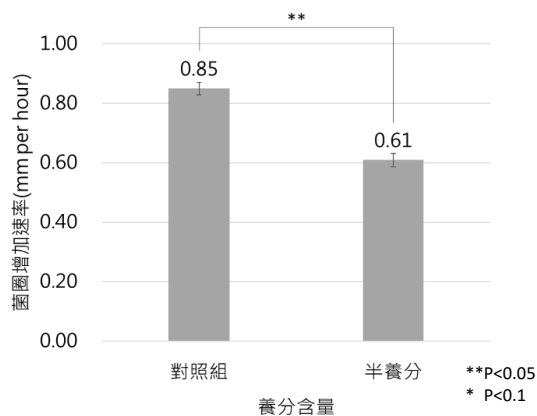
(圖 1-16) Np 每日半徑總長測量結果

二、探討不同環境對菌種生長速率影響

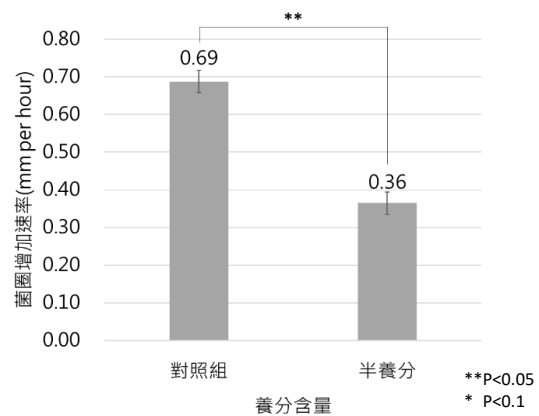
在瞭解其一般生長狀況後，我們試著觀察菌種在不同生長條件下生長會受到什麼影響，藉以瞭解其生長特性。由於具有不同的蔬果具有不同的養分含量與滲透壓，會提供菌種不同的生長環境，於是我們調整培養基的養分含量與滲透壓大小，藉以模擬上述的生長環境，與對照組進行生長情形與生長速率的比較。



(圖 2-1) Lt 半養分與正常狀況生長情形之比較 (圖 2-2) Np 半養分與正常狀況生長情形之比較
圖中可見 Lt 與 Np 菌種半養分組的菌圈密度與半徑皆明顯降低，顏色也較淡。



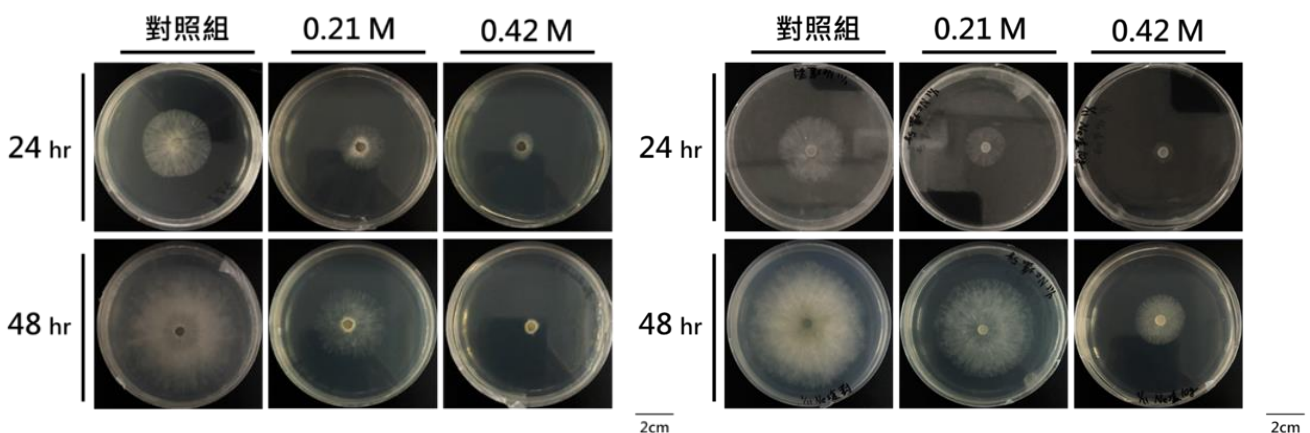
(圖 2-3) Lt 半養分與正常狀況生長速率之比較



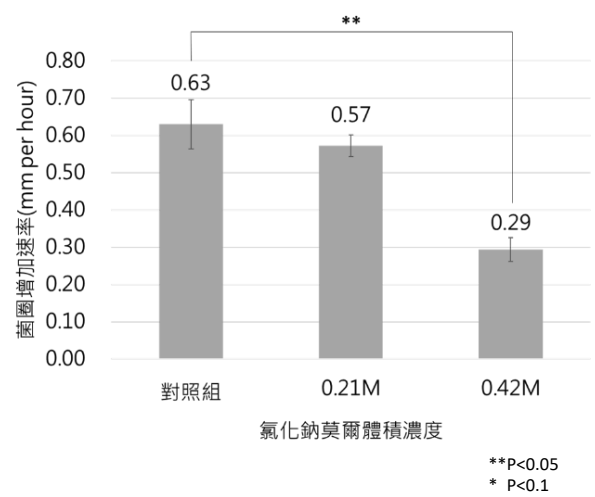
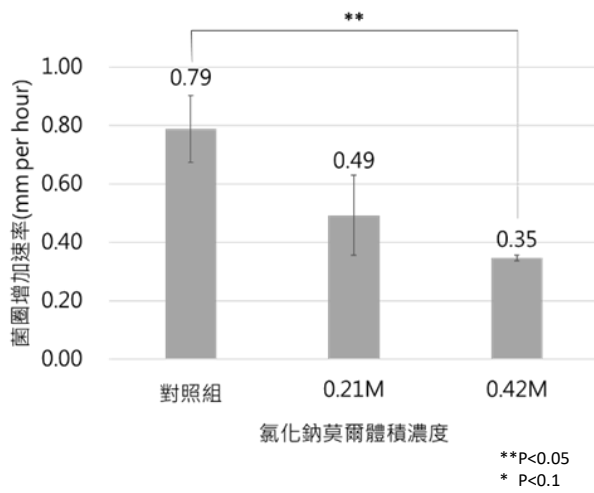
(圖 2-4) Np 半養分與正常狀況生長速率之比較

經過觀察，看出於半養分配置的培養基上菌絲密度會變低，生長中心黑色素會變少；分析後我們亦得知菌圈大小與菌圈增加速率皆明顯變小，其中 Lt 生長速率約減少 29%，而 Np 則減少約 48%，可以得知 Np 比 Lt 對生長環境的養分含量較為敏感。

接下來，我們將菌種接種在不同滲透壓的環境下，以了解在鹽逆境下，菌種生長會受產生甚麼變化。



(圖 2-5) Lt 鹽逆境與正常狀況生長情形之比較 (圖 2-6) Np 氯化鈉莫爾濃度對菌圈生長速率影響

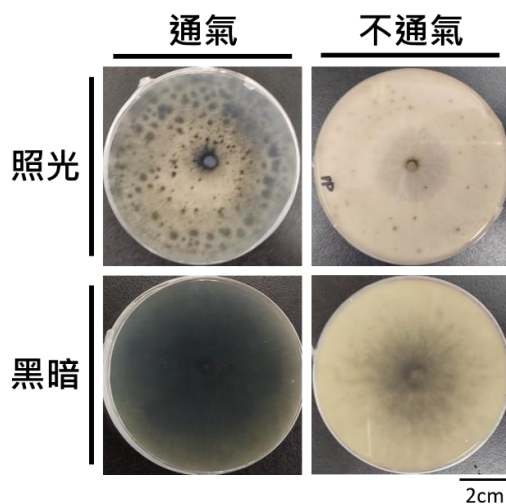


(圖 2-7) Lt 鹽逆境與正常狀況生長情形之比較 (圖 2-8) Np 氯化鈉莫爾濃度對菌圈生長速率影響

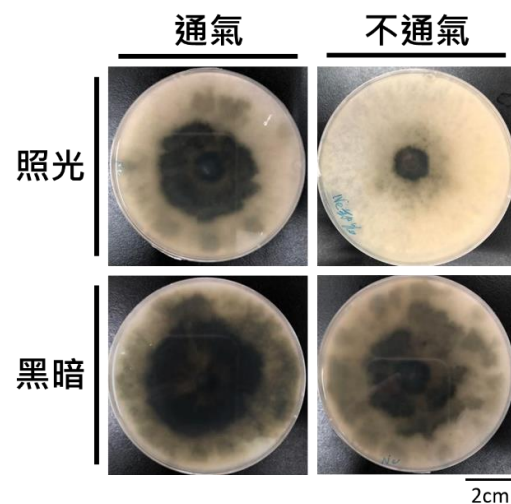
由圖 2-5 與 2-6 我們可觀察隨著鹽濃度提高，兩菌種菌絲密度與菌圈半徑皆下降，顏色也都較淡。而 Np 菌展現出了較 Lt 強的耐鹽能力。經過分析後可知，兩菌種的菌圈生長速率隨著鹽濃度上升明顯變小，且菌圈的密度也降低。但可以明顯看出兩種菌對鹽分的耐受性不同。在 0.21M 的鹽濃度下 Lt 的生長速率下降 38.0%，而 Np 的生長速率未達顯著差異；在 0.42M 鹽濃度下，Lt 生長速率下降 49.3%，而 Np 下降 54.6%。如此可得知，Np 在 0~0.21M 生長狀況較 Lt 良好，而在 0.21~0.42M 下則是 Lt 生長較 Np 良好。

三、比較光線與通氣與否對其黑色素生成之差異

實驗的過程中，我們發現光線與通氣與否似乎會影響其生長狀況因此，我們設計實驗，欲探討光照、通氣與否對菌盤產生的影響。



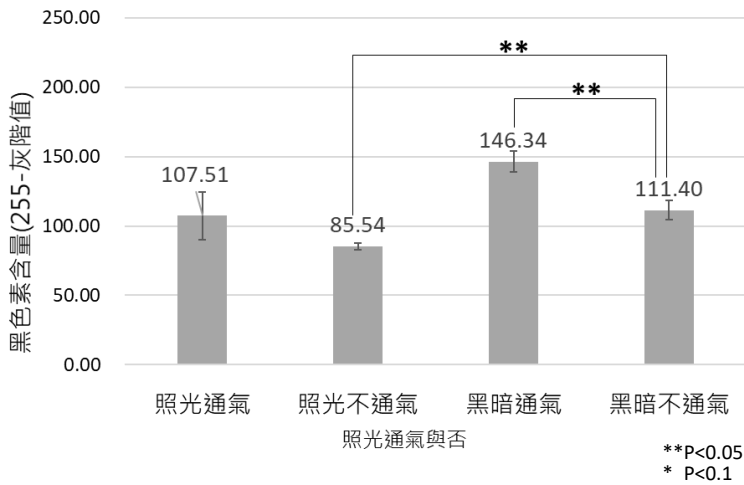
(圖 3-1) Lt 照光通氣與否之黑色素生成比較



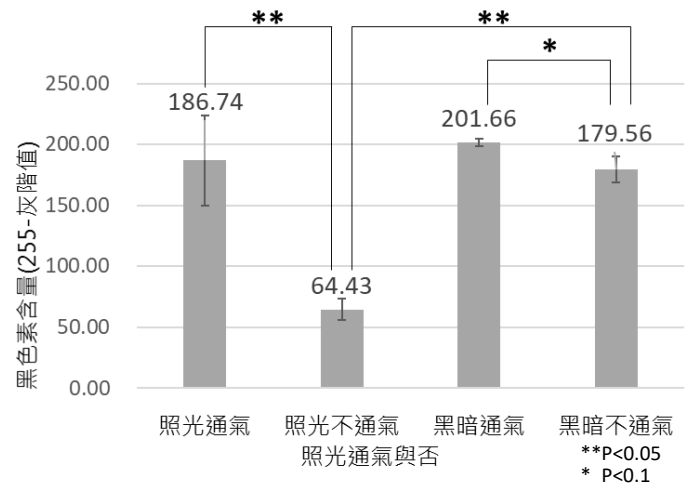
(圖 3-2) Np 照光通氣與否之黑色素生成比較

在 Lt 菌的部分，光照與密閉環境則會使黑色素生成減少，通氣與黑暗環境會使黑色素增加。在光照組中的黑色素為隨機的斑點狀分布，黑暗組則以接種處為中心放射狀分

布；Np 同樣在光照或密閉的環境黑色素會減少，通氣與黑暗中會增加，而黑色素分布皆以接種處為中心呈斑塊狀分布。



(圖 3-3) Lt 照光通氣與否之黑色素比較

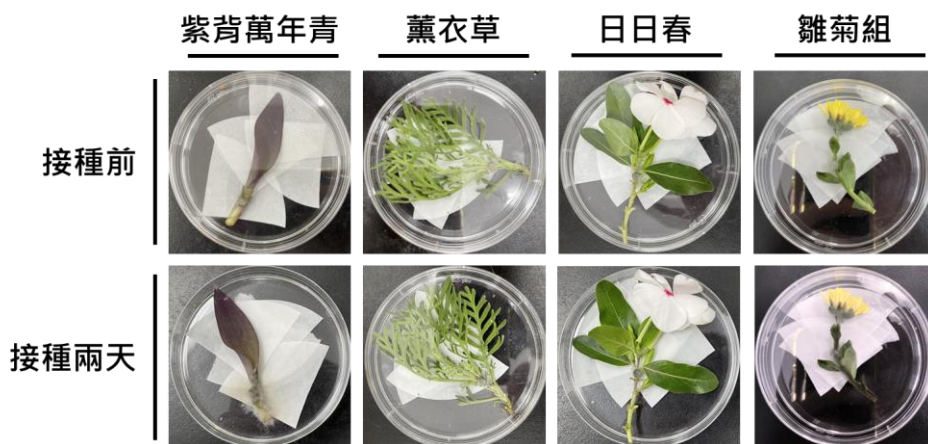


(圖 3-4) Np 照光通氣與否之黑色素比較

透過灰階值分析，可以發現在針對光照的分析下，Lt 跟 Np 兩菌種在通氣的環境下，光照造成的黑色素未成差異，但卻在不通氣的情況下皆產生達到顯著差異；在針對通氣的分析下，Np 無論照光有無，通氣皆造成差異，Lt 則僅在不照光出現顯著差異。總而言之，其黑色素分布受到光的調控，光照會使兩種菌種黑色素減少，推測此兩類菌種很可能具備感光能力，而 Np 對光線的感應能力可能較 Lt 來的敏感。另外，通氣的環境可能會使菌種黑色素增加（參見討論一）。

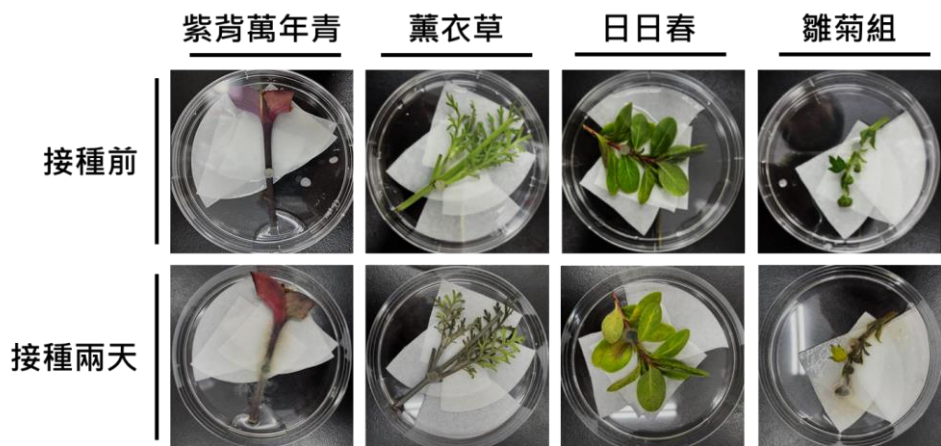
四、探討菌種對不同植物的感染情形

在了解菌種的相關特性後，我們好奇除了木瓜以外，其他類型的植物是否也會受到感染，於是從園藝植物類、水果類、蔬菜類植物各挑選四種進行接種並觀察其感染情形。



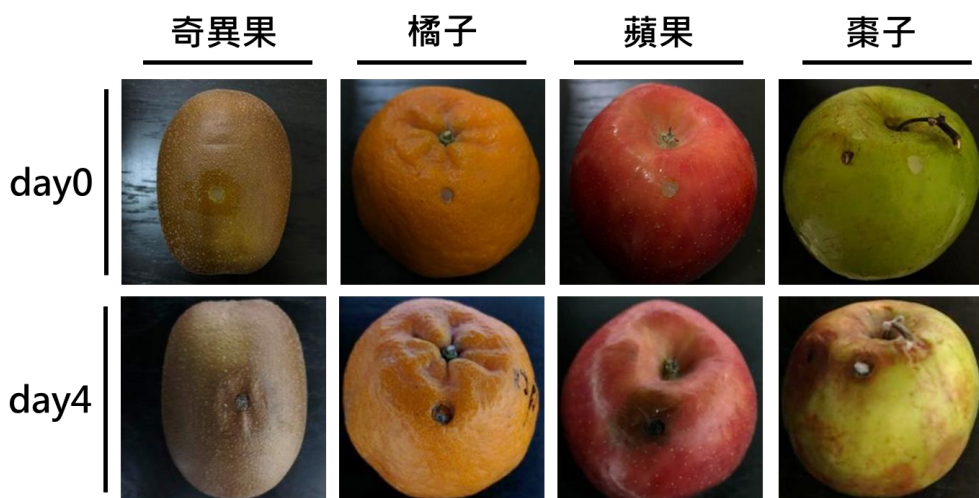
(圖 4-1) 以 Lt 接種園藝植物

2cm



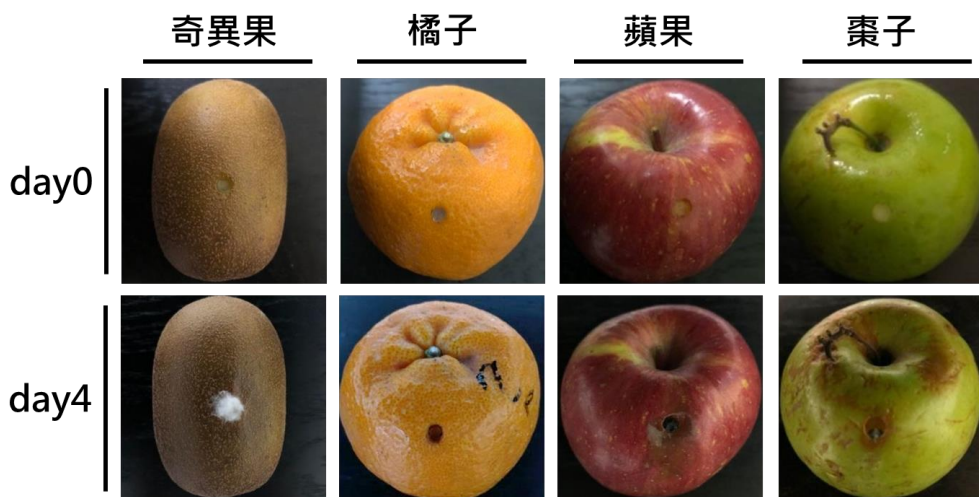
(圖 4-2) 以 Np 接種園藝植物

2cm



(圖 4-3) 以 Lt 接種水果

接種處皆有菌絲分布，而感染情形奇異果與蘋果潰爛最為明顯，棗子出現腐斑，但組織仍保持完整；橘子則幾乎沒有感染跡象。



(圖 4-4) 以 Np 接種水果

接種處皆有菌絲分布，感染情形以奇異果感染最嚴重，菌絲生長旺盛；蘋果與棗子有些微腐爛；橘子接種處雖然也有少許菌絲分布，但沒有任何腐爛跡象



(圖 4-5) 以 Lt 接種蔬菜

接種處皆有潰爛的情形，以地瓜葉最為嚴重，莖完全腐爛且發黑；九層塔受感染最不嚴重接種組織仍保持完整。

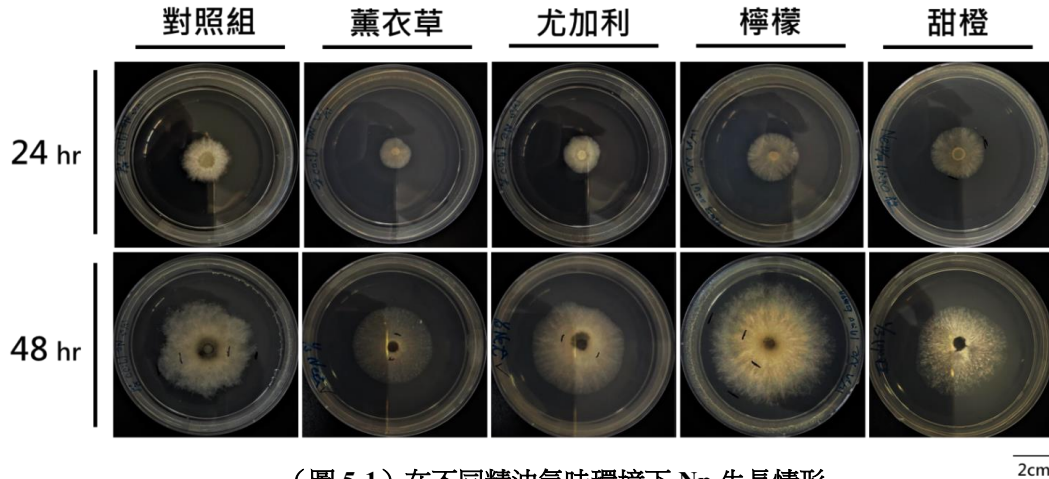


(圖 4-6) 以 Np 接種蔬菜
感染情形同 Lt 菌

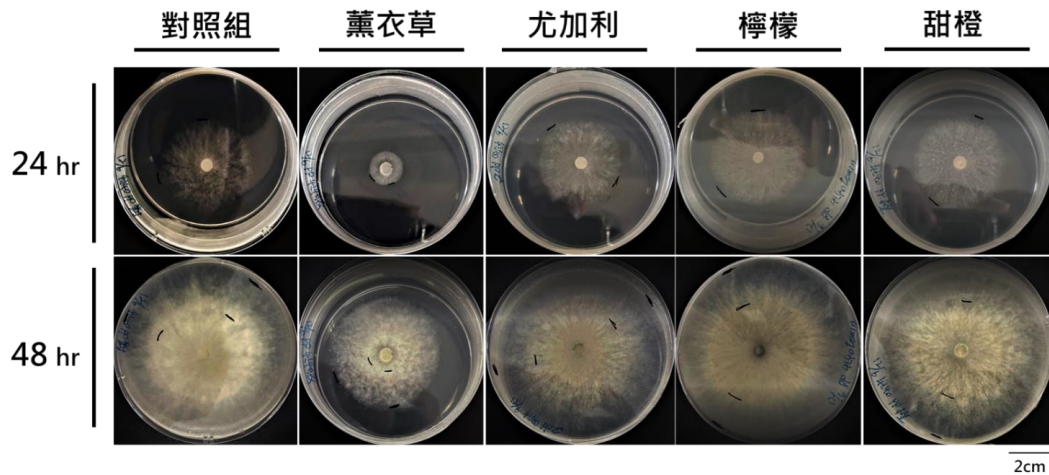
上述實驗中，我們所選的植物皆有受到感染，可以證明 Lt 與 Np 菌的感染對象並不只限於木瓜，而是對大多數植物都具有感染力。然而，有部分植物受感染情形較不顯著，如：水果組的橘子、蔬菜組的九層塔、校園植物組的薰衣草與日日春，這些植物組織病變情況在各組中都是較不明顯的。相較而言，奇異果、地瓜葉、紫背萬年青……等都出現嚴重的組織潰爛，菌絲也遍布植物表面。由於較不受感染的植物皆帶有較強烈氣味，我們推測植物的氣味或許與菌種的感染受到抑制有所關聯，或許可作為天然抑菌劑。

五、比較不同精油氣味對菌種生長情形的影響

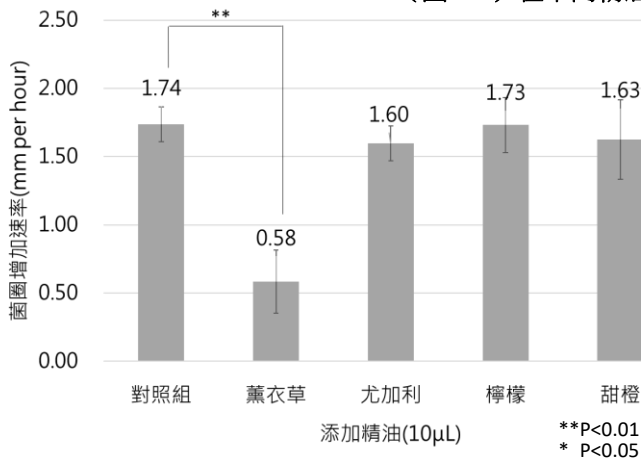
延續上述的植物接種實驗，我們決定往氣味的方向深入探討，於是利用前述結果選擇四種植物精油作實驗。我們選擇了與橘子同為芸香科的檸檬與甜橙精油、薰衣草則是直接選用薰衣草精油，而九層塔的精油較不易取得，因此選了同為芳香類植物的尤加利精油。以上述的精油氣味處理真菌，觀察並記錄其生長情形。



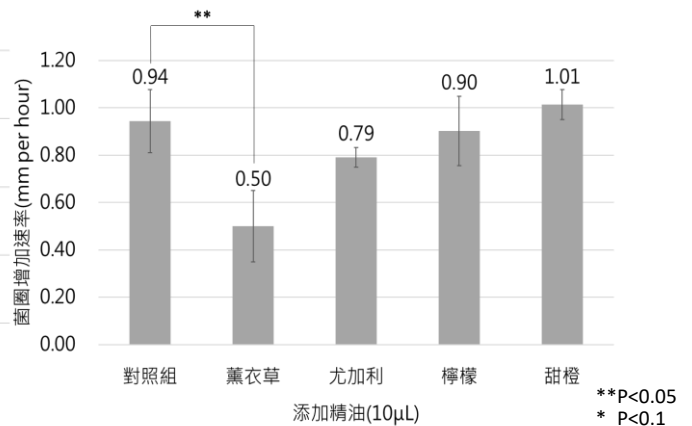
(圖 5-1) 在不同精油氣味環境下 *Np* 生長情形



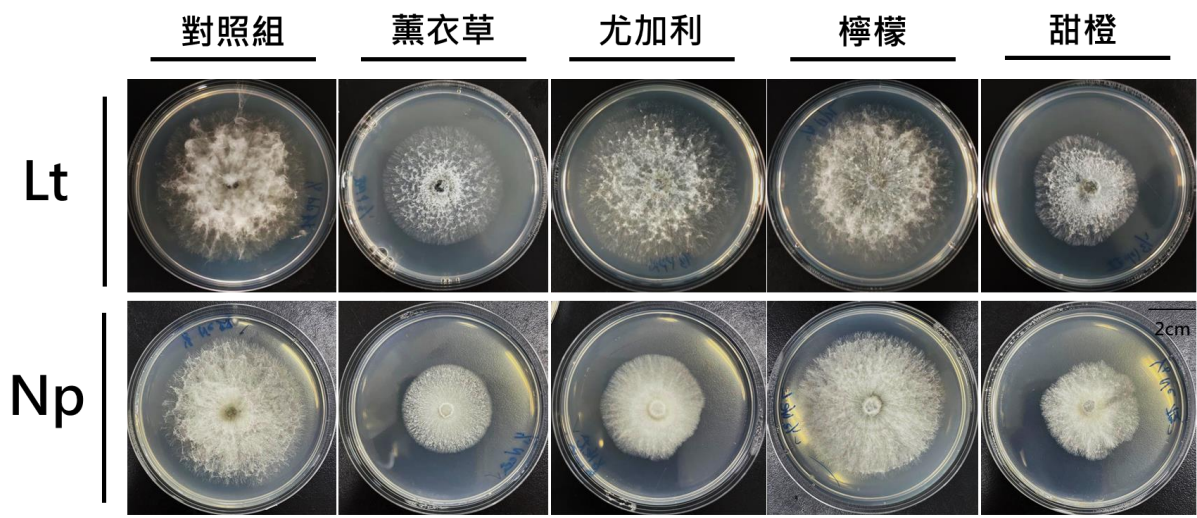
(圖 5-2) 在不同精油氣味環境下 *Lt* 生長情形



(圖 5-3) 在不同精油氣味環境下 *Lt* 生長速率



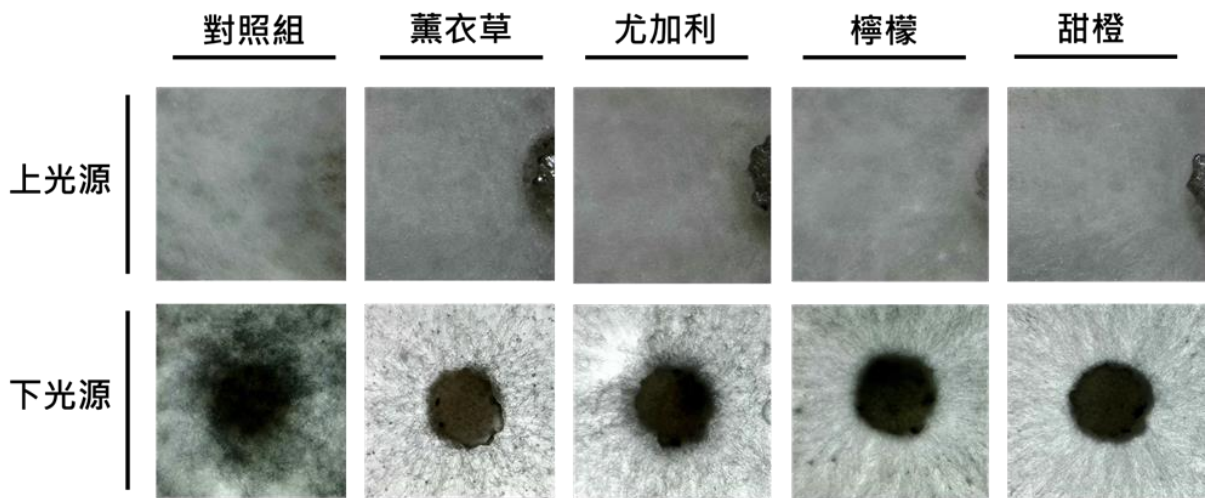
(圖 5-4) 在不同精油氣味環境下 *Np* 生長速率



(圖 5-5) 在不同精油氣味環境下 Np 生長情形 (正面照)

2cm

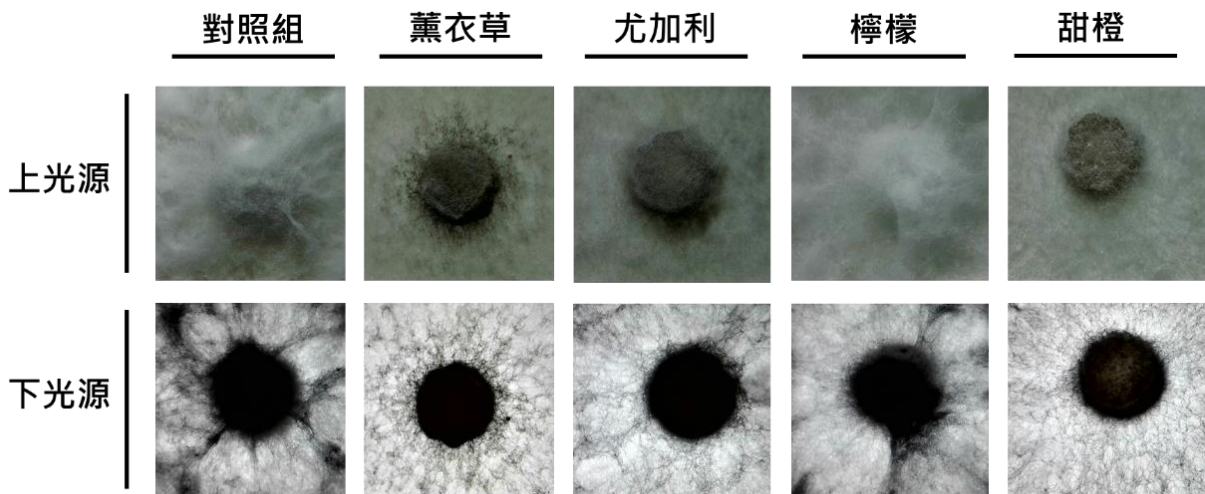
如上圖可見薰衣草迄未處理後的菌圈生長明顯受限，向上生長的菌絲也明顯減少。



(圖 5-6) 在不同精油氣味環境下 Lt 生長情形 (解剖顯微鏡下菌絲照片)

3mm

可以看到各精油組組的菌圈密度均下降 (透光度上升)、菌絲也較稀疏，由以薰衣草最為明顯。



(圖 5-7) 在不同精油氣味環境下 Np 生長情形 (解剖顯微鏡下菌絲照片)

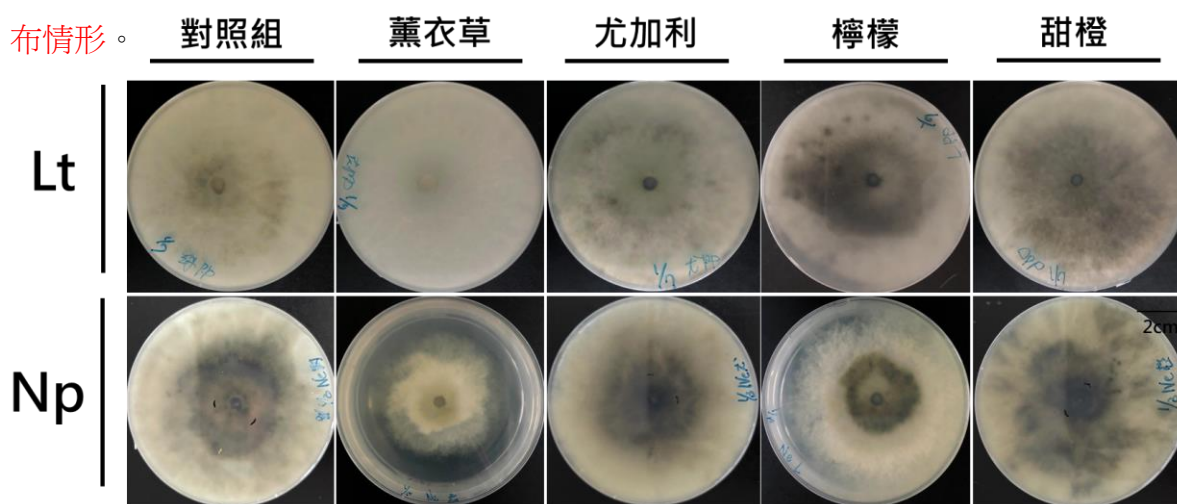
3mm

由上圖可以看到薰衣草、甜橙、尤加利的菌圈密度均下降、菌絲生長也較為受限。而檸檬組菌絲生長較對照組旺盛，密度也較高。

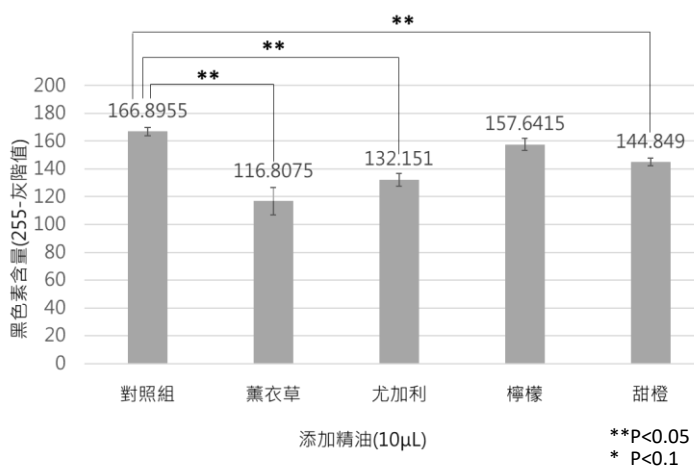
從圖 5-3、5-4 中可見，**薰衣草精油抑制菌種生長效果特別突出** (P-value < 0.05)，且其生長速率分別可減至對照組的 33.1% (Lt) 與 53.2% (Np)；相較之下，其他精油在生長速率方面皆未達顯著差異。而在菌絲型態方面，氣味處理後的菌絲密度除檸檬精油外皆可明顯受影響，可從圖中觀察出其菌絲較對照組稀疏，亦可看出其菌絲濃密程度較對照組來的濃，其中仍以薰衣草最為顯著。而**檸檬組的菌絲最為濃密**，菌絲的生長甚至比對照組旺盛。綜上所述，**薰衣草對兩種菌種皆能抑制生長，而檸檬會使菌種的菌絲生長更為旺盛**。

六、比較不同精油氣味對菌種黑色素生成的影響

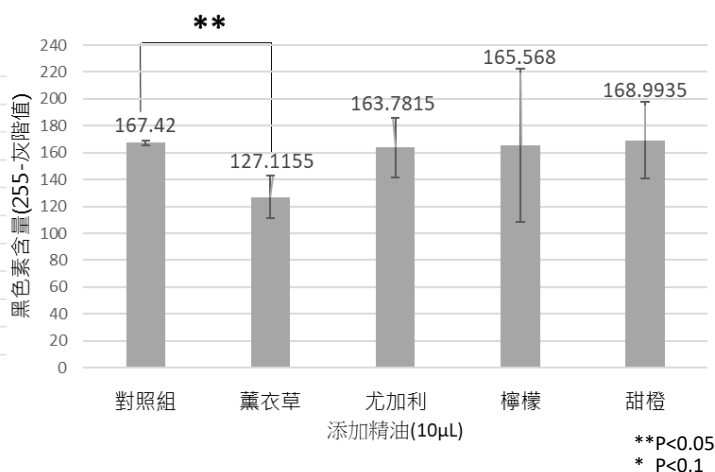
我們於幾日後觀察實驗五留下之菌盤，得知經氣味處理的菌盤黑色素含量明顯較低。**我們好奇精油能否抑制黑色素生成**，為了避免光照與通氣因素影響實驗結果，便在固定環境為無光照、密封並靜置六天以進行實驗，**觀察在不同氣味處理下，菌種的黑色素分布情形**。



(圖 6-1) 在不同精油氣味環境下菌種黑色素生成情形



(圖 6-2) 在不同精油氣味環境下 Lt 菌盤黑色素含量

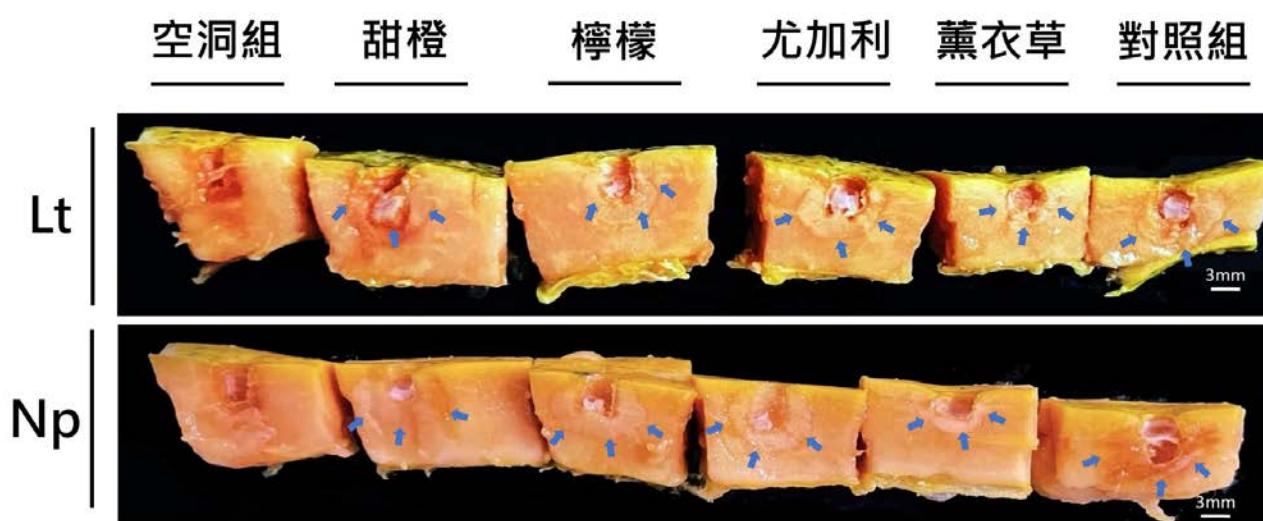


(圖 6-3) 在不同精油氣味環境下 Np 菌盤黑色素含量

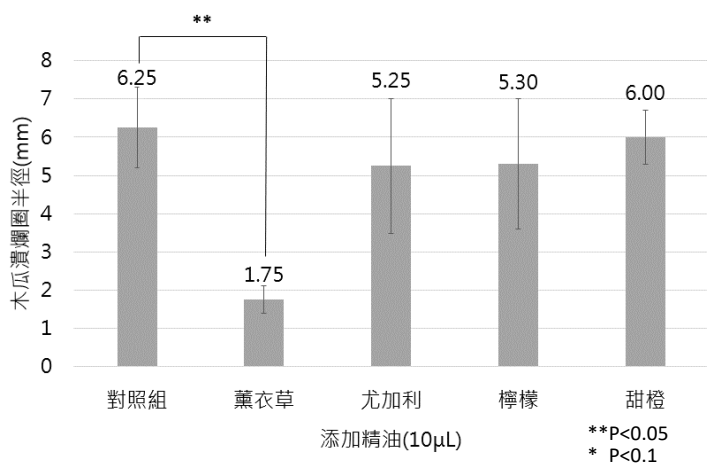
從實驗結果中，可見薰衣草精油對兩種菌種皆能顯著降低其黑色素生成 RGB，而甜橙、尤加利等只對 Lt 菌有顯著效果，對 Np 菌則沒有差異。而檸檬則是對兩菌種的黑色素生成皆沒有影響。四種精油中，**只有薰衣草對兩菌種的黑色素生成皆產生顯著影響**。

七、比較不同精油處理後對真菌感染力的影響

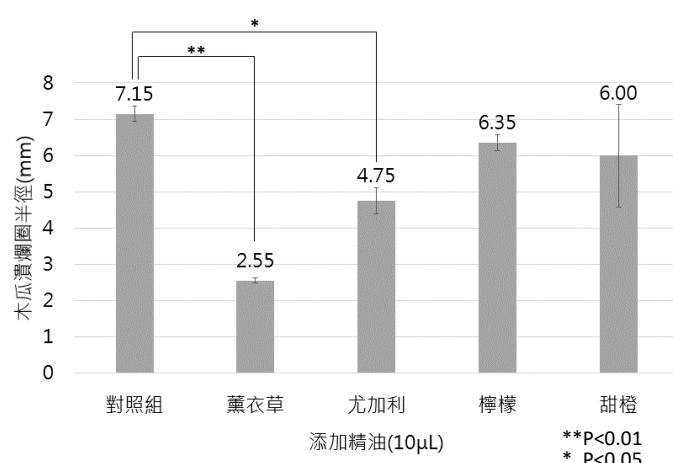
了解被精油處理過後的真菌對生長速率有影響後，**為了確認精油處理後的病原菌對植物的致病力是否也有下降**，我們將氣味處理後的病原菌接種回紅灰木瓜上，觀察潰爛圈的半徑大小差異，作為感染力量化的依據。



(圖 7-1) 精油氣味對接種菌種潰爛圈影響照片



(圖 7-2) 精油氣味對 Lt 潰爛圈半徑影響



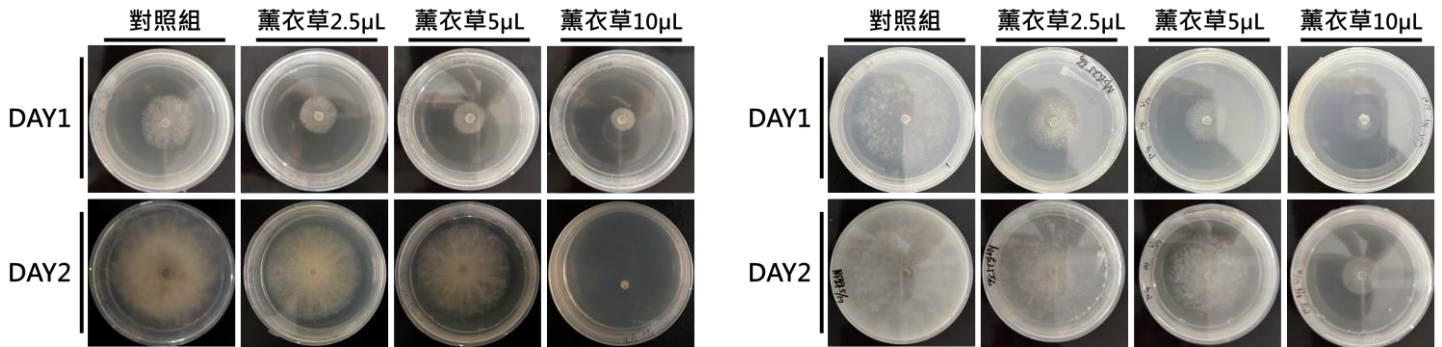
(圖 7-3) 精油氣味對 Np 潰爛圈半徑影響

由實驗結果可判斷薰衣草對兩菌種的感染力皆出現明顯抑制，而經檸檬與甜橙精油處理後對感染力的影響微乎其微，尤加利在 Np 菌上的表現達顯著差異但對 Lt 菌沒有影響。可由此推測，**柑橘類抑制真菌生長可能另有他法，而非依靠氣味**。綜上所述，四種

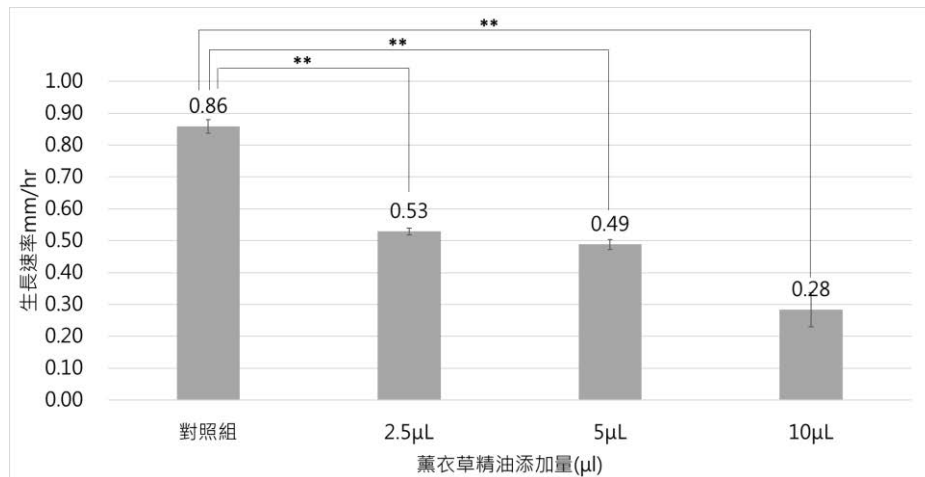
精油中，僅薰衣草能同時降低兩菌種的感染力，推測薰衣草精油的抑菌效果可能具有廣效性。

八、不同濃度薰衣草精油對菌種生長速率的影響

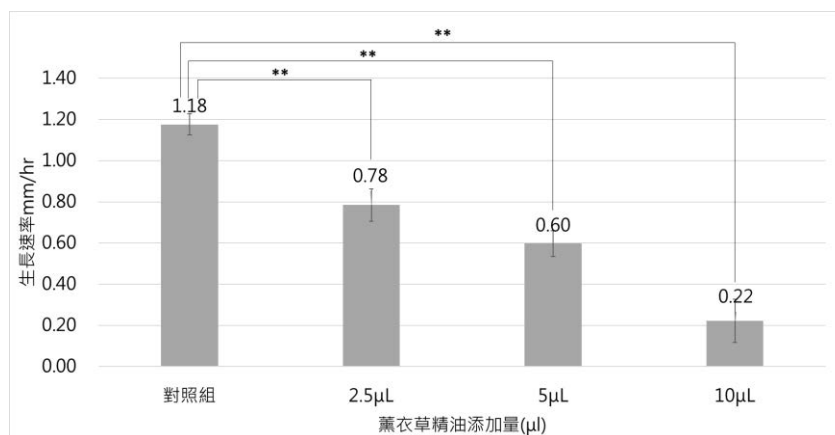
由實驗七與實驗六可以確認薰衣草精油的益菌效果，於是我們想進一步測試不同濃度的薰衣草精油之抑菌效果如何，並將結果用於分析其實際應用價值。



(圖 8-1) 不同薰衣草精油添加量之氣味對菌種生長速率影響照片 (左為 Lt、右為 Np)



(圖 8-2) 不同薰衣草精油添加量之氣味對 Lt 菌種生長速率影響



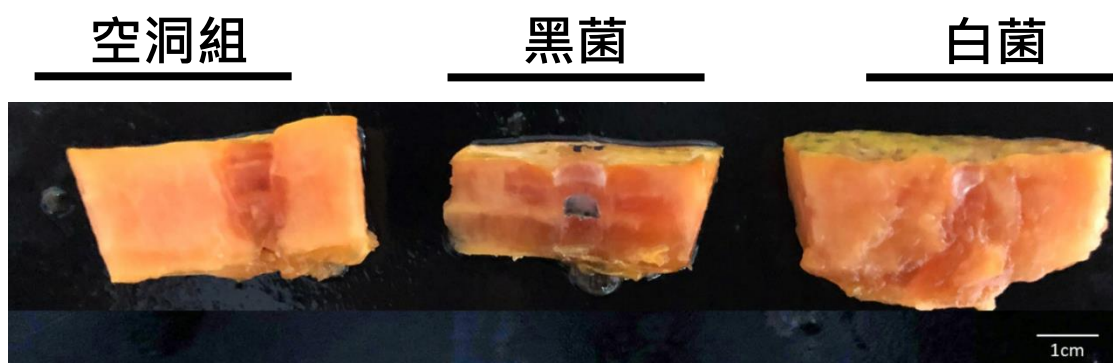
(圖 8-3) 不同薰衣草精油添加量之氣味對 Np 菌種生長速率影響

由上述實驗結果可以知道，各組均有達到顯著差異 ($p\text{-value} < 0.05$)，而薰衣草精油的

抑菌效果隨著濃度增加會顯著的提升，當加入的體積達到 $10\mu l$ 的時候菌絲幾乎無法生長。在各組中，Np 受抑制的程度皆大於 Lt 受抑制的程度。

九、黑色素對真菌感染力的影響

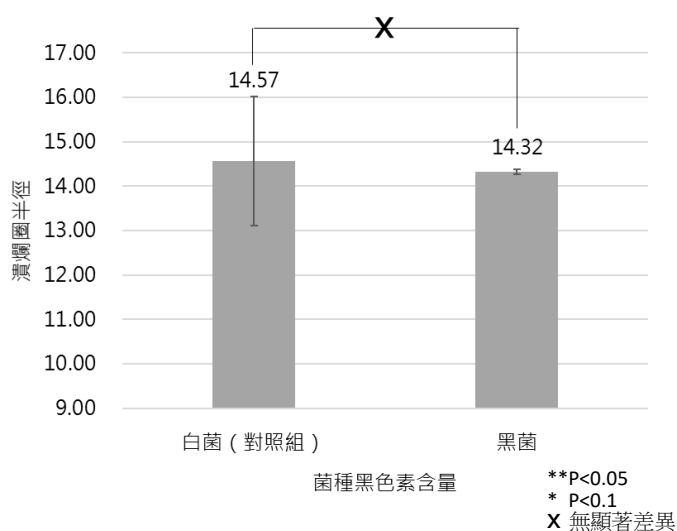
由實驗六中之結果，分析出精油除抑制真菌生長速率，亦會抑制其黑色素的生成。我們想了解黑色素本身是否對真菌感染力造成影響，因此選用生長狀態一致但黑色素含量較高的黑菌與黑色素含量較低的白菌進行接種，並觀察木瓜潰爛程度。



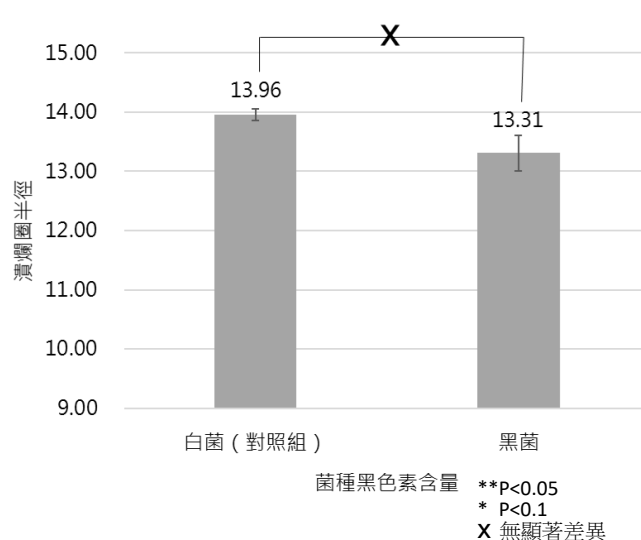
(圖 9-1) 黑色素對接種 Lt 潰爛圈影響照片



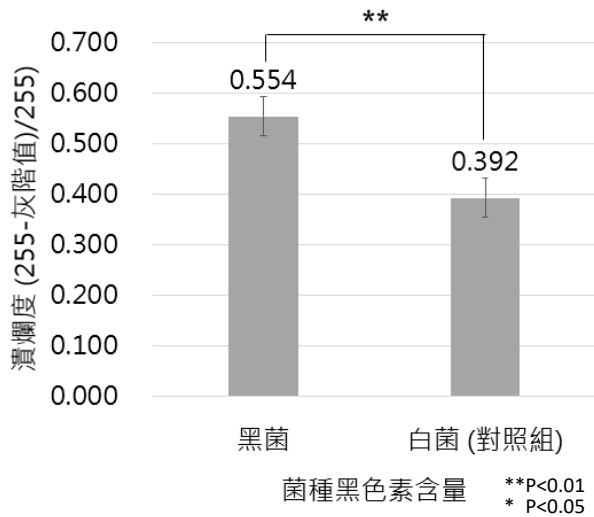
(圖 9-2) 黑色素對接種 Np 潰爛圈影響照片



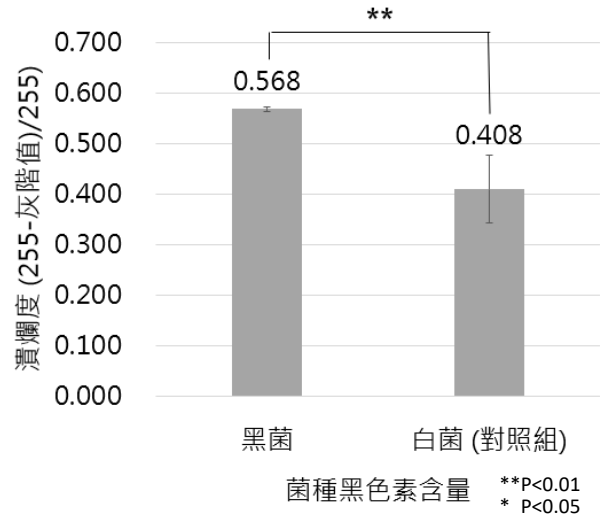
(圖 9-3) 黑色素對 Lt 潰爛圈半徑影響



(圖 9-4) 黑色素對 Np 潰爛圈半徑影響



(圖 9-5) 黑色素對 Lt 潰爛程度影響

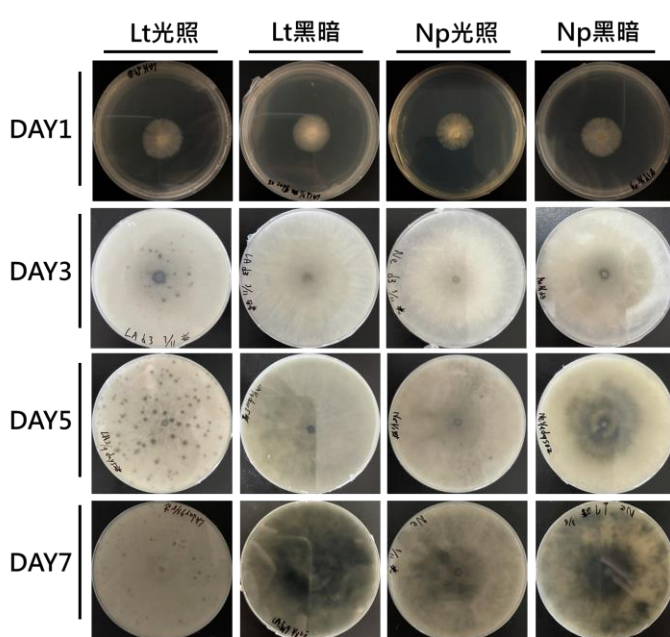


(圖 9-6) 黑色素對 Np 潰爛程度影響

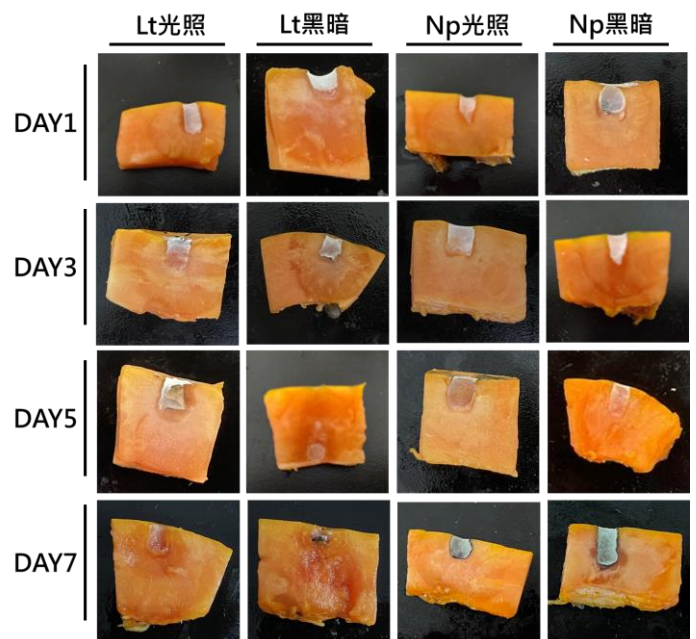
經分析實驗結果，黑色素含量在 Lt 與 Np 兩菌種上皆沒有對潰爛圈半徑造成顯著差異，但根據圖 9-1、9-2 與 9-5、9-6，可以發現**黑菌感染區域腐爛程度較嚴重**，RGB 值與對照組呈明顯差異 (P-value < 0.01)。

十、光照造成不同程度的黑色素差異的致病力影響

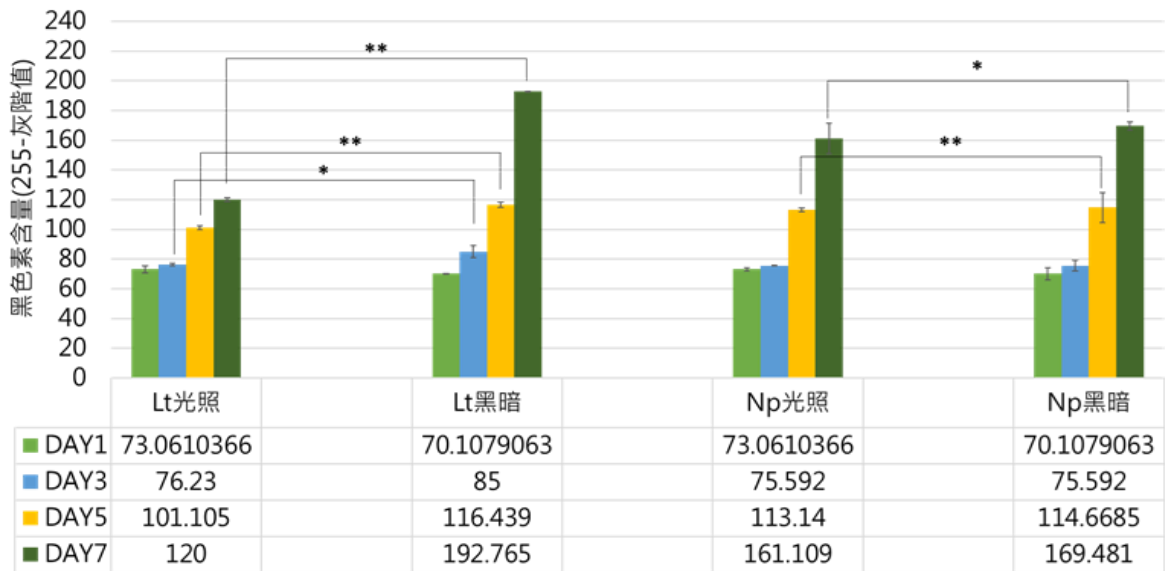
分析實驗六和實驗九的結果後，我們想進一步確認在光照的調控下，黑色素是否為影響真菌感染力的真正因素，於是我們將照光組與不照光組的菌分別放置 1、3、5、7 天後，取出並重新接回木瓜上，**觀察隨著天數增加，黑色素差異出現時，致病力是否也同時出現差異。**



(圖 10-1) 不同天數下光照對 Np 與 Lt 黑色素影響照片



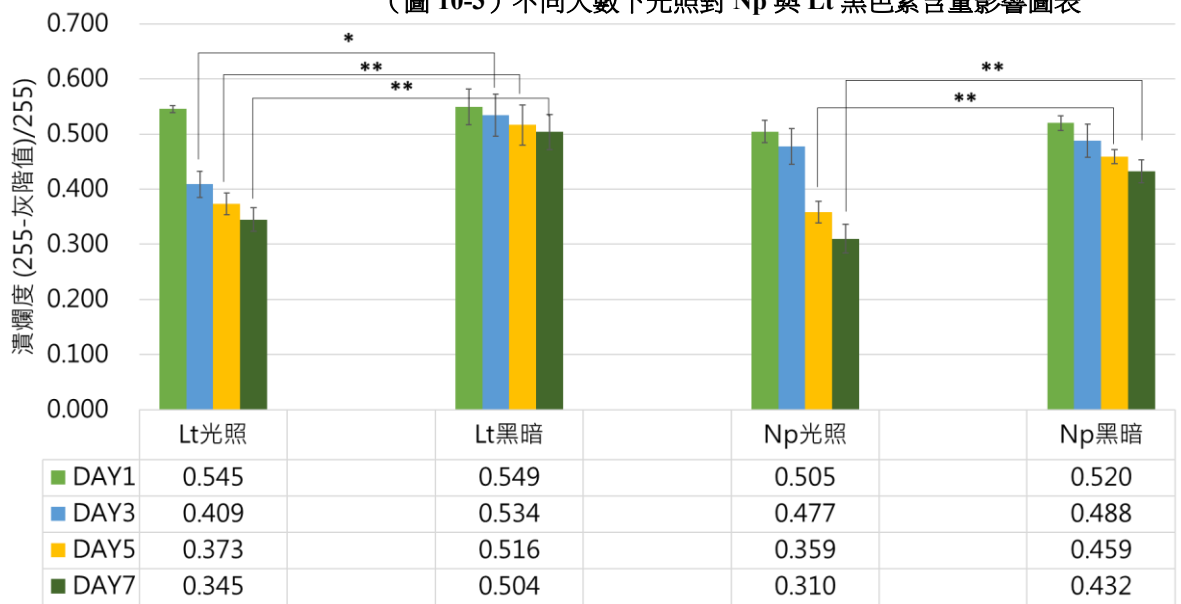
(圖 10-2) 不同天數下光照對 Np 與 Lt 致病力影響照片



**P<0.05
* P<0.1

菌種光照與否

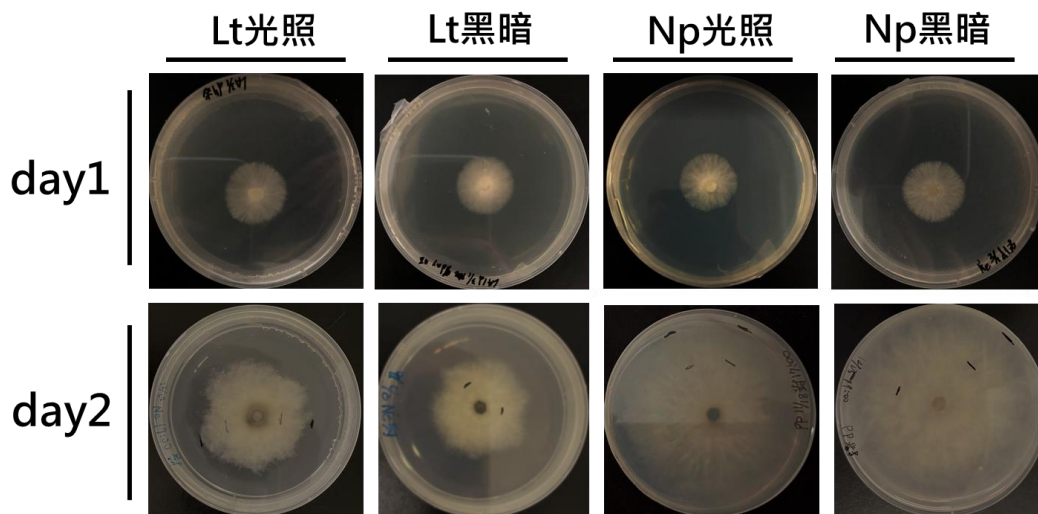
(圖 10-3) 不同天數下光照對 Np 與 Lt 黑色素含量影響圖表



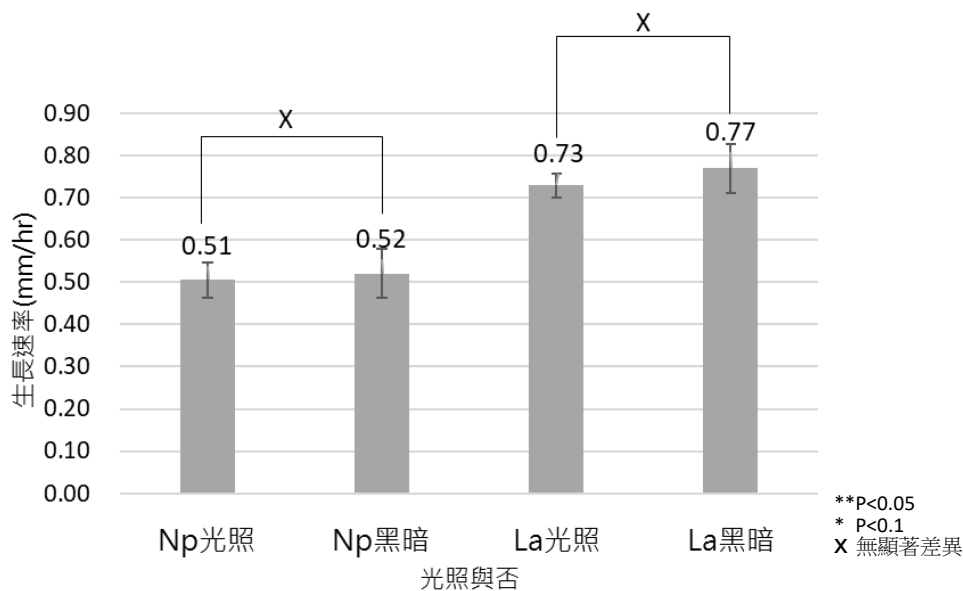
**P<0.05
* P<0.1

菌種光照與否

(圖 10-4) 不同天數下光照對 Np 與 Lt 致病力影響圖表



(圖 10-5) 光照對 Np 與 Lt 生長影響照片



(圖 10-6) 光照對 Np 與 Lt 生長影響圖表

由以上實驗可以發現，光照與否對於 Lt 與 Np 兩菌種皆不會影響生長速率，而兩菌種的黑暗組的菌盤黑色素皆大於光照組，且會隨著生長時間的增加，黑色素含量差異會越來越大。致病力方面，則是隨著生長時間增加，兩菌種的光照組與黑暗組致病力都有下降的趨勢。

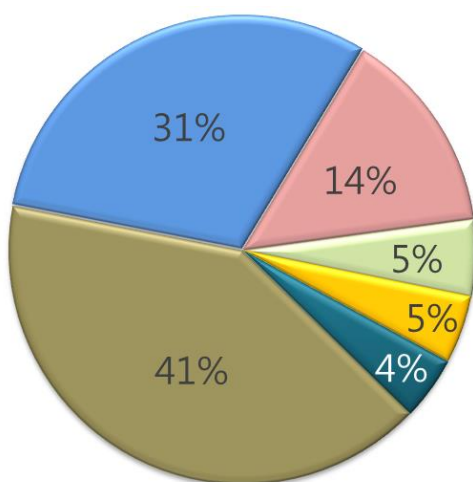
同時，我們注意到在第一天與第三天時，光照組與黑暗組的黑色素差異並不明顯，而其致病力也未出現顯著的差異，然而當菌種生長到第五或第七天，光照組與黑暗組出現了顯著的黑色素含量差異，他們的致病力也同時出現了差異，加上前述的實驗也證明光照對於 Lt 與 Np 皆不會直接影響生長速率，我們推測能造成菌種致病力差異的關鍵因素可能是黑色素。

菌種的致病力會隨著時間而下降，可能是因為菌種老化而導致致病力逐漸下降，而在黑暗環境中，菌種產生的黑色素可能具有延緩菌種老化的能力或是能夠增強菌種的致病力，使得在較長的生長時間下，黑色素含量高的黑暗組的致病力衰退程度較黑色素含量低的光照組來得低。

十一、芳樟醇氣味對菌種生長的影響

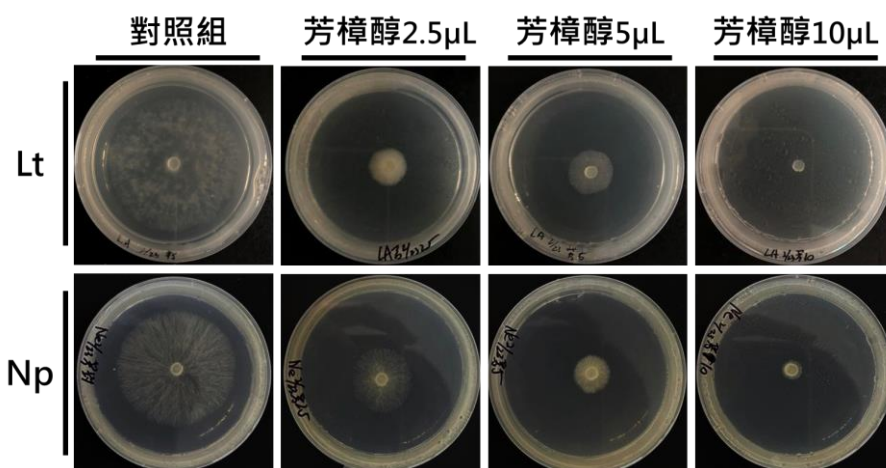
Krzysztof Smigielski 等 (2013) 的研究指出，薰衣草精油的成分為芳樟醇 (30.6%)、乙酸芳樟酯 (14.2%)、香葉醇 (5.3%)、β-石竹烯 (4.7%)、乙酸薰衣草酯 (4.4%)，而其中含量最高的成分為芳樟醇，因此我們推測芳樟醇是使薰衣草精油產生顯著抑菌效果的關

鍵成分。所以我們針對芳樟醇做與精油相同的氣味抑菌實驗，藉此找出薰衣草精油中關鍵的抑菌成份。

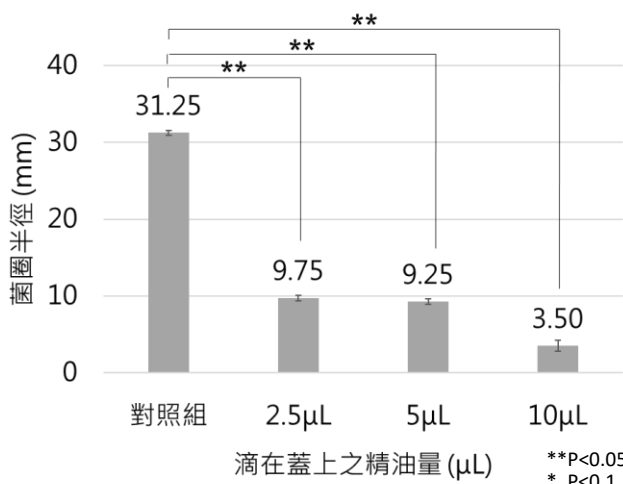


■ 芳樟醇 ■ 乙酸芳樟酯 ■ 香葉醇 ■ β-石竹烯 ■ 乙酸薰衣草酯 ■ 其他

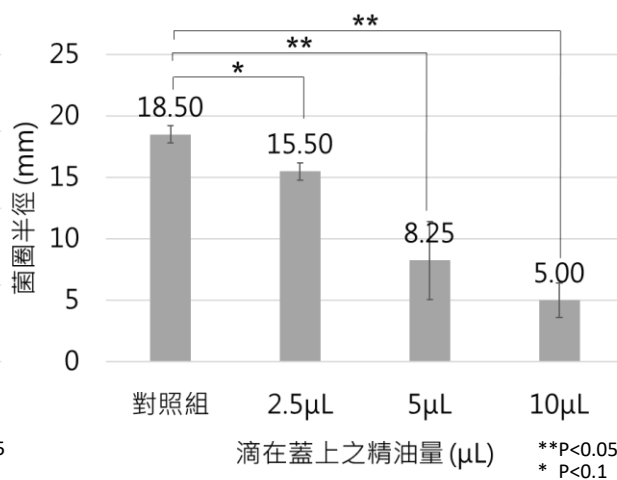
(圖 11-1) 薰衣草精油氣味成分圓餅圖 (Krzysztof Smigielski 等 (2013))



(圖 11-2) 芳樟醇氣味對菌種半徑影響照片



(圖 11-3) 芳樟醇氣味對 Lt 半徑影響照片



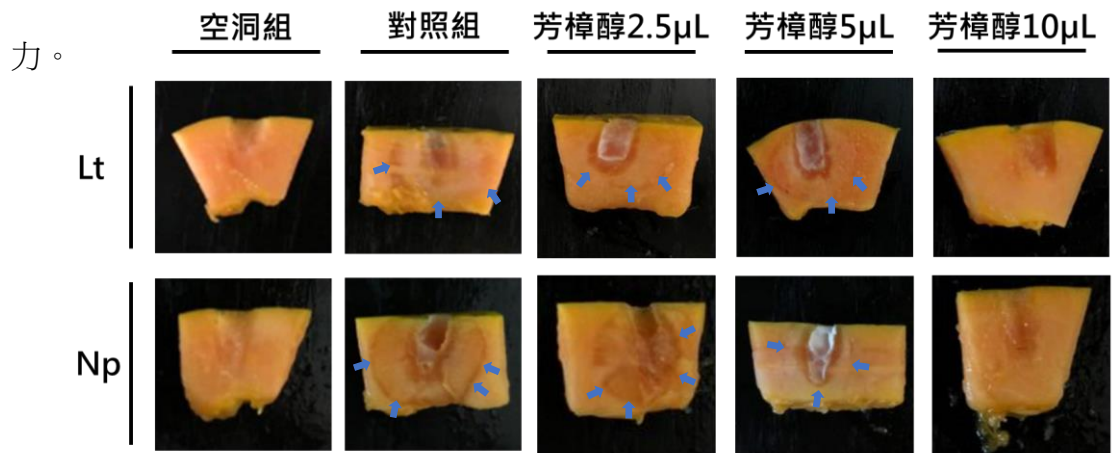
(圖 11-4) 芳樟醇氣味對 Np 半徑影響照片

我們發現芳樟醇可以顯著地抑制菌種的生長速率，且氣味濃度越高效果越顯著。而

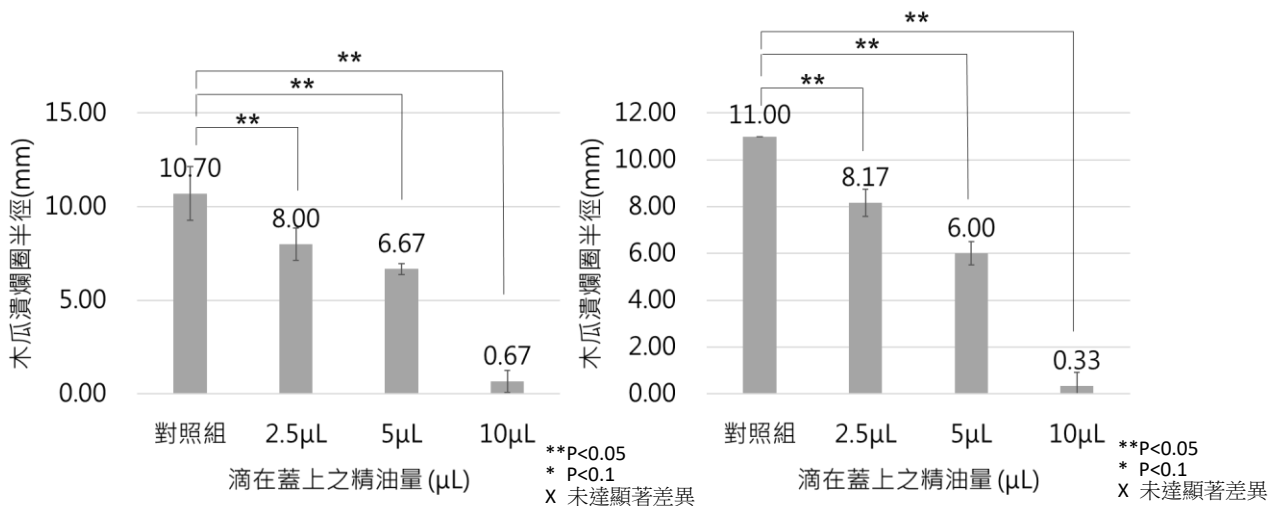
Lt 受芳樟醇抑制的程度較 Np 菌來得明顯。此實驗足以證明，芳樟醇對菌種的生長有明顯抑制，而 Np 菌對芳樟醇可能具備較 Lt 菌高的耐受性。

十二、芳樟醇氣味對菌種致病力的影響

如同實驗六的精油實驗，我們將芳樟醇氣味下生長的菌塊接種回木瓜上，觀察其致病力。

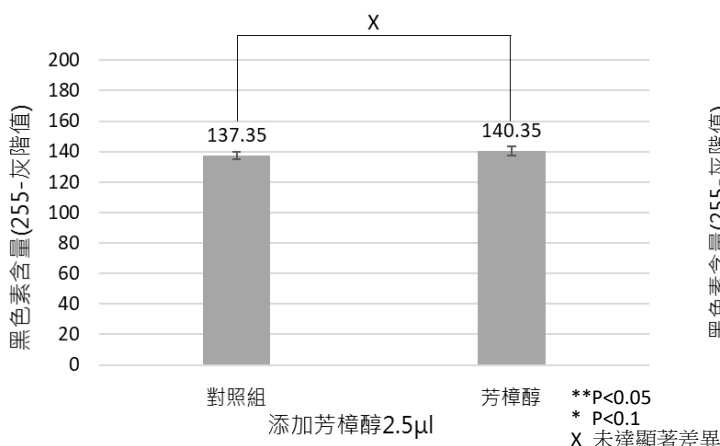


(圖 12-1) 芳樟醇氣味對時致病力影響照片

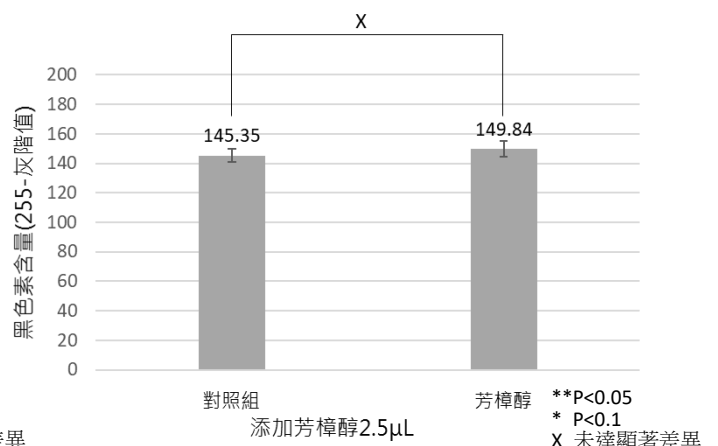


(圖 12-2) 芳樟醇氣味對 Lt 致病力影響照片

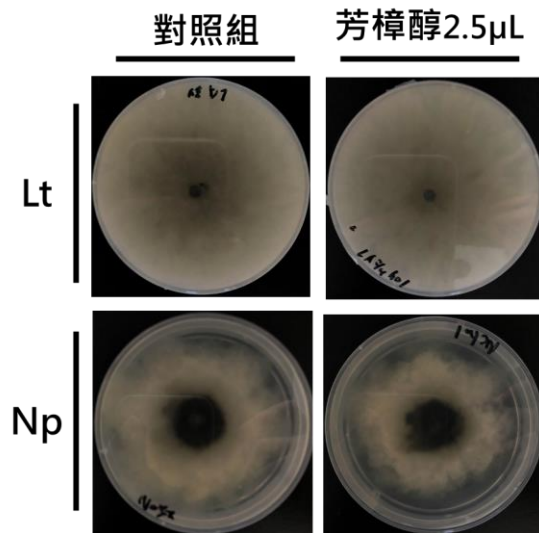
(圖 12-3) 芳樟醇氣味對 Np 致病力影響照片



(圖 12-4) 芳樟醇氣味對 Lt 黑色素影響圖表



(圖 12-5) 芳樟醇氣味對 Np 黑色素影響圖表



(圖 12-6) 芳樟醇氣味對 Lt 黑色素影響照片

透過以上實驗結果可以得知，芳樟醇氣味薰蒸後的菌種致病力明顯下降，且隨著濃度上升，抑制效果越來越強。另外，芳樟醇對 Np 菌的抑制效果較 Lt 強，Np 菌平均每一升降低的菌圈半徑 1.42mm/ μ l，Lt 則為 1.25 mm/ μ l。而芳樟醇雖然能降低菌種的致病力，但是對於黑色素的影響並不明顯，結果皆未達顯著差異。可以推知薰衣草精油中應該具有其他成分具有抑制黑色素生成的效果，此類成分配合著芳樟醇能降低菌種生長速率的能力，進而對菌種產生抑制。

伍、討論

一、黑色素與致病力的關係

在光照與通氣的實驗中，我們了解到在空氣流通的情況下，黑色素的生成會特別旺盛，針對這樣的現象。我們列出兩種可能，一是培養皿中的氣體逸出，二是外界的氣體流入。內部氣體流出的部分我們初步推測可能為真菌生長時分泌的乙烯氣體所致，但未發現任何研究足以證明乙烯與黑色素生成有關。而在外界氣體流入的部分，我們推測是氧氣所導致，因為空氣一旦流通意味這更高效率的有氧呼吸作用。Guozheng Qin 等人於 2011 年之研究提到：「真菌粒線體在呼吸作用中的電子傳遞鏈會產生活性氧化化合物 (ROS)，造成氧化壓力，而這對真菌的生長是極不利的」；E. A. Rangel-Montoya 等人在 2020 年同樣針對 *Npofusicocum parvum* 的另份研究中指出：「DOPA-黑色素被認為參與了氣生菌絲的生成，且為細胞提供了對抗溶酶裂解和氧化壓力的保護.....，DOPA-黑色素的生成是此真菌應對過氧化氫的主要方式之一」。此外，Eric S. Jacobson (2020) 提到：

「黑色素的氧化還原特性，由於黑色素根據吸收的電子數不同，具有氫醌、半醌、醌等三種狀態，這也使得黑色素變成了絕佳的氧化還原緩衝劑。」文中亦利用過錳酸鹽與次氯酸鹽等強氧化劑，發現了黑色素確實會擔任還原劑的功能，保護細胞免受強氧化劑影響。在我們的致病力實驗中，我們也發現黑色素含量較高的 Lt 與 Np 菌，組織潰爛的情形也較嚴重。綜上所述，我們認為黑色素的生成反應與黑色素本體，可能降低了細胞在充氧環境中產生的氧化壓力，而氧化壓力很可能是導致菌種隨著生長時間增加而老化的因素（感染力逐漸下降）。因此黑色素可以使菌種的細胞可以在進行旺盛的生長下仍保有良好的生長情形，不至於受 ROS 的影響而致病力下降。

二、光照與黑色素的關係

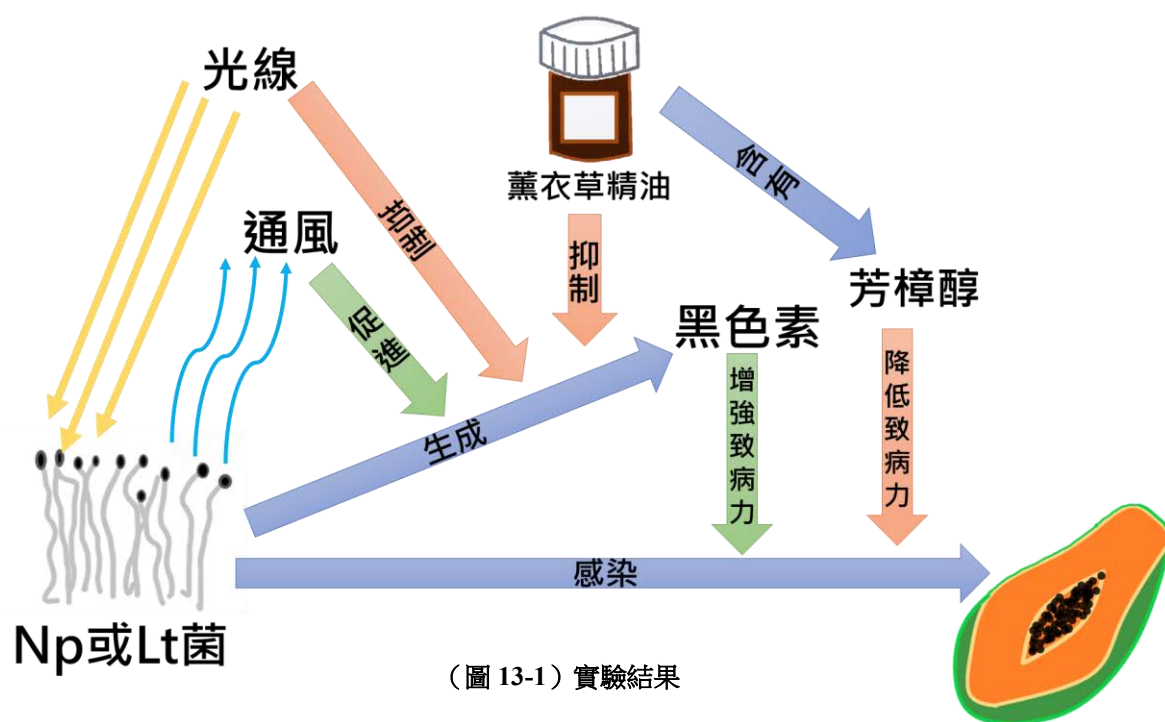
我們利用光照來調控真菌的黑色素分泌，但並沒有探討黑色素與光線的深入關係。Wenjun Sun 等人利用不同光通量的可見光的培養 *Aspergillus niger*，發現光可以激活 MAPK 信號通路中的 RlmA 轉錄因子，並且藉此促進真菌細胞幾丁質和多醣類的合成。另外，S.-M. Yu, G 和 Ramkumar, Y.H. Lee 的研究發現，可見光照射均會造成真菌黑色素沉積增加，且以藍光與白光波段的光線增加最為顯著。我們在實驗室中也曾因為將恆溫箱黃燈管換成白燈管，而發現黑色素分布明顯增加。Hao Jie Wong 等人的研究中提到：「它們（真菌）產生範圍廣泛的色素，含有黑色素、類胡蘿蔔素、真菌孢子素和 MAA 作為抵禦光致損傷的主要防禦層。儘管已經在微型真菌中發現了許多吸收紫外線的化合物」。而在我們的實驗中，光線確實對菌類的黑色素生成有很大的影響，可以確定此類真菌確實具有感光的能力。不過，我們得到的結果卻與前述的研究相反。另外，根據 Kwangwon Lee 等人（2006）的研究，光會明顯抑制稻瘟病真菌 *Magnaporthe oryzae* 的氣生菌絲生長，Min Guo 等人（2011）對於同樣菌種的研究則發現氣生菌絲的減少經常伴隨著黑色素的分泌量減少。因此，我們認為光能夠調控真菌黑色素的分泌，而根據環境的不同，真菌可能做出不同的反應，如：為了減少短波光線造成的方害而增加黑色素，或者產生較多的氣生菌絲，進而使黑色素的生成減少。

陸、結論

透過實驗，我們了解部分氣味較強烈的植物可抑制 Lt 與 Np 菌絲生長。我們也近一

步地透過精油實驗得知，薰衣草精油氣味可抑制菌絲生長的密度與速率，並降低致病力，且會導致黑色素分泌量減少。進一步經氣味分析，也發現薰衣草精油中的芳樟醇具有顯著的抑菌效果。而黑色素含量高的 Lt 與 Np，表現出較強的致病力。綜合文獻探討與分析，我們可推論，薰衣草精油中可以抑制 Lt 與 Np 菌種黑色素的生成，其中的芳樟醇更能顯著抑制菌種的生長，兩方面同時作用下，導致其感染力下降。

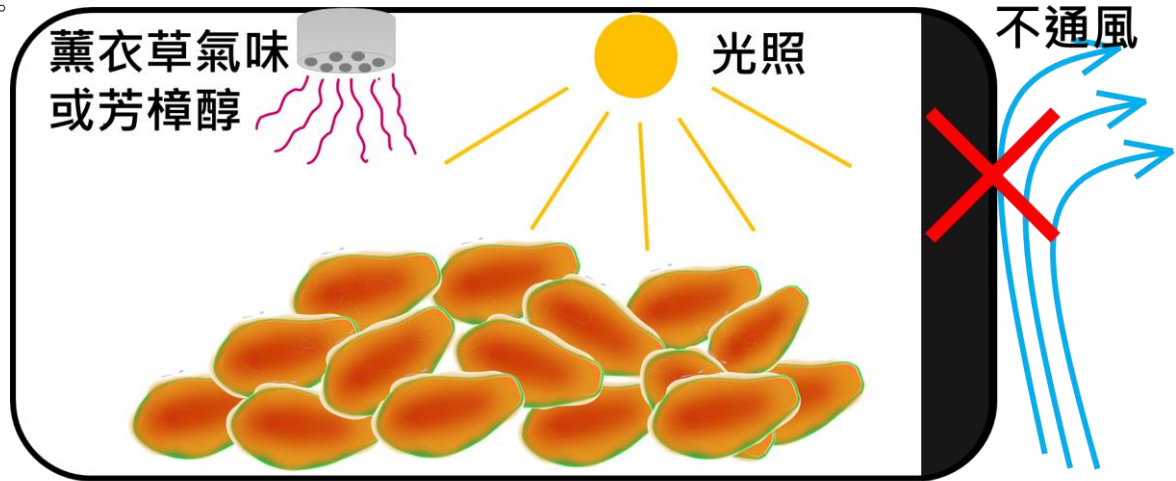
最後，我們進一步分析芳樟醇與薰衣草精油實際應用的效果。首先，我們所使用的培養皿的體積約為 382 立方公分，而芳樟醇與薰衣草精油濃度分別達 6.5~13 (微升/公升氣體) 便能看見顯著的效果。而一般封裝水果用的紙箱容積約為 25 公升，每箱僅需 0.425 毫升的抑制劑，比對各商家價格後，發先薰衣草精油的價格約落在每毫升 60~5.0 之間不等，而芳樟醇價格越落在每毫升 0.05~0.07 之間。薰蒸一箱的木瓜，若使用薰衣草精油，每箱必須花費 26~1.3 元，使用芳樟醇則需 0.02~0.03 元，可見使用芳樟醇有極高的經濟效益。



柒、未來展望

根據我們的實驗，光照、空氣流通等環境因子會增加 Lt 與 Np 菌種黑色素含量，藉以提升其致病力，而薰衣草精油可以抑制菌種的生長並降低其致病力，其中占比最大的成分——芳樟醇更能有效抑制菌種生長。利用以上的結果，可以應用在木瓜採收後的儲

存或運送環境。未來能推廣在木瓜存放空間外加光源並降低通風的程度，將有助於減少木瓜被感染的風險。此外在環境中添加微量的天然薰衣草精油或芳樟醇氣味，便能利用天然無毒之有機方式防止 Lt 與 Np 等病原菌在密閉空間大量散播、感染，藉此降低農損率。



(圖 14-1) 木瓜理想儲存裝置示意圖

捌、參考文獻資料

1. Rodríguez-Piña, A.L., et al. (2019). The UstiLtgo maydis null mutant strains of the RNA-binding protein UmRrm75 accumuLte hydrogen peroxide and meLtnin. *Sci Rep* 9, 10813.
2. Wang, C., et al. (2021). MolecuLtr characterization and overexpression of the difenoconazole resistance geNp CYP51 in Ltsiodiplodia theobromae field isoLttes. *Sci Rep* 11, 24299.
3. E. A. Rangel-Montoya, et al. (2020). The role of meLtnin in the grapeviNp trunk disease pathogen Ltsiodiplodia giLtNpnsis. *Phytopathologia editerraNpa* 59(3):549563.
4. Yang, SK. et al. (2020). Ltvender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membraNp permeability of carbapeNpmase producing KlebsielLt pNpmoniae. *Sci Rep* 10, 819.
5. Zheng, J. et al. (2019). Fumigation and contact activities of 18 pLtn essential oils on VillosicLtva virens, the pathogenic fungus of rice false smut. *Sci Rep* 9, 7330.
6. Nili, O., Azizi, A. & AbdolLthzadeh, J. (2021). Development of an efficient *Tef-1 α* RNA hairpin structure to efficient management of Ltsiodiplodia theobromae and Npofusicocum parvum.
7. Medina-Romero, Y.M. et al. (2021). Essential oils of *Bursera morelensis* and *Lippia graveolens*

for the development of a Npw biopesticides in postharvest control. *Sci Rep* 11, 20135.

8. Gehan I. Kh. Marei, et al. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpeNps on pLtn pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,

Volume 103, Issue 1.

9. Tian F., et al. (2018). p-CymeNp and its derivatives exhibit antiafLttoxic activities against *Aspergillus fLtvus* through muLtple modes of action. *Appl Biol Chem* 61, 489–497.

10. Krzysztof Smigielski, et al. (2013). Chemical Composition of the Essential Oil of *LtvanduLt angustifolia* CuLttivated in PoLtn. *Journal of Essential Oil Bearing PLtns*, Volume 12, Pages 338-347.

11. Guozheng Qin, et al. (2011). Hydrogen Peroxide Acts on Sensitive Mitochondrial Proteins to Induce Death of a Fungal Pathogen Revealed by Proteomic Analysis. *PLoS ONp* 6(7): e21945.

12. Zhang, H., et al. (2014). Germination and infectivity of microconidia in the rice bLtt fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nat Commun* 5, 4518.

13. Wenjun Sun, et al. (2021). Light Signaling ReguLttes *Aspergillus niger* Biofilm Formation by Affecting MeLtnin and ExtracelluLtr Polysaccharide Biosynthesis. *ASM Journals, mBio*, Volume 12, No.1.

14. S.-M. Yu, G. Ramkumar, Y.H. Lee. (2013). Light quality influences the virulence and physiological responses of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in pepper pLtns. *Journals of Applied Microbiology*, Volume115, Issue2, Pages 509-516.

15. Hao Jie Wong, et al. (2018). Protective mechanisms and responses of micro-fungi towards uLtraviolet-induced celluLtr damage. *PoLtr Science*, Volume 20, Part 1.

16. Eric S. Jacobson. (2020).Pathogenic Roles for Fungal MeLtnins. *ASM Journals, Clinical, Microbiology Reviews*, Vol. 13, No. 4.

17. Kwangwon Lee , et al. (2006). Light reguLttion of asexual development in the rice bLtt fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Fungal GeNptics and Biology*, Volume 43, Issue 10, October 2006, Pages 694-706.

【評語】 052202

一、 研究主題：可吸引農業生技，尤其是植物病原菌工作者之興趣，具實用性。

二、 創意、學術或實用價值：團隊在腐爛的木瓜中分離純化出兩株會使木瓜軟腐之病原真菌: *Lasiodiplodia theobromae* 與 *Neofusicoccum parvum*。並發現薰衣草氣味可以抑制菌絲生長與黑色素生成。並提出相關抑制病原菌的措施，減少農損。

三、 科學方法之適切性:

1. 作者說明了研究目的、詳細列出實驗材料與器材，也提出了可能的機制，未來若能釐清黑色素生成量與致病性的關聯性、為何黑暗中反而黑色素量增加、強烈氣味與抑制生長或致病性的機制探討會更完整。
2. 材料與方法部分未說明清楚，例如，使用之精油係如何製備或取得？是否有添加酒精或其他有機溶劑，溶劑含量可能會影響結果，應作為對照組。
3. 菌種鑑定方法？亦即如何確認致病菌種名，需要說明。
4. *Lt* 生長速率較 *Np* 快速的結果意義不大，可能因為選用的培養基較適合 *Lt* 菌生長所致。此外，如何定義 “半養分” 培養基？

四、 展示及表達能力：

1. 文獻回顧與背景介紹應再加強。作者利用照片、圖表來整理結果並呈現，讓讀者可一目了然，討論也詳盡。
2. 本研究獲得不少數據，顯示用心研究。但報告中多張圖的呈現都偏小。幾張 slides 字體太小 (slides 2,3..), 多利用 slide 裡的空間。Slide 3 應為研究方法，非研究結果。slide 6 左下角兩組之樣品標示錯誤，不是校園植物
3. 薰衣草精油成分知分布(圓餅圖)，不是自己做的結果，要加入引用數據的文獻。
4. 建議結論可加入重要的文字敘述。

作品簡報

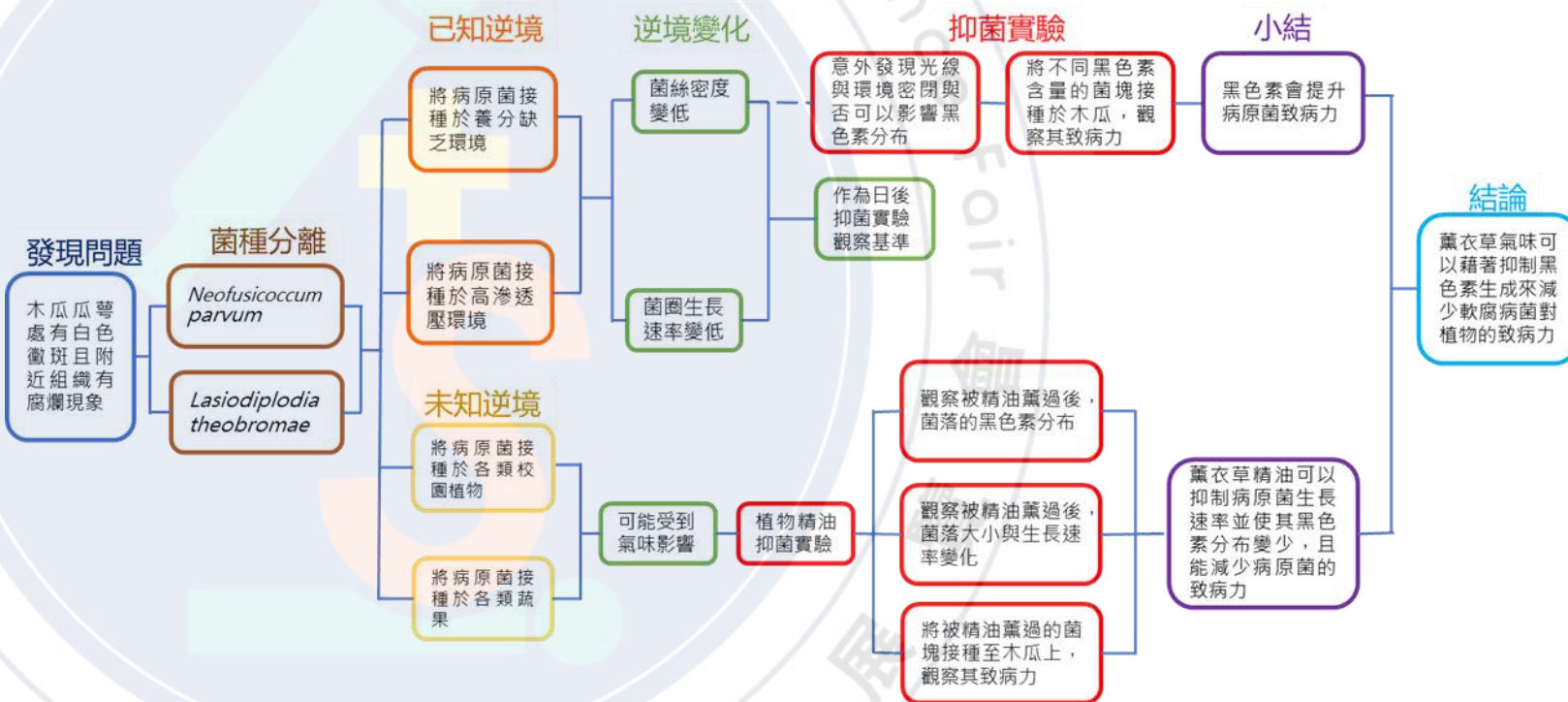
中華民國第62屆中小學科學展覽會

尋找木瓜病原菌的 天然抑制劑與抑菌機制

組別：高級中等學校組

科別：農業與食品學科

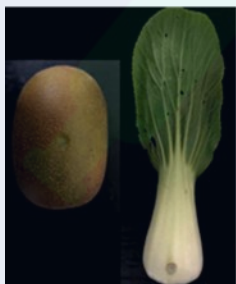
研究初始



研究結果

1. 培養皿配置

- (1) 一般培養基
將15.6g的PDA粉末與400ml的蒸餾水混合後，放入滅菌釜，以121°C加熱20分鐘，每個培養皿倒入20ml。
- (2) 鹽分培養基
所有步驟同上，另加入5g或10g的食鹽。
- (3) 半養分培養基
將7.8g的PDA粉末與400ml的水混合後，以121°C加熱20分鐘，每個培養皿倒入20ml。

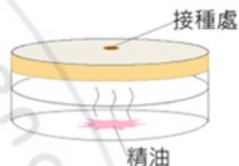


2. 光照與通氣實驗

做法與上述精油養皿相同，但下方培養皿不加入任何物質。光照組的直接將培養皿至於28°C恆溫箱的白色LED燈光下；黑暗組的則置於不透光容器中，並同樣放入28°C恆溫箱中。另外我們在培養皿側面以石蠟封條接合處用細針戳三個位置分布對稱的孔洞，作為通氣組。反之，正常情況下未開洞的即為不通氣組。利用光照與通氣兩變因觀察菌落黑色素分布。

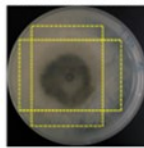
6. 精油抑菌實驗

在培養皿中滴入10 μ l的精油，作為氣味來源。另取裝有agar培養基的培養皿將菌塊接種於培養基上，並將此培養皿與前述的精油培養皿口對口接合，使精油在下而培養基在上，置於28°C恆溫箱，逐日拍照觀察，並記錄菌圈大小。



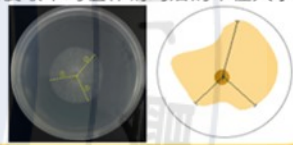
4. 黑色素量化

我們將菌落的照片至於相同光源下，拍照後取長7cm寬5.5cm的長方形區域的平均RGB值，橫的與直的各做一次後再取平均，作為黑色素分布量的量化標準。



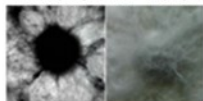
3. 菌落大小測定

由於菌落分布不一定成正圓形，我們以接種菌塊處為中心，測定從中心到菌落邊界的長度，在三個方向重複測定後取平均值作為均落的半徑大小。



8. 菌絲分布觀察

利用解剖顯微鏡，在相同的曝光程度、冷暖色調下，分別以上光源與下光源，以菌塊接種處為中心拍照。上光源觀察菌絲生長型態，下光源則觀察菌絲厚度。



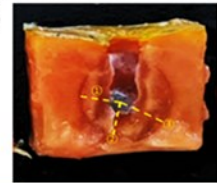
下光源 上光源

5. 植物接種

- (1) 校園植物
從活植株上剪下較新鮮的枝條，將菌塊放置於傷口處，使菌絲面與傷口處相接合。放於培養皿中，並放入濾紙，加入2ml的水保持濕潤，最後放置於28°C恆溫箱，逐日拍照觀察。
- (2) 蔬菜類
作法同上，但蔬菜類葉片較大無法放入培養皿，故直接置於恆溫箱中。
- (3) 水果類
先用disc環在水果表面打入深度為3mm的空洞，再將菌塊菌絲面朝內放入，放於28°C溫箱，逐日拍照觀察。

7. 致病力量化

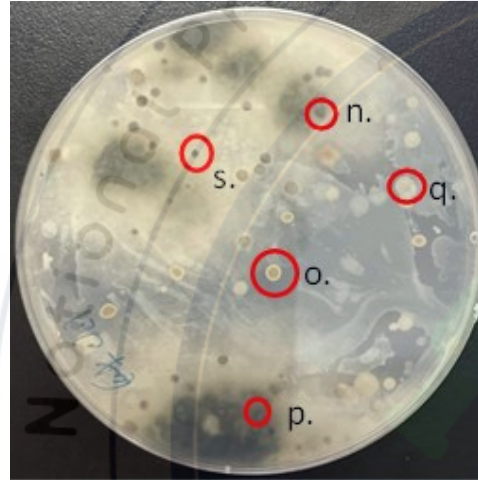
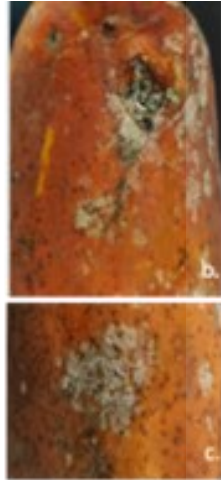
在木瓜上打入大小為3mm的空洞並放入經過不同處理的菌塊，隔一段時間後，將木瓜組織切開，藉著測量腐爛圈的半徑將致病力量化。(測量方法同菌圈半徑)



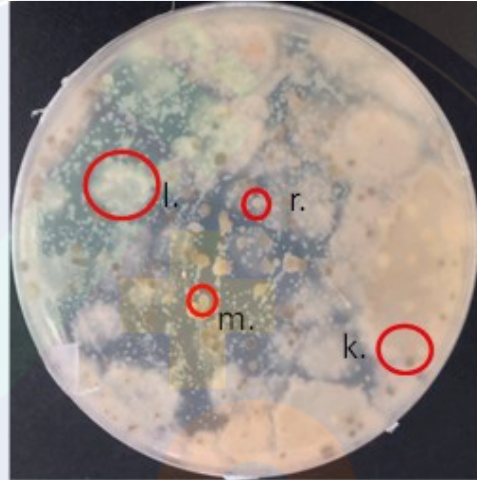
科霍氏實驗與菌種觀察



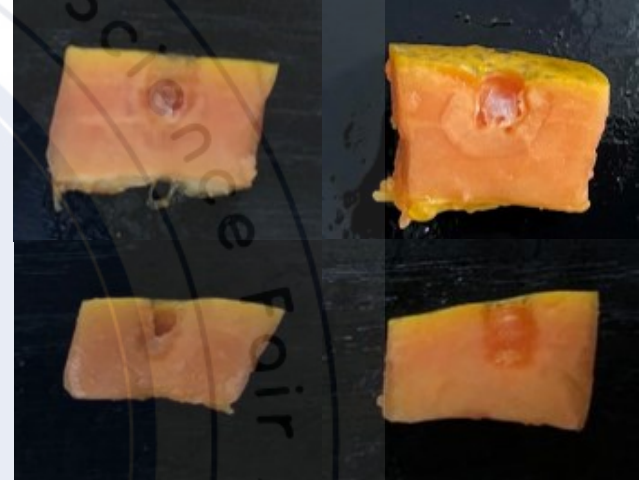
受感染的木瓜



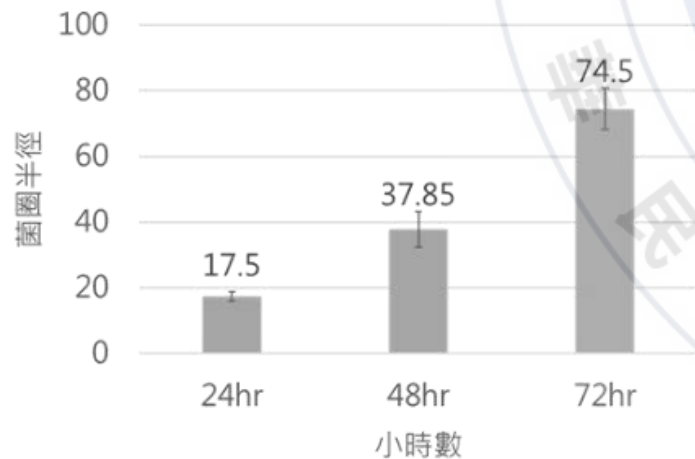
木瓜發霉處組織液塗盤情形之一



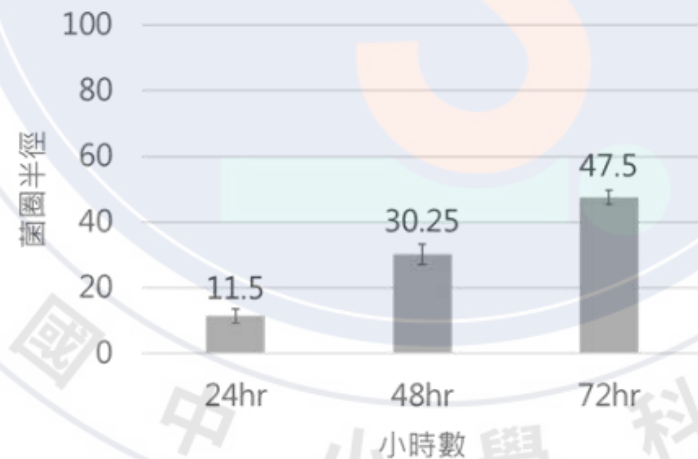
木瓜發霉處組織液塗盤情形之二



P、N、K 處菌絲與空洞組 (右下)



Lt每日半徑總長測量結果

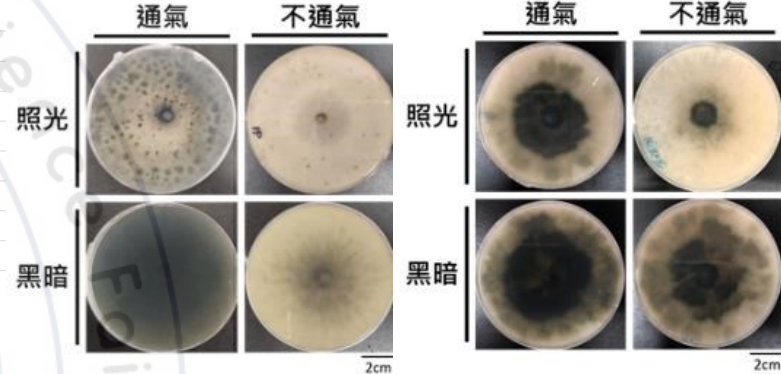
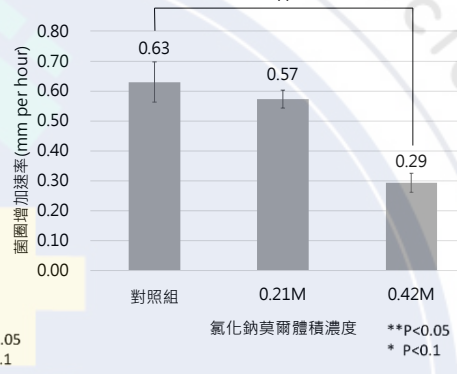
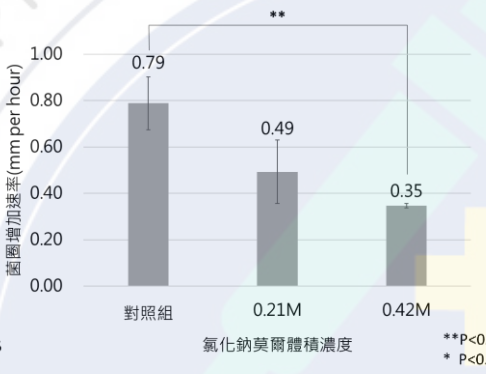
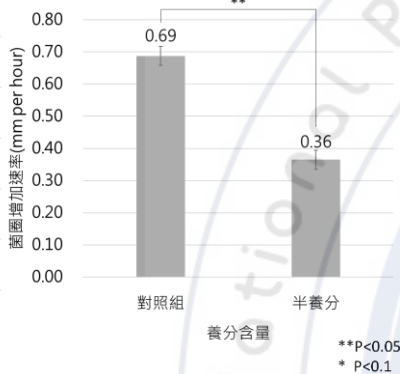
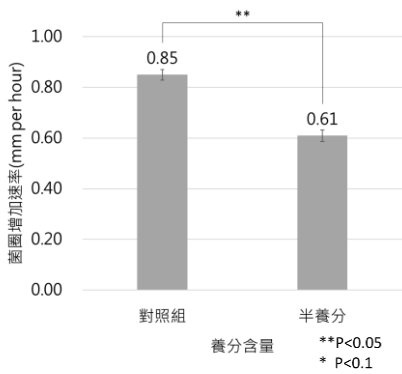


Np每日半徑總長測量結果

目的：找出與認識致病的菌種

結果：確認致病菌種 (p、n、k) 分別為 *Neofusicoccum parvum* 與 *Lasiodiplodia theobromae*；且於 72 小時，Lt 生長速率較 Np 快了近 50%

不同環境對菌種生長影響



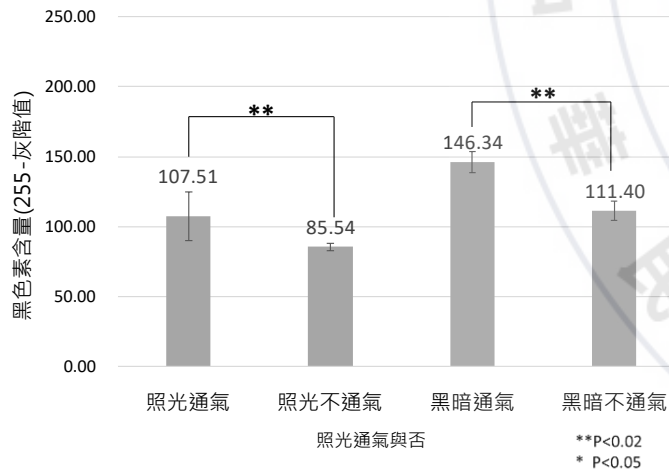
Lt 半養分與正常狀況生長速率比較

Np 半養分與正常狀況生長速率比較

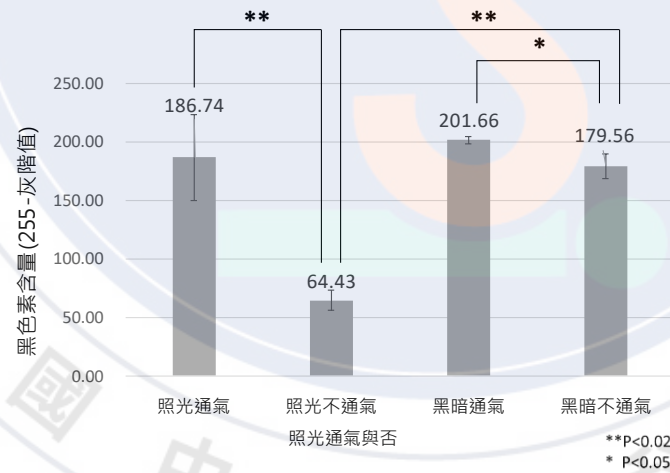
Lt 氯化鈉莫爾濃度對菌圈生長速率影響

Np 氯化鈉莫爾濃度對菌圈生長速率影響

照光通氣與否之黑色素生成比較(左Lt右Np)



Lt 照光通氣與否對菌種黑色素生成影響

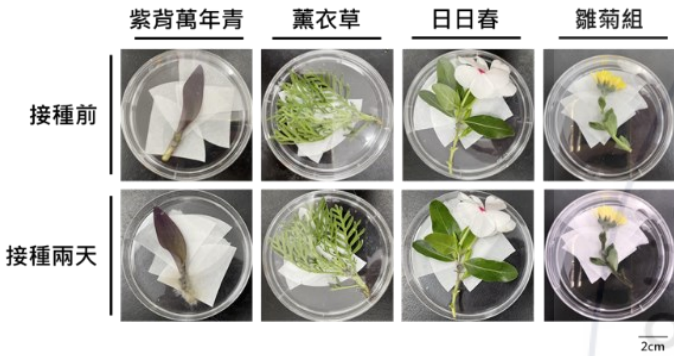


Np 照光通氣與否對菌種黑色素生成影響

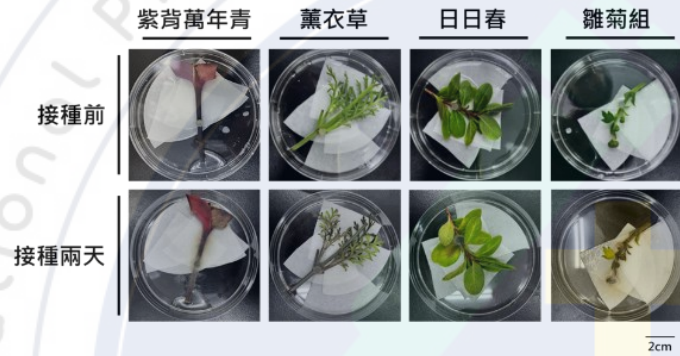
目的：一、探討不同環境對菌種生長速率影響；二、光照與通氣對真菌黑色素生成的影響

結果：兩菌種於半養分與較高滲透壓培養基上，生長速率皆下降；而缺乏光照與通氣環境皆會使該二菌種黑色素生成量增多

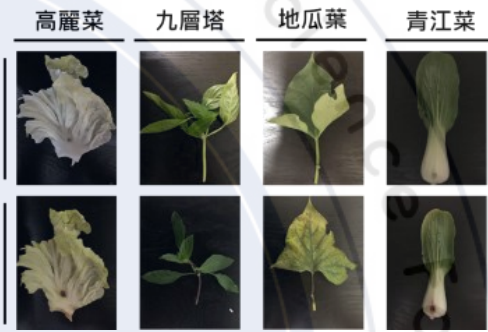
菌種對不同種植物的感染差異



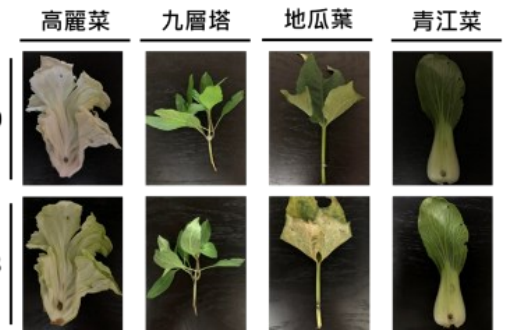
Lt 校園植物



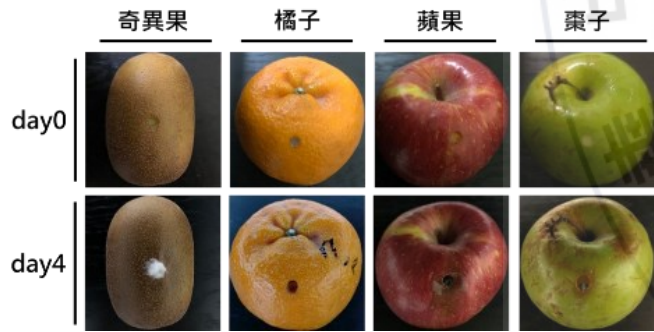
Np 校園植物



Lt 蔬菜類植物



Np 蔬菜類植物



Lt 校園植物

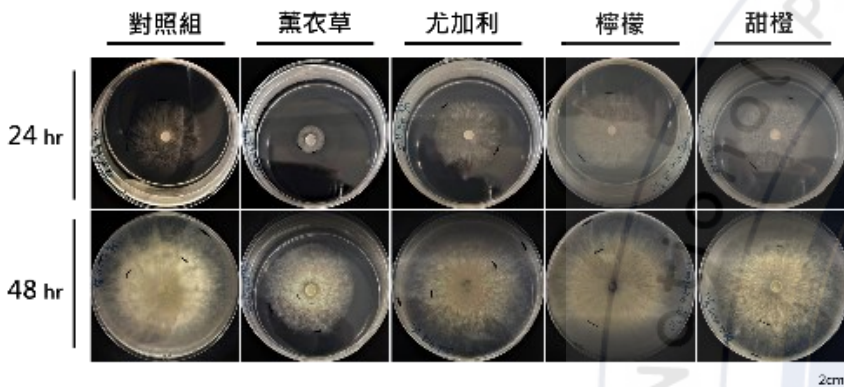


Np 校園植物

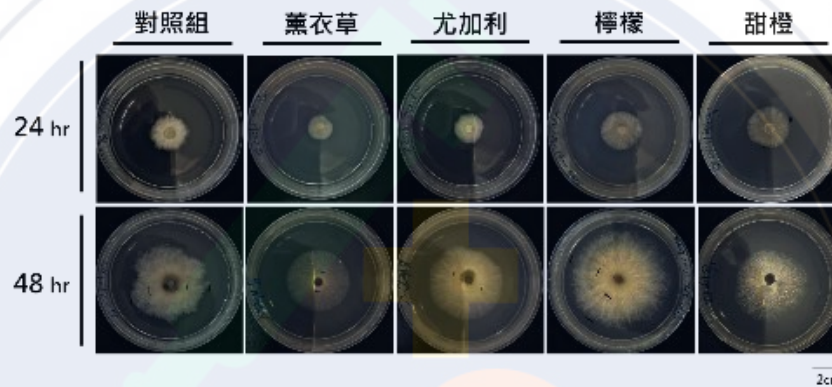
目的：一、觀察 Lt 與 Np 菌是否只感染特定植物；二、觀察接種在各類植物中後的感染情形差異

結果：橘子、薰衣草、九層塔、日日春等植物腐爛情形較不嚴重且具有較強烈的氣味，推測植物氣味可能影響該病原菌生長

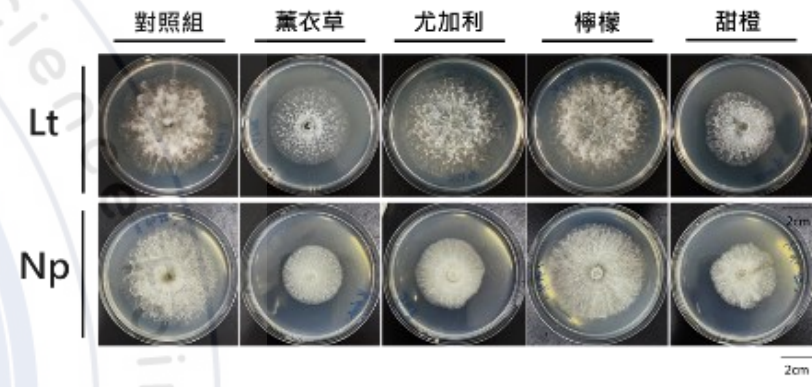
不同精油氣味對菌種的影響



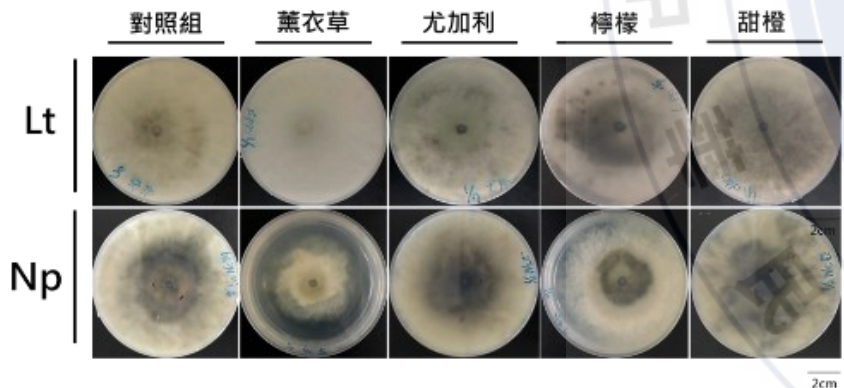
Lt 每日半徑總長測量



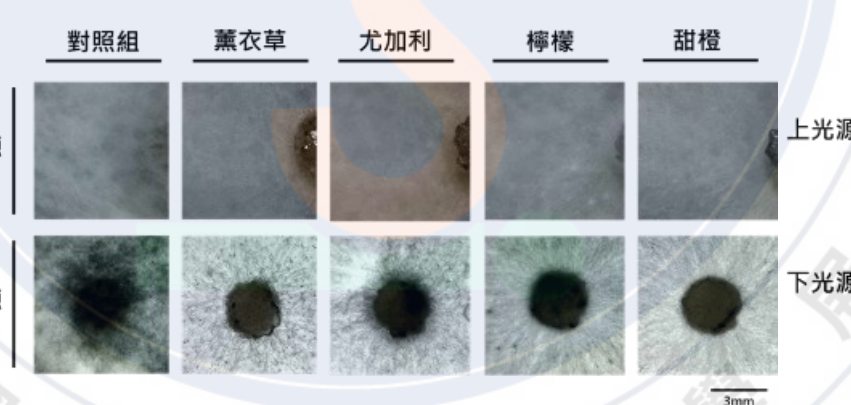
Np 每日半徑總長測量結果



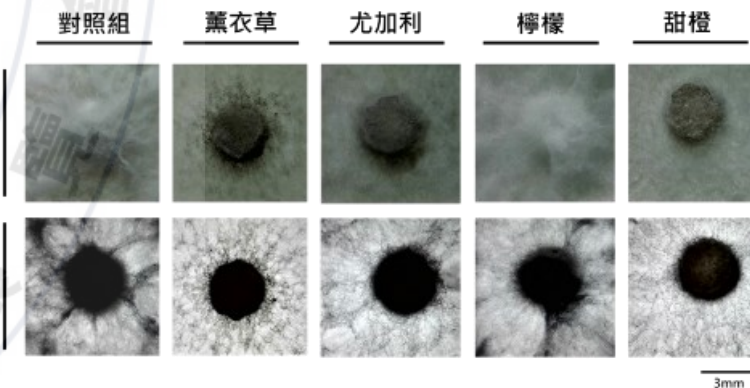
不同精油氣味環境下菌種生長正面照



不同精油氣味環境下菌種黑色素生成情形

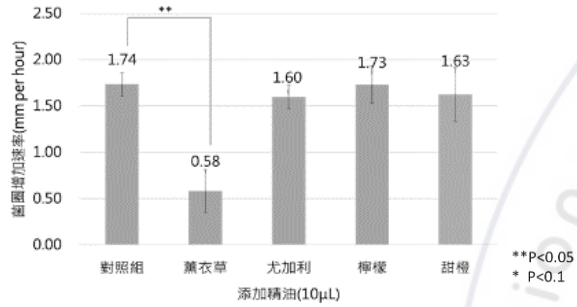


不同精油氣味環境下Lt菌絲分布

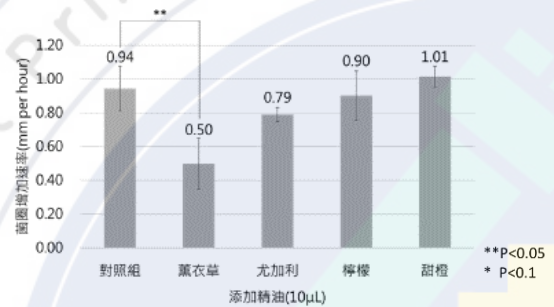


不同精油氣味環境下Np菌絲分布

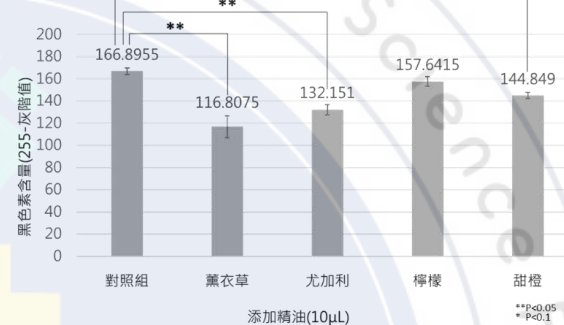
不同精油氣味對菌種的影響



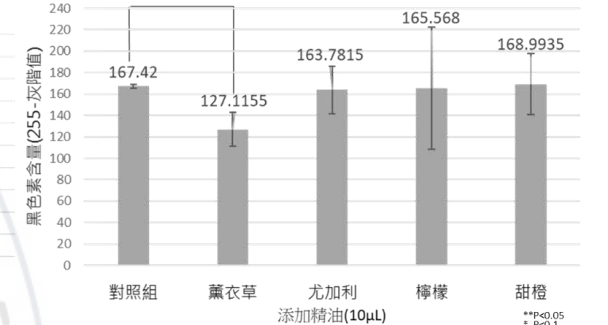
不同精油氣味環境下Lt生長速率



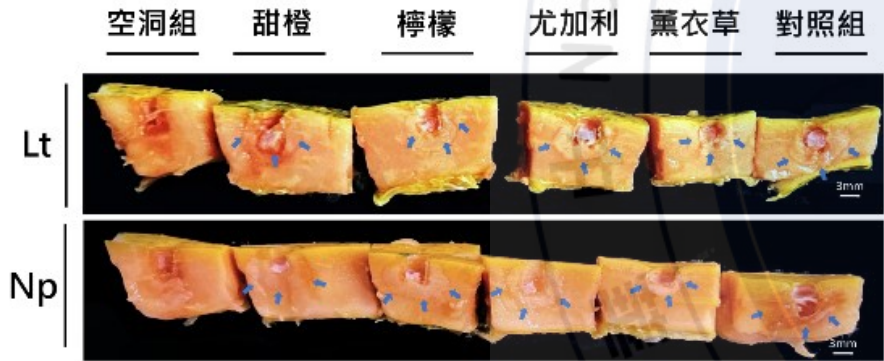
不同精油氣味環境下Np生長速率



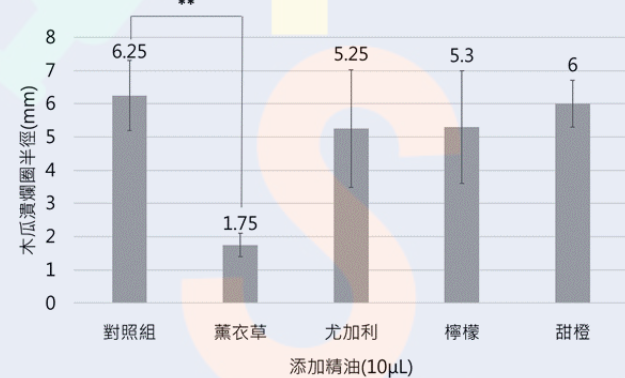
在不同精油氣味環境下Lt菌盤黑色素含量



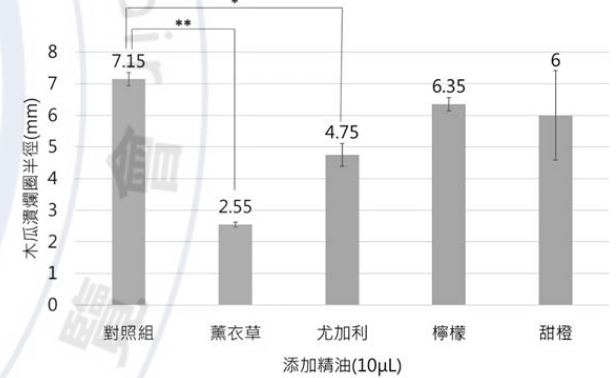
在不同精油氣味環境下Np菌盤黑色素含量



精油氣味對接種菌種潰爛圈影響照片



精油氣味對Lt潰爛圈半徑影響

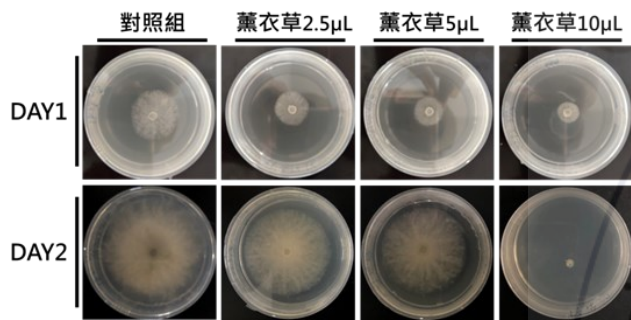


精油氣味對Np潰爛圈半徑影響

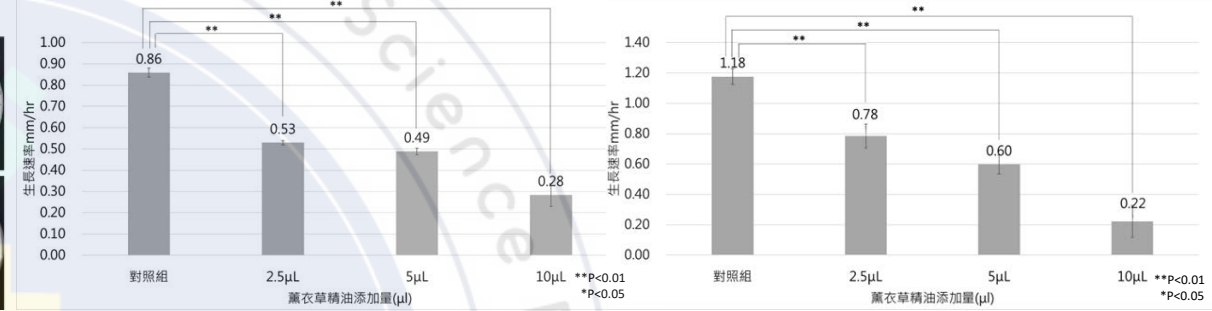
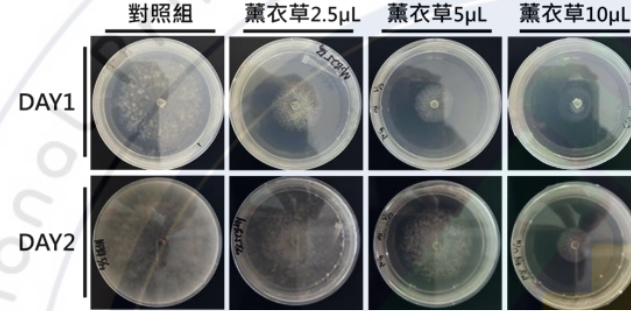
目的：探討精油氣味對菌種生長情形、黑色素生成以及對菌種感染力有何影響

結果：一、精油（尤其薰衣草）會使該二菌種菌絲密度變低、生長速率變慢與黑色素生成量變低；二、僅薰衣草氣味可以使兩菌種的感染力出現明顯下降，確認薰衣草的抑菌能力（其他精油皆未出現廣效性）

不同濃度薰衣草精油對菌種之影響

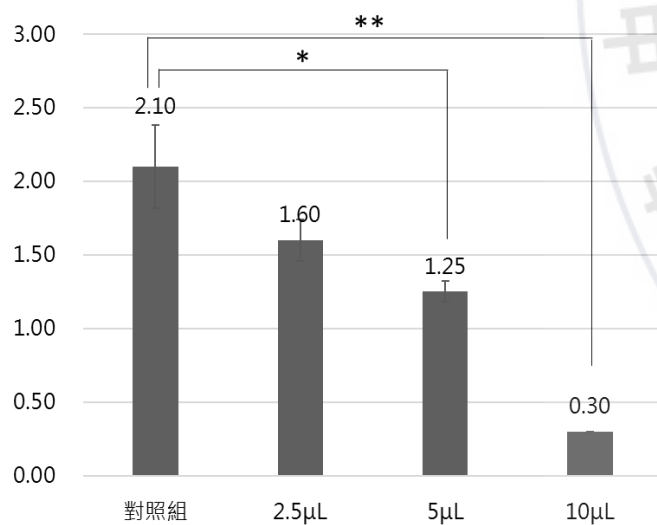


不同薰衣草精油添加量之氣味對菌種生長速率影響照片 (左為Lt、右為Np)

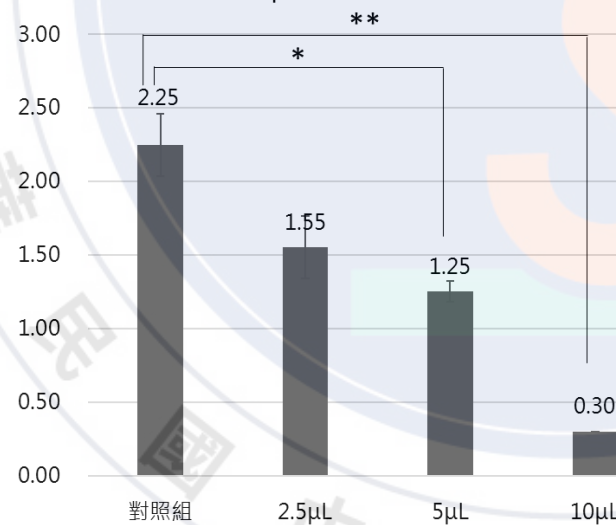


不同薰衣草精油添加量之氣味對菌種生長速率影響 (左為Lt、右為Np)

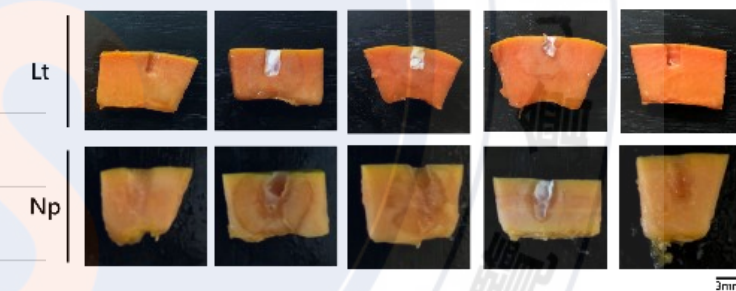
不同濃度薰衣草精油對Lt菌種感染之影響



不同濃度薰衣草精油對Np菌種感染之影響



不同薰衣草精油添加量之氣味對菌種生長速率影響 (左為Lt、右為Np)

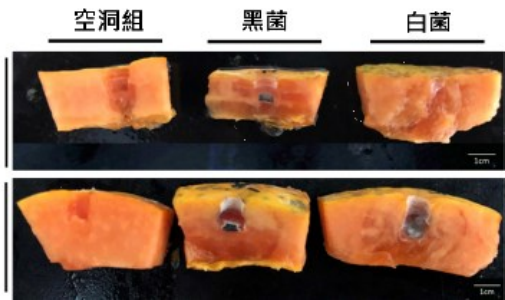


← 薰衣草精油濃度影響菌種致病力照片

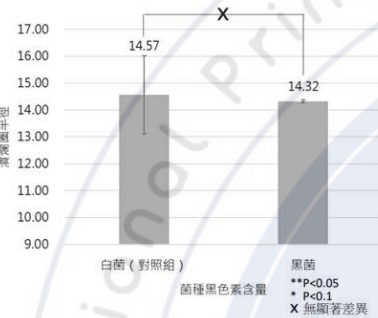
目的：觀察不同濃度薰衣草精油薰蒸下的菌種生長速率與感染木瓜程度差異

結果：濃度越高，菌圈半徑越低，且菌絲濃度越低，且感染力下降；薰衣草精油體積為10微升時，幾乎無法感染木瓜

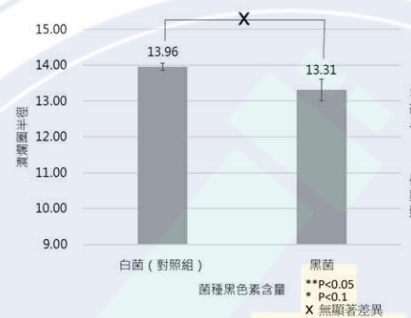
黑色素對真菌感染力的影響



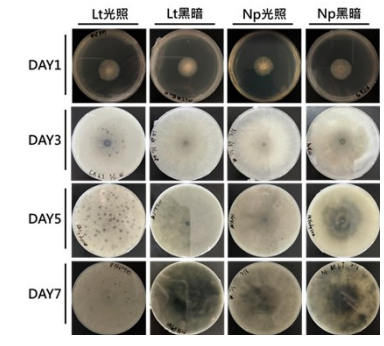
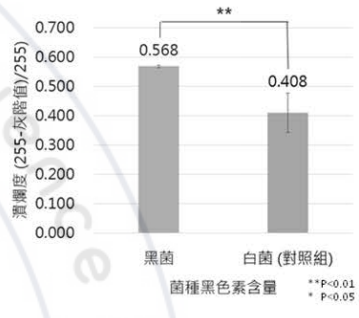
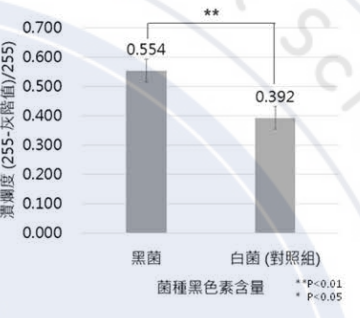
黑色素對接種菌種潰爛圈影響照片



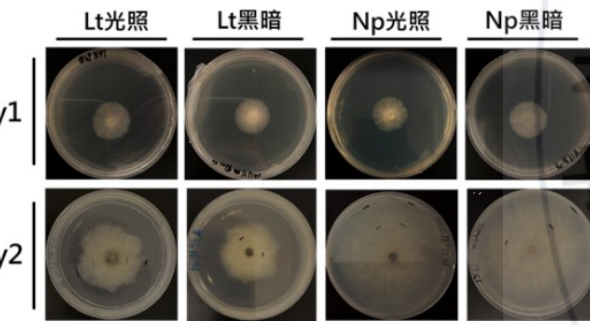
黑色素含量對木瓜潰爛圈半徑差異(左Lt、右Np)



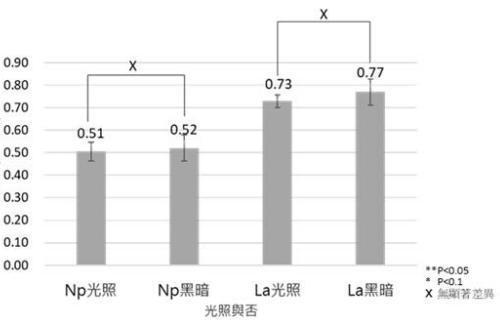
黑色素含量對木瓜潰爛度差異(左Lt、右Np)



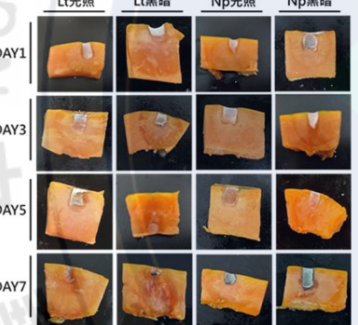
不同天數下光照對菌種黑色素影響照片



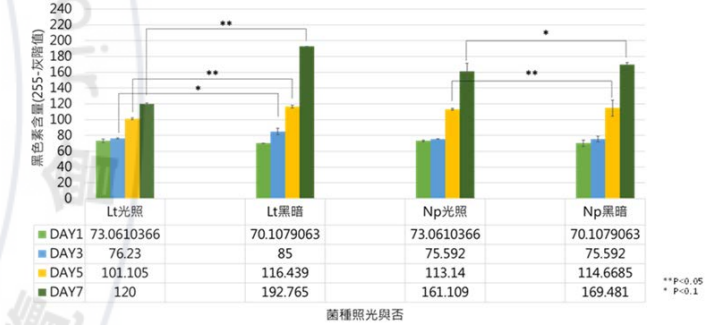
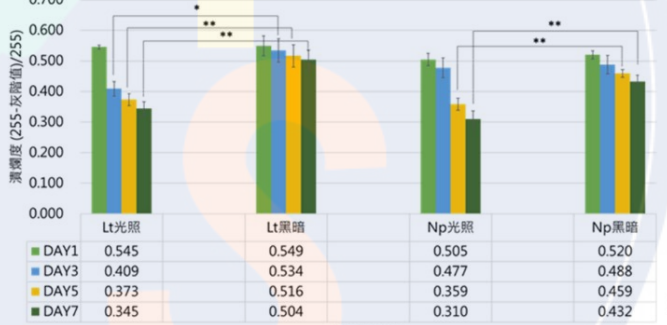
光照對菌種生長影響照片



光照對菌種生長速率影響



不同天數下光照對菌種致病力影響照片與圖表

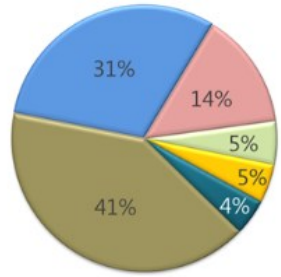


不同天數下光照對菌種黑色素影響圖表

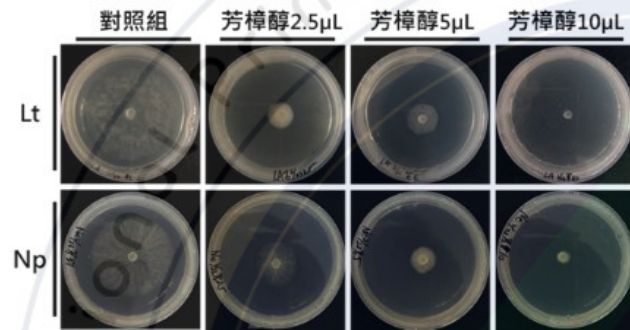
目的：一、了解黑色素本身是否對真菌感染力造成影響；二、觀察光照與黑暗環境是否使菌種生長速率下降；三、瞭解隨天數增加，黑色素出現差異時，致病力是否亦出現差異；四、確認黑色素是否為影響菌種致病力的關鍵因素

結果：一、發現黑菌感染區域腐爛程度較嚴重；二、發現光照不會影響兩菌種的生長速率；三、隨著天數增加，光照組與黑暗組黑色素差異越來越大，致病力的差異也越來越大；四、隨著生長天數增加，黑色素含量高的黑暗組表現出較高的致病力

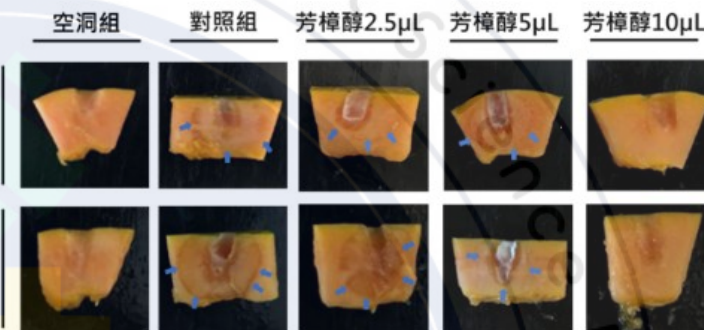
芳樟醇氣味對菌種的影響



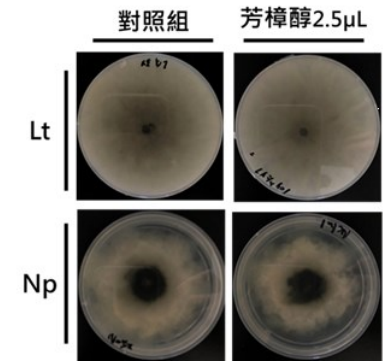
薰衣草精油成分圓餅圖



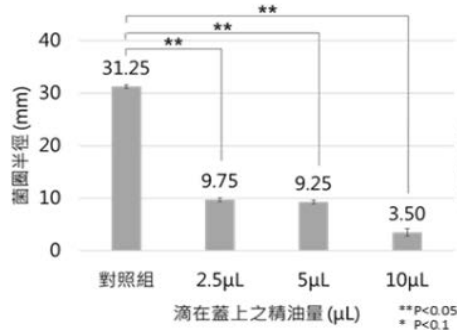
芳樟醇氣味對菌種生長影響照片



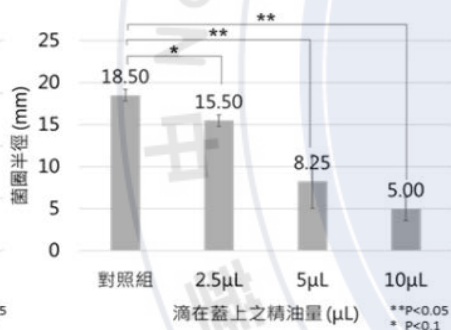
芳樟醇氣味對菌種感染力影響照片



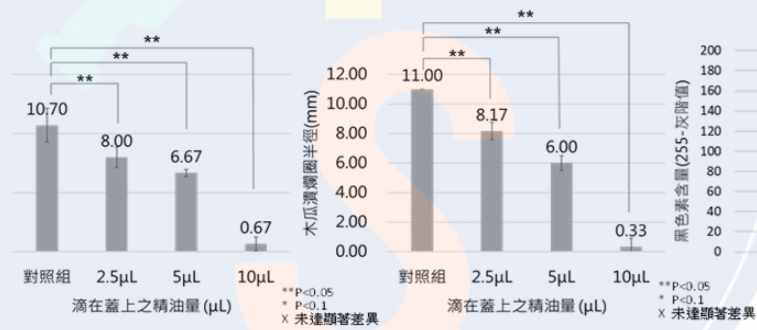
芳樟醇氣味對菌種黑色素影響



芳樟醇氣味對菌種生長速率影響 (左Lt、右Np)



不同芳樟醇氣味濃度對菌種感染力影響(左Lt、右Np)



不同芳樟醇氣味濃度對菌種黑色素生成影響(左Lt、右Np)

目的：了解芳樟醇對菌種生長速率、黑色素與致病力的影響

結果：得知芳樟醇氣味薰蒸後的菌種致病力與生長速率皆明顯下降，氣味濃度越高，抑制效果越強，但無法降低菌的黑色素含量

結論

