

柑桔綠黴病特性分析及非農藥資材防治綠黴病效果評估¹

羅佩昕、王照仁、賴奕佐、陳盟松²

摘 要

由 *Penicillium digitatum*(Pers.)Sacc.引起的綠黴病為柑桔採後與貯藏期間之重要貯藏性病害(postharvest disease)，目前防治方式多以化學農藥於採前或採後進行處理，然隨著農藥殘留問題與農產品安全之需求，近年來積極尋求非農藥防治方式。本研究為了解柑桔綠黴病菌生長之條件，進行綠黴病菌特性分析，於24℃菌絲生長速度最快，32℃下則無法生長，將其培養於 pH4-pH6，菌絲生長速度較快，其生長特性可供作柑桔綠黴病防治策略之擬定。而在培養基上非農藥防治資材之篩選試驗，以 0.5%幾丁聚醣、0.5%碳酸鈉、0.5%碳酸氫鈉及1,000 倍稀釋之己二烯酸鉀，可達到100%菌絲生長抑制率，另篩得之6 株酵母菌/類酵母菌，亦可於培養基上達到 100%菌絲生長抑制率。以非農藥防治資材處理柑桔果實對綠黴病防治效果試驗中，以 0.1%幾丁聚醣防治效果較佳，僅 47.62%之罹病率；而類酵母菌於果實上對柑桔綠黴病之防治效果，則以菌株Y466與TCY70之防治效果較佳，僅 57.14%。為提升非農藥防治資材對柑桔綠黴病之防治效果，未來期以多種拮抗菌、拮抗菌結合不同資材及拮抗菌結合不同採後處理技術，增進防治效力。

關鍵詞：柑桔綠黴病、非農藥防治資材、幾丁聚醣、酵母菌/類酵母菌

前 言

柑桔類作物為臺灣地區重要農產品，根據2019年農業統計年報，種植面積25,610 ha，產量為523,146 ton，以椪柑與柳橙為最大宗，其中又以椪柑之種植面積最廣，達到5,349 ha，產量121,777 ton，出口量為4,324 ton⁽¹⁾。椪柑於採後可立即上市或長期貯藏，在貯、運、銷期間一部分果實會發生腐爛之情形，其中*Penicillium digitatum*，引起之柑桔綠黴病是最常見的貯藏病害，受感染的果實初期表皮出現水浸狀斑點，斑點會急速擴大，後期果皮軟化並佈滿綠色孢子，病原菌可存在於田間、集貨場、貯藏庫、零售市場，經由傷口感染果實，多發生於採收後的成熟果實⁽³⁰⁾。目前綠黴病仍以化學農藥防治為最主要的方式，依據植物保護資訊系統推薦以克熱淨(Iminoctadine triacetate) 與腐絕(Thiabendazole) 於柑桔採收前或採收後進行防治⁽²⁾。全球長期於採收後以單一化學藥劑進行

¹行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0986 號。

²行政院農業委員會臺中區農業改良場研究助理、助理研究員、副研究員。

綠黴病菌的防治，腐絕是普遍被使用於果品採後處理對 *Penicillium* spp. 進行防治的殺菌劑。然已有許多研究指出，*P. expansum* 與 *P. digitatum* 在 β 微管蛋白(β -tubulin)基因上的突變，病原菌已對腐絕產生抗藥性^(6,35)，導致腐絕防治效果不佳。Lee 等人(2011)指出，造成臺灣柑桔綠黴病之病原菌 *P. digitatum* 在長期重複使用單一殺菌劑的情況下，已出現對腐絕具有抗藥性的菌株⁽¹⁵⁾。而農產品的農藥殘留更是主要非關稅貿易障礙之一，外銷農產品不僅須遵守本國用藥規定外，亦須同時符合輸入國的標準，各輸入國對農藥殘留容許量標準不一，如有違反農藥殘留標準則須銷毀或退運，嚴重影響國家之農產品安全品質形象⁽³⁾，另在安全農產品政策與消費者意識抬頭下，近年來農民積極尋求非農藥防治方式。

為減少化學農藥在採後處理對環境與食品安全的影響，以食品添加物、國際公認安全(generally recognized as safe, GRAS)物質、精油、植物萃取物及幾丁聚醣，許多研究運用此類物質對柑桔進行採後處理，以防治綠黴病。碳酸鈉(sodium carbonate)與碳酸氫鈉(sodium bicarbonate)為食品添加物，目前於國外被應用於柑桔包裝場的消毒，具有成本低且可應用於有機農業之優點。Palou 等人(2002)指出柑桔以2-3%碳酸鈉或碳酸氫鈉水溶液浸泡 60-150 sec，具有拮抗 *Penicillium* spp. 的效果，且以處理40-45°C 的碳酸鈉或碳酸氫鈉水浴效果最為顯著⁽²⁶⁾。山梨酸(sorbic acid)、丙酸鈉(sodium propionate)、己二烯酸鉀(potassium sorbate)及苯甲酸鈉(sodium benzoate)是具有抗菌效果的防腐劑，對 *Penicillium* spp. 具有拮抗效果^(22,27)。另 Palou 等人(2011)測試自植物與動物所萃取之精油與揮發性化合物，雖有多種精油與化合物於培養基上對 *P. digitatum* 或 *P. italicum* 具有抗菌效果，但僅有少數於生體上對 *P. digitatum* 或 *P. italicum* 具有抗菌活性⁽²⁹⁾。Plaza 等人(2004)測試百里香與肉桂精油於生體上測試具有防治綠黴病菌與青黴病菌的效果，然精油與蠟結合使用或以薰蒸方式，常不具有防治效果或造成果實表皮傷害⁽³⁰⁾；另亦有研究指出，此類天然化合物防治效果不顯著或具植物毒性^(4, 38)。可食性覆膜(edible coating)是柑桔產業常用來減少失重和改善外觀所使用的材料，抗菌的覆膜材料，如：加物、天然化合物或拮抗微生物⁽³⁹⁾。研究指出幾丁聚醣(chitosan)或其他幾丁質(chitin)衍生物，可顯著減少採後 *Penicillium* spp. 所造成的腐爛，並延緩不同柑桔品種在長期冷藏貯藏的果實老化^(7,8)；此外，幾丁聚醣具有抗菌活性並可誘發植物的防禦反應，可抑制多種細菌和真菌的生長⁽³⁶⁾；近期研究更以幾丁聚醣作為精油或殺菌劑的載體，以提升對柑桔綠黴病或青黴病的防治效果^(7,11)。另一方面則是以拮抗菌，如 *Candida* spp. 和 *Pseudomonas* spp.，與幾丁聚醣或 chitin 衍生物覆膜一同施用，進行柑桔綠黴病的防治，El-Ghaouth 等人指出，幾丁聚醣的衍生物glycochitosan 既不會影響 *C. saitoana* 的生長，且兩者共同施用比分別單獨施用，對於防治蘋果的腐爛效果更佳^(10,20)。

在安全農產品與農產品外銷逐漸重視下，為尋求替代化學農藥於柑桔綠黴病之採後處理資材，本研究透過柑桔綠黴病菌之特性分析，了解溫度與 pH 值對其生長之影響，以作為後續篩選非農藥防治資材與擬定防治策略之依據，另測試非農藥防治資材與酵母菌/類酵母菌於柑桔綠黴病菌防治效果，以利未來可取代化學農藥，並納入柑桔採後處理之一環。

材料與方法

一、供試菌株

供試之綠黴病菌菌株分別自柳丁所分離之菌株Pel01、桶柑所分離之菌株Pet01及椪柑所分離之菌株Pao2-3，菌株皆以單孢培養並保存於馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar, PDA)斜面培養基，供後續試驗使用。

二、綠黴病菌對不同溫度下之生長測試

將供試菌株 Pel01、Pet01 及 Pao2-3 培養於 PDA 平板培養基，並於 24°C 定溫生長箱內不照光培養 7 天後，以直徑 5 mm 之打孔器於菌落邊緣切下菌絲圓盤，置於 PDA 平板培養基之中央，並培養於 24°C 定溫生長箱，不照光培養 2 天，將其菌落邊緣畫線以作為基準線後，分別放置於 4、8、12、16、20、24、28 及 32°C 之定溫生長箱不照光培養，每隔 4 天以微量尺量測並記錄其菌落大小，每溫度處理 4 重複，每重複各量取 3 個不同方向的菌絲生長數據。

三、綠黴病菌於不同 pH 條件之生長測試

將供試菌株 Pel01、Pet01 及 Pao2-3 培養於 PDA 平板培養基，並於 24°C 定溫生長箱內，不照光培養 7 天後，以直徑 5 mm 之打孔器於菌落邊緣切下菌絲圓盤，放置於 pH4、pH5、pH6、pH7、pH8、pH9 及 pH10 之 PDA 平板培養基之中央，於 24°C 定溫生長箱內，不照光培養 2 天，將其菌落邊緣畫線作為基準線，並放置於 24°C 之定溫生長箱不照光培養，每隔 3 天以微量尺量測並記錄其菌落大小，每處理 4 重複，每重複各量取 3 個不同方向的菌絲生長數據。

四、不同非農藥防治資材對柑桔綠黴病菌絲生長抑制測試

- (一) 測試碳酸氫鈉(SBC)、碳酸氫鉀(PHC)、碳酸鈉(SC)、幾丁聚醣對柑桔綠黴病菌之菌絲生長抑制效果，將供試菌株 Pao2-3 培養於 PDA 平板培養基，並於 24°C 定溫生長箱內，不照光培養 7 天後，以直徑 5 mm 之打孔器於菌落邊緣切下菌絲圓盤，分別放置於含有 0.1% 與 0.5% 上述資材之 PDA 平板培養基上，並培養於 24°C 定溫生長箱內，不照光培養 7 天後，以微量尺量測並記錄其菌落大小，計算其菌絲生長抑制率。以 PDA 平板培養作為對照組，每處理 4 重複。
- (二) 測試食品防腐劑己二烯酸鉀(PS)與苯甲酸鈉(SB)對柑桔綠黴病菌之生長抑制測試，將供試菌株 Pao2-3 培養於 PDA 平板培養基，並於 24°C 定溫生長箱內，不照光培養 7 天後，以直徑 5 mm 之打孔器於菌落邊緣切下菌絲圓盤，分別放置於含 1,000 倍與 2,000 倍稀釋上述食品防腐劑之 PDA 平板培養基上，並以植物保護資訊系統推薦於柑桔貯藏性病害之 25% 克熱淨溶液(Iminoctadine triacetate, IMT, 億豐農化廠股份有限公司)與 41.8% 腐絕水懸劑(Thiabendazole, TBZ, 世大農藥)為參考藥劑，培養於 24°C 定溫生長箱內，不照光培養 7 天後，以微量尺量測並記錄其菌落大小，計算其菌絲生長抑制率(mycelial growth inhibition

rate)°以PDA平板培養作為對照組,每處理4重複。菌絲生長抑制率(mycelial growth inhibition rate,%) = (對照組-處理組)/對照組 x100

五、酵母菌/類酵母菌對柑桔綠黴病生長抑制測試

測試自田間篩選之酵母菌或類酵母菌 Y368、Y466、Y508、Y511、Y553、Y588、Y589、Y622 及 TCY70 菌株,對抑制柑桔綠黴病菌之菌絲生長抑制效果。將酵母菌/類酵母菌培養於 24°C 定溫生長箱內,不照光培養 5 天後,以經高溫高壓滅菌之無菌水配製酵母菌/類酵母菌懸浮液,並添加於經高溫高壓滅菌且降溫之PDA,配製為含有 2×10^7 CFU/mL 酵母菌/類酵母菌之平板培養基。將供試菌株 Pao2-3 培養於 PDA 平板培養基,並於 24°C 定溫生長箱內,不照光培養 7 天後,以直徑 5 mm 之打孔器於菌落邊緣切下菌絲圓盤,分別放置於含酵母菌/類酵母菌之平板培養基中央,於 24°C 定溫生長箱內,不照光培養 3 天與 7 天後,以微量尺量測並記錄其菌落大小,計算其菌絲生長抑制率,病原菌菌絲生長抑制率之計算方式同上。以 PDA 平板培養作為對照組,每處理 4 重複。

六、不同非農藥防治資材於極柑上對綠黴病防治效果

將市售極柑果實表面以沾取 75%酒精之棉花進行消毒,風乾後將果實表面赤道處,以 5 mL 塑膠針筒之針頭製造一個深 3 mm 之傷口,分別浸泡 0.5% SBC、0.1%幾丁聚醣及 1,000 倍稀釋之 PS,果實傷口處浸泡不同處理 5-10 sec,並依照植物保護資訊系統推薦於柑桔貯藏性病害防治之 IMT 與 TBZ 為參考藥劑,依系統推薦使用之標準稀釋倍數分別為 2,000 倍稀釋與 500 倍稀釋。風乾後,於果實傷口上接種 $5 \mu\text{l } 2 \times 10^5$ spores/mL Pao2-3 菌株之孢子懸浮液,將果實放置於 20L 之保鮮盒內,放置於室溫 7 天後,觀察其發病情形。每處理 3 重複,每重複 7 顆。由於 0.5%幾丁聚醣於施用上過於濃稠,因此本試驗中以 0.1%幾丁聚醣進行。

七、酵母菌/類酵母菌對柑桔綠黴病防治效果

將極柑果實表面以沾取 75%酒精之棉花進行消毒,風乾後將果實表面赤道處,以針頭製造深 3 mm 之傷口,分別浸泡 Y466、Y508、Y553、Y588、Y622 菌株之 2×10^8 spores/mL 之懸浮液,風乾後,於果實傷口上接種 $5 \mu\text{l } 2 \times 10^5$ spores/mL Pao2-3 菌株之孢子懸浮液,將果實放置於 20L 之保鮮盒內,放置於室溫(20-25°C) 7 天後,觀察其發病情形。每處理 3 重複,每重複 7 顆。

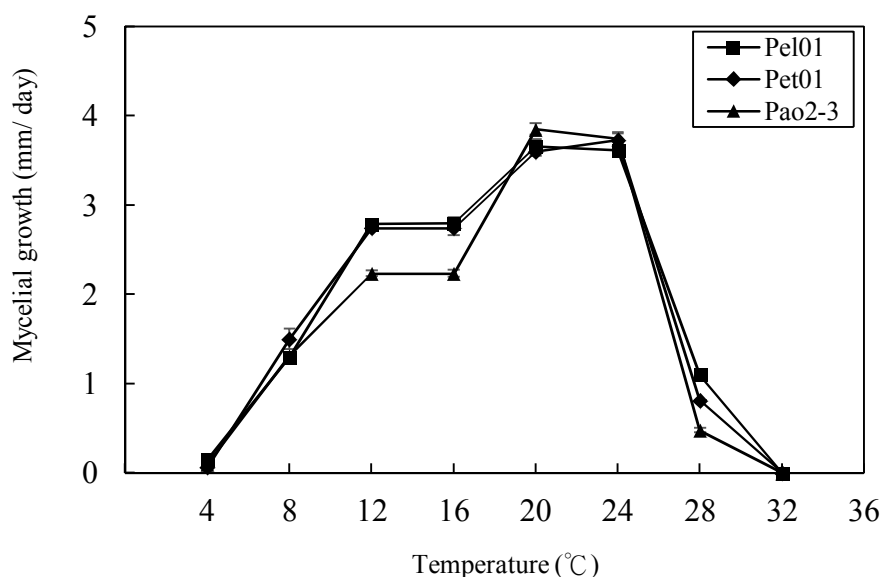
八、統計分析

本研究所得之實驗數據以 PASW Statistics 統計軟體進行分析,以 LSD(Fisher Least Significant Difference)分析比較各處理間之顯著差異($P < 0.05$)。

結 果

一、綠黴病菌生長溫度測試

於溫度試驗結果顯示，不同來源之供試菌株 Pel01、Pet01 及 Pao2-3，於 4-28°C 皆可生長，Pel01 與 Pao2-3 菌株於 20°C 生長速度最快，分別為 3.66 mm/day 與 3.85 mm/day，於 24°C 之生長速度次之，分別為 3.62 mm/day 與 3.74 mm/day；Pet01 菌株於 24°C 生長速度最快，為 3.73 mm/day，而於 20°C 生長速度次之，為 3.60 mm/day。供試菌株於 4°C 生長速度介於 0.06-0.15 mm/day，於 32°C 不生長(圖一)。

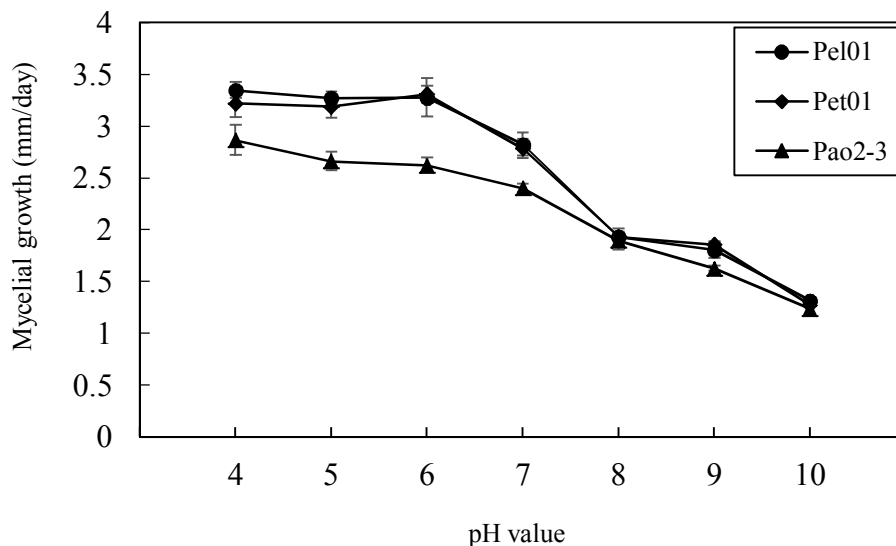


圖一、柑桔綠黴病菌 Pel01、Pet01 及 Pao2-3 菌株於 4-32°C 之菌絲生長速度。

Fig 1. Mycelial growth of *P. digitatum* isolate Pel01, Pet01 and Pao2-3 at 4-32°C. Bars represents means of 4 replications \pm S.E. (n=4).

二、綠黴病菌不同 pH 生長測試

將不同來源的柑桔綠黴病菌 Pel01、Pet01 及 Pao2-3 菌株培養在不同 pH 值下，得知於 pH4-pH10 菌株皆可生長，Pel01 菌株與 Pao2-3 菌株於 pH4 之生長速度較快，分別為 3.35 mm/day 與 2.86 mm/day，而 Pet01 菌株則於 pH6 之生長速度最快，為 3.31 mm/day。三菌株於 pH10 之生長速度最慢，介於 1.24-1.31 mm/day(圖二)。

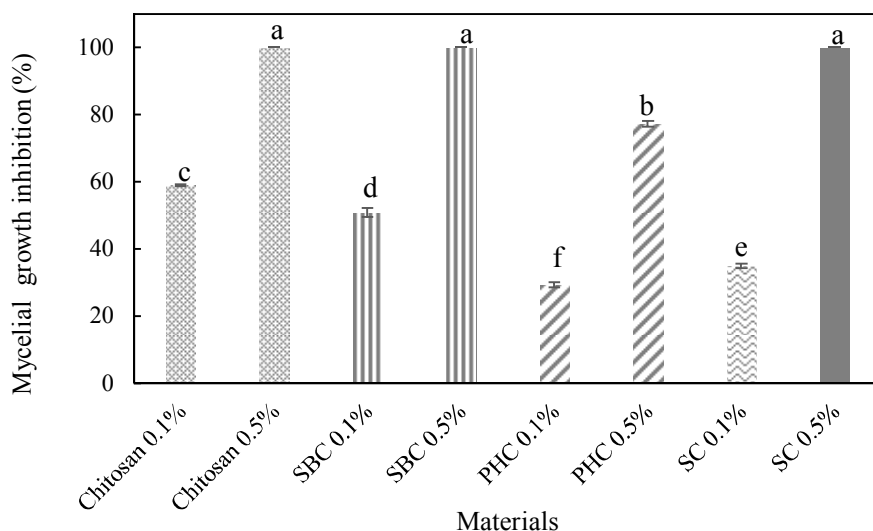


圖二、Pel01、Pet01 及 Pao2-3 菌株於不同 pH 培養基之菌落生長速度。

Fig 2. Mycelial growth of isolate Pel01, Pet01 and Pao2-3 cultured on PDA medium in different pH value. Bars represents means of 4 replications \pm S.E.(n=4).

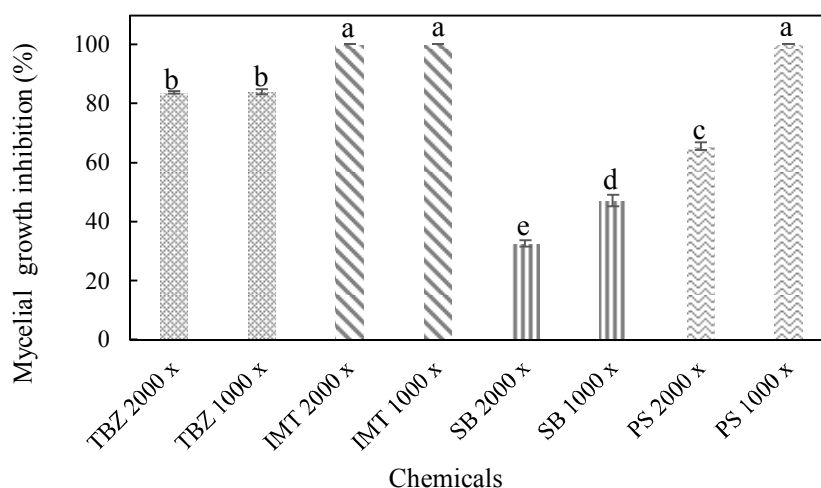
三、不同非農藥防治資材對柑桔綠黴病菌生長抑制測試

將 Pao2-3 菌株培養於含有 0.1%與 0.5%之幾丁聚醣、SBC、PHC 及 SC 培養基，以 0.5%幾丁聚醣、SBC 及 SC 之抑制效果最佳，抑制率達 100%；其次為 0.5%PHC，對菌絲生長抑制率達 77.24%；另 0.1%PHC 對菌絲生長抑制率最低，僅 29.28%(圖三)。將 Pao2-3 培養於含有 1,000 倍與 2,000 倍稀釋的 PS 與 SB 培養基內，以 1,000 倍稀釋的 PS 對菌絲生長抑制率最高，可達 100%；而 2,000 倍稀釋的 SB 菌絲生長抑制率最低，僅 47.18%。試驗中加入參考藥劑 IMT 與 TBZ，結果顯示 2,000 倍稀釋的 IMT 對於 Pao2-3 即具有 100%的菌絲生長抑制率，而 1,000 倍與 2,000 倍稀釋的 TBZ 僅有約 83.00%的菌絲生長抑制率(圖四)。



圖三、不同濃度的幾丁聚醣(Chitosan)、碳酸氫鈉(SBC)、碳酸氫鉀(PHC)及碳酸鈉(SC)對於 Pao2-3 菌株之菌絲生長抑制效果。

Fig 3. Effect of different concentration of chitosan, sodium bicarbonate(SBC), potassium hydrogen carbonate(PHC) and sodium carbonate(SC) on inhibiting mycelial growth of isolate Pao2-3. Bars with different letters indicate significant difference by LSD at $P < 0.05$.

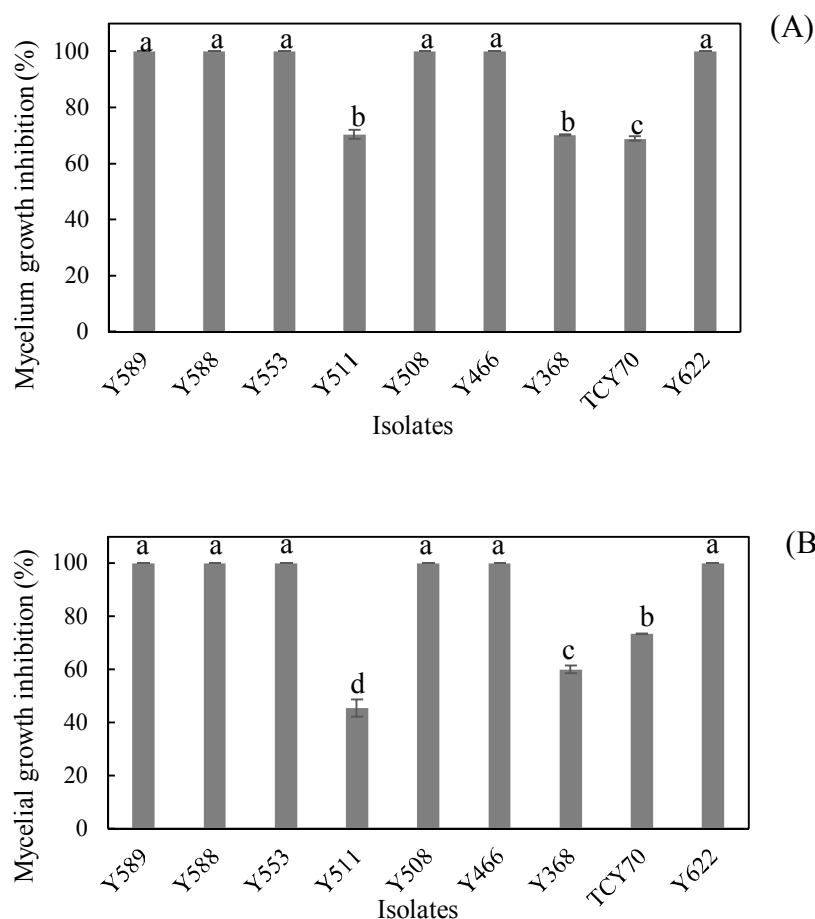


圖四、不同稀釋倍數的苯甲酸鈉(SB)、己二烯酸鉀(PS)、腐絕(TBZ)及克熱淨(IMT)對柑桔綠黴病菌 Pao2-3 菌株之菌絲生長抑制效果。

Fig 4. Effect of different dilution of food preservative sodium benzoate(SB), potassium sorbate(PS) and fungicide Thiabendazole(TBZ), Iminoctadine triacetate(IMT) on inhibiting mycelial growth of isolate Pao2-3. Bars with different letters indicate significant difference by LSD at $P < 0.05$.

四、酵母菌/類酵母菌對柑桔綠黴病菌絲生長抑制效果

測試自田間篩選 9 株酵母菌/類酵母菌菌株對柑桔綠黴病菌 Pao2-3 菌株之菌絲生長抑制效果，柑桔綠黴病菌培養於分別含有 9 株酵母菌/類酵母菌的培養基上，於第 3 天與第 7 天量測 Pao2-3 菌落大小，結果顯示其中 6 株酵母菌/類酵母菌菌株對 Pao2-3 菌株之菌絲生長抑制效果最佳，皆可達 100%，分別為 Y466、Y508、Y553、Y588、Y589、Y622 菌株；另 TCY70 菌株於第 3 天之菌絲生長抑制率為 68.87%，第 7 天菌絲生長抑制率則達到 73.37%，此酵母菌/類酵母菌對 Pao2-3 菌株之菌絲生長抑制效果具有上升趨勢(圖五)。

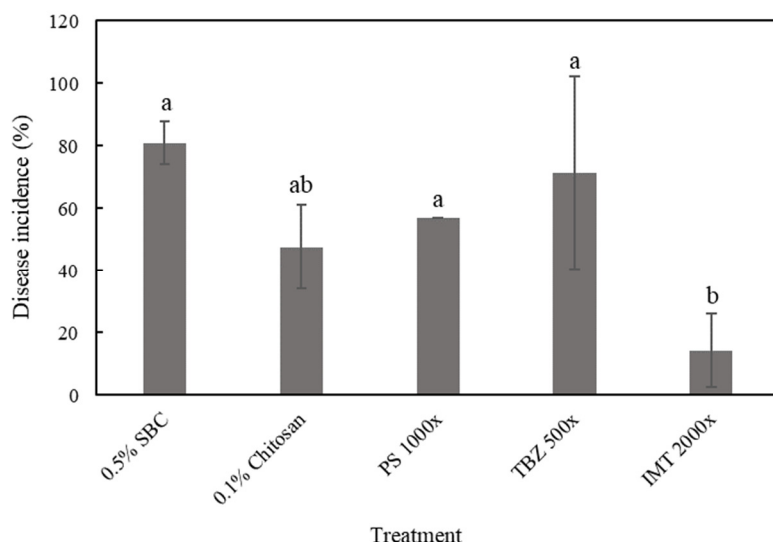


圖五、柑桔綠黴病菌 Pao2-3 菌株培養於含有 2×10^7 CFU/mL 酵母菌/類酵母菌之培養基，於第 3 天 (A)與第 7 天(B)酵母菌/類酵母菌對 Pao2-3 菌株之菌絲生長抑制率。

Fig 5. Mycelial growth inhibition rate of *P. digitatum* isolate Pao2-3 cultured on the medium containing 2×10^7 CFU/mL yeasts or yeast-like antagonists after (A)3 days and (B)7 days. Bars with different letters indicate significant difference by LSD at $P < 0.05$.

五、不同非農藥防治資材於椪柑上對綠黴病防治效果

將前述試驗中具有柑桔綠黴病菌菌絲生長抑制效果之非農藥防治資材 0.5% SBC、0.5%幾丁聚醣、1,000 倍稀釋的 PS，於椪柑果實上進行對綠黴病之防治效果測試，由於 0.5%幾丁聚醣於採後處理過於濃稠，因此以 0.1%幾丁聚醣進行試驗，而參考藥劑 TBZ 於前述試驗以 1,000 倍稀釋僅 83.00% 菌絲抑制率，於果實上試驗則依植物保護資訊系統推薦稀釋倍數進行。結果顯示，處理 2,000 倍稀釋的 IMT 罹病率最低，僅 14.29%，其防治效果最為顯著；而非農藥防治資材以 0.1%幾丁聚醣處理，對綠黴病的防治效果次之，罹病率 47.62%。另處理 1,000 倍稀釋的 PS 罹病率為 57.14%，0.5%的 SBC 防治率為 80.95%。處理 500 倍稀釋 TBZ 之椪柑，其罹病率為 71.43%，此三項處理於分析上並無顯著差異(圖六)。

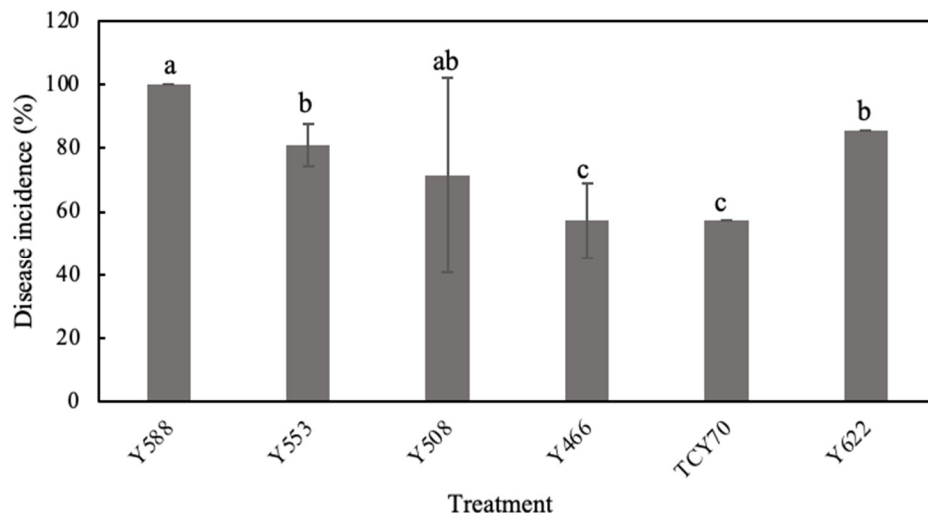


圖六、多種非農藥防治資材處理對椪柑果實綠黴病菌防治效果。碳酸氫鈉(SBC)、幾丁聚醣(Chitosan)、己二烯酸鉀(PS)、腐絕(TBZ)及克熱淨(IMT)。

Fig 6. Effect of non-chemical materials on controlling green mold of citrus. sodium bicarbonate(SBC), potassium sorbate(PS), Thiabendazole(TBZ)and Iminoctadine triacetate(IMT). Bars with different letters indicate significant difference by LSD at $P < 0.05$.

六、酵母菌/類酵母菌於椪柑上對綠黴病之防治效果

將前述試驗中對綠黴病菌菌絲生長具顯著抑制效果之酵母菌/類酵母菌，於椪柑果實上對綠黴並進行防治效果測試，結果顯示酵母菌/類酵母菌菌株以 TCY70 與 Y466 具有較佳的防治率，柑桔綠黴病之罹病率僅 57.14%。另 Y553 與 Y622 防治效果次之，罹病率 80.95%與 85.71%，而 Y588 則不具有防治效果(圖七)。



圖七、椪柑果實經酵母菌/類酵母菌菌株處理後，柑桔綠黴病菌之罹病率。

Fig 7. Effect of yeasts or yeast-like antagonists on controlling green mold of citrus. Bars with different letters indicate significant difference by LSD at $P < 0.05$.

討 論

本研究測試自不同來源所分離之綠黴病菌最適培養的溫度與 pH 值，以作為後續篩選防治資材或擬定防治策略之依據。*Penicillium* spp. 菌絲在果皮傷口內繼續生長的要件，包含水、養分、特定溫度及適當的 pH 環境下，根據研究指出 *P. digitatum* 與 *P. italicum* 最適生長溫度為 25°C，且其在 4-30°C 的環境下皆具有生長活性，然於 37°C 的環境下無法生長^(31,32)；本研究結果證實，來自臺灣不同柑桔類所分離之 *P. digitatum* 其可生長之溫度亦介於 4-28°C，於 32°C 則無法生長，菌絲無法生長的溫度則較國外的菌株低。而環境的 pH 值亦關係病原菌的生長，Prusky 等人(2004)指出，*Penicillium* spp. 會藉由分泌有機酸以酸化寄主細胞加以利用，並經由試驗證實 *P. digitatum* 與 *P. italicum* 在柑桔類果皮傷口上，寄主周圍環境酸化會助長其毒力的表現⁽³³⁾。而本研究亦發現此 3 株供試菌株皆是在 pH4-6 之培養基上生長速度較快，證實 *P. digitatum* 在酸性的環境下較具活性。未來可進一步透過了解病原菌在不同 pH 環境下的毒力表現，應用環境 pH 值的改變，作為採後真菌性病原菌防治的新策略⁽³⁴⁾。

臺灣目前在柑桔類採後綠黴病菌的防治，以浸泡植物保護資訊系統推薦之腐絕與克熱淨為主，然在腐絕的使用上已有許多文獻指出，*Penicillium* spp. 對腐絕已產生抗藥性^(6,35)，另外銷國目標國家對農藥殘留容許量不一，以及消費者對於安全農產品之意識抬頭，因此，篩選非農藥防治資材具有其必要性。本研究篩選對柑桔綠黴病菌生長具抑制效果的非農藥防治資材，以 0.5% 的碳酸鈉與碳酸氫鈉對綠黴病菌具有顯著的抑制效果，然在柑桔果實上的綠黴病防治試驗中，0.5% 的碳酸氫鈉

並未有顯著的防治效果。碳酸鈉與碳酸氫鈉是食品可添加的化合物，在國外已被應用於柑桔類包裝場，兼具成本低與效果顯著，但卻無法有持續性的防治效果，因此後續有許多研究則以碳酸氫鈉結合溫湯處理浸泡柑桔，以達到最佳的防治效果^(25, 26)。另於食品防腐劑中以 1,000 倍稀釋的己二烯酸鉀的抑制綠黴病菌菌絲生長效果最佳，然在柑桔果實防治綠黴病試驗中，無法達到顯著的防治效果，己二烯酸鉀屬於廣效性的防腐劑，其對綠黴病的防治效果受柑桔種類、品種及環境的影響⁽²²⁾，相較於殺菌劑，其不具有持續性的防治效果，缺乏殘效性。研究指出將柑桔浸泡含 2-3% 己二烯酸鉀不同溫度水溶液，對柑桔綠黴病的防治效果不一，以含有己二烯酸鉀水溶液的溫湯處理較室溫水溶液之效果佳^(27, 37)。本研究中幾丁聚醣於培養基上對柑桔綠黴病菌之抑制效果顯著，其處理極柑後對柑桔綠黴病菌之防治效果較碳酸氫鈉與己二烯酸鉀良好，幾丁聚醣屬可食性覆膜(edible coating)，與前兩者的應用方向較為不同，前人研究指出，在柑桔長期低溫貯藏期間，可顯著降低採收後 *Penicillium spp.* 所造成的腐爛，具延緩果實老化及減少果實失重之效果^(7, 8)。而幾丁聚醣的抗菌效果來自於所帶的正電會影響細胞表面所帶的負電，造成細胞膜滲漏；另一方面其扮演誘發寄主抗菌物質的生合成的角色^(23, 36)。而本次所篩選之非農藥防治資材，幾丁聚醣較臺灣推薦慣行農業使用之腐絕之防治效果良好，但仍不及克熱淨之防治效果優異。

柑桔綠黴病之生物防治以酵母與細菌最為常見，酵母菌以 *Pichia membranefaciens*⁽¹⁷⁾ 與 *Metschnikowia fructicola*⁽¹⁴⁾ 等，類酵母以 *Aureobasidium pullulans*⁽¹⁶⁾，細菌則以 *Pseudomonas syringae*⁽⁹⁾ 與 *Bacillus amyloliquefaciens*⁽⁴⁰⁾ 等。本研究在酵母菌或類酵母菌的抑制柑桔綠黴病菌生長的篩選上，篩得 6 株對病原菌生長具有顯著抑制效果，然在極柑果實上對綠黴病之防治試驗中，以 Y466 與 TCY70 菌株之罹病率較低，兩菌株皆屬類酵母菌 *Aureobasidium sp.*。已有研究指出類酵母菌可防治於採後造成蘋果腐爛之 *P. expansum*^(19, 21)，另亦有類酵母菌之微生物製劑 Botector，針對草莓、葡萄及番茄灰黴病進行防治，於採後或採前施用⁽¹²⁾，是極具開發潛力之菌種。為提升採後病害之防治之效果，結合 2-3 種生物防治菌或結合其他方式將為防治趨勢⁽²⁴⁾，研究中常見以碳酸氫鈉結合拮抗菌，如 *P. syringae*、*C. oleophila*、*B. subtilis* 等⁽²⁸⁾，近期更朝向生物化學與分子生物方向，誘導果實產生抗病反應，以達到防治效果⁽⁵⁾，許多研究已證實不同柑桔品種處理拮抗菌 *C. oleophila* 與 *M. fructicola* 皆可達誘發寄主抗病反應之效果^(13, 18)。

單一微生物製劑或單一非農藥防治資材，常因作用方式單一而未能達到顯著的防治成效，未來將以複合菌種及拮抗菌結合其他非農藥防治資材或可食性覆膜，以提升柑桔採後處理對綠黴病菌之防治效果。

參考文獻

1. 行政院農業委員會 農業統計年報 <<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>>。
2. 行政院農業委員會 農業藥物毒物試驗所 植物保護資訊系統 <<https://otserv2.tactri.gov.tw/PPM/>>。

3. 黃慶文、涂青宇 2015 外銷農產品農藥殘留基準簡介 藥毒所專題報導 117: 1-11。
4. Ameziane, N., H. Boubaker, H. Boudyach, F. Msanda, A. Jilal and A. A. Benaoumar. 2007. Antifungal activity of moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron. Sustain. Dev.* 27(3): 273-277.
5. Castoria, R. and S. A. Wright. Host responses to biological control agents. 2009. p.171-181. In: Prusky D. and M. Gullino (eds) *Post-harvest Pathology*. Springer.
6. Cabañas, R., G. Castellá, M. L. Abarca, M. R. Bragulat and F. J. Cabañes. 2009. Thiabendazole resistance and mutations in the β -tubulin gene of *Penicillium expansum* strains isolated from apples and pears with blue mold decay. *FEMS Microbiol. Lett.* 297(2): 189-195.
7. Cháfer, M., L. Sánchez-González, C. González-Martínez and A. Chiralt. 2012. Fungal decay and shelf life of oranges coated with chitosan and bergamot, thyme, and tea tree essential oils. *J. Food Sci.* 77(8): E182-E187.
8. Chien, P. J. and C. C. Chou. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *J. Sci. Food Agri.* 86(12): 1964-1969.
9. Cirvilleri, G., A. Bonaccorsi, G. Scuderi and M. Scortichini. 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *J. Phytopathol.* 153(11-12): 654-666.
10. El-Ghaouth, A., J. L. Smilanick, G. E. Brown, A. Ippolito, M. Wisniewski and C. L. Wilson. 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Dis.* 84(3): 243-248.
11. El-Mougy, N. S., M. M. Abdel-Kader and M. H. Aly. 2012. Effect of a new chemical formula on postharvest decay incidence in citrus fruit. *J. Plant Prot. Res.* 52(1): 156-164.
12. Fabbro, R. D., L. Crivelli, G. Lacertosa, G. Digeronimo, A. Calari, B. Edler and D. D'Ascenzo. 2016. Activity of *Aureobasidium pullulans* (Botector) against grey mold on grape, strawberry and tomato. *Atti, Giornate Fitopatologiche, Chianciano terme (Siena), 8-11 marzo 2016.* 2: 231-239.
13. Hershkovitz, V., C. Ben-Dayan, G. Raphael, M. Pasmanik-Chor, J. Liu, E. Belausov, R. Aly, M. Wisniewski and S. Droby. 2012. Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Mol. Plant Pathol.* 13: 338-349.
14. Kutzman, C. P. and S. Droby. 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascospore yeast effective for biocontrol of postharvest fruit rots. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 395-399.
15. Lee, M. H., S. M. Pan, T. W. Ng, P. S. Chen, L. Y. Wang and K. R. Chung. 2011. Mutations of β -tubulin codon 198 or 200 indicate thiabendazole resistance among isolates of *Penicillium digitatum* collected from citrus in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 150(2-3): 157-163.

16. Liu, X., J. Wang, P. Gou, C. Mao, Z. R. Zhu and H. Li. 2007. *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 223-229.
17. Luo, Y., Y. Zhou and K. Zeng. 2013. Effect of *Pichia membranaefaciens* on ROS metabolism and postharvest disease control in citrus fruit. *Crop Prot.* 53: 96-102.
18. Macarisin, D., S. Droby, G. Bauchan and M. Wisniewski. 2010. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biol. Technol.* 58(3): 194-202.
19. Mari, M., C. Martini, A. Spadoni, W. Rouissi and P. Bertolini. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol Technol.* 73: 56-62.
20. McGuire RG. 1994. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biol. Control.* 4: 1-7.
21. Mounir, R., A. Durieux, E. Bodo, C. Allard, J. Simon, E. H. Achbani, S. El-Jaafari, A. Douira and M. H. Jjakli. 2007. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnol Lett.* 29: 553-559.
22. Montesinos-Herrero, C., M. Á. del Río, C. Pastor, O. Brunetti and L. Palou. 2009. Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 52(1): 117-125.
23. No, H. K., S. P. Meyers, W. Prinyawiwatkul and Z. Xu. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *J. Food Sci.* 72(5): R87-R100.
24. Nunes, C. A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.* 133(1): 181-196.
25. Palou, L., J. L. Smilanick, J. Usall and I. Viñas. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Dis.* 85(4): 371-376.
26. Palou, L., J. Usall, J. A. Munoz, J. L. Smilanick and I. Vinas. 2002_a. Hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Bio. Technol.* 24(1): 93-96.
27. Palou, L., J. Usall, J. L. Smilanick, M. J. Aguilar and I. Vinas. 2002_b. Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. *Pest Manag. Sci.* 58(5): 459-466.
28. Palou, L., J. L. Smilanick and S. Droby. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Rev.* 2(2): 1-16.
29. Palou, L., Smilanick, J. L., Montesinos-Herrero, C., Valencia-Chamorro, S., & Pérez-Gago, M. B.

2011. Novel approaches for postharvest preservation of fresh citrus fruits. p.1-45. In: Slanker, D. A. (Ed) Citrus Fruits: Properties, Consumption and Nutrition, Nova Science Publishers, Inc., NY, USA.
30. Palou, L. 2014. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). p.45-105. In: Bautista-Baños S (eds.) Postharvest Decay (1st). Academic Press. Mexico.
31. Plaza, P., J. Usall, N. Teixidó and I. Vinas. 2003. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. J. Appl. Microbiol. 94(4): 549-554.
32. Plaza, P., J. Usall, N. Teixidó and I. Vinas. 2004. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. Int. J. Food Microbiol. 90(1): 75-82.
33. Prusky, D., J. L. McEvoy, R. Saftner, W. S. Conway and R. Jones. 2004. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. Phytopathology: 94(1): 44-51.
34. Prusky, D., S. Barad, N. Luria and D. Ment. pH Modulation of host environment, a mechanism modulating fungal attack in postharvest pathogen interactions. 2014. p.11-25. In: Prusky D. and M. Gullino (eds) Post-harvest Pathology. Springer.
35. Schmidt, L. S., J. M. Ghosop, D. A. Margosan and J. L. Smilanick. 2006. Mutation at β -tubulin codon 200 indicated thiabendazole resistance in *Penicillium digitatum* collected from California citrus packinghouses. Plant Dis. 90(6): 765-770.
36. Sebti, I., E. Chollet, P. Degraeve, C. Noel and E. Peyrol. 2007. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. J. Agri. Food Chem. 55(3): 693-699.
37. Smilanick, J. L., M. F. Mansour, F. M. Gabler and D. Sorenson. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. Postharvest Biol. Technol. 47(2): 226-238.
38. Szczerbanik, M., J. Jobling, S. Morris and P. Holford. 2007. Essential oil vapours control some common postharvest fungal pathogens. Aust. J. Exp. Agric. 47(1): 103-109.
39. Valencia-Chamorro, S. A., L. Palou, M. A. del Rio and M. B. Perez-Gago. 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. Criti. Rev. Food Sci. nutr. 51(9): 872-900.
40. Yu, S. M., B. T. Oh and Y. H. Lee. 2012. Biocontrol of green and blue molds in postharvest satsuma mandarin using *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36. Biocontrol Sci. Technol. 22(10): 1181-1197.

Analysis of the Characteristics of *Penicillium digitatum* and Evaluation the Efficacy of Non-pesticide Materials and Yeasts on Controlling Green Mold of Citrus¹

Pei-Hsin Lo, Chao- Jen Wang, Yi-Tso Lai and Meng-Sung Chen²

ABSTRACT

Green mold caused by *Penicillium digitatum* ((Pers.) Sacc.) is one of the most important postharvest disease of Citrus in Taiwan. The main approach to control the green mold is treating the chemical fungicides before storage. However, fungicide resistance of *P. digitatum* and fungicide residue of Citrus for export are problems for Citrus storage. Thus, non-chemical treatment to control green mold is necessary. This study is aim to analyze the characteristics of *P. digitatum*, and screen non-chemical materials and yeasts for controlling the green mold. The mycelial growth of *P. digitatum* is faster at 24°C, but can't grow at 32°C. Also, it grew faster when cultured on pH4-6 medium. Moreover, to screen non-chemical materials and yeasts for inhibiting the mycelial growth of *P. digitatum in vitro*, 0.5% chitosan, 0.5% sodium bicarbonate, potassium sorbate in 1,000x dilution, and 6 isolates of yeasts or yeast-like antagonists can 100% inhibit the mycelial growth of *P. digitatum*. On controlling test of green mold of citrus *in vivo*, the treatment of 0.1% chitosan showed 47.62% disease incidence, is the most effective non-chemical material. And, the treatment of yeast-like antagonists isolate Y466 and TCY70 showed 57.14% disease incidence, it showed the ability on controlling the green mold. Therefore, integrate multiple antagonists or different non-chemical materials can be a new strategy for enhancing the efficiency on controlling the green mold of citrus after harvest.

Key words: green mold, non-pesticide materials, chitosan, yeast/yeast-like antagonist

¹ Contribution No.0986 from Taichung DARES, COA.

² Assistant, Assistant Researcher, Associate Researcher of Taichung DARES, COA.