

十字花科蔬菜黑腐病菌種子帶菌檢測 與去病原技術¹

吳雅芳、鄭安秀²

摘 要

吳雅芳、鄭安秀。2014。十字花科蔬菜黑腐病菌種子帶菌檢測與去病原技術。臺南區農業改良場研究彙報 64：43-55。

十字花科蔬菜黑腐病菌之不同菌株間在測試的半選擇性培養基上，其菌落及澱粉水解透明環大小及生長速度和選擇性均有差異，因此在檢測種子帶菌時應使用 2 種以上的培養基，將種子加入 0.85% NaCl / 0.02% Tween 20 緩衝液在 28°C 振盪 2 小時後之洗出液經 0、24 及 48 小時增量培養後再分別塗抹於不同的平板上，取可能之菌落以 ELISA 測試或進行甘藍剪葉接種以確定其為黑腐病菌。

測試農藥及拮抗菌對黑腐病菌之生長抑制結果，以 20% 歐索林酸可濕性粉劑 1,000 倍及 81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 1,000 倍，拮抗微生物菌株 B40、S67、S101、S201 培養液效果最好，以上述藥劑或拮抗菌浸泡種子 30 分鐘後，以菌株 S67、S101、S201 及嘉賜銅浸泡處理之種子未檢出黑腐病菌，以菌株 B40 及歐索林酸處理則仍檢出高帶菌率，但各組發芽率均差；播種後澆灌處理上述藥劑或拮抗菌則發芽率未受影響，其發病株率在處理天然帶菌種子上並無明顯差異，但若處理人工被覆之帶菌種子則以菌株 B40 及嘉賜銅處理之發病株率降低較多。

關鍵字：十字花科蔬菜黑腐病、*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

接受日期：2014 年 5 月 14 日

前 言

由 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 所引起的黑腐病為十字花科蔬菜最主要病害之一，病原菌常由葉緣水孔或傷口侵入，引起萎黃之 V 字型病斑，病斑擴展後中肋及葉主脈導管變黑，呈現黑色或褐色病徵，影響蔬菜品質及產量甚鉅。臺灣地處亞熱帶地區，溫度及濕度均適宜黑腐病的發生，尤其近年來氣候異常，冬季十字花科蔬菜的盛產期仍常維持溫暖的氣溫，使得此病害之發生較過去更為嚴重，為臺灣地區十字花科蔬菜之重要病害；種子傳染為本病害之重要傳播途徑，病原細菌可侵入感染或經由表面污染之十字花科蔬菜種子，成為田間病害發生的初次感染源⁽²⁾。目前十字花科蔬菜種子黑腐病原細菌之檢測技術有選擇性

1. 行政院農業委員會臺南區農業改良場研究報告第 430 號。

2. 行政院農業委員會臺南區農業改良場助理研究員、研究員兼課長。

培養基^(4,5)、核酸探針⁽¹⁾、種子栽種觀察⁽¹⁶⁾、噬菌體檢測法⁽¹³⁾及血清檢測法^(8,9)等。本研究擬針對臺灣十字花科蔬菜種子內外銷之現況，發展出黑腐病菌之簡易偵測技術，符合進出口業者之需求，避免內外銷種子攜帶有黑腐病原細菌而成爲田間之初次感染源。此外亦針對感染或污染黑腐病菌種子之處理方式，並探討十字花科蔬菜黑腐病菌在種子上去病原之處理效果。

材料與方法

一、臺灣不同地區及不同十字花科寄主黑腐病病原細菌之分離

於臺灣各地採集不同十字花科蔬菜之黑腐病罹病葉片，進行病原細菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) 之分離純化，在溫室內以剪葉接種方法測定其病原性，並保存於 -80°C 甘油中。

二、建立帶菌種子之細菌回收增量技術

(一) 將田間採集之帶菌種子以 saline buffer (0.85% NaCl) 或 0.01 M phosphate buffer 分別添加 0.02%、0.05%、0.1%、1% 及 2% 的 Tween 20 或 0.01%、0.05%、0.1%、0.5% 的 SDS (Sodium dodecyl sulfate) 經 5 分鐘、10 分鐘、30 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時振盪漂洗後取洗出液以 ELISA 方式檢測，比較其檢出率。

(二) 測試 Cephalexin、Nitrofurantoin、Bacitracin、Neomycin 及 Cycloheximide 等不同抗生素添加於 SMA^(4,5)、mCS20ABN⁽¹²⁾、CS20、及 W1 培養基內評估對回收帶菌種子之細菌增量培養效果。

三、以各種選擇性培養基進行純菌培養及種子上病原菌之回收培養測試

根據國內外多位學者之研究報告^(4,5,6,10,12)，比較已發表之選擇性培養基對黑腐病菌之檢出率及檢出靈敏度，將 XCC25、XCC57、XCC60、XCC81、XCC240、XCC425、XCC441、XCC609、XCC672、XCC693 等 10 個黑腐病菌菌株製成細菌懸浮液稀釋塗抹於 SX、NSCAA、BSCAA、SMA、FS、mCS20ABN (International Seed Testing Association (ISTA) 使用)⁽¹²⁾、W1 (本場研發)、CS20 (修改 ISTA 使用之 mCS20ABN) 等半選擇性培養基上，比較其生長速度及菌落辨識度。另將帶菌種子洗出液稀釋塗抹於上述培養基上，比較其對於黑腐病菌之選擇性及生長速度。

四、檢測不同十字花科蔬菜種子之帶菌情形，評估適合之檢測流程

洽種子公司收集或購買不同十字花科種子計 80 批次進行測試，測試方法分以下三種，檢測用培養基及配方如附件：

(一) 種子漂洗法：種子漂洗後逕行 ELISA 測試

1. 以 Saline buffer + 0.5% SDS (4 g 種子 / 10 ml) 振盪漂洗 2 小時
2. 洗出液進行 ELISA 測試

(二) 液體培養法

1. 以 Saline buffer + 0.02% Tween 20 (4 g 種子 / 10 ml) 振盪漂洗 2 小時
2. 洗出液取 1 ml 加入 10 ml W1 液體培養基中振盪培養 24 ~ 64 小時
3. 洗出液及經培養 24、48、64 小時後之培養液分別取出 0.2 ml 進行 ELISA 測試及塗抹於平板上

(三) 種子培養法

1. 取 0.5 g 種子加入 10 ml W1 液體培養基培養
2. 培養 24、48、64 小時分別取出 0.2 ml 進行 ELISA 測試及塗抹於平板上

五、田間自然感染的帶菌種子採集

於本場試驗田設立青花菜及花椰菜採種圃各一區，99 年 9 月育苗，10 月定植，12 月抽花梗後開始進行黑腐病病原菌接種，其間視天氣狀況及田間發病情形調整接種量及接種時間，共計接種 10 次，於 100 年 3 月採種。採收後的種子以上述半選擇性培養基進行帶菌檢測。

六、以人工被覆方式調製帶菌種子

黑腐病菌菌株 XCC425 製成 10^8 CFU/ml 之懸浮液，將市售經檢測未檢出帶菌之甘藍種子浸泡於懸浮液中 1 小時後晾乾。並以半選擇性培養基進行帶菌檢測。

七、利用溫度、藥劑、微生物等方式進行種子處理

(一) 溫度處理：

將天然帶菌種子在 70°C 恆溫箱中乾熱處理 48 小時。

(二) 藥劑處理：

藥劑篩選：選用細菌性病害常用之藥劑利用濾紙圓盤法測試抑制黑腐病菌試驗，直徑 0.8 cm 之濾紙圓盤經高壓滅菌後，每一圓盤滴入 0.1 ml 供試藥劑稀釋液，置於無菌箱中吹乾後，放置於混入黑腐病菌之雙層培養基 (nutrient agar) 平板上，另以無菌蒸餾水取代藥劑為對照處理。每處理三重覆，調查抑制圈大小。供試藥劑包括：37.5% 氫氧化銅水懸劑 400 倍、85% 鹼性氫氧化銅可濕性粉劑 300 倍、20% 歐索林酸可濕性粉劑 1,000 倍、40% 銅快得寧可濕性粉劑 500 倍、35% 護粒丹可濕性粉劑 1,000 倍、68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑 1,000 倍、10% 鏈四環黴素可溶性粉劑 1,000 倍、10% 維利黴素溶液 600 倍、81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 1,000 倍、72% 波爾多可濕性粉劑 400 倍、27.12% 三元硫酸銅水懸劑 500 倍、無菌水。選用其中抑制效果較佳之藥劑進行種子處理。

(三) 微生物處理：選用本實驗室篩選對病原細菌具抑制效果之拮抗微生物包括芽孢桿菌菌株 B40、B53、B72、B90、B196 及放線菌菌株 S67、S101、S201、CH38 之培養液與黑腐病菌進行拮抗測試，直徑 0.8 cm 之濾紙圓盤經高壓滅菌後，每一圓盤滴入適量供試拮抗菌培養液至吸收飽和但不滲出菌液，放置於混入黑腐病菌之雙層培養基 (nutrient agar) 平板上，另以無菌蒸餾水為對照處理。每處理三重覆，調查抑制圈大小。選用其中抑制效果較佳之拮抗菌進行種子處理。

(四) 種子處理：以前項篩選對黑腐病菌生長具較佳抑制效果之藥劑及微生物進行種子處理，處理方法分為二種：

1. 種子浸泡於藥劑及微生物培養液內 30 分鐘後晾乾。
2. 種子播種後立即以藥劑及微生物培養液澆灌，之後每 5 天澆灌一次 (第 1、5、10 天)。

(五) 檢測處理過之種子的黑腐病帶菌情形。

經前項 1. 浸泡於藥劑及微生物培養液內 30 分鐘晾乾處理後之種子進行黑腐病菌帶菌檢測，檢測流程如下：將種子加入 0.85% NaCl / 0.02% Tween 20 緩衝液內，於 28°C 振盪 2 小時後，收集其洗出液經適當稀釋再分別塗抹於半選擇性培養基 W1 及

CS20 上，觀察是否有黑腐病菌菌落。

- (六) 播種處理過之種子並觀察其發病情形及處理方式對發芽或生長的影響：處理過之種子播種於穴盤上紀錄其發芽率及發病株率，每一處理播種二盤。直接澆灌之處理亦紀錄其發芽率及發病株率。

結果與討論

一、臺灣不同地區及不同十字花科寄主黑腐病病原細菌之分離

採集自花椰菜、青花菜、甘藍、白菜、芥藍等十字花科蔬菜之黑腐病病原細菌經分離純化後，在溫室內以剪葉接種方法測定病原性，於 -80°C 保存於甘油中，採集地點多分佈於雲林、嘉義、台南等地區，部分來自於臺灣東部、北部的菌株則由亞蔬中心及台東區農業改良場所提供。

二、建立帶菌種子之細菌回收增量技術

以 Saline buffer (0.85% NaCl) 或 0.01 M phosphate buffer 分別添加不同濃度 SDS 及 Tween 20 振盪漂洗不同時間後取洗出液以 ELISA 方式檢測，發現以 Saline buffer 添加 0.5% SDS 振盪漂洗 2 小時後之檢出率最高，但以此方式回收之黑腐病菌雖可經 ELISA 檢出，但因受 SDS 影響菌體多數遭破壞為死菌，無法供做增量培養用，另以 Saline buffer 添加 0.02% Tween 20 振盪漂洗 2 小時後回收之細菌可供增量培養用。至於不同抗生素添加於培養基內針對回收帶菌種子之細菌增量培養效果則以添加 Cycloheximide 200 ug/ml、Cephalexin 50 ug/ml、Nitrofurantoin 10 ug/ml 於平板培養基上及 Cephalexin 25 ug/ml、Nitrofurantoin 10 ug/ml 於液體培養基上之效果最好。另比較目前國內所使用的半選擇性培養基 SMA、ISTA (International Seed Testing Association) 所使用的 mCS20ABN 培養基及本研究嚐試使用之 W1 培養基發現添加 ISTA 所使用的 Neomycin 及 Bacitracin 二種抗生素均生長不好，至於這三種培養基添加 Cycloheximide 200 ug/ml、Cephalexin 50 ug/ml、Nitrofurantoin 10 ug/ml，以 CS20 (mCS20ABN 改添加上述三種抗生素) 之生長最快也最容易辨識，SMA 與 W1 生長速度差不多，但在三種培養基中以 W1 對黑腐病菌之選擇性最大，在用於種子回收細菌之增量培養時最為適合。

三、以各種選擇性培養基進行純菌培養及種子上病原菌之回收培養測試

將 XCC25、XCC57、XCC60、XCC81、XCC240、XCC425、XCC441、XCC609、XCC672、XCC693 等 10 個黑腐病菌菌株製成細菌懸浮液稀釋塗抹於 SX、NSCAA、BSCAA、SMA、FS(ISTA 使用)、mCS20ABN (ISTA 使用)、W1 (本場研發)、CS20 (修改 ISTA 使用之 mCS20ABN) 等半選擇性培養基上，並以 NA 培養基做對照，培養 72 小時後比較其平板效率 (表 1)，其中各菌株在 SX 培養基之平板效率普遍最差，其它培養基則各菌株間均有差異，比較菌落及澱粉水解透明環大小 (表 2)，則以 mCS20ABN、NSCAA、W1、CS20 培養基最好，培養 72 小時後，菌落均較 NA 為大，其餘培養基則有些菌株生長慢，菌落小或不易辨識。另將四批已知帶有黑腐病菌之種子洗出液經不同時間增量培養後以 10 倍系列稀釋塗抹於上述培養基上，比較其對於黑腐病菌之選擇性及生長速度，則以 W1、CS20、NSCAA 表現較好，其中 SX 培養基雖然在測試平板效率時各菌株之生長最差，但在種子洗出液的培養上則對於黑腐病菌之選擇

性優於部分培養基 (表 3)。因此綜合以上試驗結果，種子檢測只使用 1 種培養基可能會因菌株間的差異而造成誤差，因此在可能的範圍內多選用數種培養基進行檢測可得到較為正確的結果，依據本試驗各菌株在上述 8 種半選擇性培養基上的平板效率、生長速度、菌落辨識度及對種子洗出液的黑腐病菌選擇性等，建議選用的培養基順序為 W1 (本場研發)、mCS20ABN、NSCAA、FS 培養基。檢測流程則是將種子加入 0.85% NaCl / 0.02% Tween 20 緩衝液在 28°C 振盪 2 小時後之洗出液經 0、24 及 48 小時增量培養後再分別塗抹於不同的平板上，取可能之菌落以 ELISA 確定其為黑腐病菌。或取可能之菌落進行甘藍剪葉接種。

表 1. 不同來源之黑腐病菌菌株在八種選擇性培養基上之平板效率

Table 1. Plating efficiency of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates on eight semi-selective media

Medium	Plating efficiency (%) ^a									
	XCC57	XCC60	XCC81	XCC240	XCC441	XCC672	XCC25	XCC693	XCC425	XCC609
BSCAA	83	64	46	71	56	50	74	x	89	93
mCS20ABN	75	59	43	18	47	25	75	49	11	67
FS	90	66	42	41	61	44	31	47	21	87
NSCAA	76	66	50	29	49	47	86	74	42	79
SMA	83	58	47	26	66	40	68	62	3	70
SX	2	x	16	2	13	10	43	16	2	62
CS20	55	58	56	26	47	23	65	66	21	59
W1	82	61	61	38	62	30	112	81	53	71
NA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

^a Plating efficiency (%) = (CFU per plate on tested medium / CFU per plate on NA) × 100

表 2. 不同來源之黑腐病菌菌株在八種培養基上之菌落及澱粉水解環大小

Table 2. Colony and clear zone size of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates on media

Medium		Colony/ clear zone (mm)									
		XCC57	XCC60	XCC81	XCC240	XCC441	XCC672	XCC25	XCC693	XCC425	XCC609
BSCAA	colony	3	1.8	0.5	0.5	1.5	2	0.2	0.1	0.1	2
	Clear zone	14	11.3	9	8.8	10.8	10	5	3.3	11.5	11.5
mCS20	colony	5.8	2.5	3	3.5	6.3	4.5	2.5	7.3	3.8	3.8
	Clear zone	13.8	8.3	7.3	8.3	11.3	10.8	8.8	11	10.3	11
FS	colony	3.8	3.5	0.6	0.5	2.3	2.3	0.5	0.5	0.1	2.3
	Clear zone	12.3	11.5	8.8	9	12	13.5	4.3	5.8	12.3	11.5
NSCAA	colony	5.8	5	2.8	1	6.8	4.3	1.4	1.4	2	5
	Clear zone	13.3	14	11	8.3	11.8	13	8.8	9	10	13.5
SMA	colony	2.5	1	1	1	1	1	1	1.5	0.5	0.5
	Clear zone	x	8.5	7.3	11.5	7.5	9	9.3	9.5	5	8.8
SX	colony	0.75	1	0.5	0.1	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2
	Clear zone	6	13	4.8	3	4.5	5.3	4.3	3	4	6.8
CS20	colony	7	7	3	3.8	5	5.5	3	3.8	2.5	4.5
	Clear zone	12.8	14	7.8	9.5	9.8	10.8	9.8	9.3	10.5	12
W1	colony	3.5	3.5	1	1.4	3	3	3	2	2.3	4
	Clear zone	9.5	8	5.8	7	7	5.8	6.5	6.5	7.8	9.8
NA	Colony	2.5	1.9	2	1	1.8	1.5	1	1	1	4

表 3. 帶菌種子洗出液經不同時間增量培養後在八種半選擇性培養基上的平板效率

Table 3. Efficiency of eight media for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from seed washes and different enrich time

Medium	Plating efficiency (%) ^a											
	A ^b			B			C			D		
	0 hr ^c	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
BSCAA	93.5	+ ^d	200	86.7	+	150	64.2	+	100	0	x ^e	+
mCS20ABN	56	x	50	55	x	x	21	x	X	0	x	+
FS	79.4	+	50	100	+	100	84	+	50	0	x	+
NSCAA	51.4	x	x	70	x	50	67.9	x	50	28.6	x	x
SMA	84.1	x	100	13.3	+	200	43.2	x	100	60	x	+
SX	23.4	+	23.5	18.7	+	20	43.2	+	100	37.9	x	+
CS20	25.2	x	x	86.7	x	x	55.6	x	100	28.6	x	x
W1	92.5	+	163	163	+	367	96.3	+	5,000	28.6	x	+
NA	100	x	100	100	x	100	100	x	100	100	x	x

^a Plating efficiency (%) = (CFU per plate on tested medium / CFU per plate on NA) × 100

^b seed lot

^c enrich time of seeds washes

^d XCC colony can be identified, but not on NA medium

^e other colony, no XCC colony can be identified

四、檢測不同十字花科蔬菜種子之帶菌情形，評估適合之檢測流程

以三種方法檢測 80 批種子結果計檢出 22 批帶菌（表 4），其中以種子漂洗法檢出 1 批次；以液體培養法塗抹於 W1 平板檢出 16 批次，塗抹於 CS20 平板檢出 8 批次；以種子培養法塗抹於 W1 平板檢出 12 批次，塗抹於 CS20 平板檢出 9 批次（表 5）。

五、田間自然感染的帶菌種子採集

於本場試驗田設立青花菜及花椰菜採種圃各一區，99 年 9 月育苗，10 月定植，12 月抽花梗後開始進行黑腐病病原菌接種，其間視天氣狀況及田間發病情形調整接種量及接種時間，共計接種 10 次，於 100 年 3 月採種。其中花椰菜部分因小菜蛾危害嚴重而放棄，青花菜種子則採收 1.5 公斤。採收之種子進行帶菌檢測，結果所採收之青花菜每克種子帶菌量約為 10⁶ CFU。

六、以人工被覆方式調製帶菌種子

黑腐病菌菌株 XCC425 製成 10⁸ CFU/ml 之懸浮液，將甘藍種子浸泡於懸浮液中 1 小時後晾乾，檢測其種子帶菌量約為每克種子 10⁶ CFU。

七、利用溫度、藥劑、微生物等方式進行種子去病原處理

(一) 溫度處理：

將天然帶菌種子在 70°C 恆溫箱中乾熱處理 48 小時，處理後未影響發芽率，但種子仍可檢出病原菌。本處理方法因設備問題無法保持恆溫，初步試驗後選擇放棄。

表 4. 十種十字花科蔬菜種子之檢測數

Table 4. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in ten cruciferous vegetable seeds

蔬菜名	檢測批數	檢出批數
不結球白菜	10	1
甘 藍	12	3
油 菜	2	0
花椰菜	29	12
芥 菜	2	0
芥 藍	6	1
青花菜	7	1
球莖甘藍	2	0
結球白菜	7	4
蘿 蔔	3	0
合 計	80	22

表 5. 以不同方法及培養基檢出之批數

Table 5. The number of lots by 3 detect methods and medium

蔬菜名稱 (批數)	種子漂洗法 ^a	液體培養法 ^b		種子培養法 ^c	
		W1 平板	CS20 平板	W1 平板	CS20 平板
不結球白菜 (10)	0	1	0	1	0
甘藍 (12)	0	1	2	0	1
油菜 (2)	0	0	0	0	0
花椰菜 (29)	0	11	6	8	7
芥菜 (2)	0	0	0	0	0
芥藍 (6)	0	0	0	1	0
青花菜 (7)	0	0	0	1	0
球莖甘藍 (2)	0	0	0	0	0
結球白菜 (7)	1	3	0	1	1
蘿蔔 (3)	0	0	0	0	0
合計 80	1	16	8	12	9

^a 種子漂洗法：0.85% NaCl + 0.5% SDS 漂洗 2 hrs 之濾液測 ELISA

^b 液體培養法：0.85% NaCl + Tween 20 漂洗 2 hrs 之濾液於 W1 液體培養基中培養

^c 種子培養法：0.5 g seed 培養於 W1 液體培養基中

^a Seed wash method: ELISA detect of seed filtrate with 0.85% NaCl + 0.5% SDS wash for 2 hrs

^b Broth culture method: Seed filtrate with 0.85% NaCl + Tween 20 wash for 2 hrs culture in W1 broth

^c Seed culture method: 0.5g seed culture in W1 broth

(二) 藥劑處理：

藥劑篩選：選用細菌性病害常用藥劑，利用濾紙圓盤法與黑腐病菌進行抑菌試驗，直徑 0.8 cm 之濾紙圓盤經高壓滅菌後，每一圓盤滴入 0.1 ml 供試藥劑稀釋液，置於無菌箱中吹乾後，放置於混入黑腐病菌之雙層培養基平板上，另以無菌蒸餾水取代藥劑為對照處理。每處理三重覆，調查抑制圈大小。結果如表 6，其中以歐索林酸與嘉賜銅對黑腐病菌之抑制效果較佳。

(三) 微生物處理：選用本實驗室篩選對植物病原細菌具抑制效果之拮抗微生物包括芽孢桿菌菌株 B40、B53、B72、B90、B196 及放線菌菌株 S67、S101、S201、CH38 之培養液與黑腐病菌進行拮抗測試，結果如表七。其中以菌株 B40、S67、S101、S201 抑制效果較佳。

表 6. 藥劑對黑腐病菌之抑制效果

Table 6. Chemical inhibition on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

處理別 ^a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抑制圈直徑 ^b	1.7	1.9	2.4	3	0	1.8	1.7	0	2.1	1.9	1.2	0

^a 藥劑種類：(1) 37.5% 氫氧化銅水懸劑 400 倍、(2) 85% 鹼性氫氧化銅可濕性粉劑 300 倍、(3) 20% 歐索林酸可濕性粉劑 1000 倍、(4) 40% 銅快得寧可濕性粉劑 500 倍、(5) 35% 護粒丹可濕性粉劑 1,000 倍、(6) 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑 1,000 倍、(7) 10% 鏈四環黴素可溶性粉劑 1,000 倍、(8) 10% 維利黴素溶液 600 倍、(9) 81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 1,000 倍、(10) 72% 波爾多可濕性粉劑 400 倍、(11) 27.12% 三元硫酸銅水懸劑 500 倍、(12) 無菌水

^b 抑制圈直徑：單位為 cm，0 表無抑制效果，其它數值含濾紙圓盤直徑 0.8 cm

^a Chemical: (1) Copper hydroxide 37.5% SC 400X, (2) Copper oxychloride 85% WP 300X, (3) Oxolinic acid 20% WP 1000X, (4) Copper hydroxide + oxine-copper 40% WP 500X, (5) Edifenphos + phthalide 35% WP 1000X, (6) Thiophanate-methyl + streptomycin 68.8% WP 1,000X, (7) Streptomycin + tetracycline hydrochloride 10% SP 1,000X, (8) Validamycin A 10% SL 600X, (9) Kasugamycin hydrochloride hydrate + copper oxychloride 81.3% WP 1,000X, (10) Bordeaux mixture 72% WP 400X, (11) Tribasic copper sulfate 27.12% SC 500X, (12) Sterile water

^b Diameter of inhibition zone: cm in diameter, 0 means No inhibitory effect, Other values means inhibition zone plus filter paper disc diameter 0.8 cm

表 7. 微生物對黑腐病菌之拮抗效果

Table 7. Effect of microbes on the inhibition of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

處理別	B40	B53	B72	B90	B196	S67	S101	S201	CH38	無菌水
抑制圈直徑 ^a	2.0	0	0	0	0	3.2	3.6	3.4	2.7	0

^a 抑制圈直徑：單位為 cm，0 表無抑制效果，其它數值含濾紙圓盤直徑 0.8 cm

^a Diameter of inhibition zone: cm in diameter, 0 means No inhibitory effect, Other values means inhibition zone plus filter paper disc diameter 0.8 cm

(四) 種子處理：以前項篩選對黑腐病菌生長抑制效果較佳之藥劑 20% 歐索林酸可濕性粉劑 1,000 倍及 81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 1,000 倍進行種子處理；拮抗微生物 B40、S67、S101、S201 培養液進行種子浸泡及播種後之澆灌處理，其中拮抗微生物部分經比較其培養液、培養液經高溫高壓滅菌及培養液經 0.22 μ m Millipore 過濾之拮

抗效果後，選擇 B40 培養液、S67 培養液經高溫高壓滅菌、S101 培養液經 0.22 um Millipore 過濾、S201 培養液進行處理。

(五) 檢測處理過之種子的黑腐病帶菌情形

經浸泡處理後之種子進行黑腐病菌帶菌檢測，檢測流程如下：將種子加入 0.85% NaCl / 0.02% Tween 20 緩衝液內，於 28°C 振盪 2 小時後，收集其洗出液經適當稀釋再分別塗抹於半選擇性培養基 W1 及 CS20 上，計數黑腐病菌菌落。結果如表 8，以 S67、S101、S201 及嘉賜銅浸泡處理之種子未檢出黑腐病菌，以 B40 及歐索林酸處理則仍檢出高帶菌率。

(六) 播種處理過之種子並觀察其發病情形及處理方式對發芽或生長之影響

以浸泡處理種子播種後發芽率差，因此未紀錄其發病情形。澆灌處理之結果如表 9，各處理未影響發芽率，天然帶菌種子之發病株率並未因處理而有差異，以人工被覆之帶菌種子則以 B40 及嘉賜銅處理之發病株率降低較多。

表 8. 種子經浸泡處理後之帶菌情形

Table 8. Population of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after seed treatment

處理別	天然帶菌種子	人工被覆之帶菌種子
B40	6.8×10^{4a}	1×10^4
S67	— ^b	—
S101	—	—
S201	—	—
歐索林酸	1×10^5	3×10^4
嘉賜銅	—	—
無菌水	1.2×10^5	6.1×10^4

^a CFU/ 克種子

^b —表未檢出

^a CFU/g seed

^b -not detect

表 9. 種子播種後經藥劑及拮抗菌澆灌處理後之及芽率及發病株率

Table 9. Seed germination and disease incidence of seeds treated with chemicals and antagonistic microbes

處理別	發芽率 (%)			發病株率 (%)		
	A ^a	B	C	A	B	C
B40	96.6	91.1	75.5	1.6	16.3	0
S67	97.9	72.7	78.1	2.6	33.3	0
S101	97.4	78.6	84.1	1.3	33.8	0
S201	97.1	86.2	86.0	2.1	45.6	0
歐索林酸	96.9	80.7	70.8	1.3	22.5	0
嘉賜銅	93.7	81.7	75.5	1.3	18.1	0
CK (無菌水)	95.6	87.0	83.3	1.9	41.9	0

^aA：田間採收自然帶菌種子；B：人工被覆之帶菌種子；C：市售無帶菌種子

^aA: contaminated seeds in field; B: contaminated seeds by artificial coating; C: commercially health seed

結 論

十字花科蔬菜黑腐病菌之不同菌株間在測試的半選擇性培養基上菌落及澱粉水解透明環大小及生長速度和選擇性均有差異，因此在檢測種子帶菌時應使用 2 種以上的培養基，種子帶菌可能來自於種莢甚至於種子之罹病感染，或是採收時及採收後處理過程的污染。若是前者，則其帶菌量多或可利用本試驗之種子漂洗法偵測，只需要一天的時間，但無法得知是否為活菌；若是後者或帶菌量少時則必須進行增量培養後塗抹於選擇性培養基上，可直接測知菌之活性。目前 ISTA 之檢測方法係以 0.85% NaCl / 0.02% Tween 20 緩衝液振盪 2.5 小時之洗出液塗抹於 mCS20ABN 及 FS 平板上，取可能之菌落培養於 YDC 培養基上進行甘藍幼苗之接種，如此可直接測知檢出細菌之致病力。而本試驗觀察種子在上述緩衝液振盪一段時間後種皮略為裂開時細菌的回收率最好，至於振盪的時間則視溫度而有差異，以 28°C 振盪 2 小時最佳，本試驗將種子洗出液經 0、24 及 48 小時增量培養後再分別塗抹於不同的平板上，培養 48 ~ 72 時後計數黑腐病菌菌落數，對於疑似的菌落則挑取細菌進行 ELISA 檢測或進行甘藍剪葉接種，確定其為黑腐病菌。

十字花科黑腐病之種子帶菌除表面污染外，也可能因病原菌直接感染種莢而侵入種子內部，本試驗中以菌株 S67、S101、S201 及嘉賜銅浸泡處理之種子未檢出黑腐病菌，可能表示這些處理可有效去除表面之病原菌，但因發芽率差未能調查其發病率，因此對於侵入種子內部之病原菌是否有去除效果仍需進一步調整處理的時間及濃度再進行測試。而於播種後以澆灌處理天然帶菌種子並無法有效降低其發病率，對於人工被覆的帶菌種子則以菌株 B40 及嘉賜銅處理之發病株率與對照組有明顯差異，表示對於表面污染的病原菌，在播種後處理有一定的效果，但相對於已侵入感染之種子則無防治效果，而十字花科蔬菜種子之黑腐病帶菌雖有直接侵入感染的現象，但實際上表面污染的機會仍很大，因此播種後的苗期處理仍不失為一個降低苗期及田間發病率的方法之一。

引用文獻

1. 石信德。1994。十字花科蔬菜黑腐病專一性核酸探針之製備及病菌偵測應用。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。
2. 林俊義。1981。臺灣十字花科黑腐病之研究。植保會刊 23：158-168。
3. 黃德昌、徐世典。1986。臺灣十字花科黑腐病菌血清偵測技術之研究。植保會刊 28：441-442。
4. 黃德昌、徐世典。1987。不同選擇性培養基偵測臺灣十字花科蔬菜黑腐病菌之效率。植保會刊 29：203-215。
5. 黃德昌、徐世典。1987。利用選擇性培養基由臺灣十字花科蔬菜種子及土壤中偵測黑腐病菌之技術。植保會刊 29：217-231。
6. 黃德昌。1988。臺灣十字花科黑腐病防治研究近況。蔬菜品種改良研討會：29-43。
7. 趙永椿、徐世典、曾國欽。2010。二氧化氯溶液對三種種媒植物病原細菌之殺菌效率及應用於種子處理之除菌效果。植病會刊 19：19-29。
8. Alvarez, A. M. and Lou, K. 1985. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv.

- campestris* by ELISA. Plant Dis. 69: 1082-1086.
9. Alvarez, A. M., Benedict, A. A. and Mizumoto, C. Y. 1985. Identification of xanthomonads and grouping of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. Phytotathology 75: 722-728.
 10. Chang, C. J., Donaldson, R., Crowley, M. and Pinnow, D. 1991. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. Phytopathology 81: 449-453.
 11. Groot, S.P.C.; Birnbaum, Y.; Rop, N.; Jalink, H.; Forsberg, G.; Kromphardt, C.; Werner, S.; Koch, E. 2006. Effect of seed maturity on sensitivity of seeds towards physical sanitation treatments. Seed Science and Technology 34: 403-413(11).
 12. ISTA. 2014. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. 7-019 in ISTA International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. International Seed Testing Association(ISTA), Bassersdorf, Switzerland.
 13. Liew, K. W. and Alvarez, A. M. 1981. Phage typing and lysotype distribution of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology 72: 274-276.
 14. Purcifull, D. E. and Bstchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion Test with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. Florida Agric. Expt. Sta. Bull. No. 78, 39 pp.
 15. Taylor, J. D., Conway, J., Roberts, S. J., Astley, D. and Vicente, J. G. 2002. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. Phytopathology 92: 105-111.
 16. Schaad, N. W. and Kendrick, R. 1975. A qualitative method for detection *Xanthomonas campestris* on crucifer seed. Phytopathology 65: 1034-1036.
 17. Schaad, N. W. 1978. Use of direct and indirect immunofluorescence tests for identification of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology 68: 249-252.
 18. Schaad, N. W., Sitterly, W. R. and Humaydan, H. 1980. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifer. Plant Dis. 64: 91-92.
 19. Taylor, A. G., Harman, G. E. and Nielsen, P. A., 1994, Biological seed treatments using *Trichoderma harzianum* for horticultural crops, HorTech. 4: 105-109.
 20. Vicente, J. G., Taylor, A. G., Parkin, I. A. P., Lydiate, D. J. and King, G. J. 2002. Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. Phytopathology 92: 1134-1141.

Detection and Disinfection Technique of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Crucifer Seeds¹

Wu, Y. F. and A. H. Cheng²

Abstract

Plating efficiency and recovery efficiency of tested *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) isolates on eight tested semi-selective media varied depending on the Xcc isolates. Thus, detection of Xcc from crucifer seeds uses at least two kinds of media to reduce the effect on the diverse sources of Xcc isolates. Shaking the seeds in 0.85% NaCl / 0.02% Tween 20 buffer at 28°C for 2 hours, the seeds were washed and plated on semi-selective media after enrich culture for 0, 24, 48 hours. Taking Xcc possible colonies to ELISA test or cabbage leaf-cutting to determine it is black rot pathogen.

1,000 times dilution of 20% oxolinic acid WP, 81.3% kasugamycin + copper oxychloride acid WP and antagonistic microbes B40, S67, S101, S201 are the best to inhibit growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. These two chemicals and 4 microbes were used to treat cabbage seeds by soaking 30 minutes or drenching after sow. XCC could not be detected when treated by soaking in S67, S101, S201 and kasugamycin+copper oxychloride acid respectively. But the Xcc detected from soaking in B40 or oxolinic acid. The germination rate was not affected when drenching these 6 agents after sow the crucifer seeds respectively. Disease incidence was not different significantly with natural contaminated seeds, whereas the artificial Xcc coated crucifer seeds treated with B40 and kasugamycin+copper oxychloride acid were reduced.

Key words: Black Rot of Crucifer, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Accepted for publication: May 14, 2014

1. Contribution No.430 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

2. Assistant Plant Pathologist and Plant Pathologist, respectively, Tainan District Agricultural Research and Extension Station, COA.

附件：檢測用培養基配方

Accessories: formula of detection medium

medium	Compound (每公升)	Antibiotics		
mCS20ABN plate (from ISTA)	Soya Peptone	2 g	Cycloheximide	200 ug/ml
	Bacto Tryptone	2 g	Neomycin	40 ug/ml
	KH ₂ PO ₄	1.59 g	Bacitracin	100 ug/ml
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.33 g		
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4 g		
	L-Glutamine	6 g		
	L-Histidine	1 g		
	D-Glucose	1 g		
	Distilled water	1,000 ml		
	Soluble starch	25 g		
	Agar	18 g		
CS20 plate	同 CS20ABN	同 CS20ABN	Cycloheximide	200 ug/ml
			Cephalexin	50 ug/ml
			Nitrofurantoin	10 ug/ml
W1 plate	甘藍葉片粗汁液	10 ml	Cycloheximide	200 ug/ml
	Distilled water	1,000 ml	Cephalexin	50 ug/ml
	Soluble Starch	25g	Nitrofurantoin	10 ug/ml
	Agar	18g		
W1 broth	甘藍葉片粗汁液	10 ml	Cephalexin	25 ug/ml
	Distilled water	1,000 ml	Nitrofurantoin	10 ug/ml

甘藍葉片粗汁液：甘藍葉加等重量水磨碎後以二層紗布過濾後之汁液

Crude extracts of cabbage leaf: filtrate of cabbage leaf add equal weight of water by double layer gauze