

番石榴葉片萃取液對結球白菜軟腐病病原 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 抑菌 能力之評估

莊佩蓉¹⁾ 鍾文鑫²⁾ 林慧玲³⁾

關鍵字：番石榴葉片萃取液、結球白菜、軟腐病、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

摘要：本試驗主要目的為，了解不同品種或種類之番石榴葉片萃取液，對 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 抑菌能力。體外(*in vitro*)抑菌實驗顯示，'榕葉'、'馬來'、'大蒂'、'細葉'、'泰國'和'珍珠'等種類或品種葉片萃取液能夠抑制軟腐病原細菌 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 之生長，其中'榕葉'、'馬來'、'細葉'、'泰國'和'珍珠'具有明顯殺菌能力，進一步對萃取液進行分析，結果顯示具較佳抑菌能力之萃取液，具有較高的總酚含量及 FRAP 抗氧化能力。於體內(*in vivo*)抑菌實驗顯示，將不同品種或種類葉片萃取液處理結球白菜葉片基部後，以'榕葉'、'馬來'和'珍珠'萃取液有較佳的抑病表現。挑選具有較佳抑病能力及較高總酚含量之'榕葉'和'馬來'萃取液進行處理，並以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察其對 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 之影響，結果顯示，當處理'榕葉'或'馬來'萃取液時，*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 生長及形態可與對照組有所差異。

前 言

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* 和 *P. chrysanthemi* 為引起台灣作物細菌性軟腐病之主要病原，其中以 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 為引起結球白菜軟腐病害之主要病原細菌(黃等，2007)，在溫暖潮溼之多雨季節常可造成田間蔬菜嚴重損失，採後

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班學生。
 - 2) 國立中興大學植物病理學系副教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

在不良高溫運輸系統與貯藏環境中，亦會出現軟腐病造成嚴重經濟損失 (Bhat *et al.*, 2010)。細菌性軟腐病可透過化學、物理和生物防治等方式防治，其中以化學農藥為主，然長期施用化學藥劑，不僅導致病原微生物產生抗藥性，亦會對環境與人體造成為害 (Clardy and Walsh, 2004; Rahman *et al.*, 2012)，因此近年來較天然或低毒性的抑菌方式逐漸受到了重視，其中又以植物源防治資材最為受到注目。

番石榴原產於熱帶美洲，可周年開花結果，為台灣地區重要常綠果樹之一。除果實鮮食外，番石榴長久以來一直被作為傳統的藥物，其抗菌活性早被確認，目前番石榴葉片萃取液抗菌相關研究主要為抗食源性及腐敗性病原菌，如金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、變形鏈球菌(*Streptococcus mutans*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、腸炎沙門氏菌(*Salmonella enteritidis*)、仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*)、變形桿菌(*Proteus vulgaris*)、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、志賀氏痢疾桿菌(*Shigella dysenteriae*) 及大腸桿菌(*Escherichia coli*)等(Hoque *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 1994; Penecilla and Magno, 2011; Perez *et al.*, 2008)。番石榴葉片萃取液於抗植物病原之利用上，相對研究報告較少；在抗真菌部分，Abirami 氏等人(2013)曾調查不同濃度番石榴水萃取液對炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和軟腐病菌(*Rhizopus stolonifer*) 兩種真菌之影響，並指出使用未稀釋的番石榴葉水萃取液對軟腐病菌(*R. stolonifer*)菌絲生長無抑制能力，但對孢子萌發抑制率為 59.3%；反之該萃取液對炭疽菌(*C. gloeosporioides*) 菌絲生長具有抑制力，對孢子發芽抑制率為 7.5%。在抗細菌部分，Acedo 氏等人(1999)曾利用番石榴葉片萃取液處理甘藍切端抑制軟腐病的發生，證實有良好的抑制效果。番石榴葉片萃取液的利用，除了能減少化學農藥的施用，亦能達到農業廢棄物再利用之優點。

本篇報告將評估不同品種或種類之番石榴葉片萃取液，對 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 之抑制能力，並挑選具較佳抑菌能力品種或種類，進一步觀察其對 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 形態或生長之影響。

材料方法

一、試驗材料

本試驗材料番石榴葉片為 2012 年春、夏季採自台中北屯區林氏果園'夏威夷'('Hawaii')、'馬來'('Malaysia')、'榕葉'('Rong-Ye')、'大蒂'('Dar-Dih')、'細葉'('Se-Ye')、'珍珠'('Jen-Ju')、'紅葉'('Hong-Yeh')、'梨仔'('Li-Zai')、'泰國'('Tai-Guo')及'帝王'('Di-Wang')等 10 種不同種類或品種番石榴成熟葉片。

所使用之結球白菜葉片為西螺地區所栽培之結球白菜，挑選無病徵之結球白菜葉片，並接種 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 軟腐病原細菌。

二、試驗方法

(一)、番石榴葉片萃取液製備與分析

將新鮮採集之番石榴成熟葉片，分別清洗後以 70°C 烘箱烘乾，隨後將乾燥之番石榴葉片磨成 20-40 mesh 粉末，取番石榴葉片粉末加入 10 倍體積之純水，接著利用超音波進行熱水萃取 30 分鐘，萃取完成後進行離心過濾並分析萃取液之 FRAP 抗氧化能力(Ferric reducing ability of plasma)及總酚類化合物(Total phenolic content ,TPC)含量。

1. 抗氧化能力 FRAP 之測定

採用 Benzie 和 Strain(1996) 的方法，將萃取液適當稀釋後，取 50 μ l 稀釋液加入 700 μ l working reagent (預先放置 37°C 預熱)震盪均勻後，放置 37°C 水浴 10 分鐘，以分光光度計(spectrophotometer, Hitachi U2000)測定其在 593 nm 波長之吸光值。標準曲線以 1000 μ M FeSO₄ 配置。單位以 μ mol/ml 表示。

2. 總酚類化合物含量

採用 Keith 等人(1958)之方法，將萃取液適當稀釋後，取 1 ml 稀釋液加入 0.1 ml 的 Folin-Ciocalteus phenol reagent 及 0.2 ml 20% Na₂CO₃ 與 8.7 ml 去離子水震盪均勻後，利用沸水煮 3 分鐘後冷卻，以分光光度計(spectrophotometer, Hitachi U2000)測定其在 660 nm 波長之吸光值。標準曲線以 100 ppm caffeic acid 配置。單位以 μ g/ml 表示。

(二)、番石榴葉片萃取液體外(*In vitro*)抑病能力之評估

1. 含10%不同品種或種類番石榴葉片萃取液培養液抑菌實驗

分別在已滅菌之NA液態培養基中，加入10%不同品種或種類的番石榴葉片萃取液，再添加濃度約為 $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml菌液至液態培養基中，對照組為添加無菌水，每處理為三重複，並放置30°C恆溫箱中培養一天。

取100 μ l液態培養液塗抹於NA固態培養基上方觀察是否有菌落形成，若有形成肉眼可見之菌落即判定為不具抑制能力(N)，若無肉眼可見菌落形成則判定為具抑菌能力(Y)。

2. 殺菌或靜菌作用試驗

為確定萃取液是否為殺菌作用或靜菌作用之效果，取本試驗二之含菌液與10%萃取液之NA液態培養液200 μ l，離心去除上清液後加入200 μ l無菌水清洗，離心去除上清液後，加入200 μ l無菌水震盪後取100 μ l塗抹於NA固態培養基上，每處理為三重複，並放置30°C恆溫箱中培養一天。

觀察塗抹後是否有菌落形成，若有則判定萃取液主要為靜菌作用(Bacteriostatic effect, B)，若無菌落形成則判定萃取液主要為殺菌作用(Germicidal effect, G)。

3. 掃描式電子顯微鏡觀察'馬來'或'榕葉'葉片萃取液對*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*之生長與形態影響

配製添加10% '馬來'或'榕葉'葉片萃取液之 Nutrient Agar 液態培養基，並在培養基內添加蓋玻片後進行高壓滅菌，待其冷卻後添加與萃取液量相同之菌液，放置於30°C恆溫箱中，並以100 rpm震盪培養24小時，將蓋玻片取出以2.5% Glutaraldehyde (50% glutaraldehyde

stock以0.1 M pH 7.0 phosphate buffer稀釋)固定4小時以上，再以磷酸緩衝液沖洗(pH 7.0) 3-4次。固定完成後，將樣品保存於4°C低溫待脫水。

將樣品取出後以不同濃度的酒精進行漸進式脫水(30%→40%→50%→70%→85%→90%→95%→100%)，完成後直接以液態二氧化碳進行臨界點乾燥，乾燥完成後以鈹(Pd)進行樣本coating，再以掃描式電子顯微(Topcon ABT-150S)進行觀察。

以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察經'馬來'或'榕葉'葉片萃取液處理後，對*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*生長或形態之影響。

(三)、番石榴葉片萃取液體內(*In vivo*)抑菌能力之評估

將結球白菜基部之葉片剝下後，去除腐爛及多餘的葉片，以0.1%次氯酸鈉進行消毒，再以無菌水清洗乾淨，待已清洗乾淨之葉片乾燥後，切齊其基部後，立即以含有菌液約為 $10^8\sim 10^9$ cfu/ml之萃取液或純水進行浸泡接種處理，並以浸泡無菌純水作為對照組，每處理為三重複。處理完之葉片，待其稍為乾燥後放置於30°C相對濕度90%以上之環境下。

當結球白菜葉片葉柄基部若出現腐爛水浸狀即判定為發病，再以 $100-(發病葉片數/處理葉片數*100)$ 計算抑病能力。

三、統計分析

試驗結果使用SAS軟體(Statistical Analysis System)進行最小顯著差異值(LSD)比較各處理間差異顯著性。

結 果

一、番石榴葉片萃取液抗氧化能力FRAP與總酚類化合物(TPC)含量

分析番石榴葉片萃取液抗氧化能力FRAP和總酚類化合物含量部分，以'榕葉'葉片萃取液有最高的FRAP抗氧化能力和總酚類化合物含量，其次為'馬來'、'大蒂'及'細葉'萃取液，以'梨仔'和'夏威夷'萃取液有最低的抗氧化能力FRAP和總酚類化合物含量(圖1、2)。

二、番石榴葉片萃取液體外(*In vitro*)抑菌能力之評估

(一)、評估添加10%不同品種或種類番石榴葉片萃取液之抑菌能力評估

添加10%不同品種或種類番石榴葉片萃取液之NA液態培養基，進行液態培養1天後，塗抹於NA固態培養基上培養1天，試驗結果顯示，10%'榕葉'、'馬來'、'大蒂'、'細葉'、'泰國'或'珍珠'葉片萃取液，能夠完全抑制*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*軟腐細菌之生長(表1)。

(二)、殺菌或靜菌作用試驗

以10%'榕葉'、'馬來'、'大蒂'、'細葉'、'泰國'或'珍珠'葉片萃取液處理，結果顯示這些品種對*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*軟腐細菌有殺菌作用，'大蒂'萃取液則為靜菌作用(表2)。

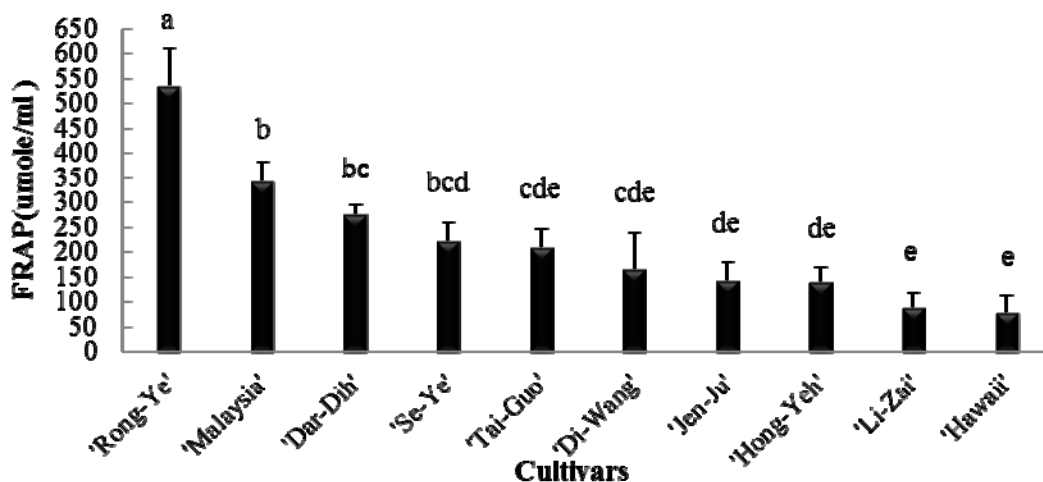


圖 1. 不同品種番石榴葉片萃取液 FRAP 抗氧化能力。'榕葉'('Rong-Ye')、'馬來'('Malaysia')、'大蒂'('Dar-Dih')、'細葉'('Se-Ye')、'泰國'('Tai-Guo')、'帝王'('Di-Wang')、'珍珠'('Jen-Ju')、'紅葉'('Hong-Yeh')、'梨仔'('Li-Zai')及'夏威夷'('Hawaii')。

Fig. 1. Antioxidant capability of FRAP of aqueous extracts from various guava leaves. Bars with the same letters are not significantly difference by LSD at 5% level.

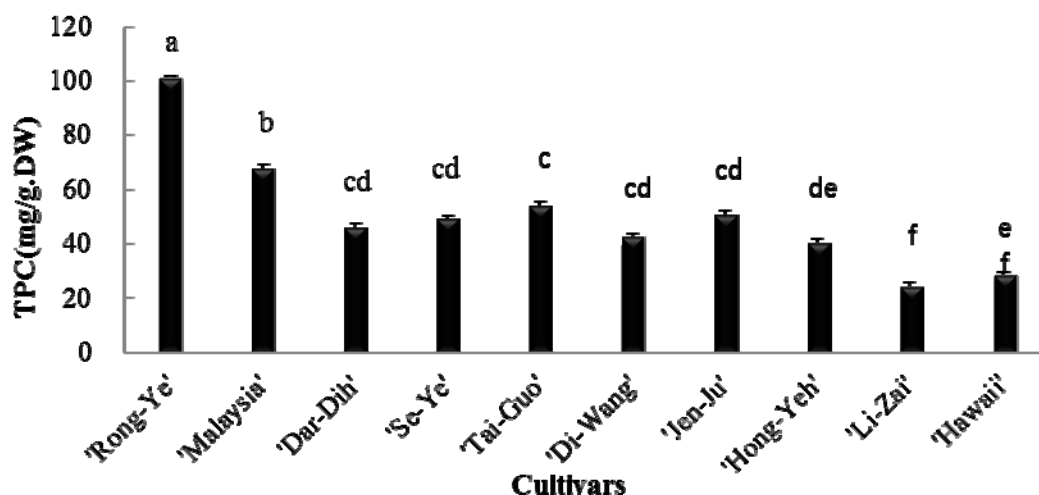


圖 2. 不同品種番石榴葉片萃取液之總酚類化合物含量。'榕葉'('Rong-Ye')、'馬來'('Malaysia')、'大蒂'('Dar-Dih')、'細葉'('Se-Ye')、'泰國'('Tai-Guo')、'帝王'('Di-Wang')、'珍珠'('Jen-Ju')、'紅葉'('Hong-Yeh')、'梨仔'('Li-Zai')及'夏威夷'('Hawaii')。

Fig. 2. Concentration of total phenolic compounds of aqueous extracts from various guava leaves. Bars with the same letters are not significantly difference by LSD at 5%level.

表1. 10%不同品種番石榴葉片萃取液對*P.carotovorum* subsp.*carotovorum*之抑菌效果

Table 1. Effect of 10 % various guava extracts added in media on inhibition *P.carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Plant materials	Inhibition ability
'榕葉' ('Rong-Ye')	Y
'馬來' ('Malaysia')	Y
'大蒂' ('Dar-Dih')	Y
'細葉' ('Se-Ye')	Y
'泰國' ('Tai-Guo')	Y
'帝王' ('Di-Wang')	N
'珍珠' ('Jen-Ju')	Y
'紅葉' ('Hong-Yeh')	N
'梨仔' ('Li-Zai')	N
'夏威夷' ('Hawaii')	N
無菌水(Sterile distilled water)	N

Y=Have antimicrobial activity N=No inhibition ability

表 2. 10%番石榴葉片萃取液對*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*之殺菌或靜菌作用

Table 2. Germicide or bacteriostatic effect of 10% various guava leaveextracts against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Plant materials	Inhibition ability
'榕葉' ('Rong-Ye')	G
'馬來' ('Malaysia')	G
'大蒂' ('Dar-Dih')	B
'細葉' ('Se-Ye')	G
'泰國' ('Tai-Guo')	G
'珍珠' ('Jen-Ju')	G
無菌水(Sterile distilled water)	-

-: no inhibitory effect. B: Bacteriostatic effect G: Germicide effect

(三)、'馬來'或'榕葉'葉片萃取液對 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 之影響

圖 3 結果顯示，'馬來'葉片萃取液處理，會使蓋玻片附著菌數明顯減少，且蓋玻片細菌形態明顯較小(圖 3B)；'榕葉'葉片萃取液處理則無法明顯觀察到 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 附著之情形(圖 3C)。

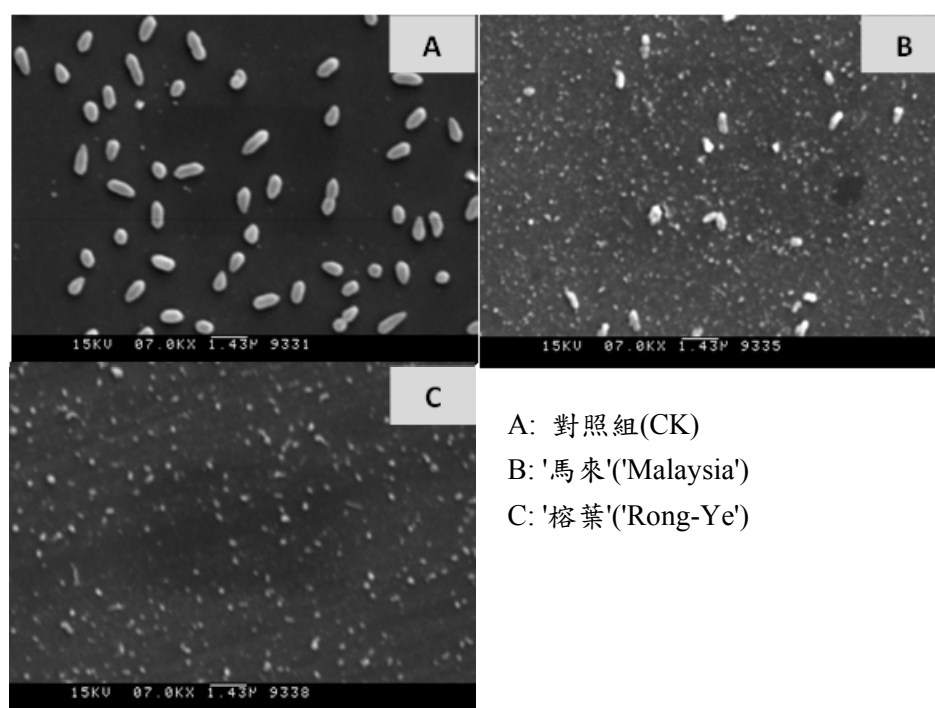


圖 3. 掃描電子顯微鏡觀察'馬來'和'榕葉'葉片萃取液對 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 生長及形態之影響。

Fig. 3. Effect of aqueous extracts from 'Malaysia ' and 'Rong-Ye' leaves against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* growth and morphology in SEM observation.

三、番石榴葉片萃取液體內(*In vivo*) 抑病能力之評估

將結球白菜葉片切端進行不同萃取液預處理並接種軟腐病病原細菌後，貯藏於30°C下1天，結果顯示處理 '榕葉'、'馬來'或'珍珠'萃取液之結球白菜葉片會有較佳抑制病害發展能力，但貯放3天後，'榕葉'、'馬來'或'珍珠'萃取液處理抑病能力會下降，其中又以'榕葉'萃取液處理抑病效果優於其他品種萃取液處理(圖4)，在本次試驗中，'夏威夷'萃取液處理抑病能力表現最差。

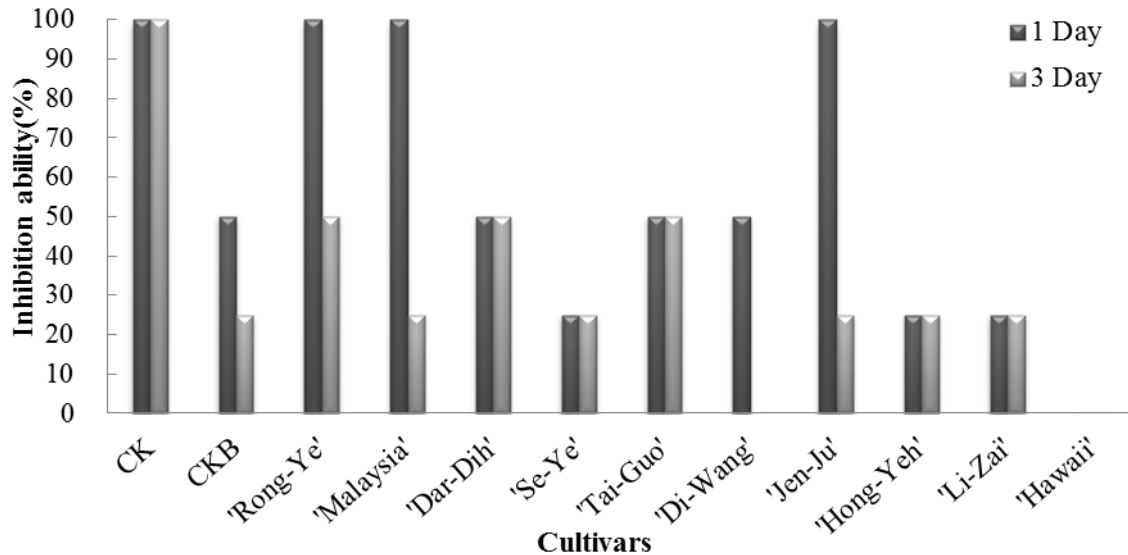


圖4. 不同品種番石榴葉片萃取液處理對貯藏在30 °C 1天和3天結球白菜葉片切端軟腐病發生之抑制能力。CK:未接菌對照組、CKB:接菌對照組、'榕葉'('Rong-Ye')、'馬來'('Malaysia')、'大蒂'('Dar-Dih')、'細葉'('Se-Ye')、'泰國'('Tai-Guo')、'帝王'('Di-Wang')、'珍珠'('Jen-Ju')、'紅葉'('Hong-Yeh')、'梨仔'('Li-Zai')及'夏威夷'('Hawaii')。

Fig. 4. Control of bacterial soft rot of Chinese cabbage leaves cut end treated with various guava leaves extracts during storage period at 30°C for 1 and 3 days. CK: non-infection control, CKB: infection control.

討 論

在體外(*In vitro*)、植體內(*In vivo*)試驗結果中，'榕葉'、'馬來'或'珍珠'葉片萃取液均有良好的抑菌/抑病表現，'大蒂'、'泰國'、'細葉'雖在體外(*In vitro*)試驗有良好的抑菌表現，但在植體內(*In vivo*)試驗結果中，抑病表現並沒有優於接菌對照組。而'榕葉'、'馬來'、'細葉'、'泰國'或'珍珠'葉片萃取對 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 軟腐細菌具有殺菌作用，'大蒂'萃取液則為靜菌作用，不同品種或種類的番石榴葉片，其抗菌有效成分會有所差異需，根據 Vaidya (2012)報告指出，番石榴葉片主要含有精油、外源凝集素、酚類、皂甙和鞣質等抗菌成份。

不同品種之萃取液中以'榕葉'萃取液有最高的 FRAP 抗氧化能力與總酚類化合物含量'馬來'萃取液次之，同品種萃取液 FRAP 抗氧化能力與總酚類化合物含量變化有同的趨勢，且具有相當高的相關性與 Henríquez 氏等人(2010) 結果相符。本次試驗中結果顯示，具有較高抗氧化能力 FRAP 與總酚類化合物含量之萃取液，其抗菌表現也較佳，由此推測酚類

化合物為本試驗主要抗菌二次代謝物，根據 Arima 和 Danno (2002) 研究報告指出，番石榴萃取液中主要含有番石榴甙 (Guaijavarin)、槲皮素 (Quercetin)、morin-3-O- α -L-lyxopyranoside 和 morin-3-O- α -L-arabopyranoside 等黃酮類抗菌物質；而酚類化合物中的黃酮類化合物多親脂性會破壞微生物細胞膜 (Cowan, 1999)、鞣質可能與降低微生物黏附、酶、細胞轉運蛋白等有關 (Ya *et al.*, 1988)，這些二次代謝物對 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 所造成之影響，可能為導致較少或沒有 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 附著於蓋玻片之主要原因。

參考文獻

- 黃穗昌、曾國欽、呂昫陞。2007。細菌性軟腐病之診斷與鑑定。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(6)。
- Abirami, L. S. S., R. Pushkala, and N. Srividya. 2013. Antimicrobial activity of selected plant extracts against two important fungal pathogens isolated from papaya fruit. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 4(1):234-238.
- Acedo, A. L. Jr. 2010. Postharvest technology for leafy vegetables. In: AVRDC-ADB Postharvest technology of leafy vegetables (eds). pp.11-27
- Arima, H. and G. Danno. 2002. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (8):1727-1730.
- Benzie, I. F. F. and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239(1):70-76.
- Bhat, K. A., S. D. Masood, N. A. Bhat, M. A. Bhat, S. M. Razvi, M. R. Mir, Sabina Akhtar, I. N. Wani, and M. Habib. 2010. Current status of postharvest soft rot in vegetables: A review. *Asian J. Plant Sci.* 9: 200-208.
- Clardy, J. and C. Walsh. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 16: 637-641.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 564-582.
- Henríquez, C., S. Almonacid, I. Chiffelle, T. Valenzuela, M. Araya, L. Cabezas, R. Simpson, and H. Speisky. 2010. Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chil. J. Agr. Res.* 70 (4):521-536.
- Hoque, M. D. M., M. L. Bari, Y. Inatsu, V. K. Juneja, and S. Kawamoto. 2007. Antibacterial activity of guava (*Psidium guajava* L.) and Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) extracts

- against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Foodborne Pathogens Dis.* 4(4):481-488.
- Keith R. W., D. L. Tourneau, and D. Mahlum. 1958. Quantitative paper-chromatographic determination of phenol. *J. Chromatogr.* 1:534-536.
- Matsuo, N. H., K. S. Y. Nakamura, and I. Tomita. 1994. Identification of (+)gallocatechin as a bio-antimutagenic compound in *Psidiumguava* leaves. *Phytochem.* 36(4): 1027-1029.
- Penecilla, G. L. and C. P. Magno. 2011. Antibacterial activity of extracts of twelve common medicinal plants from the Philippines. *J. Med. Plants Res.* 5(16): 3975-3981.
- Perez, G. R. M., S Mitchell, and R. V. Solis. 2008. *Psidiumguajava*: A review of its traditional uses, phytochem. and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 117: 1-27.
- Rahman, M. M., A. A. Khan, M. E. Ali, I. H. Mian, A. M. Akanda, and H. S. B. Abd. 2012. Botanicals to control soft rot bacteria of potato. *Sci. World J.* 10:1-6.
- Vaidya, M. 2012. Phytochemical Screening & Antibacterial activity of aqueous & methanolic extract of Young & Mature leaves of *Psidiumguajava* L. (guava). *Int. J. Green Herbal Chem.* 1(3): 211-216.
- Ya, C., S. H. Gaffney, T. H. Lilley, and E. Haslam. 1988. Carbohydrate-polyphenol complexation, p. 553. In R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press, New York, N.Y.

The Evaluation of Guava Leaf Extracts Against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Chinese Cabbage

Pei-Rung Jhuang ¹⁾ Wen-Hsin Chung ²⁾ Huey-Ling Lin ³⁾

Key word: Guava leaf extracts, Chinese cabbage, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, Soft rot

Summary

The main purpose of this study is to evaluate the efficacy of different varieties or types of guava leaves extracts on inhibiting *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *In vitro* inhibition experiments showed that leaves extracts from 'Rong-Ye', 'Malaysia', 'Dar-Dih', 'Se-Ye', 'Tai-Guo' and 'Jen-Ju' cultivars can inhibit the growth of soft rot bacteria *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Consequently, the 'Rong-Ye', 'Malaysia', 'Se-Ye', 'Tai-Guo' and 'Jen-Ju' have significantly active capabilities against soft rot bacteria. Further analysis indicated that the cultivars extracts showed better antibacterial ability have higher total phenolic content and antioxidant capacity FRAP. *In vivo* experiments, the different varieties or types of leaf extracts treated Chinese cabbage leaf cut end revealed that the leaves extracts from 'Rong-Ye', 'Malaysia' and 'Jen-Ju' had better disease suppression performance. Based on the scanning electronic microscopy (SEM) observation, the growth and morphology of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* could be changed by leaves extracts. Thus, treated with 'Rong-Ye' or 'Malaysia' extraction fluid, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* growth or morphology may be affected.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Plant pathology, National Chung Hsing University.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

