

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 農業與食品學科

第二名

052206

中藥萃取物抑制尖孢镰刀菌功效之探討

學校名稱：慈濟學校財團法人慈濟大學附屬高級中學

作者：  高二 黎克剛  高二 王祥丞  高二 邱奕愷	指導老師：  林麗君
---	------------------

關鍵詞：尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、香豆素、天然物抑菌劑

# 中藥萃取物抑制尖孢镰刀菌功效之探討

## 摘要

巴拿馬病是由尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 透過分泌毒素，引發香蕉植株死亡。目前無有效防治手段。以植物萃取物作為病蟲害防治手段為現代非農藥防治策略的重要發展方向。本研究以肉桂酒精萃取物，在抑菌測試結果中，發現具抑制尖孢镰刀菌生長的功效，結果呈現濃度及時間相關性，最低有效濃度介於30~35 (mg/ml)，藥效時間可持續至少八天，效果的穩定性不因高溫高壓環境處理而受影響。萃取物主要成分為香豆素。此外，使用五種經濟作物進行對植株的毒性測試，在有效濃度下，不影響其生長。另外，也發現對於玉米反而有促進生長的效果。本研究證實，肉桂酒精萃取物具抑制尖孢镰刀菌的功效且在有效濃度下不影響作物生長，甚至可能具有促進生長的效果。

## 壹、前言

### 一、研究動機

2021 年年初，一篇 BBC 「The ‘pandemic’ destroying the world’s favourite fruit」的新聞吸引了我們的注意。

黃葉病是一種由尖孢镰刀菌所引起嚴重危害香蕉產業的疾病，不管是對台灣還是在全球都造成了巨大的經濟損失，對生產香蕉國家的經濟和社會發展帶來了重大影響。在台灣，根據農委會的統計，2017 年黃葉病在台灣經濟損失就達到了 13.7 億元，涉及面積超過 800 公頃，且該菌會在土地中存活 7 年至 40 年以上，目前並沒有有效的防治手段。對於香蕉的產業結構已經造成嚴重的威脅，有效的預防及治療是現在農業上首要的目標之一，是一個不論是台灣還是全球都需要迫切處理的課題。

目前香蕉黃葉病的防治方法有限，這些方法主要在防止病株擴散 (Albert P. Aquino, Genny G. Bandoles and Virma Anne A.Lim, 2013)。目前各國主要採用以下幾種方法來防範，包括：植物檢疫，禁止從病區進口香蕉防止傳播；清除撲滅感染源，控制損失數量，避免擴大；品種改良，研發能夠承受較極端環境之香蕉，並使生

長環境對病原體傳播較不利，從而避免感染。

不過植物檢疫增加了進口成本和檢驗的成本，會導致成本轉移至消費者，尚未完善的法條及不夠嚴苛的檢驗也可能無法完全防止病原進入；清除撲滅感染源則需要大量的人力和物力成本；品種改良會面臨品質和產量不如預期及可能的作物口味口感改變，造成消費市場接受度降低的問題。

透過資料的收集，及閱讀相關論文我們了解病原的侵害方式，發病機制等，並了解絲裂原活化激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase；MAPK）參與生物生長、生殖、感應及代謝的過程。我們希望以「非農藥防治」的方式，在對環境、人體及植物最無害的條件下，找到能夠抑制尖孢镰刀菌的天然物，因此，我們提出「抑制 MAPK 信號通路可能有助於抑制尖孢镰刀菌」的假設，並查找與抑制 MAPK 路徑有關的中草藥文獻，文獻指出雙和湯（韓國及中國配方）及桂枝茯苓湯三種中藥複方，能夠有效抑制 MAPK，我們以這三種中藥複方展開系列實驗，希望以「植物治療植物」即應用植物萃取物這個非農藥防治策略，發展對抗尖孢镰刀菌的手段，有效解決香蕉黃葉病，幫助香蕉產業。

## 二、研究背景與文獻探討

### （一）巴拿馬病（Panama Disease）及植物死亡機制

巴拿馬病又稱作黃葉病，是一種由尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 所引起的植物病害，尖孢镰刀菌是一種常見的致病真菌，可導致許多不同植物物種發生維管束枯萎病 (Antonio Di Pietro et al., 2003)，植物在被感染後，尖孢镰刀菌的菌絲附著在寄主根部，到達木質部導管並通過壁孔進入 (Bishop and Cooper, 1983；Di Pietro et al., 2001)，阻礙植物養分的運輸，另外，該真菌會分泌毒素，它們產生毒素和纖維素分解酶，影響宿主次級代謝途徑，以更好地吸收宿主營養 (Lakshmi Priya Perincherry et al., 2019)，最後會使植物細胞進入凋亡程序 (Juan Carlos Nunez-Rodriguez, Carmen Ruiz-Roldán, Pedro Lemos, Sergio Membrives and Concepcion Hera, 2020)，造成香蕉植株的死亡。目前，除了研發尖孢镰刀菌除抗病品種外，尚無有效的防治措施 (Juan Carlos Nunez-Rodriguez et al., 2020)。

## （二）巴拿馬病造成的經濟損失

香蕉為全球第四大的糧食作物。以全球最大的香蕉生產國印度為例，根據聯合國糧食及農業組織（FAO）的調查，該國的香蕉年產量約為 2860 萬噸，受到巴拿馬病的影響，會給該國的香蕉產業造成 5000 億印度盧比（約 70 億美元）的損失（Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Gómez-Lama Cabanás C and Mercado-Blanco J, 2019），是龐大的經濟打擊，更會連帶影響多項發展。

臺灣也深受影響，自 1967 年發現黃葉病後，至今仍無法根除，受感染的土壤需廢耕 30 至 40 年才可再種植香蕉（郭琇真，2018）。2019 年年底黃葉病在臺灣爆發，最早感染的區域出現在南部的高雄和屏東，據農委會的統計，目前感染區域已經遍及全島。周浩平和陳以錚（2016）指出，臺灣目前紀錄顯示由尖孢镰刀菌危害的作物超過 30 種，每年約可造成 1,200 萬美元以上的農業損失。台灣是全球香蕉主要生產國之一，病毒的感染不僅對本土是一個重大的打擊，更會連帶影響其他農產品的出口，造成的經濟損失可能無法在數學統計上完整呈現，這是一個重大挑戰，需要持續努力才能解決的問題。

## （三）現代非農藥防治

現代非農藥防治策略是一種永續農業的做法，強調利用自然的生物多樣性和生態系統來防治病害和害蟲，以降低農藥的使用量，藉此降低對環境及人體健康的影響。其中，一項重要的策略是推廣整合性病蟲害管理（Integrated Pest Management, IPM），它是以最小化農藥使用為目標的綜合性防治方案，綜合運用多種病蟲害管理方法提高作物的生產力和品質。另外，非農藥防治還包括多種策略，包括：引進天敵和寄生蟲，引進對特定害蟲和病害具有天敵或寄生作用的生物；使用生物肥料，使用有機肥料和微生物肥料，增加土壤生態系統的多樣性，提高作物的抗病能力等多種方法，注重尊重自然環境和生物多樣性，在兼顧多種條件下取得平衡，是科學家們目前努力的方向之一。

非農藥防治策略中使用植物萃取物是一種越來越受到重視的防治方式。植物萃取物通常是從植物中提取出來的一些物質，可以用來防治病蟲害，並且對環境和人體的危害非常小。這種防治方式的優點是，植物萃取物通常對人體和環境沒有危害，對生態環境的影響較小，同時也不會產生農藥殘留問題，是一種環保、健康的防治方式。它可以針對特定的病蟲害進行防治，並且可以調整萃取物的配方和濃度來達到最佳的防治效果。此外，植物萃取物還可

以提高農作物的免疫力，使其更加健康和抵抗病蟲害的能力。例如，中興大學黃振文教授以甘藍下位葉及菸葉渣為主要成份，製造液體的中興 100(CH 100)植物健素，可防治許多種植物病害，包括韭菜銹病、瓜類白粉病及馬鈴薯軟腐病，而且已經商品化(黃振文，1992; Huang and Chung, 2003)。農試所亦發現大風子酒精萃取液 200 倍稀釋液可抑制白菜炭疽病菌之孢子發芽率，亦可降低此病之發病率(謝等, 2003)。

#### (四) MAPK 對尖孢镰刀菌之影響

絲裂原活化激酶 (MAPK) 信號通路參與尖孢镰刀菌的發育和引發細胞程序性死亡相關的幾個重要過程 (Juan Carlos Nunez-Rodriguez et al., 2020)，不同的因子相互作用會引發一連串不同的反應，三種 MAPK 通路 Fmk1、Mpk1 和 Hog1 之間的相互作用有助於尖孢镰刀菌的應激反應和交叉致病性 (David Segorbe, Antonio Di Pietro, Elena Pérez-Nadales and David Turrà, 2017)，Fmk1、Mpk1、Hog1 等蛋白質與尖孢镰刀菌有密切關係，參與調節尖孢镰刀菌的一些生物學過程，Fmk1 和 Mpk1 參與了尖孢镰刀菌的細胞壁合成和細胞週期，Fmk1 在細胞膜生成、分裂及細胞核分裂也有重要的地位，Mpk1 還參與調節尖孢镰刀菌的菌絲形態和生長速率，Hog1 則影響菌絲形態和細胞凋亡。Fmk1 和 Mpk1 在 G1 期參與調節細胞生長和細胞壁合成，在 S 期參與調節 DNA 複製和細胞核的分裂，G2 期 Fmk1 和 Mpk1 參與調節菌絲形態和細胞壁合成，M 期參與調節細胞分裂酵母菌母細胞的子囊體形成。

#### (五) 雙和湯功效及配方比例

雙和湯是一種傳統的中藥複方，在中國的《太平惠民和劑局方》和韓國的《東醫寶鑑》均有紀錄，傳統用於鎮痛、保肝、抗炎和抗骨質疏鬆用 (Aeyung Kim et al., 2013)。由白芍、當歸、黃耆、川芎、熟地黃、甘草、肉桂、生薑、棗子組成，中國和韓國的成分一樣，不過配方的比例不同。中國配方參考《太平惠民和劑局方》之紀錄，韓國複方參考 Aeyung Kim et al. (2013) 研究所使用之比例。尚未有相關的研究直接利用雙和湯萃取物抑制尖孢镰刀菌的生長，不過有研究利用抑制 MAPK 訊號通路的方式治療其他疾病，抑制 PKA 和 p38 MAPK 信號通路有效抑制黑色素瘤細胞 (B16F10) 細胞中 c-AMP 誘導的黑色素合成 (Aeyung Kim et al., 2013)，我們希望使用雙和湯的萃取物來嘗試是否具有抑制真菌生長的功能。

表 1-1 雙和湯各成分比例

藥材	中國配方	韓國配方
白芍	31.25%	28.0%
當歸	12.5%	11.2%
黃耆	12.5%	11.2%
川芎	12.5%	11.2%
熟地黃	12.5%	11.2%
甘草	9.375%	8.4%
肉桂	9.375%	8.4%
生薑	三片/6 克	4.4%
棗子	一枚/6 克	6.0%

表 1-2 桂枝茯苓湯各成分比例

藥材	比例
桂枝	三錢
茯苓	三錢
甘草	二錢
丹皮	三錢
芍藥	三錢
桃仁	三錢

### (六) 桂枝茯苓湯功效及配方比例

桂枝茯苓湯是一種傳統的中藥複方，桂枝茯苓湯在中國的《傷寒卒病論》被記載，是治療婦科腫瘤的經典中藥複方之一 (Yifei Dai et al., 2020)，由桂枝、茯苓、甘草、丹皮、芍藥、桃仁組成，配方參考《四聖心源》卷十之紀錄。

尚未有相關的研究直接利用桂枝茯苓湯萃取物抑制尖孢镰刀菌的生長，不過有研究證實桂枝茯苓湯主要通過調節 PI3K 和 MAPK 信號通路抑制 BRCA(遺傳性乳癌基因)，從而具有抗增殖、促凋亡和抗血管生成活性 (Yifei Dai et al., 2020)。

### 三、研究目的

探討植物萃取物抑制尖孢镰刀菌生長之可行性，亦即對真菌生長的情形達到最大的抑制效果，但對作物之生長發育影響最小。

- (一) 分析三種複方及個別組成中藥對尖孢镰刀菌生長的抑制效果
- (二) 篩選出有效藥物後進行功效確認
- (三) 分析與推測藥物有效成分
- (四) 評估藥物對一般植物生長之影響
- (五) 探討天然物對植物病害之可行性及利用價值

## 貳、研究設備與器材

### 一、實驗用研究設備

植物萃取:粉碎機、超音洗淨機、真空幫浦、酒精乾燥機、冷凍乾燥機、蒸餾儀

高壓滅菌鍋、HPLC 層析儀、Potato Dextrose Broth (PDB)、Potato Dextrose Agar (PDA)、植物生長箱、微量吸管、細胞盤、離心管、無菌操作台

### 二、實驗真菌、藥材來源

尖孢镰刀菌購入自食品工業發展研究所;中藥複方之藥材均購入自一良中藥行;植物種子、幼苗皆購入自黃裕泰種子行

## 參、研究過程與方法

### 一、研究架構

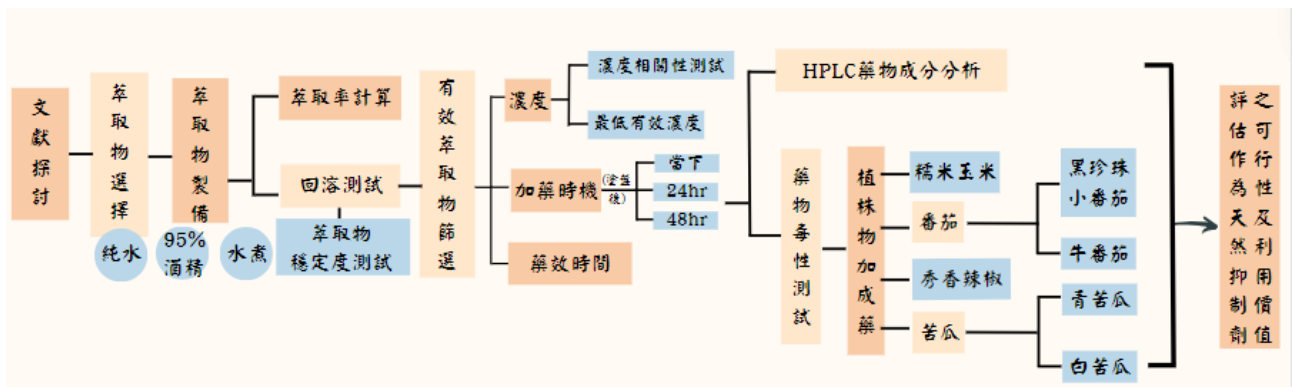


圖1 研究架構圖 (筆者自製)

### 二、研究方法

#### (一) 中藥萃取方法及條件

將購回藥品放至冷凍乾燥機去除多餘水分。酒精萃取及純水萃取以 1:5 的比例加入溶媒，放入超音洗淨機震盪 30 分鐘後以濾紙過濾收集液體，重複以上步驟三次進行萃取；水煮萃取以 1:20 的比例加入純水，加入磁石攪拌，加熱至沸騰後計時一小時，三種方法皆須在過濾後，進行減壓濃縮，並放入乾燥機完全去除溶媒，測量乾燥完重量計算萃取率 (萃取重/原樣品重\*100%) 並置於 -20°C 冰箱保存

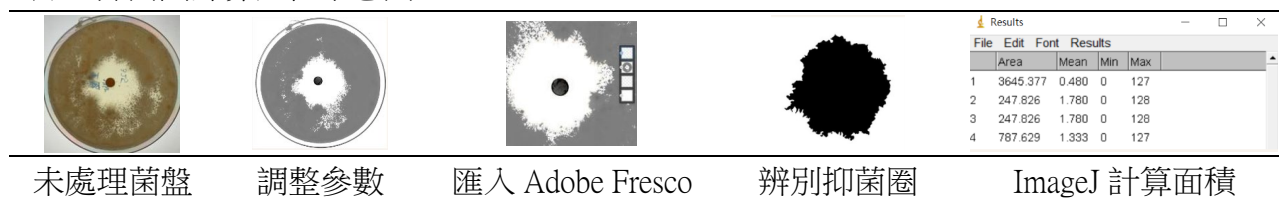
## (二) 抑菌測試

依實驗需求準備菌盤，吸取液態菌液 $100\ \mu\text{l}$ 塗盤，將滅菌過的濾紙泡入藥品中，夾出置於菌盤上，倒扣放回培養箱觀察，於加藥後24hr、48hr、72hr拍照記錄，並計算抑菌圈大小

## (三) ImageJ 計算抑菌圈大小

以一固定光源至於菌盤底部拍攝，抑菌圈大多為不規則形，為方便計算，將照片進行以下處理:曝光+100 亮度、陰影、對比、黑點、飽和度、色溫、色調-100 利用 Adobe Fresco 繪圖軟體辨別出抑菌圈形狀，匯入 image J 計算面積大小（四捨五入至小數點後第三位）。

表 2 抑菌圈計算過程示意圖



## (四) 真菌培養液、agar製備

混合 24g 的 PDB 及 1 升的純水，製成液態營養液；混合 39g 的 PDA 及 1 升的純水備用。放入高壓滅菌鍋以  $121^{\circ}\text{C}$  高壓滅菌 15 分鐘，冷卻後，將營養液放入  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存；PDA 分裝至 10 公分盤，倒扣於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存

## (五) HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 藥物成分分析

樣品處理：秤取 5 mg 酒精萃取物萃取物加入 1 mL 酒精回溶，並使用  $0.45\ \mu\text{m}$  濾紙過濾製樣品瓶。

表 3-1 分析條件

項目	
分析時間	30 min
波長範圍	290 nm
分析量	$20\ \mu\text{l}$
流速	1 ml/min

表 3-2 移動項條件

時間(min)	Acetonitrile(乙腈)(%)	ddH <sub>2</sub> O(%)
0	0	100
10	10	90
30	25	75

管柱: Shimadzu Shim-pack GIST C<sub>18</sub>,  $5\ \mu\text{m}$ , 10 x 250 mm



## (六) 植株培養及藥物毒性測試

本研究共實驗六種一般作物，測試藥物對其生長毒性之影響。植物成株種類：糯米玉米 (*Zea mays var. ceratina*)、牛番茄 (*Solanum lycopersicum cv.*)、黑珍珠小番茄 (*Lycopersicon*

表 4 植物生長箱條件

光照時間	溫度
日間光照 12 小時	28° C
夜間無光照	20° C

*esculentum Mill.*)、白苦瓜 (*Momordica charantia*)、青苦瓜 (*Momordica charantia var. abbreviata.*)、秀香辣椒 (*Capsicum annuum*)。糯米玉米自種子階段培養，其餘植物購買發芽後生長兩周之幼苗實驗。糯米玉米生長速度較快，於發芽後兩周進行加藥測試；其餘植株於發芽後四周進行加藥測試。糯米玉米及秀香辣椒置於植物生長箱培養；牛番茄、黑柿大番茄、白苦瓜、青苦瓜置於室溫環境下培養。每隔三天分別加入 35、50、100、150、200 mg/ml 濃度的藥物 2ml 至根部附近的土壤，每天定時澆水、紀錄測量植株高度（土到頂芽間的距離）。

## (七) 統計方法

本研究使用以下統計方法來分析收集的資料。

1、描述性統計：對於不同組實驗，計算抑菌圈、植物變化量等的平均值、標準差。提供每個組別基本特徵的描述。

2、同質性檢定：檢驗不同組別之變異數是否相等，確定這些組別在統計上的同質性，於 t 檢定前統計，確保 t 檢定使用適當的方式。

3、獨立樣本 t 檢定：用於比較兩組獨立組別的均值是否存在顯著差異。本研究用於比較兩種不同濃度對抑菌圈面積、生長變化量之影響是否存在顯著性差異。

4、單變異數分析：用於大於三個獨立組別的均質是否存在顯著性差異。本研究用於濃度相關性、時間相關性等組別較多之情形。

5、回歸直線分析：用於多個變數之間的關係，預測一個連續變數的數值。探討不同濃度下之抑菌圈之連續變化及濃度相關性。

6、共變數分析：本研究用於探討不同藥物濃度下，對於刺激玉米生長增加生長變化量之分析。

## 肆、研究結果

### 一、各藥物有效成分萃取比率

表 5 藥物萃取率

藥物	萃取率	藥物	萃取率
雙和湯(中國)	16.20%	雙和湯(韓國)	15.46%
白芍	15.30%	桂枝茯苓湯	12.00%
黃耆	9.60%	當歸	8.50%
熟地黃	6.60%	川芎	13.20%
肉桂	10.12%	甘草	6.70%
丹皮	12.00%	桂枝	11.20%
芍藥	9.10%		

### 二、抑制尖孢镰刀菌生長藥物篩選

將所有萃取物分別以 2mg/mL、20mg/mL 及 200mg/mL 測試尋找有效萃取物。為節省空間及方便閱讀，以下為簡稱說明：

A 組包含：當歸、茯苓、桂枝、黃耆、甘草、熟地、白芍、川芎，共 8 種藥品

B 組包含：桂枝茯苓湯、桃仁、丹皮、雙和湯（中國）、雙和湯（韓國），共 5 種藥品

我們事先測試萃取過程會用到之 75%酒精、95%酒精及純水，觀察其抑菌效果從表 7 可知，兩種濃度之酒精及純水不會對菌株產生抑制效果。

表 6 對照組抑菌結果

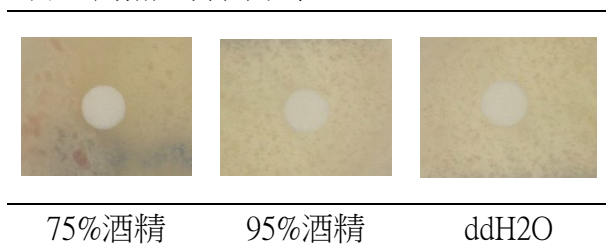


表 7 藥品位置示意圖

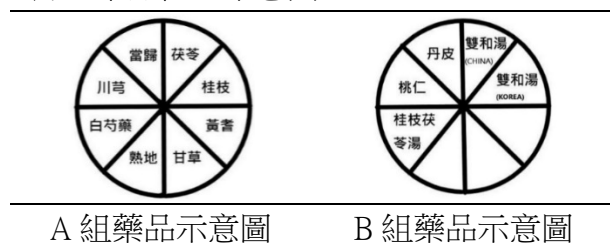


表 8-1 濃度 2mg/mL、20mg/mL 及 200mg/mL 水層萃取物加藥結果

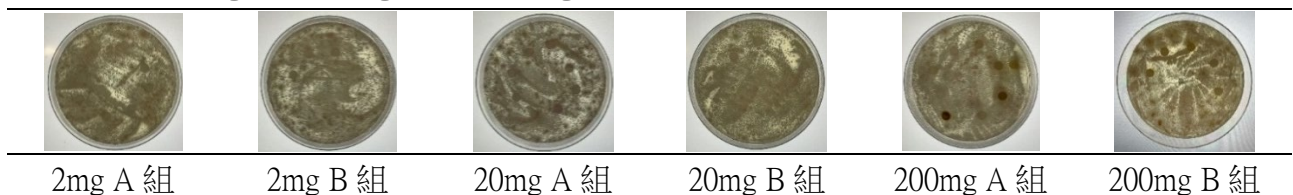


表 8-2 濃度 2mg/mL、20mg/mL 及 200mg/mL 水煮萃取物加藥結果

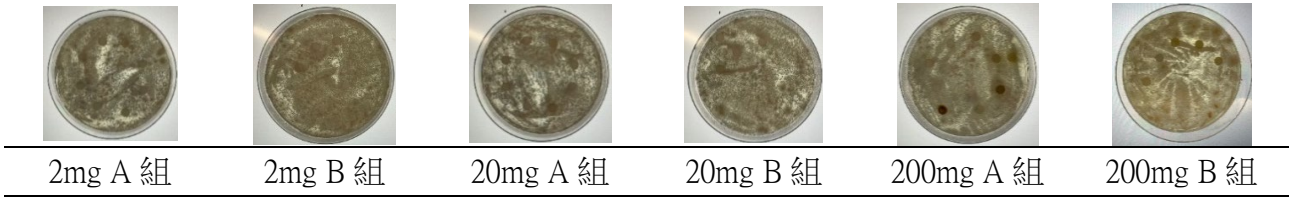


表 8-3 濃度 2mg/mL、20mg/mL 及 200mg/mL 酒精萃取物加藥結果

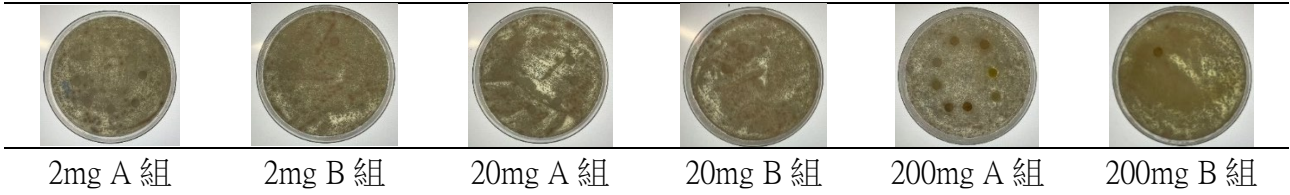
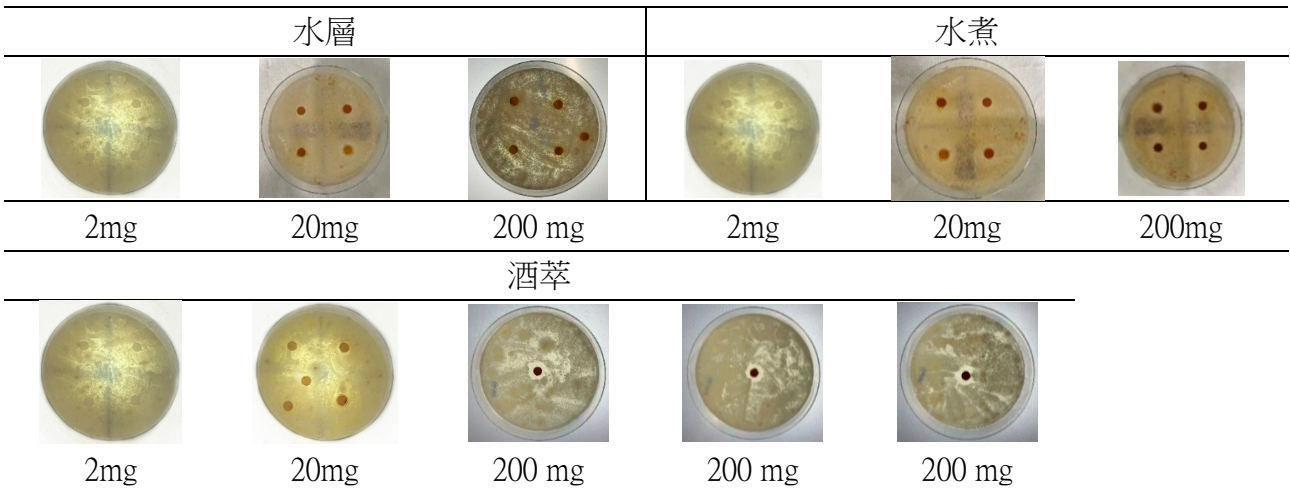
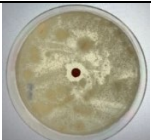




表 8-4 肉桂 2mg/mL、20mg/mL 及 200mg/mL 萃取物加藥結果



由表 8-1 至表 8-4 可判讀，濃度為 2mg/mL、20mg/mL 的所有藥品均無出現抑菌圈。200mg/mL 的濃度中，僅使用酒精萃取的肉桂具有抑菌圈，故以下實驗針對酒萃肉桂進行研究。透過 imageJ 計算，抑菌圈平均大小為 101.917 (mm<sup>2</sup>)。

表 9 濃度 200mg/ml 肉桂酒精萃取物抑菌圈大小計算結果 (mm<sup>2</sup>)

原拍攝相片			抑菌圈				
							
計算結果	100.517	107.147	98.087	平均	101.917	標準差	4.689

### 三、肉桂抑菌效果測試

#### (一) 藥效時間及藥效間隔

將實驗一中有有效的酒萃肉桂延長觀察時間，以 24hr 為一個觀察單位，紀錄觀察，用來了解藥物能夠抑制菌株的有效時間。

表 10-1 200mg/ml 肉桂酒精萃取物藥效時間觀察

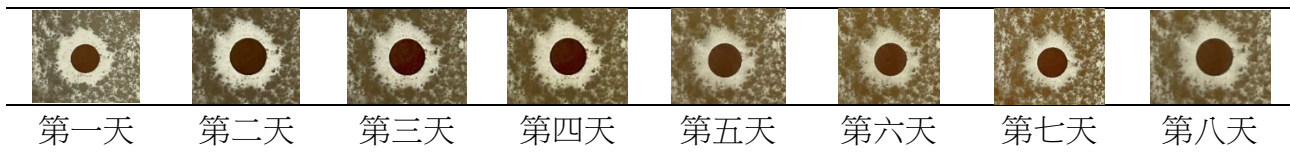


表 10-2 200mg/ml 肉桂酒精萃取物八天抑菌圈計算結果 (mm<sup>2</sup>)

天數	數據一	數據二	數據三	平均	標準差
第一天	100.517	107.147	98.087	101.917	4.689
第二天	99.601	107.453	98.712	101.922	4.811
第三天	100.479	106.651	98.126	101.752	4.403
第四天	99.049	106.343	97.856	101.083	4.594
第五天	97.972	105.233	96.432	99.879	4.700
第六天	95.186	104.752	95.032	98.323	5.567
第七天	94.986	103.436	93.275	97.232	5.440
第八天	94.876	102.854	92.367	96.699	5.476

表 10-3 200mg/ml 肉桂酒精萃取物計算結果 (mm<sup>2</sup>)

	平均	標準差
第一天	101.917	4.68945
第八天	96.699	5.47602

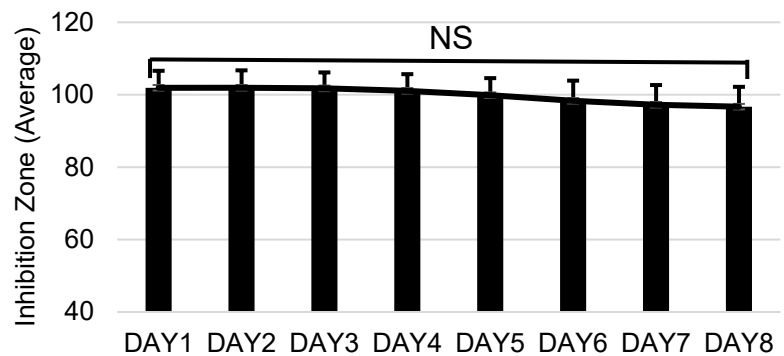


圖 2 200mg/ml 肉桂萃取物抑菌圈平均大小 藥效時間觀察

從描述性統計的表格來看，第一天的抑菌圈比第八天的來的大，第八天的抑菌圈相較第一天為分散。同質性檢定無顯著性差異。配對 t 檢定中，無顯著差異 (0.278； >0.05)，顯示抑菌圈大小第一天到第八天無顯著變化。

## (二) 最低抑制濃度及濃度相關性測試

目前我們配置的方法，酒萃肉桂回溶的最高飽和濃度為 328.15mg/ml，為了進一步證實抑菌功效，進行濃度相關性實驗。第一階段試驗 200、150、100、50mg/ml 四個濃度，觀察抑菌圈大小。

表 11-1、200、150、100、50mg/ml 抑菌結果


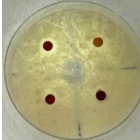
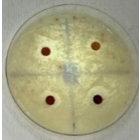
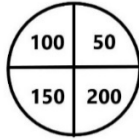



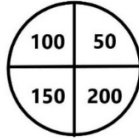
			
200、150、100、50mg/ml 24 小時生長結果			示意圖
			
200、150、100、50mg/ml 72 小時生長結果			示意圖

表 11-2 200、150、100、50mg/ml 之肉桂酒精萃取物 imageJ 計算抑菌圈大小結果 (mm<sup>2</sup>)

濃度	數據一	數據二	數據三	平均	標準差
200mg/ml	104.487	100.462	106.486	103.812	3.068
150mg/ml	88.965	84.742	90.265	87.991	2.888
100mg/ml	72.354	68.125	74.541	71.673	3.262
50mg/ml	56.258	52.984	58.635	55.959	2.837

由表 11-1 及 11-2 可知酒萃肉桂在這四個濃度皆有抑菌圈，200 mg/ml 的組別最為顯著，50mg/ml 最不明顯。

第二階段測試 25、30、35、40、45 mg/ml 及 328.15 mg/ml 兩個組別，尋找最低有效抑制濃度及驗證濃度相關性。

表 12-1 20、25、30、35、40、45 mg/ml 抑菌結果

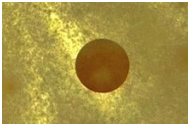
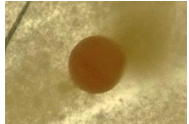
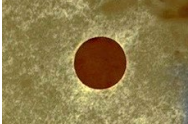
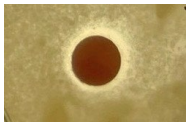
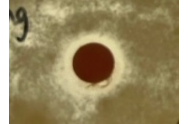
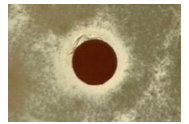
20mg/ml	25mg/ml	30mg/ml	35mg/ml	40mg/ml	45mg/ml
					

表12-2 25、30、35、40、45 mg/ml 抑菌圈大小計算結果 (mm<sup>2</sup>)

濃度	數據一	數據二	數據三	平均	標準差
45mg/ml	48.398	44.165	50.266	47.610	3.126
40mg/ml	40.156	36.756	42.741	39.884	3.002
35mg/ml	31.984	28.652	34.845	31.827	3.099



表 13 35mg/ml 與各濃度多重比較表

比較對象		顯著性
35mg/ml	40mg/ml	0.006
	45mg/ml	<0.001
	50 mg/ml	<0.001
	100mg/ml	<0.001
	150mg/ml	<0.001
	200mg/ml	<0.001

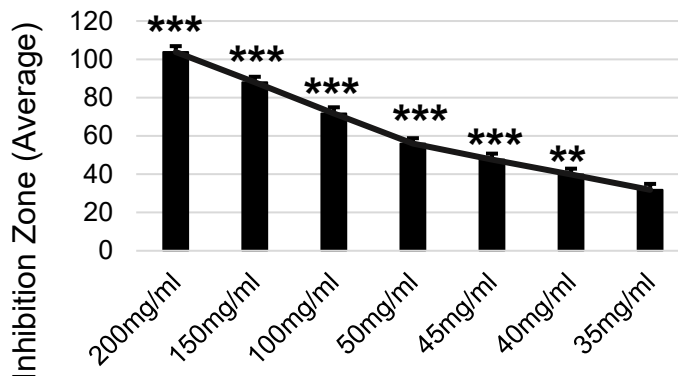


圖 3 不同濃度平均抑菌變化(相較 35mg/ml 之顯著性)

表 13 及圖三顯示，抑菌圈大小呈現濃度相關性擴大，達顯著差異 (\*\*代表  $p < 0.01$ ，\*\*\*代表  $p < 0.001$ )。

表14 濃度相關性迴歸分析結果

模型摘要		變異數分析		係數	
R	R <sup>2</sup>	F	顯著性	$\beta$	常數
0.969	0.939	292.034	0.000	0.969	27.458

方程式

$$y \text{ (面積)} = 0.398x \text{ (濃度)} + 27.458$$

透過濃度相關性迴歸分析，得到抑菌圈面積與藥物濃度的方程式。濃度對於抑菌圈面積的解釋力高達93.9%。

表15-1 328.15 mg/ml 抑制結果



表15-2 328.15 mg/ml 抑菌圈大小計算結果 (mm<sup>2</sup>)

	數據一	數據二	數據三	平均	標準差
328.15mg/ml	147.412	138.621	141.854	142.629	4.446

### (三)加藥時間不同對抑菌效果之影響

將尖孢镰刀菌移至 Agar 培養後，粗略可以分為三個階段，剛塗完盤後呈現透明混濁感，培養 24 小時後已看的到灰白菌落，48 小時後會呈現粉紅色，推測是菌株生長的完整性、菌量不同造成的。我們在塗盤後 0、24、48、72 小時加藥做觀察。

表16 328.15 mg/ml不同加藥時間之抑菌圈

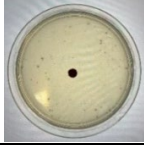


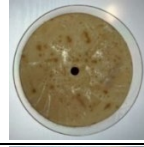
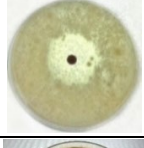
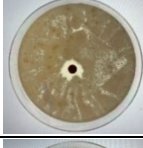
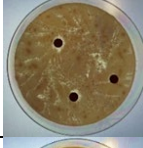

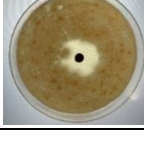

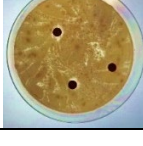

	塗盤當下加藥	塗盤後 24 小時加藥	塗盤後 48 小時加藥	塗盤後 72 小時拍照
24 小時				
48 小時				
72 小時				

表 17-1 塗盤當下加藥抑菌圈大小計算結果 (mm<sup>2</sup>)

	數據一	數據二	數據三	平均	標準差
24 小時	7853.982	7853.982	7853.982	7853.982	0
48 小時	700.965	711.423	706.412	706.267	5.231
72 小時	250.084	259.375	254.781	254.747	4.646

(24 小時數據在三重複實驗中均無觀察到菌株生長，視為完全抑制，以菌盤大小做計算)

表 17-2 塗盤當下加藥時間相關性 t 檢定統計表

多重比較		
比較對象		顯著性
加藥 24 小時	加藥後 48 小時	<0.001
	加藥後 72 小時	<0.001
加藥後 48 小時	加藥後 72 小時	<0.001

同質性檢定顯著差異，依照觀測時間不同做兩兩比較，均呈現顯著差異 (\*\*\*)代表  $p < 0.001$ )

表 18-1 塗盤後 24 小時加藥抑菌圈大小計算結果 (mm<sup>2</sup>)

	數據一	數據二	數據三	平均	標準差
24 小時	138.621	147.412	141.854	142.629	4.446
48 小時	138.453	146.248	140.642	141.781	4.020
72 小時	135.961	143.978	139.064	139.668	4.042

表 18-2 時間相關性 t 檢定統計表

多重比較		
比較對象		顯著性
加藥 24 小時	加藥後 48 小時	0.811
	加藥後 72 小時	0.448
加藥後 48 小時	加藥後 72 小時	0.594

同質性檢定無顯著差異，依照觀測時間不同做兩兩比較，亦無顯著差異。

表 19-1 塗盤後 48 小時加藥抑菌圈大小計算結果 (mm<sup>2</sup>)

時間	數據一	數據二	數據三	平均	標準差
24 小時	46.162	30.145	48.673	41.660	10.051
48 小時	46.086	29.942	48.043	41.357	9.934
72 小時	45.974	29.013	47.035	40.674	10.113

表 19-2 塗盤後 48 小時加藥時間相關性 t 檢定統計表

多重比較		
比較對象		顯著性
加藥 24 小時	加藥後 48 小時	0.972
	加藥後 72 小時	0.908
加藥後 48 小時	加藥後 72 小時	0.936

同質性檢定無顯著差異，依照觀測時間不同做兩兩比較，亦無顯著差異。

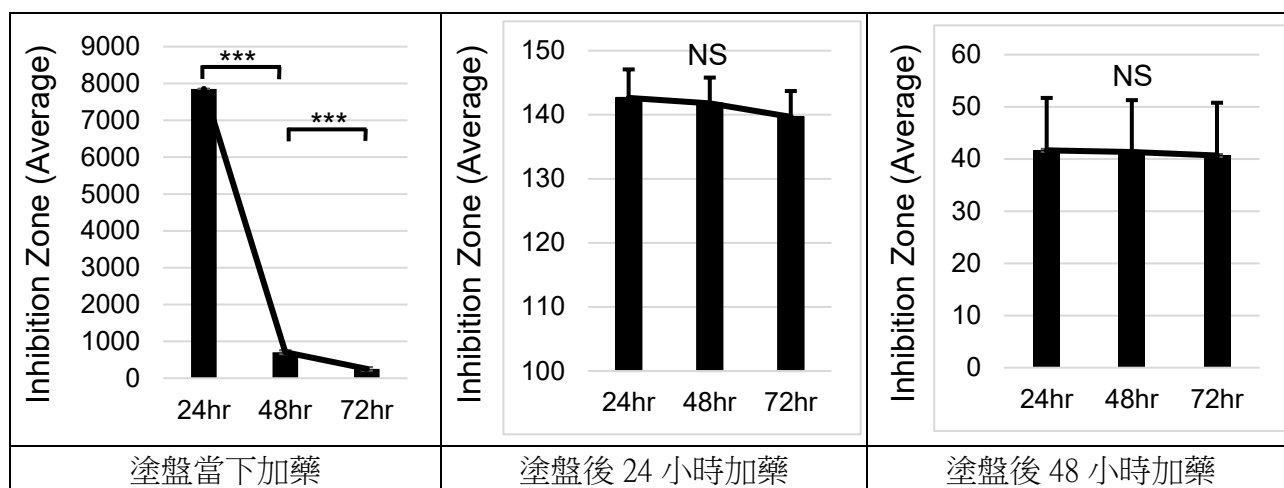


圖 4 不同加藥時間平均抑菌圈大小及時間相關性比較圖 (註:\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$ , \*\*\*代表  $p < 0.001$ , NS 代表無顯著差異)

從表 16 至表 19-2 及圖 4 可知，塗盤當下加藥在 24 小時後有顯著的抑制效果，在 48 小時及 72 小時的觀察紀錄中，抑菌圈呈現衰退的趨勢；隨著加藥時間點的延後，抑菌圈的大小也越小，結果顯示塗盤當下加藥的組別，抑菌圈較無隨著時間縮小的情況。塗盤後 72 小

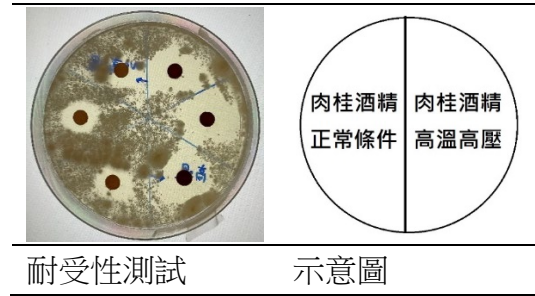


時加藥，則觀察不到任何抑菌圈。

#### (四) 藥物耐受性測試

在前期的實驗中，為避免高溫破壞藥物活性，所有需要加溫之過程皆控制在 60°C 以下。我們將未知濃度但已確定有抑制效果之藥品放入滅菌鍋(120°C，2atm)，測試此藥品在高溫高壓下之活性是否被破壞。

表 20 藥物耐受性測試結果



由表 20 可知，高溫高壓下，藥物還是有抑菌效果，推測有效抑制菌株生長的成分其沸點較高，不受影響。

#### 四、HPLC 藥物成分分析

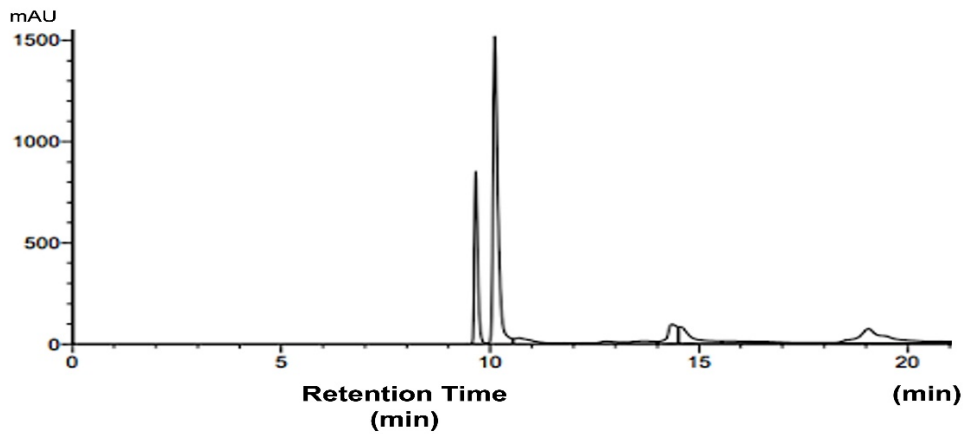


圖 5 肉桂酒精萃取物 HPLC 層析結果 (筆者自行實驗結果)

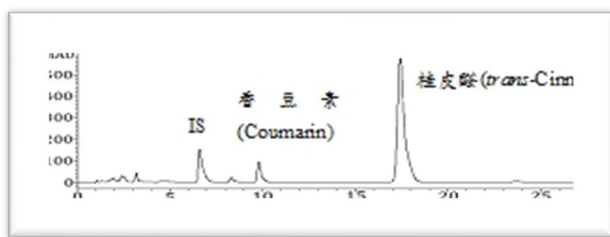


圖 6 市售肉桂 HPLC 層析結果  
(參考自國家中醫藥研究所)

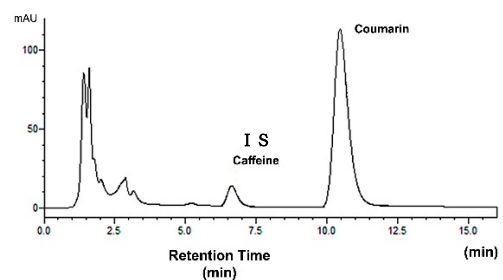


圖 7 香豆素標準品 HPLC 層析結果  
(筆者自行實驗結果)

由圖 5 至圖 7 可知，我們的肉桂酒精萃取物在 9 分鐘時有一支吸光值約為 850mAU 的波峰，10 分鐘時有一支吸光值約為 1500mAU 的波峰，14 分鐘及 19 分鐘各有一支吸光值約為 150mAU 的小波峰。參考國家中醫藥研究所進行的市售肉桂 HPLC 層析結果如圖 6；10 分鐘時有一支吸光值約為 100 mAU 的波峰為香豆素，及自行實驗香豆素標準品 HPLC 層析結果如圖 7；11

分鐘時有一支吸光值約為 110 mAU 的波峰為香豆素，和我們的肉桂酒精萃取物結果如圖 5 進行比較，可得知我們的肉桂萃取物主要成分為香豆素，故推測抑制尖孢镰刀菌生長的主要成分為香豆素。

## 五、肉桂酒精萃取物對植物生長影響之測試

玉米成株的試驗總共進行三十二天，第十五天後開始第一次加藥。

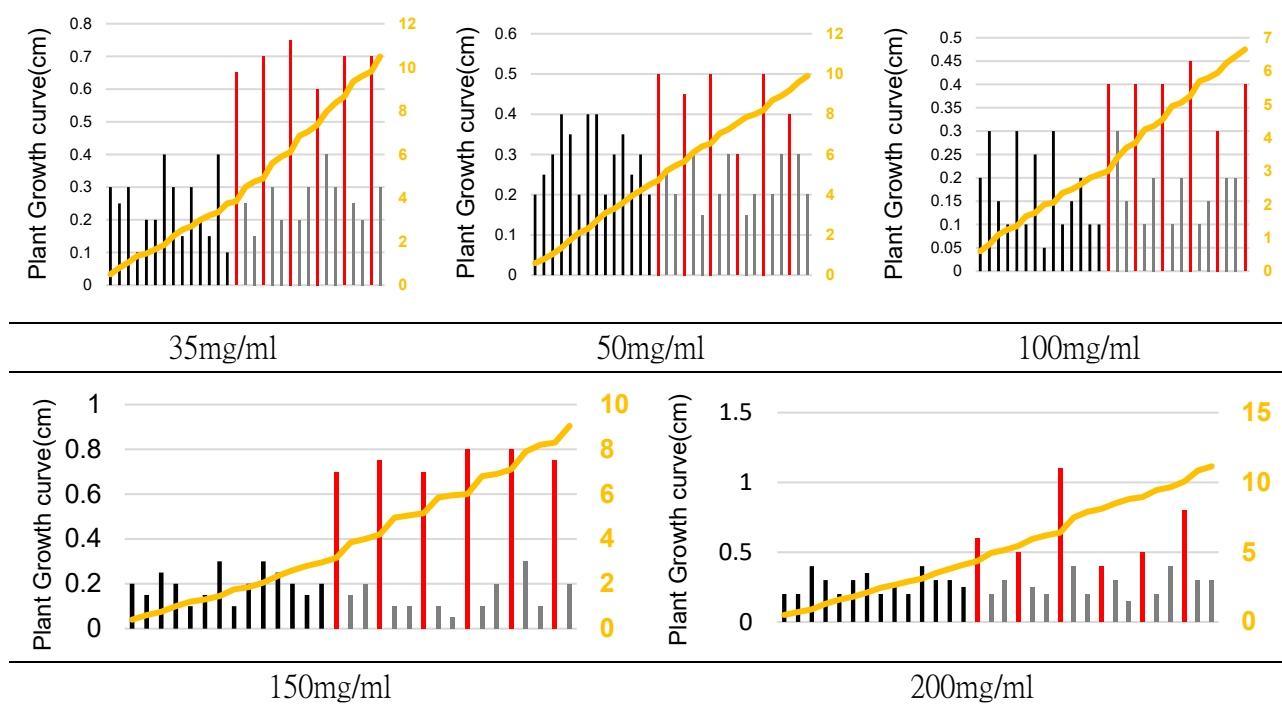


圖 8 玉米植株生長曲線

(註:柱狀圖為每日生長變化量，黑柱為加藥前生長情形，紅柱為加藥隔日的生長量，灰柱為加藥後二三日生長情形，橘色曲線代表植株生長曲線。左右座標軸單位皆為「cm」)

表 21-1、無加藥與加藥組別 (35mg/ml) 比較分析表

無加藥 (n=14)		平均數: 0.2393 標準差: 0.09841	加藥 (n=17)		平均數: 0.4088 標準差: 0.21811
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
17.981	<0.001		-2.870	23.147	0.009

比較分析無加藥組(n=14)與加藥組(n=17)的每日生長量平均值(\*\*代表  $p < 0.01$ , 標準差=0.22)

。結果顯示加藥濃度 35mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 21-2、無加藥與加藥(35mg/ml)隔日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均數: 0.2393 標準差: 0.09841	加藥隔日生長量 (n=6)		平均數: 0.6833 標準差: 0.05164
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
3.963	0.062		-10.347	18	<0.001

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=6) 的每日生長量平均值 (\*\*\*)代表  $p < 0.01$ , 標準差 =0.05)。結果顯示加藥濃度 35mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 21-3、無加藥及加藥 (35mg/ml) 後第 2、3 日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均數: 0.2393 標準差: 0.09841	扣除加藥每日生長量 (n=11)		平均數: 0.2591 標準差: 0.07006
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
2.170	0.154		-0.564	23	0.579

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=11) 的每日加藥後生長量平均值，無顯著差異。

結果顯示加藥濃度 35mg/ml 不會抑制玉米生長。

表 22-1、無加藥與加藥組別 (50mg/ml) 比較分析表

無加藥 (n=14)		平均數: 0.2929 標準差: 0.07810	加藥 (n=18)		平均數: 0.3000 標準差: 0.12127
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
1.840	0.185		-0.191	30	0.850

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=18) 的每日生長量平均值，無顯著差異。結果顯示加藥濃度 50mg/ml 不會抑制玉米生長。

表 22-2、無加藥與加藥 (50mg/ml) 隔日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均數: 0.2929 標準差: 0.07810	加藥隔日生長量 (n=6)		平均數: 0.4417 標準差: 0.08010
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
0.045	0.834		-3.877	18	0.001

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=6) 的每日生長量平均值 (\*\*\*)代表  $p < 0.001$ , 標準差 =0.08)。結果顯示加藥濃度 50mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 22-3、無加藥及加藥（50mg/ml）後第 2、3 日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均值: 0.2929 標準差: 0.07810	扣除加藥每日生長量 (n=12)		平均值: 0.2292 標準差: 0.05823
同質性統計		t 檢定			
F	顯著性	t	自由度	顯著性	
1.272	0.271	2.323	24	0.029	

加藥後第 2、3 日生長量平均值小於沒有加藥的 (\*代表  $p < 0.05$ )，有顯著差異。在加藥濃度 50mg/ml 的組別中，加藥後第 2、3 日植物生長量低於無加藥組。

表 23-1、無加藥與加藥組別（100mg/ml）比較分析表

無加藥 (n=14)		平均值: 0.1714 標準差: 0.08708	加藥 (n=16)		平均值: 0.2531 標準差: 0.12446
同質性統計		t 檢定			
F	顯著性	t	自由度	顯著性	
4.303	0.047	-2.103	26.800	0.045	

比較分析無加藥組(n=14)與加藥組(n=16)的每日生長量平均值(\*代表  $p < 0.05$ , 標準差=0.12)。結果顯示加藥濃度 100mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 23-2、無加藥與加藥（100mg/ml）隔日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均值: 0.1714 標準差: 0.08708	加藥隔日生長量 (n=6)		平均值: 0.3917 標準差: 0.04916
同質性統計		t 檢定			
F	顯著性	t	自由度	顯著性	
5.331	0.033	-7.167	16.213	<0.001	

比較分析無加藥組(n=14)與加藥組(n=6)的每日生長量平均值(\*\*\*)代表  $p < 0.001$ , 標準差=0.05)。結果顯示加藥濃度 100mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 23-3、無加藥及加藥（100mg/ml）後第 2、3 日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均值: 0.1714 標準差: 0.08708	扣除加藥隔日生長量 (n=10)		平均值: 0.1700 標準差: 0.06325
同質性統計		t 檢定			
F	顯著性	t	自由度	顯著性	
2.414	0.135	0.044	22	0.965	

比較分析無加藥組(n=14)與加藥組(n=10)的每日加藥後生長量平均值，無顯著差異。結果顯示加藥濃度 100mg/ml 不會抑制玉米生長。

表 24-1、無加藥與加藥組別 (150mg/ml) 比較分析表

無加藥 (n=14)		平均值: 0.1964 標準差: 0.06344	加藥 (n=17)		平均值: 0.3588 標準差: 0.30426
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
56.568	0.000		-2.145	17.673	0.046

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=17) 的每日生長量平均值 (\*代表  $p < 0.05$ , 標準差=0.30)。

結果顯示加藥濃度 150mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 24-2、無加藥與加藥 (150mg/ml) 隔日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均值: 0.1964 標準差: 0.06344	加藥隔日生長量 (n=6)		平均值: 0.7500 標準差: 0.04472
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
0.624	0.440		-19.280	18	0.000

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=17) 的每日生長量平均值 (\*\*\*)代表  $p < 0.001$ , 標準差=0.04)。結果顯示加藥濃度 150mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 24-3、無加藥及加藥 (150mg/ml) 後第 2、3 日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)		平均值: 0.1964 標準差: 0.06344	扣除加藥每日生長量 (n=11)		平均值: 0.1455 標準差: 0.07230
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
0.507	0.483		1.876	23	0.073

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=11) 的每日加藥後生長量平均值，無顯著差異。結果顯示加藥濃度 150mg/ml 不會抑制玉米生長。

表 25-1、無加藥與加藥組別 (200mg/ml) 比較分析表

無加藥 (n=14)		平均值: 0.2750 標準差: 0.07272	加藥 (n=18)		平均值: 0.3944 標準差: 0.24186
同質性統計			t 檢定		
F	顯著性		t	自由度	顯著性
6.033	0.020		-1.983	20.814	0.061

比較分析無加藥組 (n=14) 與加藥組 (n=18) 的每日生長量平均值，無顯著差異。結果顯示加藥濃度 200mg/ml 不會抑制玉米生長。

表 25-2、無加藥與加藥（200mg/ml）隔日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)	平均值: 0.2750 標準差: 0.07272	加藥隔日生長量 (n=6)	平均值: 0.6500 標準差: 0.25884	
同質性統計		t 檢定		
F	顯著性	t	自由度	顯著性
13.079	0.002	-3.490	5.342	0.016

比較分析無加藥組(n=14)與加藥組(n=6)的每日生長量平均值(\*代表  $p < 0.05$ , 標準差=0.26)。結果顯示加藥濃度 200mg/ml 不會抑制玉米生長，反而促進玉米生長的效果。

表 25-3、無加藥及加藥（200mg/ml）後第 2、3 日生長量比較分析表

無加藥每日生長量 (n=14)	平均值: 0.2750 標準差: 0.07272	加藥隔日生長量 (n=10)	平均值: 0.2600 標準差: 0.0277	
同質性統計		t 檢定		
F	顯著性	t	自由度	顯著性
0.477	0.497	0.458	22.000	0.652

比較分析無加藥組(n=14)與加藥組(n=10)的每日加藥後生長量平均值，無顯著差異。結果顯示加藥濃度 200mg/ml 不會抑制玉米生長。

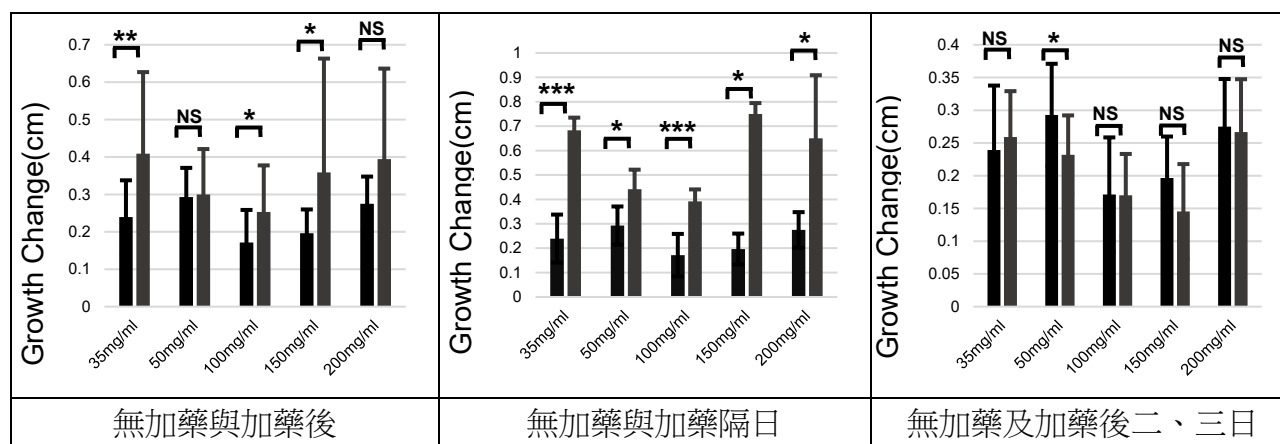


圖 9、不同濃度對玉米植株生長量影響比較圖 (cm)

(註:\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$ , \*\*\*代表  $p < 0.001$ , NS 代表無顯著差異)

表 26 不同濃度加藥前後生長量差值成對比較

濃度	35	50	100	150	200
50	**		NS	**	**
100	**	NS		***	*
150	NS	**	***		NS
200	NS	**	*	NS	

(註:\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$ ,

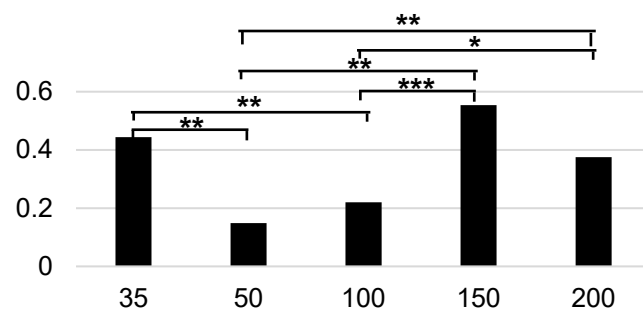


圖 10 不同濃度加藥前後生長量差值比較

\*\*\*代表  $p < 0.001$ , NS 代表無顯著差異)

由表 26 及圖 10 顯示，每個濃度的藥物對於玉米皆有顯著促進生長，其中 35mg/ml、150 mg/ml 及 200mg/ml 的濃度下，生長變化的增加量皆大於 50mg/ml 及 100mg/ml 的組別，並且呈現顯著性差異。35mg/ml、150mg/ml 及 200mg/ml 三者之間藥效並沒有顯著差異。

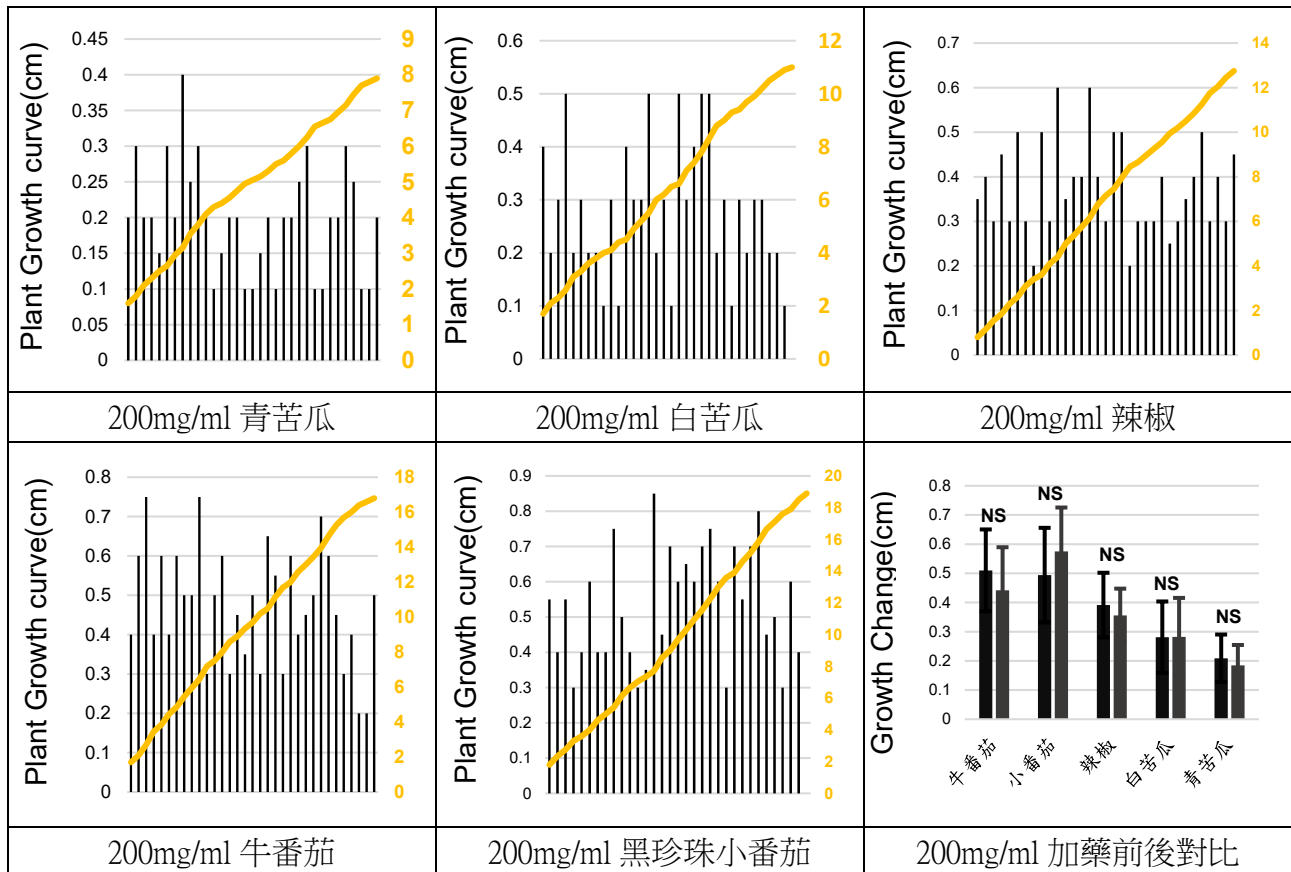


圖 11 五種作物 200mg/ml 組別生長曲線及加藥前後平均生長量比較

(註:柱狀圖為每日生長變化量，黑柱為加藥前生長情形，橘色曲線代表植株生長曲線。左右座標軸單位皆為「cm」)

## 伍、討論

### 一、有效藥物篩選

本實驗測試 11 種藥材，3 種複方，每種 3 個萃取方法，總共 39 種的藥品，在 2mg/ml、20 mg/ml、200 mg/ml 三種濃度下測試抑制尖孢镰刀菌生長的能力，研究結果中，200 mg/ml 的酒萃肉桂具有最佳抑制效果。選擇這些藥材是因為我們提出「抑制 MAPK 通路可能有助於抑制尖孢镰刀菌」的假設，所以選擇了兩種被證實能夠抑制 MAPK 的複方中藥做測試，並且將其成分分開萃取判斷主要的有效成分。從複方的組成成分來看，僅雙和湯具有肉桂的成分，桂枝茯苓湯則無，推測肉桂是使得雙和湯有抑制 MAPK 特性的主要成分。桂枝茯苓湯中能夠抑制 MAPK 的成分在用來抑制尖孢镰刀菌生長時並無明顯的效用，可以推論出兩種假設：第一種是「桂枝茯苓湯抑制的信號通路與尖孢镰刀菌生長相關之通路不同」，這點目前受限於我們的技術尚無法得到驗證；第二種是「桂枝茯苓湯能夠抑制 MAPK 的成分含量過低」，這點在設法提高藥物濃度後可能有不同的結果，在未來可以深入研究。另外，理論上以酒精萃取的雙和湯也應該出現抑菌圈，實際上則觀察不到，這點如果從成分比例來看的話，肉桂在韓國及中國的複方分別僅佔 8.4%和 9.375%，再考量到萃取率的部分的話，肉桂在複方中的濃度就明顯過低了，推測這是導致酒精萃取的雙和湯並無出現抑菌圈之原因。

### 二、肉桂酒精萃取物對尖孢镰刀菌有抑制效果

本次實驗有效之觀察最長天數為 8 天，而第八天之抑菌效果和第一天相比僅有小幅衰退。此藥物呈現濃度相關性之特性，不過越早給藥之組別藥效有明顯度幅度的衰退，最後衰退至和塗盤後 24 小時加藥之組別差不多的抑菌圈大小；另外在測試「越晚給藥」的部分的測試中，肉桂酒精萃取物在菌株生長兩天的菌盤中仍有抑制效果，超過菌株生長三天後投藥則看不到任何抑制效果，這點應該跟菌株生長的完整性及數量相關，這可以在未來作為研發抑制劑時作為參考，肉桂酒精萃取物具有預防及治療黃葉病之用途。實驗結果也顯示萃取物功效在高溫高壓處理後仍維持穩定功效，高穩定度的特性，使這個萃取物更具有潛力應用於田間環境，以上針對藥物特性之研究處於分離菌株培養下之研究，在菌株轉移至植物上後之情形可能和分離培養之情況不同，這點需要在未來實驗中進行測試。在這部分實驗穩定的數據呈現下，



用線性回歸的統計方法，在  $R^2=0.939$  的相關性下，得到藥物濃度與抑菌圈大小的方程式，可做為未來製造尖孢镰刀菌防治用藥的參考。

### 三、肉桂水煮、水層、酒精萃取物與香豆素之關係

香豆素易溶於有機溶液，如：乙醇；相反的，不易溶於水，對水的溶解度僅  $1.7\text{g/L}$ ，故推測為肉桂水煮、水層萃取物無法抑制尖孢镰刀菌生長之原因。

### 四、肉桂酒精萃取物主要成分分析

肉桂萃取物含有多種活性成分，包括丁香酚、桂皮醛、肉桂酸和香豆素（Yae JinYoon and Byoung-Mog Kwon, 2021），其中桂皮醛是最具代表性的物質，含量從  $62\% \sim 90\%$  不等（Seyed Fazel Nabavi et al., 2015），因此我們一開始推測桂皮醛是主要抑制尖孢镰刀菌生長的化學成分。

在 HPLC 層析實驗結果圖中，波峰與時間點的對照，在 10 分鐘時出現吸光值約  $1500\text{mAU}$  的波峰，因此我們推測肉桂酒精萃取物的主要成分為香豆素及香豆素衍生物，和香豆素標準品第 10 分鐘出現吸光值約為  $200\text{mAU}$  的波峰相比，肉桂酒精萃取物中的香豆素含量非常高，含量約為市售肉桂的 15 倍；而普遍被認為具抑菌效果的桂皮醛我們推測降解為 14 分鐘與 19 分鐘的兩個小波峰，或在萃取過程中有部分揮發，故不為本實驗萃取物的主要成分。所以香豆素應是使肉桂酒精萃取物具有抑制效果之主要成分，而非普遍被認為有抑菌效果的桂皮醛。

### 五、香豆素與 MAPK 之關聯性

過去研究指出，透過抑制 MAPK 路徑，可抑制尖孢镰刀菌的生長。探討香豆素及香豆素衍生物抑制 MAPK 的可能性，在 Basem M Abdallah et al. (2019) 的研究中顯示：香豆素衍生物 5'-羥基 Auraptene 可通過抑制 MAPK 信號通路抑制腫瘤壞死因子 (RANKL) 誘導的破骨細胞生成，此外，在 Jian Song et al. (2022) 的研究中顯示：香豆素-吡啶衍生物可抑制 MAPK 通路，誘導胃癌細胞凋亡，使細胞週期停滯在  $G2/M$  期。因此，由上述研究可知，許多香豆素衍生物已被證實具抑制 MAPK 的能力，而我們的酒精肉桂萃取物中的主要成分應為可抑制 MAPK 通路之香豆素衍生物，也可推論香豆素為抑制尖孢镰刀菌生長的重要成分。

## 六、藥物濃度對植物生長之影響

劉芸等人(2011)研究中提到苦瓜、辣椒、番茄會受尖孢镰刀菌感染；以及 TM Kolomiets, MIMI Kiseleva, NS Zhemchuzhina, LF Pankratova and SA Elizarova (2022) 研究中提到玉米會受尖孢镰刀菌感染。我們以這四種植物為基礎，以臺灣常見的糯米玉米、牛番茄、黑珍珠小番茄、白苦瓜、青苦瓜、秀香辣椒進行植物成株加藥實驗。

由於尖孢镰刀菌可藉由土壤傳播，且會先附著於植物根部表皮後，再藉由侵入皮層感染植物 (Bishop et al., 1983; Di Pietro et al., 2001)，因此，我們將肉桂酒精萃取物加在植物根部附近的土壤，使尖孢镰刀菌無法藉由土壤傳播及感染植物根部，模擬田間測試時的加藥方式。

經過 16~18 天的觀察，六次的加藥過後，我們發現肉桂酒精萃取物在 35、50、100、150、200 mg/ml 的濃度中皆不會影響作物的生長；且在玉米的生長測試中還進一步觀察到生長促進的現象。在 Dora agri-tech (2021) 的研究提到，海藻萃取物增強植株抗逆性的能力，也可以促進植物生長發育，證明天然萃取物除了防治疾病，也可能對植物有正面影響。

我們在研究過程中曾經嘗試藥物對發芽的影響，因一般種子的發芽率介在四~六成之間，所以沒有辦法有效評估是否為藥物造成的影響；在蔣永正(2009)的研究中提到：根部雖無角質層，但藥劑必須穿越防止水分外流之卡氏帶構造。地下莖、芽則因為沒有類似之角質層屏障，對藥劑的敏感程度也相對提高。因此就目前實驗結果，我們建議在植株生長超過兩週後，可使用肉桂酒精萃取物防治黃葉病，也不影響植株生長；此外，也可以在玉米生長時使用肉桂酒精萃取物，促進植物生長。

## 七、香豆素對植株之影響及促進玉米生長探討

Sebastian F. Beyer et al.(2019)研究了亞洲大豆鑄病(SBR)，並評估了含有香豆素的 scopletin 對其的抑制作用。研究結果顯示，scopletin 能夠抑制亞洲大豆鑄菌 (Pp) 的活性，具有作為天然抑制劑的應用潛力。

Parvin K, Hasanuzzaman M, Mohsin SM, Nahar K and Fujita M. (2021) 的研究中，探討了香豆素對番茄植株在鹽逆境下的影響。他們發現香豆素能夠抑制鹽誘導的活性氧物種 (ROS) 和甲醛 (MG) 的過量累積，減少膜損傷、脂質過氧化和鈉離子 (Na<sup>+</sup>) 毒性，同時改善植物的

生長、生物量含量、光合色素含量、保水性以及鹽度施加後的礦物質穩定性，提高了番茄對鹽逆境的耐受性。

A Lupini et al. (2018) 的研究中，將玉米幼苗暴露在不同濃度的香豆素中，並添加了硝酸鹽，以研究香豆素對玉米吸收硝酸鹽的攝取率的影響。研究發現，香豆素可能通過在基因轉錄中發揮誘導作用，顯著增加了 NNUR、PM H<sup>+</sup>-ATPase 活性以及 ZmNAR2.1 的表達，從而增強玉米根係對硝酸鹽的吸收的能力。硝酸鹽是一種常用來做為植物氮肥的化合物，其中的氮元素可以被植物吸收後轉為有機化合物，對於植物生長有重要影響，能夠促進植物根系生長。從實驗結果及文獻推測，香豆素刺激玉米根部吸收養分的速度，從而提升玉米生長速度。這些研究結果共同顯示了香豆素在植物中的多種正面影響，這些效益對植物的生長和發展具有正向影響，香豆素具有應用於植物生產和保護的潛力。由本研究得知肉桂酒精萃取液，在施用後第一天對玉米生長有顯著的促進效果。未來施用於農藥上時，可以期待具有額外增加促進生長的效益，建議在初次使用時可以觀察作物生長情形並尋找具有最大效益的施用頻率。

#### 八、肉桂酒精萃取物作為天然物抑菌劑之可行性及經濟效益

據聯合國糧食及農業組織估計，全球每年因尖孢镰刀菌引發的巴拿馬病損失的香蕉產量約為 400 萬噸，價值超過 20 億美元。我們認為研發肉桂酒精萃取物作為天然物抑菌劑具有以下優勢：第一，減少作物損失，尖孢镰刀菌對許多農作物造成嚴重損害，因此能夠有效地抑制其生長，可以減少作物損失，提高農作物產量和品質，進而提高農民的收入；第二，減少農藥使用，目前農藥防治尖孢镰刀菌時需要使用大量的農藥，但這些農藥不僅對環境造成污染，也對人類健康產生負面影響。如果以天然物抑菌劑作為非農藥防治策略，減少農藥的使用量，將有益於環境保護和人類健康；第三，增加非農藥防治策略的可行性，我們實驗中發現肉桂酒精萃取物可以抑制尖孢镰刀菌生長，證實天然物抑菌劑之可行性；且對植物成株生長顯無著差異。目前已知最低抑菌濃度為 35mg/ml，且 200mg/ml 均不影響植物生長，在田間施作上有以下建議：

- (一) 使用穴孔盤進行育苗，待根系、卡氏帶等發展成熟，將植株植入田間同時開始施藥。
- (二) 本研究之萃取物在 35mg/ml 的濃度下極有顯著效果，建議可依照實際災情、嚴重程度選擇藥物濃度，可節省施藥成本。

(三) 由本研究得知肉桂酒精萃取液對玉米生長有顯著的促進效果。施用於玉米上時，可以使用 35mg/ml、150mg/ml 或 200mg/ml，額外增加促進生長的效益。

## 陸、結論

### 一、重點研究成果

本研究發現肉桂酒精萃取物對尖孢镰刀菌有抑制效果，且呈現濃度相關性及時間相關性，在高溫高壓環境下也不影響其穩定度。萃取物主要成分為香豆素，經實驗結果證實香豆素為抑制尖孢镰刀菌生長的重要成分。在藥物毒性測試實驗中，肉桂酒精萃取物不影響苦瓜、番茄、辣椒等一般植物生長，並發現其對玉米具有促進生長的效果。肉桂酒精萃取物具有作為非農藥防治策略之可行性及利用價值。

### 二、肉桂酒精萃取物之應用價值

臺灣自 1967 年發現黃葉病後，至今仍無法根除，受感染的土壤需廢耕 30 至 40 年才可再種植香蕉，且每年造成大約 1200 萬美元的農業損失。本研究的肉桂酒精萃取物可以有效的抑制尖孢镰刀菌生長，降低農業損失，具成為天然物藥物之潛力，亦具有相當高的經濟價值。

### 三、未來研究方向及展望

目前研究已證實肉桂酒精萃取物抑制黃葉病之可行性，對於未來產業應用須實施田間測試（小規模栽植、接菌給藥、施藥後產品口感評測、成本分析）、對於藥物量產上市需有萃取物製程標準化，此外，本次研究使用的肉桂來源為越南，未來亦可往在地化發展，探討花蓮光復種植的土肉桂應用於抑制尖孢镰刀菌的可能性，藉由土肉桂可從葉子取出其中成分（如：香豆素、桂皮醛等）且不須進行植物環狀剝皮的特性，做為未來研究方向。透過本研究，我們建立了一個非農藥防治策略天然物抑菌劑開發的模式與平台，未來可以開始關注其他植物病害，透過這次的經驗，發展更多非農藥防治策略的天然物抑菌劑，進一步協助友善的農業發展。

## 柒、參考文獻資料

1. Pietro AD, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MI (2003) . *Fusarium oxysporum*. exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol*, 4 ( 5 ) ,315–25.
2. Di Pietro A, García-MacEira FI, Mègez E, Roncero MI (2001) . A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*, 39( 5 ) , 1140–52.
3. Perincherry L, Lalak-Kańczugowska J, Stepień (2019) .*Fusarium*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins* (Basel) , 11 ( 11 ) , 664.
4. Nunez-Rodriguez JC, Ruiz-Roldán C, Lemos P, Membrives S, Hera C (2020) . The phosphatase Ptc6 is involved in virulence and MAPK signalling in *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol*, 21 ( 2 ) , 206–217.
5. Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Gómez-Lama Cabanás C, Mercado-Blanco J (2019) . Biological Control Agents Against *Fusarium* Wilt of Banana. *Front Microbiol*. Erratum in: *Front Microbiol*, 10, 1290.
6. López-Berges MS, Rispail N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A (2010) . A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell*, 22 ( 7 ) , 2459–75.
7. Zhang M, Zhang S (2022) . Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. *J Integr Plant Biol*, 64 ( 2 ) , 301–341.
8. Segorbe D, Di Pietro A, Pérez-Nadales E, Turrà D (2017) . Three *Fusarium oxysporum* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have distinct and complementary roles in stress adaptation and cross-kingdom pathogenicity. *Mol Plant Pathol*, 18 ( 7 ) , 912–924.
9. Kim A, Yim NH, Im M, Jung YP, Liang C, Cho WK, Ma JY (2013) . Ssanghwa-tang, an oriental herbal cocktail, exerts anti-melanogenic activity by suppression of the p38 MAPK and PKA signaling pathways in B16F10 cells. *BMC Complement Altern Med*, 13, 214.
10. Dai Y, Qiang W, Yu X, Cai S, Lin K, Xie L, Lan X, Wang D (2020) . GuizhiFuling Decoction

inhibiting the PI3K and MAPK pathways in breast cancer cells revealed by HTS<sup>2</sup> technology and systems pharmacology. *Comput Struct Biotechnol J*, 18, 1121–1136.

11. Abdallah BM, Ali EM, Elsayy H, Badr GM, Abdel-Moneim AM, Alzahrani AM (2019) . The Coumarin Derivative 5'-Hydroxy Auraptene Suppresses Osteoclast Differentiation via Inhibiting MAPK and c-Fos/NFATc1 Pathways. *Biomed Res Int*, 2019, 9395146.
12. Song J, Guan YF, Liu WB, Song CH, Tian XY, Zhu T, Fu XJ, Qi YQ, Zhang SY (2022) . Discovery of novel coumarin-indole derivatives as tubulin polymerization inhibitors with potent anti-gastric cancer activities. *Eur J Med Chem*, 238, 114467.
13. Won JB, Ma JY, Um YR, Ma CJ (2010) . Simultaneous determination of five marker constituents in *Ssanghwa tang* by HPLC/DAD. *Pharmacogn Mag*, 6 (22) , 111–5.
14. Wang X, Su P, Hao Q, Zhang X, Xia L, Zhang Y (2022) . A Chinese classical prescription Guizhi-Fuling Wan in treatment of ovarian cancer : An overview. *Biomed Pharmacother*, 153, 113401.
15. Jie Gao, KenzaMamouni, Lei Zhang, Bal L. Lokeshwar (2021) , Spice up your food for cancer prevention: Cancer chemo-prevention by natural compounds from common dietary spices, Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules. Academic Press, 13, 275–308.
16. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients*, (9) , 7729–48.
17. Lupini A, Araniti F, Mauceri A, Princi MP, Sorgonà A, Sunseri F, Varanini Z, Abenavoli MR(2018) . Coumarin enhances nitrate uptake in maize roots through modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Plant Biol (Stuttg)*, 20(2), 390-398.
18. Parvin K, Hasanuzzaman M, Mohsin SM, Nahar K, Fujita M (2021) . Coumarin improves tomato plant tolerance to salinity by enhancing antioxidant defence, glyoxalase system and ion homeostasis. *Plant Biol (Stuttg)*, 23 Suppl 1, 181-192.
19. Beyer SF, Beesley A, Rohmann PFW, Schultheiss H, Conrath U, Langenbach CJG (2019) . The

Arabidopsis non-host defence-associated coumarin scopoletin protects soybean from Asian soybean rust. *Plant J*, 99(3), 397-413.

20. Kolomiets TM, MI Kiseleva MI, Zhemchuzhina NS, Pankratova LF, Elizarova SA. A characteristic of the species composition of pathogenic fungi of the genus *Fusarium* in corn biocenoses of the Voronezh region. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektzii*, 26(6), 583-592.
21. Dora agri-tech (2021) .Application of Seaweed Extract in Agricultural Production , 民國 112 年 6 月 9 日 , 取自 : <https://doraagri.com/application-of-seaweed-extract-in-agricultural-production/>
22. 周浩平和陳以錚 (2016) 。應用液化澱粉芽孢桿菌 PMB01 防治作物土壤傳播性病害。取自 : <https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2504100&print=Y>
23. 黃有才 (2014) 。亞太地區香蕉黃葉病有效防治的研發與政策方向。取自 : <https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2501114>
24. 郭琇真 (2018 年 9 月 15 日) 。你不可不看臺灣香蕉與病害搏鬥半世紀的連續劇—黃葉病。民國 112 年 4 月 12 日農傳媒。取自 <https://www.agriharvest.tw/archives/14631>
25. 謝廷芳和黃鴻章 (2009) 病害防治與植物健康管理。農業試驗所特刊, 143, 91-104。
26. 蔣永正 (2009) 。農作物藥害發生與診斷。民國 112 年 6 月 9 日, 取自 : <https://www.tactri.gov.tw/Uploads/Item/066c3d89-2cd9-4b87-8d1d-a4538fba77db.pdf>
27. 劉芸、朱育菁、陳清西、李智聰、胡桂萍、於曉傑和劉波 (2011) 。灰黃黴素對尖孢镰刀菌抑制作用的研究。中國農學通報, 27(27), 282-287。
28. 國家中醫藥研究所 (無日期) 。市售桂皮檢品之 HPLC 層析。民國 112 年 4 月 10 日。取自 : <http://qatcm.nricm.edu.tw/analysis.php?id=1992>

## 【評語】 052206

- (1) 實驗紀錄完整，且第二次回覆非常用心，並用平板一一回答，對研究有進步的說明和見解。
- (2) 報告內容大致敘述完整、研究目的表達清楚。但研究方法中有些實驗條件描敘不夠完整，研究成果的呈現有顧及到重複性及統計差異，是優點。
- (3) page 23 提到「僅雙和湯具有肉桂的成分，桂枝茯苓湯則無，推測肉桂是使得雙和湯有抑制 MAPK 特性的主要成分」，沒有直接抑制 MAPK 的數據，此推論不適當。
- (4) HPLC 分析條件應一致，標準品的選擇需要再考慮。
- (5) 因為尖孢镰刀菌之菌種複雜多元，文獻中感染香蕉的菌種與感染玉米的不同，或許「藥物濃度對植物生長之影響」可以以香蕉直接實驗。
- (6) 未來玉米的生長效果應加入細菌感染試驗，以得知實際抑菌效果。



# 作品海報

「中藥萃取物抑制尖孢鏽刀菌功效之探討」





# 摘要

黃葉病 (又名巴拿馬病)



尖孢镰刀菌 (Fusarium oxysporum)



分泌毒素



植株死亡

植物萃取物

病蟲害防治

非農藥防治策略

11種藥材

3種複方



95%酒精

純水

水煮

抑菌測試結果中，發現具抑制尖孢镰刀菌生長的功效，結果呈現濃度及時間相關性，最低有效濃度介於30~35 (mg/ml)，藥效時間可持續至少八天，效果的穩定性不因高溫高壓環境處理而受影響。萃取物主要成分為香豆素。此外，使用五種經濟作物進行對植株的毒性測試，在有效濃度下，不影響其生長。另外，也發現對於玉米反而有促進生長的效果。本研究證實，肉桂酒精萃取物具抑制尖孢镰刀菌的功效且在有效濃度下不影響作物生長，甚至可能具有促進生長的效果。

## 壹、研究動機與背景文獻探討

2021年年初，一篇BBC「The 'pandemic' destroying the world's favourite fruit」的新聞吸引了我們的注意。

根據農委會的統計.....



目前防治方法:

- 植物檢疫 品種改良 清除撲殺感染植株

遇到的問題:

- 大量的人力、物力 消費者接受度 法規完整度

非農藥防治--植物萃取物:

- 危害人體、環境 環保 農藥殘留 生態環境的影響

### (一)巴拿馬病介紹及植物死亡機制



### (二)巴拿馬病造成的經濟損失

- 影響物種超過30種 13.7億台幣 廢耕30~40年 遍布全台 影響出口

### (三) MAPK對尖孢镰刀菌之影響

MAPK參與尖孢镰刀菌的發育和引發細胞程序性死亡相關的幾個重要過程

Fmk1 Mpk1 Hog1

細胞週期

### (四)藥材選擇-雙和湯及桂枝茯苓湯

雙和湯及桂枝茯苓湯都是一種傳統複方，前者在中國的《太平惠民和劑局方》和韓國的《東醫寶鑑》均有紀錄；後者在中國的《傷寒卒病論》被記載。傳統用於抗骨質疏鬆和治療婦科腫瘤。

- 雙和湯 抑制MAPK 抑制黑色素瘤細胞(B16F10)黑色素合成 桂枝茯苓湯 調節MAPK 抑制BRCA(遺傳性乳癌基因)

我們的假設:

「抑制MAPK信號通路可能有助於抑制尖孢镰刀菌生長」

### (五)雙和湯配方比例(中國及韓國)

表1、雙和湯配方比例

藥材	中國配方	韓國配方	藥材	中國配方	韓國配方
白芍	31.25%	28.0%	熟地黃	12.5%	11.2%
當歸	12.5%	11.2%	甘草	9.375%	8.4%
黃耆	12.5%	11.2%	肉桂	9.375%	8.4%
川芎	12.5%	11.2%	生薑	三月/6克	4.4%
			棗子	一枚/6克	6.0%

### (六)桂枝茯苓湯配方比例

表2、桂枝茯苓湯配方比例

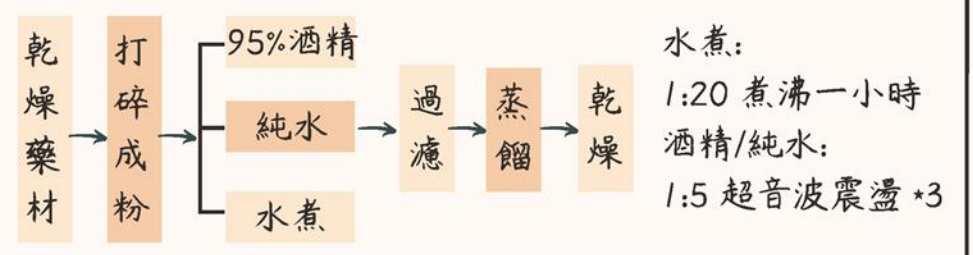
藥材	比例	藥材	比例
桂枝	三錢	丹皮	三錢
茯苓	三錢	芍藥	三錢
甘草	二錢	桃仁	三錢

## 貳、研究目的及方法

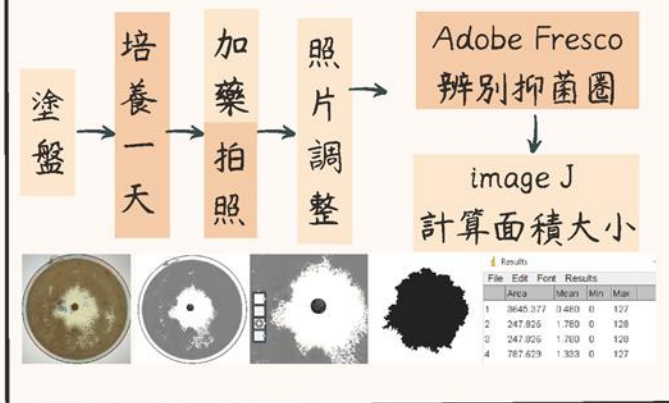
### [研究目的]

- (一)分析三種複方及個別組成中藥對尖孢镰刀菌生長的抑制效果
- (二)篩選出有效藥物後進行功效確認
- (三)分析與推測藥物有效成分
- (四)評估藥物對一般植物生長之影響
- (五)探討天然物對植物病害之可行性及利用價值

### [萃取方法及流程]



### [抑菌測試及抑菌圈計算]



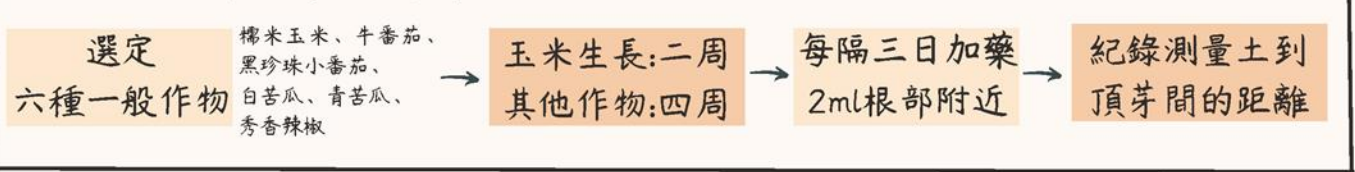
### [HPLC藥物成分分析]

樣品處理: 秤取5 mg酒精萃取物萃取物 加入1 ml酒精回溶,並使用0.45 μm Filter 過濾至樣品瓶。

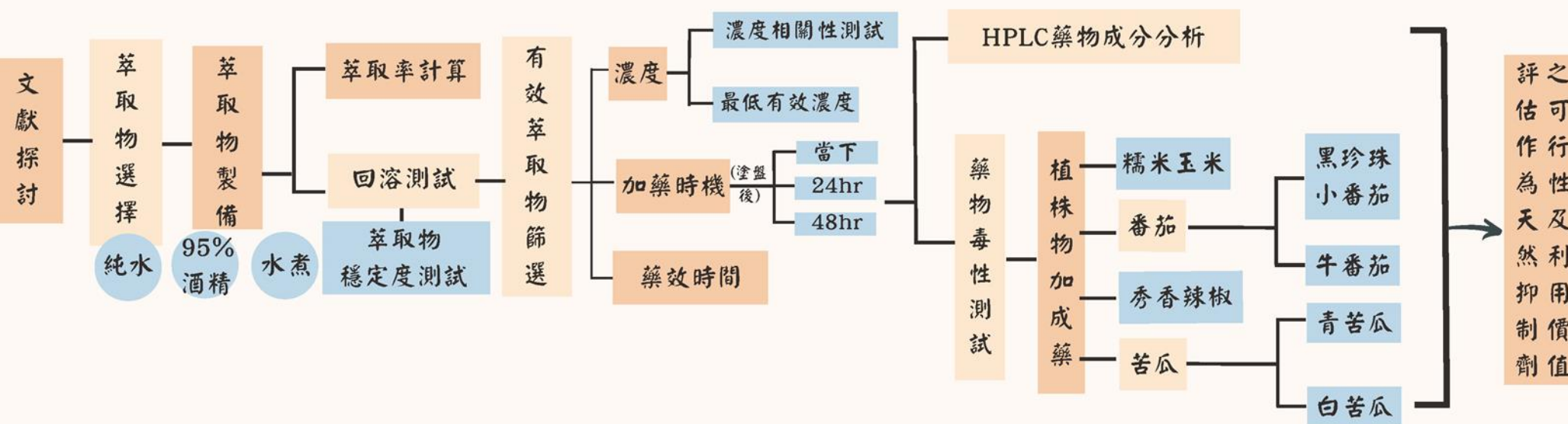
表3、HPLC分析及移動項條件

項目	時間(min)	Acetonitrile(乙腈)(%)	ddH <sub>2</sub> O(%)
分析時間	30 min	0	100
波長範圍	290 nm	10	90
分析量	20 μl	30	75
流速	1 ml/min	管柱: Shimadzu Shim-pack GIST C18, 5 μm, 10 x 250 mm	

### [藥物毒性測試]



## 參、研究架構





# 肆、研究結果

表4、各藥物萃取率

藥物	萃取率	藥物	萃取率
雙和湯(中國)	16.20%	雙和湯(韓國)	15.46%
白芍	15.30%	桂枝茯苓湯	12.00%
黃耆	9.60%	當歸	8.50%
熟地黃	6.60%	川芎	13.20%
肉桂	10.12%	甘草	6.70%
丹皮	12.00%	桂枝	11.20%
芍藥	9.10%		

## 實驗一、有效抑制尖孢鐮刀菌生長藥物篩選

表5、對照組抑菌結果



表6、肉桂2mg/mL、20mg/mL及200mg/mL萃取物加藥結果

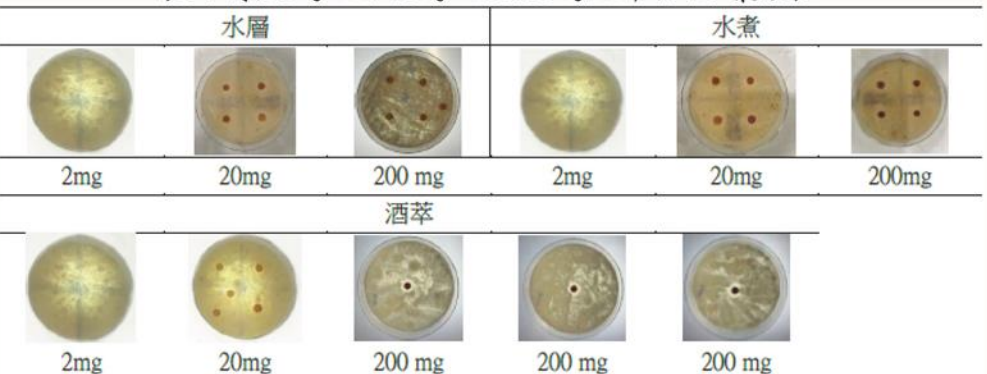


表7、濃度200mg/ml肉桂酒精萃取物抑菌圈大小計算結果 (mm<sup>2</sup>)

原拍攝相片	抑菌圈	計算結果
		100.517
		107.147
		98.087
平均		101.917
標準差		4.689

## 實驗二、藥效時間

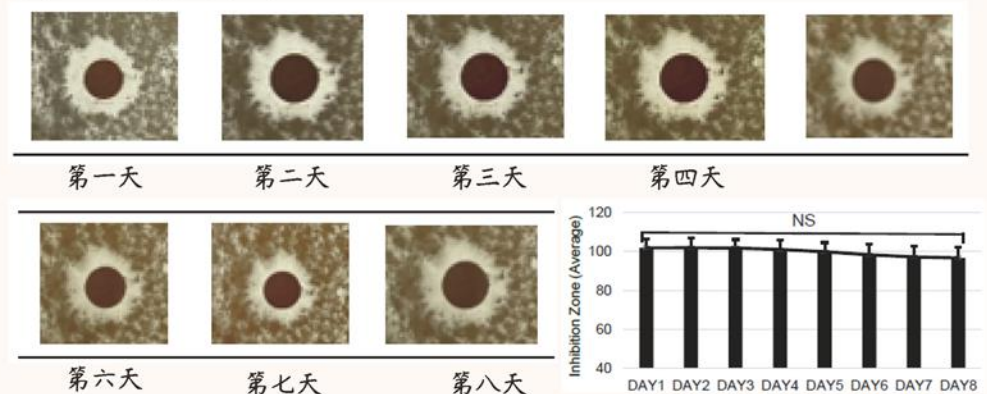


圖1、200mg/ml肉桂酒精萃取物藥效時間觀察

表8、200mg/ml肉桂酒精萃取物藥效時間觀察統計表

同質性統計		配對t檢定		
F	顯著性	t	自由度	顯著性
0.134	0.732	1.254	4	0.278

## 實驗三、最低抑制濃度及濃度相關性測試

表9、200、150、100、50、mg/ml抑菌結果

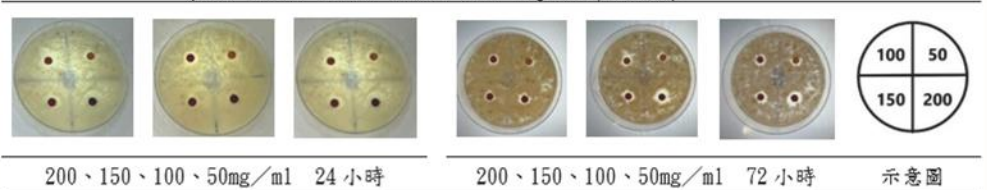


表10、20、25、30、35、40、45mg/ml濃度相關性測試

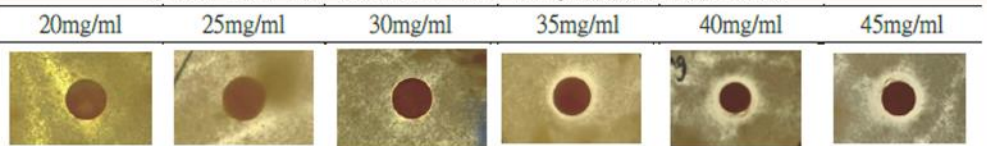


表11、35mg/ml與各濃度多重比較表

比較對象	顯著性
35mg/ml vs 40mg/ml	0.006
35mg/ml vs 45mg/ml	<0.001
35mg/ml vs 50mg/ml	<0.001
35mg/ml vs 100mg/ml	<0.001
35mg/ml vs 150mg/ml	<0.001
35mg/ml vs 200mg/ml	<0.001

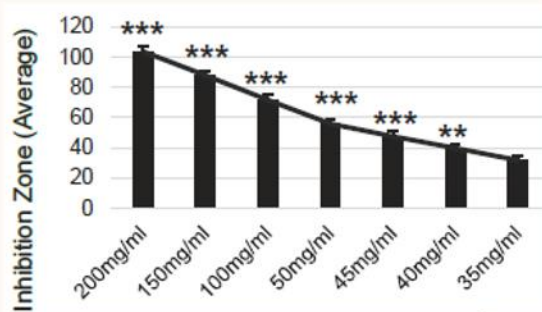


圖2、不同濃度平均抑菌變化 (mm<sup>2</sup>) (\*\*代表 p < 0.01, \*\*\*代表 p < 0.001)

表12、濃度相關性迴歸分析結果

模型摘要		變異數分析		係數	
R	R <sup>2</sup>	F	顯著性	β	常數
0.969	0.939	292.034	0.000	0.969	27.458

方程式  
y (面積) = 0.398x (濃度) + 27.458



圖3、328.15 mg/ml 抑制結果

表13、328.15 mg/ml 抑制結果

328.15mg/ml	平均	標準差
	142.629	4.446

## 實驗四、加藥時間不同對抑菌效果之影響

表14、加藥時間不同抑制效果比較

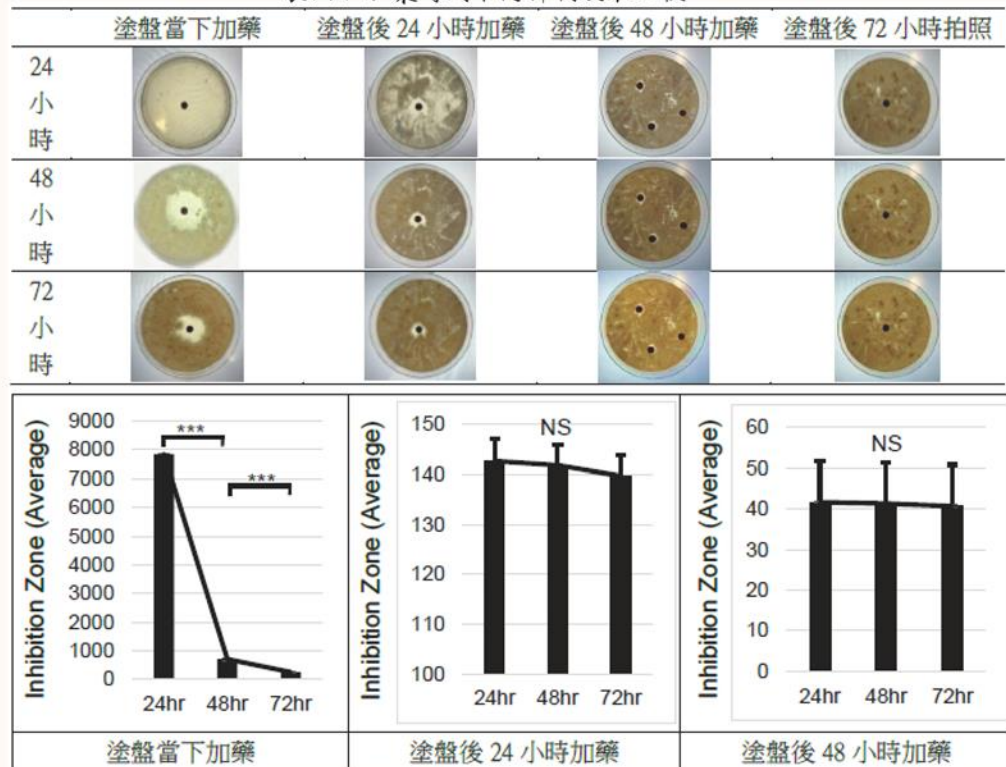


圖4、不同加藥時間平均抑菌圈大小及時間相關性比較圖

## 實驗五、藥物耐受性測試

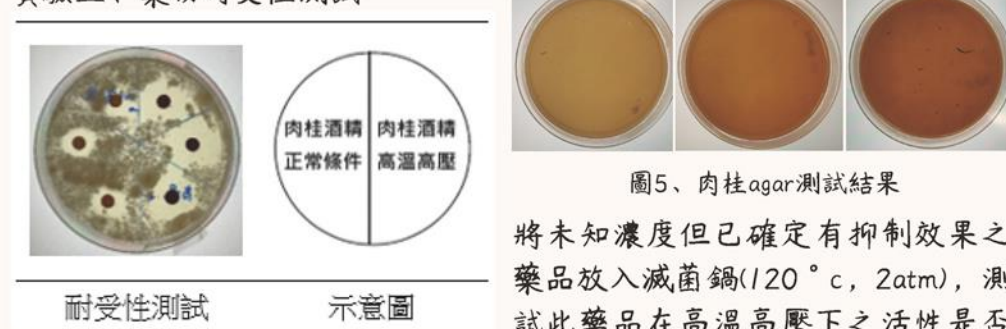


圖6、藥物耐受性測試結果

圖5、肉桂 agar 測試結果

將未知濃度但已確定有抑制效果之藥品放入滅菌鍋(120 °c, 2atm), 測試此藥品在高溫高壓下之活性是否被破壞。

## 實驗六、HPLC藥物成分分析

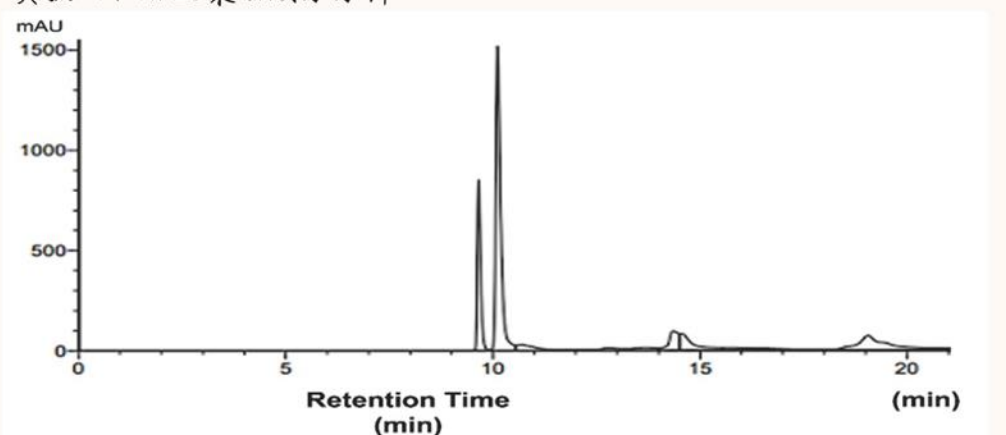


圖7、肉桂酒精萃取物HPLC層析結果(筆者自行實驗結果)

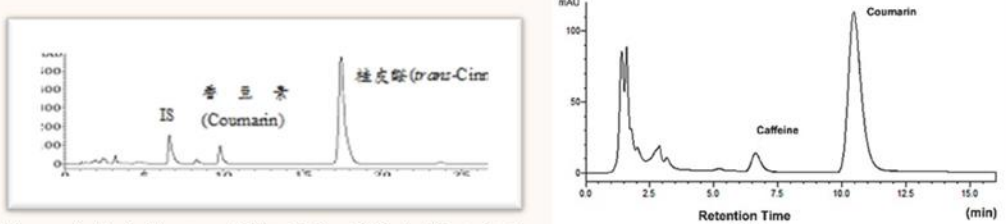


圖8、市售肉桂HPLC層析結果(國家中藥研究所)

圖9、香豆素標準品HPLC層析結果(筆者自行實驗結果)

## 實驗七、藥物毒性測試

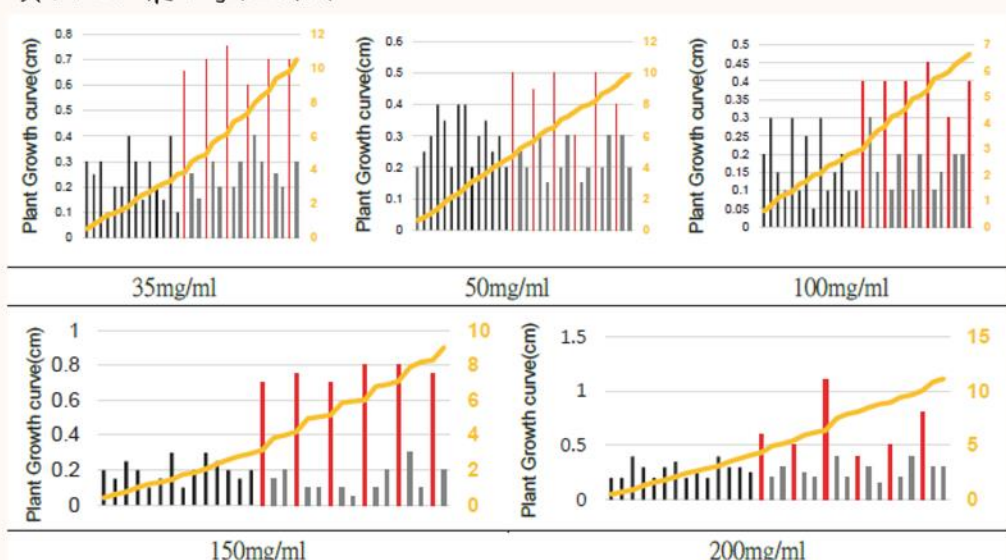


圖10、玉米植株生長曲線

(註:柱狀圖為每日生長變化量, 黑柱為加藥前生長情形, 紅柱為加藥隔日的生長量, 灰柱為加藥後二三日生長情形, 橘色曲線代表植株生長曲線。左右座標軸單位皆為「cm」)



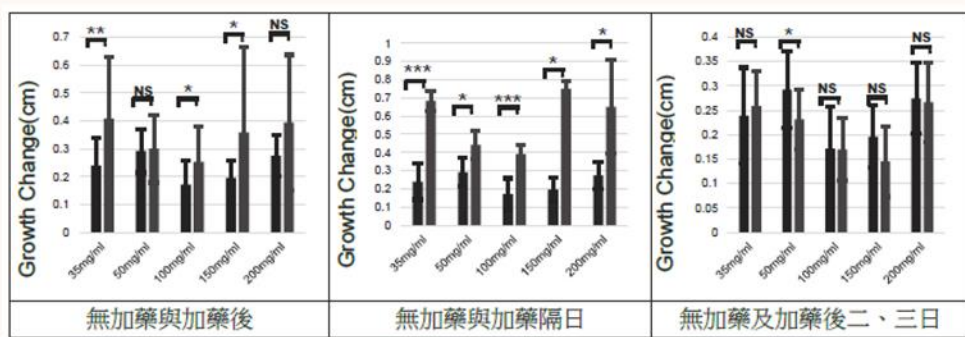


圖 11、不同濃度對玉米植株生長量影響比較圖 (cm)

表 15、不同濃度加藥前後生長量差值成對比較 (註:\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$ , \*\*\*代表  $p < 0.001$ , NS 代表無顯著差異)

濃度	35	50	100	150	200
50	**		NS	**	**
100	**	NS		***	*
150	NS	**	***		NS
200	NS	**	*	NS	

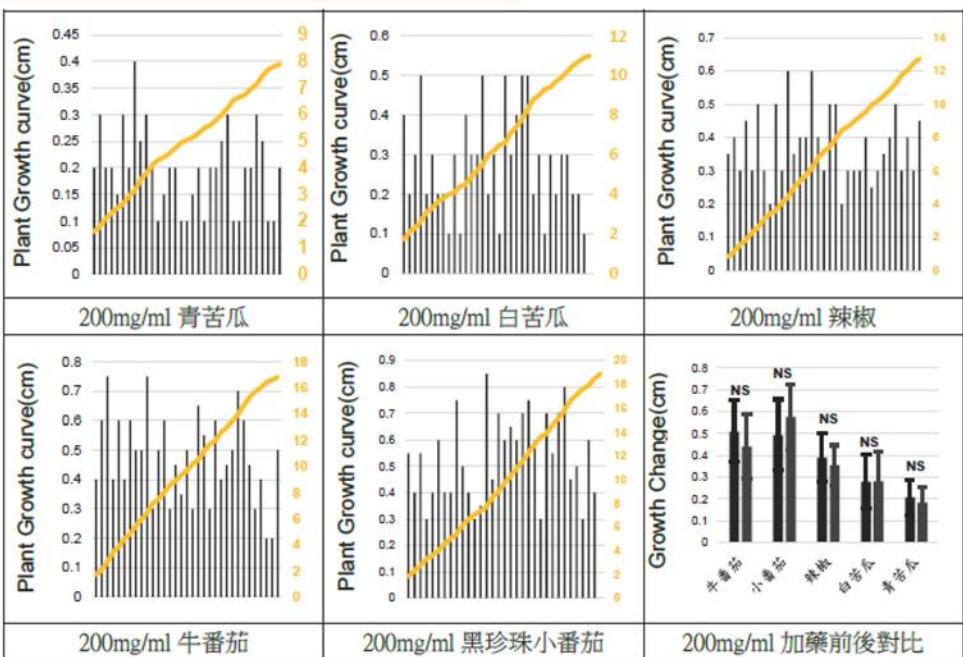
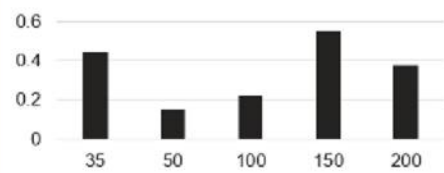


圖 12、五種作物 200mg / ml 組別生長曲線及加藥前後平均生長量比較

## 伍、討論

### (一) 有效藥物篩選

( 11 種藥材 + 3 種複方 ) \* 3 種萃取方法 = 42 種藥物

原因 → 我們提出假設：  
「抑制 MAPK 通路可能有助於抑制尖孢镰刀菌」

選擇 → 兩種被證實能夠抑制 MAPK 的複方中藥做測試

方法 → 將其成分分開萃取判斷主要的有效成分

從複方的組成成分來看：

雙和湯 ✓ 桂枝茯苓湯 ✗ ( 僅雙和湯具有肉桂的成分 )

推測 → 肉桂為抑制 MAPK 的主要成分

桂枝茯苓湯中能夠抑制 MAPK 信號通路的成分在用來抑制尖孢镰刀菌生長時並無明顯的效用，有兩種可能的原因：

- (1) 抑制的信號通路與尖孢镰刀菌生長相關之通路不同
- (2) 桂枝茯苓湯能夠抑制 MAPK 的成分含量過低

以酒精萃取的雙和湯複方觀測不到抑制效果：

推測原因 → 肉桂占比較過低

中國配方 9.375%

韓國配方 8.4%

以其他方式萃取肉桂觀測不到抑制效果：

香豆素易溶於有機溶劑，不易溶於水，對水的溶解度僅 1.7g / L

### (二) 肉桂酒精萃取物對尖孢镰刀菌抑制效果特性

- 比較第一天及第八天之抑菌圈，並無顯著變化

- 加藥時間越早 → 明顯衰退

- 菌株生長兩天 → 顯著抑菌效果      菌株生長三天 → 抑菌效果降低

- 藥物在高溫高壓處理後仍維持穩定功效。

濃度相關性

時間相關性

高穩定度

### (三) 肉桂酒精萃取物成分分析

桂皮醛是最具代表性的物質，含量從 62% ~ 90% 不等 (Seyed Fazel Nabavi et al., 2015)，為起初我們推測抑制尖孢镰刀菌生長的主要化學成分。

HPLC 層析實驗結果圖看：( 對照波峰與時間點 )

香豆素：( 10 分鐘左右 )

國家中研所 → 100mAU 左右      我們的 → 1500mAU 左右

桂皮醛：( 17、18 分鐘 )

國家中研所 → 500mAU 左右

我們的 → 推測降解為 14 分鐘與 19 分鐘的兩個小波峰

推測 → 香豆素應為使肉桂酒精萃取物具有抑制效果之主要成分

### (四) 香豆素與 MAPK 之關聯性

香豆素 抑制 抑制腫瘤壞死因子誘導的破骨細胞生成  
衍生物 MAPK 誘導胃癌細胞凋亡 細胞週期停滯在 G2 / M

呼應假設：

「抑制 MAPK 信號通路可能有助於抑制尖孢镰刀菌生長」

### (五) 香豆素對植物生長之影響

在 2011 年劉芸等人的研究中提到苦瓜、辣椒、番茄會受尖孢镰刀菌感染；2022 年的研究中發現能感染玉米。以臺灣常見的糯米玉米、牛番茄、黑珍珠小番茄、白苦瓜、青苦瓜、秀香辣椒進行植物成株加藥實驗。

經過 16 ~ 18 天的觀察，六次的加藥過後，我們發現肉桂酒精萃取物在 35、50、100、150、200 mg / ml 的濃度中皆不會影響作物的生長；且在玉米的生長測試中還進一步觀察到生長促進的現象。

### (六) 香豆素對植物生長之影響

Sebastian F. Beyer et al. 等人在 2019 年發現含有香豆素的 scopletin 能夠抑制亞洲大豆鏽菌 (Pp) 的活性，具有作為天然抑制劑的應用潛力。

Parvin 等人在 2011 年發現香豆素提高了番茄對鹽逆境的耐受性。A Lupini et al. (2018) 的研究中，發現香豆素可能通過在基因轉錄中發揮誘導作用，增強玉米根系對硝酸鹽的吸收的能力。這些研究結果共同顯示了香豆素在植物中的多種正面影響，香豆素具有應用於植物生產和保護的潛力。

### (七) 肉桂酒精萃取物作為天然物抑菌劑可行性及利用價值

我們認為肉桂酒精萃取物作為天然物抑菌劑具有以下優勢：

第一，透過抑制尖孢镰刀菌生長，減少作物損失；第二，減少農藥使用，將有益於環境人類健康；第三，增加非農藥防治策略的可行性，

施用建議：

1. 使用穴孔盤進行育苗，待根系、卡氏帶等發展成熟，將植株植入田間同時開始施藥。
2. 本研究之萃取物在 35mg / ml 的濃度下有顯著效果，建議可依照實際災情、嚴重程度選擇藥物濃度，可節施藥成本。
3. 由本研究得知肉桂酒精萃取液對玉米生長有顯著的促進效果。施用於玉米上時，可以使用 35mg / ml、150 mg / ml 或 200 mg / ml，額外增加促進生長的效益。

## 陸、結論

### (一) 重點研究結果

本研究發現肉桂酒精萃取物對尖孢镰刀菌有抑制效果，且呈現濃度相關性及時間相關性，在高溫高壓環境下也不影響其穩定度。萃取物主要成分為香豆素，經實驗結果證實香豆素為抑制尖孢镰刀菌生長的重要成分。在藥物毒性測試實驗中，肉桂酒精萃取物不影響苦瓜、番茄、辣椒等一般植物生長，並發現其對玉米具有促進生長的效果。肉桂酒精萃取物具有作為非農藥防治策略之可行性及利用價值。

### (二) 未來展望

未來產業應用須實施田間測試 ( 小規模栽植、接菌給藥、施藥後產品口感評測、成本分析 )、萃取物製程標準化，此外，本次研究使用的肉桂來源地為越南，未來亦可往在地化發展，探討花蓮光復種植的土肉桂應用於抑制尖孢镰刀菌的可能性，抽取土肉桂葉子其中成分不須進行植物環狀剝皮的特性，作為未來研究方向。

柒、參考資料 ( 略 )