

# 芽孢桿菌屬細菌處理甘藍種子對黑腐病之防治效果探討<sup>1</sup>

陳俊位<sup>2</sup>、黃姿碧<sup>3</sup>、曾德賜<sup>3</sup>

## 摘 要

甘藍黑腐病(black rot)為全球十字花科蔬菜之重要病害，其可藉由種子進行長距離傳播，在世界各地造成嚴重危害。目前化學藥劑防治與種子消毒處理並無法有效控制本病害的發生與蔓延，且甘藍黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)菌株抗藥性亦已產生，而目前市場上常用的栽培品種抗病能力弱，生物農藥遂為本病害防治的新途徑。本研究擬篩選具拮抗黑腐病菌的枯草桿菌，應用於十字花科蔬菜種子上，以減少種子攜帶黑腐病菌。將所搜集的枯草桿菌菌株與黑腐病菌進行對峙培養，結果以 WG6-14(*Bacillus amyloliquefaciens*)、TKS1-1 (*B. subtilis*)與 SP4-17 (*B. megaterium*)三菌株拮抗能力最強，其次為 TCB9407 與 TCB102-B7。將液化澱粉芽孢桿菌(*B. amyloliquefaciens*) TCB102-B7、TCB9407 與 WG6-14 及枯草桿菌(*B. subtilis*)TKS1-1 等菌株進行量產醱酵，製備完成後取樣分析菌量與醱酵菌液营养成分，並與黑腐病菌進行對峙培養，抑制圈半徑在 1 cm 以上。將各菌株之醱酵菌液與甘藍‘台中 1 號’種子進行拌種試驗，初步檢測種子上各液化澱粉芽孢桿菌與枯草桿菌菌株帶菌率 100%，種子帶菌量則以 TCB102-B7 最高，每粒種子上可達  $4 \times 10^5$  cfu 以上，各菌株並有抑制種子黑腐病菌發生及提升幼苗發芽率效果。綜合試驗結果顯示所篩選之芽孢桿菌屬細菌可減少種子上所攜帶之黑腐病菌，可做為未來甘藍種子採種後拌種使用之生物製劑。

**關鍵字：**甘藍黑腐病菌、枯草桿菌、芽孢桿菌屬、種子處理

## 前 言

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 引起的十字花科黑腐病是世界性的重要病害<sup>(46)</sup>。以往，種子檢定、種子處理、田間衛生、輪作及採用抗病品種<sup>(7,8,9,10,13,44,47)</sup>，被認為是預防該病有效的策略，但迄未發現有效的田間防治藥劑。有關本病病菌的殘存與傳播，長久以來研究報告甚多，至今已確定，種子帶菌為本病主要的初次感染源<sup>(12,19,34,36)</sup>，病菌可經由維管束系統感染種臍或種皮，染子葉及幼葉<sup>(2,11,39,45)</sup>。黑腐病菌在土壤中的存活期限，則隨地區及存在狀態而異<sup>(2, 7,11,37)</sup>，在游離並在種

<sup>1</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 1043 號。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究員。

<sup>3</sup> 國立中興大學植物病理學系教授、兼任教授。

子內殘存達三年之久<sup>(29)</sup>，污染種子表面的病菌也可以殘存近三個月，待種子發芽後直接感狀態下，大約可存活60天左右，如在罹病殘莖中，則可存活507-615天，因此，在某些地區，土壤也被認為是重要的初次感染源<sup>(18,20,37,38)</sup>。此外，罹病的十字花科蔬菜、雜草，甚至健康蔬菜或雜草葉片上表生的病菌，也是重要的感染源<sup>(14,34,49)</sup>，在此部位存活的菌體，可藉由雨水飛濺，作短距離散佈，也可藉由雨天或晴天時產生的煙霧狀顆粒，作較長距離的傳播，昆蟲也可傳播本病，但較不重要<sup>(2,3,7,27)</sup>。

種子處理是減少本病發生的有效措施，國外對種子處理技術的研究始於1920年代<sup>(17)</sup>，迄今，開發成功的方法為數不少，例如有機汞劑處理<sup>(17)</sup>、熱水浸漬<sup>(17,18)</sup>、抗生素浸漬<sup>(25,26,41)</sup>、次氯酸鈣拌種<sup>(40)</sup>、銅劑處理<sup>(35)</sup>及氯酸鈉浸漬<sup>(24)</sup>等，這些方法都能有效除滅種傳(seed borne)黑腐病菌，但也各有缺點，有機汞劑殘毒問題嚴重，已遭禁用；熱水浸漬操作方面而且安全，以往亦被普遍採用，但經常影響種子發芽率，且無法完全除滅病菌<sup>(17,18)</sup>；抗生素效果優良，但容易造成幼苗傷害，且病菌對抗生素容易產生抗性，也常影響處理效果<sup>(25,26)</sup>；Schaad等氏推荐的熱酸性醋酸銅處理法，不但可除滅黑腐病菌，也可防治*Phoma lingam*引起的黑腳病，但處理時必須調整pH值，不便於農友採行，且該處理法會降低許多品種種子的發芽率，亦不適於當做例行的處理措施<sup>(35)</sup>；Harman等氏的Nyolate浸漬法及Schultz等氏的次氯酸鈣拌種法，操作簡便，不會造成種子或幼苗傷害，但僅能除滅種子表面病菌，效果未臻理想<sup>(24,40)</sup>。熱酸性硫酸鋅種子浸漬法則為國內黃氏所研發<sup>(4,5,6)</sup>，效果優於前述二者化學藥劑。這些種子消毒方法雖然有效，但因操作上的限制，並未被普遍被採用。

桿菌屬細菌為需氧或兼性厭氧之桿菌，在食品飼料添加物、酵素及種子保護劑等生技產業發展上應用已有多年<sup>(43,48)</sup>，在植物病蟲害的生物防治之研究與應用上，許多桿菌屬已知會產生可以抑制植物病原細菌、真菌及昆蟲之抗生性物質。此屬細菌多存在於土壤及植物體表<sup>(30)</sup>，一般認定為安全性(GRAS, generally regarded as safe)之有益微生物。在植物病害防治工作中，常被應用者包括*B. subtilis*<sup>(16,22)</sup>、*B. cereus*<sup>(21,23)</sup>、*B. megaterium*<sup>(28)</sup>及*B. pumilus*<sup>(31)</sup>等，應用防治對象則包括土壤病害、葉部病害、維管束病害、儲藏期病害<sup>(32,33)</sup>等；在種子種苗病害防治上，Umechuruba利用對峙培養發現*Bacillus subtilis*可抑制多種種傳真菌病原(seed-borne fungal pathogens)<sup>(42)</sup>，如*Alternaria brassicae*、*A. brassicicola*、*A. dauci*、*A. linicola*、*A. radicina*、*Ascochyta fabae*、*Colletotrichum lini*、*Fusarium culmorum*、*F. moniliforme*、*Macrophomina phaseolina*、*Pyrenophora graminea*、*P. teres*及*Stemphylium botryosum*等<sup>(42)</sup>。實際應用上*Bacillus subtilis*可有效抑制豆類種子上的炭疽病菌(*Colletotrichum lindemuthianum*)，Wharton施用商品化的枯草桿菌製劑Serenade(*B. subtilis*)及Sonata(*B. pumilus*)處理馬鈴薯種薯後可抑制其上的晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)、軟腐病菌(*Pectobacterium* spp.)及鐮胞病菌(*Fusarium* spp.)等，而延長種薯的儲存期間。而生物製劑Kodiak(*B. subtilis* GB03)更被廣泛應用於榨油蔬菜種子如芥花籽(canola)、芥菜籽(mustard)、油菜籽(rapeseed)及豆科作物如大豆(soybeans)等種子的拌種處理上使用，可減少*Fusarium* spp.及*Rhizoctonia solani*等病原的危害。為此，本研究擬利用所篩選的芽孢桿菌屬菌株及製劑針對甘藍種子上所帶之黑腐病菌進行防治試驗，從種子處理技術上進行探討，以建立甘藍健康種子的處理技術。

## 材料與方法

### 一、芽孢桿菌屬細菌菌株來源與製備方法

枯草桿菌菌株WG6-14、TKS1-1及SP4-17三菌株由中興大學植物病理學系分子植物病理研究室所提供，TCB9407及TCB102-B7則為田間採集篩選具拮抗黑腐病菌之枯草桿菌菌株。各供試菌株分類為*Bacillus subtilis* group中的*Bacillus subtilis* TKS1-1、*B. megaterium* SP4-17及*B. amyloliquefaciens* WG6-14、TCB 9407、TCB 102-B7、TCB NF、TCB N及TCB F。供試菌株經劃線培養於PSA斜面上，於30°C定溫箱培養一天後，移置4°C定溫箱保存。進行各項試驗前，將保存之菌取出塗抹於PSA平板上，置於30°C定溫箱中培養，俟菌落長出，挑取單一菌落於PSA平板上培養在30°C中。繼而於PSA斜面繼代培養兩次後，每1-2週更新一次供各項試驗之用。在供試菌醱酵量產方面，以既有之醱酵流程進行，以糖蜜、酵母粉、黃豆粉等為主要培養基質，利用5公升的Pilot Plant醱酵槽(百歐公司，臺灣)進行產製，培養過程中每天取樣檢視菌量變化及內生孢子轉換率，以確定供試樣品之活菌體品質<sup>(1)</sup>。本試驗供試甘藍品種(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)為甘藍‘台中1號’及‘初秋K-Y Cross’種子。

### 二、不同枯草桿菌菌株與甘藍黑腐病菌之對峙培養測試

將枯草桿菌WG6-14、TKS1-1及SP4-17三菌株與自行篩選之TCB-NF、TCB102-B7、TCB N、TCB F、TCB 9407-1及TCB 9407-2等菌株先培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜平板培養基(PDA)上，於36°C培養箱黑暗培養三天後，以移殖環沾取劃線於PDA中央，隨後取製備菌量為( $OD_{620} = 0.3$ )之甘藍黑腐病菌菌液裝入已消毒過的100 ml玻璃噴霧瓶中，黑腐病菌菌株係由埔里甘藍田區所分離之黑腐病菌株(Xcc-puli 024)，以噴霧方式將菌液均勻噴覆到PDA平板上，置於室溫下俟培養基表面無多餘水份後，置於30°C培養箱黑暗培養二天後，取出計數各菌株之抑制圈半徑大小。各菌株之抑制效果(抑制效果(I)=抑制圈距離(D)/芽孢桿菌屬菌帶直徑(R))計算以抑制圈距離除以枯草桿菌菌帶直徑，取數值最高的菌株進行後續試驗。

### 三、枯草桿菌醱酵製劑與甘藍種子在50°C不同處理時間對帶菌率之影響

供試菌株為TKS1-1、WG6-14、TCB9407及TCB102-B7等四菌株的醱酵製劑，培養條件為以實驗室既有之醱酵流程進行，以糖蜜、酵母粉、黃豆粉等為主要培養基質，利用5公升的Pilot Plant醱酵槽進行產製之醱酵製劑<sup>(1)</sup>。供試種子為‘台中1號’，各處理之種子以熱風循環之烘箱進行乾燥，比照一般十字花科種子調製溫度，乾燥溫度定為50°C<sup>(4)</sup>，乾燥時間分別為30、60及90 min，另以室溫風乾為對照組。處理後，分析種子上之帶菌量，分析方法為各處理之種子於乾燥後稱取1 g加入含9 ml無菌水之玻璃試管中，以振盪器振盪試管使各處理之枯草桿菌菌株懸浮於水中，靜置1 hr後再次振盪試管，隨後吸取1 ml菌液加入9 ml無菌水之玻璃試管中進行10倍系列稀釋，取系列稀釋第3、4及第5管菌液0.01 ml，滴於馬鈴薯葡萄糖洋菜平板培養基上，以消毒過L型玻棒將菌液塗抹均勻，

俟乾後置於30°C培養箱中黑暗培養24 hr，然後取出調查其上菌落數量，對照組同樣以無菌水處理種子。各處理種子以洋菜平板法測試其種子發芽率與帶菌率，每處理挑選25粒種子置於馬鈴薯葡萄糖洋菜平板培養基中，每處理四重覆。種子放置好後將培養皿置於室溫下培養一星期，一星期後取出調查各處理之發芽率、帶枯草桿菌率及其它微生物發生率，以比較各製劑內的芽孢桿菌屬菌株在不同乾燥處理時間後於種子上的殘存量。

#### 四、種子拌藥對甘藍種子上枯草桿菌醱酵製劑之影響

供試枯草桿菌菌株為 TKS1-1、WG6-14、TCB9407 及 TCB102-B7 等四菌株之醱酵菌液製劑，調整菌量為(OD<sub>620</sub>=0.3)備用。供試種子為市售之‘初秋’甘藍(拌藥藥劑為 Thiram 得恩地)，將拌藥之種子分為二批，一批置於自來水下洗去種子外所拌的藥劑，隨後瀝乾供試，另一批則為正常拌藥供試種子。二批種子分別稱取 10g 後處理四供試菌株，接種方式以拌種方式處理，拌種後之甘藍種子參考前法以循環風扇於室溫下乾燥，另以添加黑腐病菌株(Xcc-puli 024)拌種處理二批種子模擬人工接菌，處理後陰乾再處理四供試菌株，對照組以無菌水處理種子。各處理室溫乾燥後，分析種子上之帶菌量，分析方法同上。以探討種子上所拌之藥劑對供試菌株及各菌株對種子上所帶黑腐病菌之影響。

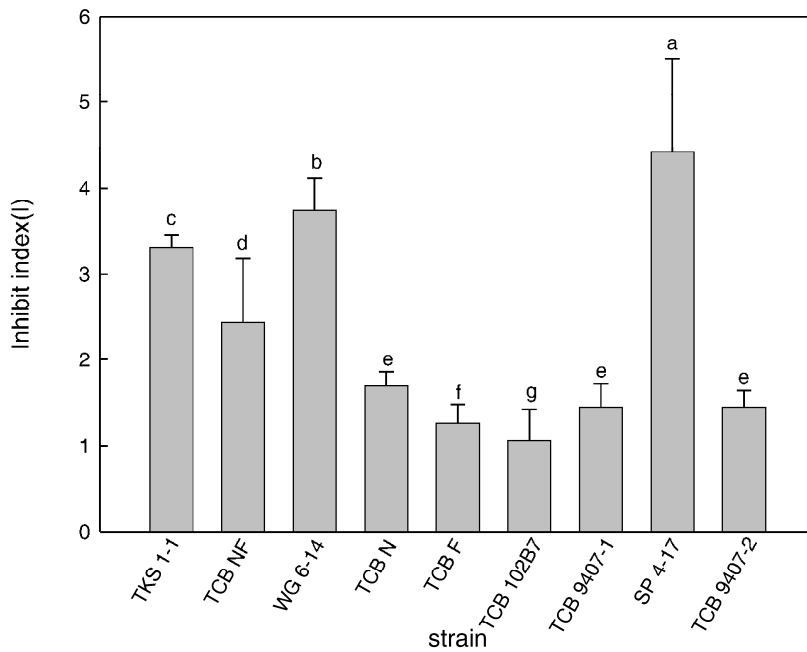
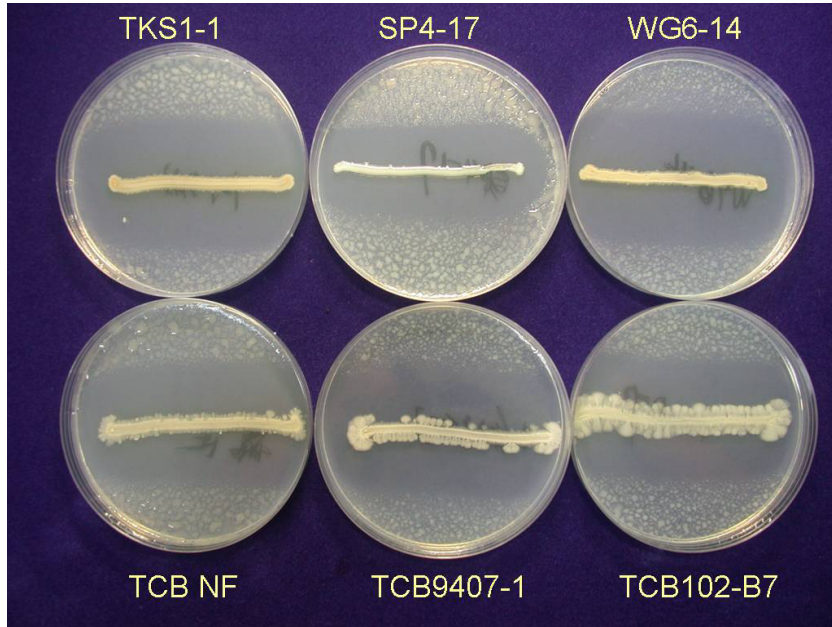
#### 五、甘藍種子混拌黑腐病菌對枯草桿菌醱酵製劑之影響

供試枯草桿菌菌株為 TKS1-1、WG6-14、TCB9407 及 TCB102-B7 等四菌株之醱酵菌液製劑，調整菌量為(OD<sub>620</sub>=0.3)備用。供試種子為市售未拌藥之‘台中 1 號’甘藍種子。將種子分別稱取 10 g 後處理四供試菌株，接種方式以拌種方式處理，拌種後之甘藍種子參考前法以循環風扇於室溫下乾燥，種子先添加黑腐病菌株(Xcc-puli 024)拌種處理模擬人工接菌，處理後陰乾再處理四供試菌株，對照組以無菌水處理種子，並以未拌種黑腐病菌之甘藍種子為正對照。各處理室溫乾燥後，分析種子上之帶菌量，分析方法同上。以探討各菌株對種子上所帶黑腐病菌之影響。

## 結 果

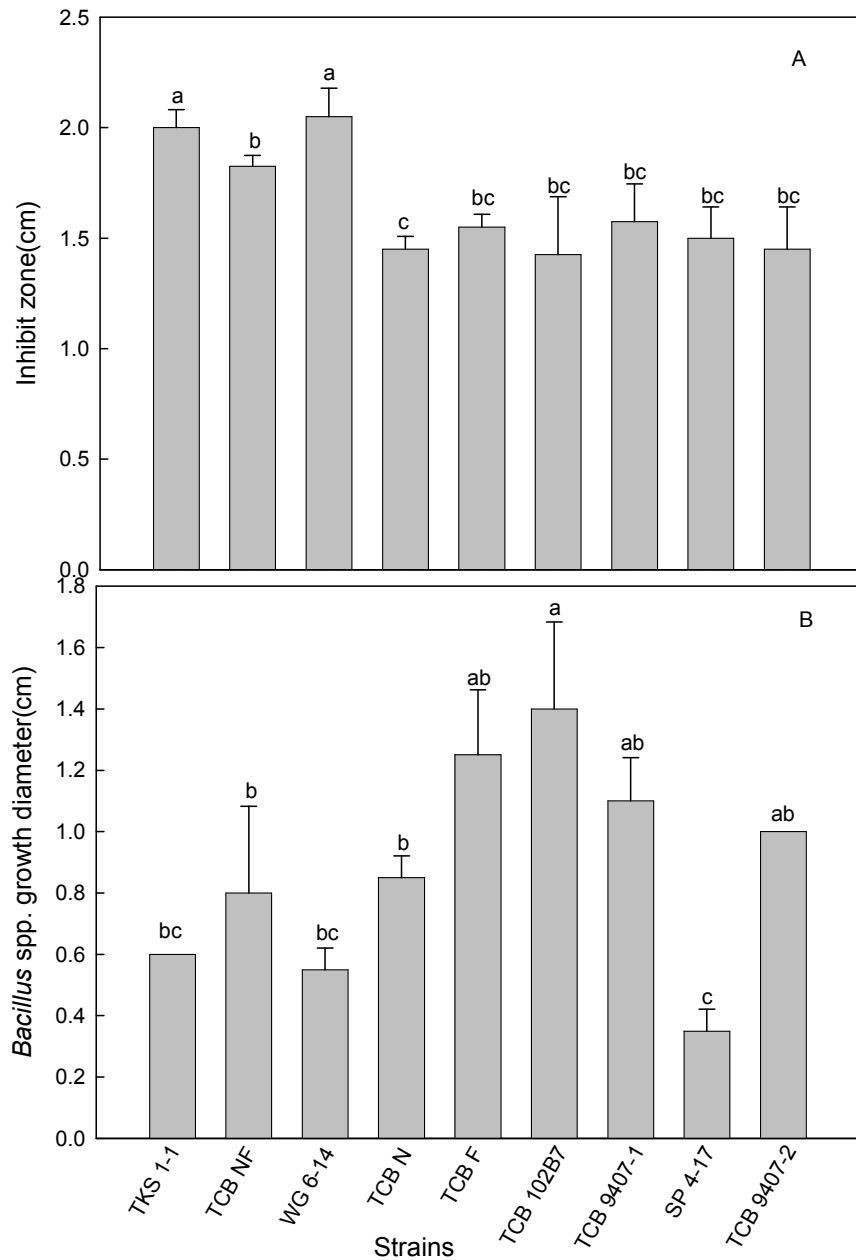
### 一、不同枯草桿菌菌株與甘藍黑腐病菌之對峙培養測試

將枯草桿菌 WG6-14、TKS1-1 及 SP4-17 三菌株與自行篩選之 TCB NF、TCB102-B7、TCB N、TCB F、TCB 9407-1 及 TCB 9407-2 測試其對黑腐病菌(Xcc-puli 024)拮抗能力強弱，測試結果發現抑制圈以 WG6-14 及 TKS1-1 最好，其於菌株差異不大(圖一)。在 PDA 上菌株生長情形則以 TCB102-B7 生長情形最佳，其次為 TCB F、TCB 9407-1 及 TCB 9407-2。將上述二者資料換算成抑制效果(I)，結果抑制效果以 SP4-17 最強，其次 WG6-14、TKS1-1、TCB NF、TCB N、TCB 9407-1 及 TCB 9407-2，TCB F 及 TCB102-B7 則最弱(圖二)。



圖一、不同枯草桿菌供試菌株對甘藍黑腐病菌之抑制效果。

Fig. 1. The inhibitory activity of different tested strains growth in PDA at 30°C for 2 day to resist against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc-puli 024.

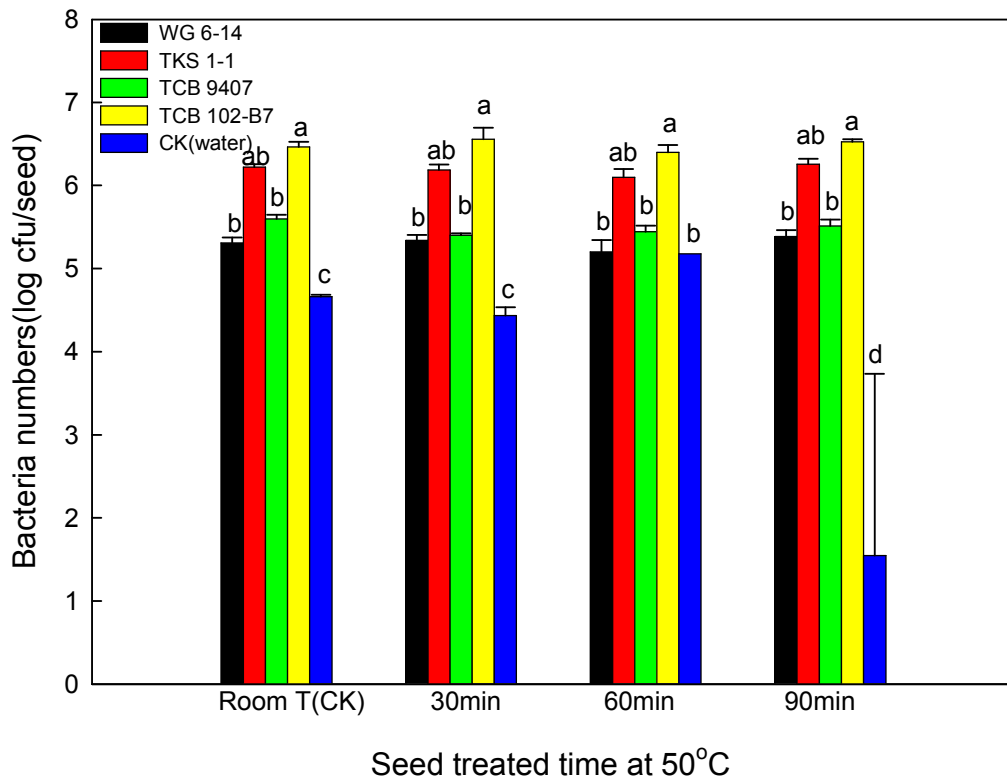


圖二、不同枯草桿菌菌株與甘藍黑腐病菌之對峙培養測試(A)及培養情形(B)。

Fig. 2. Antimicrobial activity of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) after 24 hours of incubation. Antimicrobial activity (mm) is expressed as the difference between diameter of inhibition zone and diameter of *Bacillus* colony.

## 二、枯草桿菌醱酵製劑與甘藍種子在 50°C 不同處理時間對帶菌率之影響

將 TKS1-1、WG6-14、TCB9407及TCB102-B7等四菌株的醱酵菌液與甘藍種子混拌後，在50°C下處理不同時間後，各菌株在每粒種子上皆可維持在 $10^5$ cfu/ml以上，顯示50°C下乾燥時間的長短對種子上所攜帶的枯草桿菌數量影響不大。各菌株間菌量以TCB102-B7及TKS 1-1二菌株在各處理時間上仍可維持 $10^6$ cfu/ml為最高，其次為WG 6-14及TCB 9407，對照組上的微生物在50°C下處理90分鐘後其數量已低於 $10^2$ cfu/ml以下(圖三)。

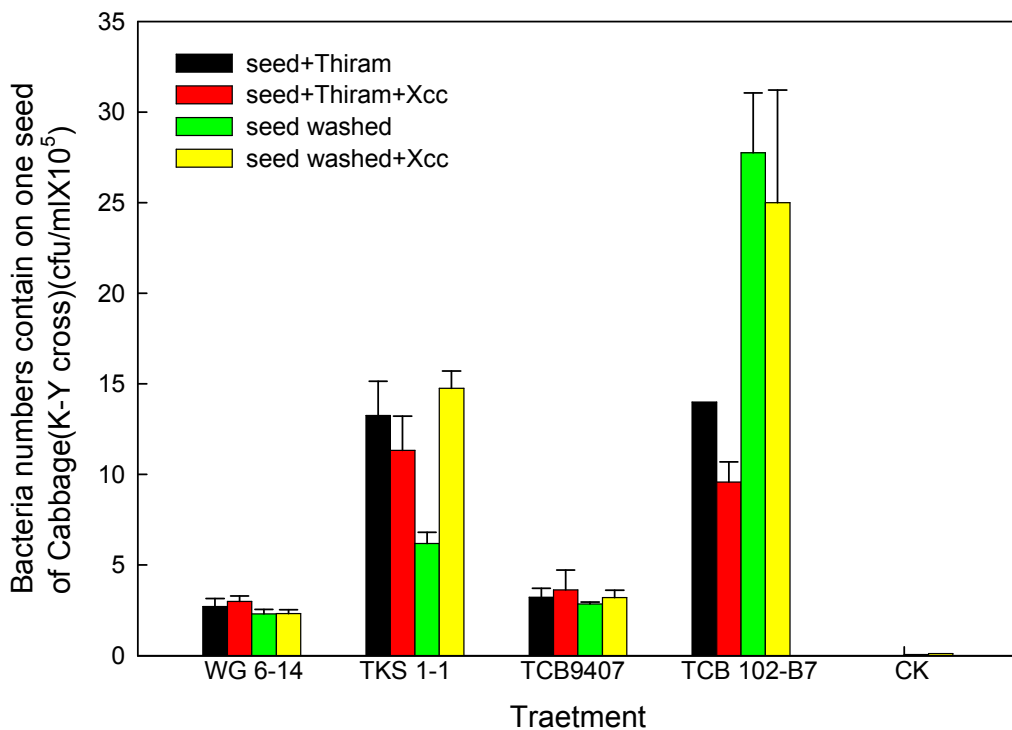


圖三、50°C下不同處理時間醱酵菌液施用於甘藍台中一號種子後供試菌 WG 6-14,TKS 1-1,TCB 9407 與 TCB 102-B7 殘存檢測。

Fig. 3. Population dynamics of *Bacillus subtilis* WG 6-14、TKS 1-1,TCB 9407and TCB 102-B7 (applied 100X dilution) on cabbage seed(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*, cultivar:Taichung No.1) after application under 50°C condition. A total of 10 gram seed were sampled from each treatment, the survival count of test bacteria was determined by dilution plate method. Bars indicate standard deviation.

### 三、醱酵菌液施用於拌藥甘藍種子後供試菌殘存檢測

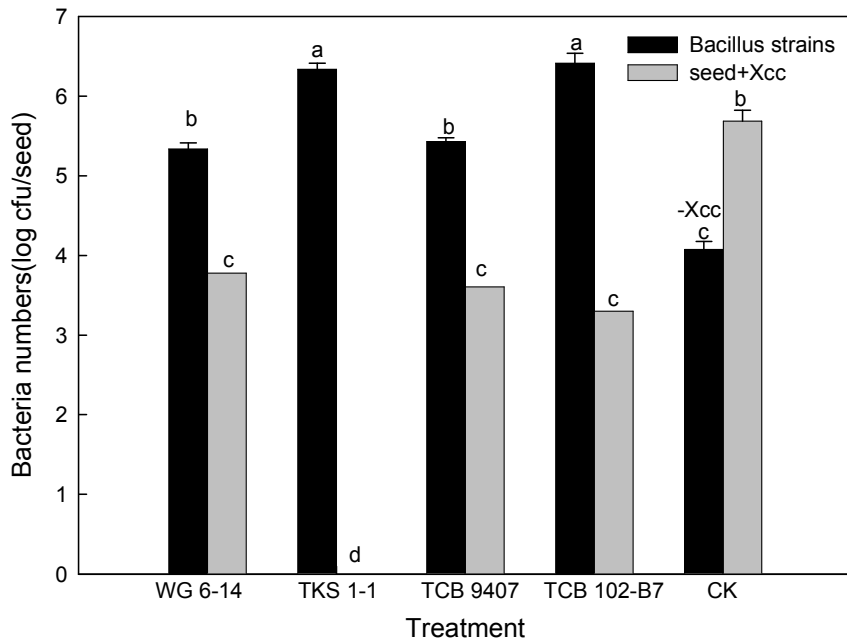
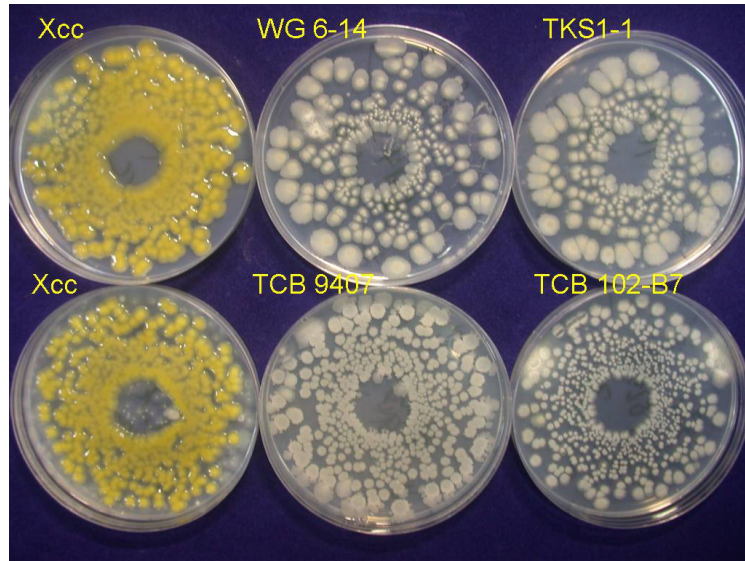
將市售拌有得恩地(Thiram)之初秋甘藍種子與 TKS 1-1、WG 6-14、TCB 9407 及 TCB 102-B7 等四菌株的醱酵菌液混拌後，各種處理中各供試菌株在每粒種子上皆可維持在  $10^5$ cfu/ml 以上，顯示拌藥種子對其所攜帶的枯草桿菌數量影響不大。各菌株間菌量仍以 TCB 102-B7 及 TKS 1-1 二菌株在各處理上仍可維持  $10^6$ cfu/ml 為最高，其次為 WG 6-14 及 TCB 9407，對照組上的微生物在藥劑處理下其數量趨近於 0(圖四)。洗去種子上的藥劑後對 TCB 102-B7 的菌量可增加  $1.4 \times 10^6$ cfu/ml 以上，但對 TKS1-1、WG6-14 及 TCB9407 影響則不大。先混拌黑腐病菌再添加枯草桿菌，結果發現在培養時各菌株可抑制洗去藥劑種子上的黑腐病菌，拌藥種子上則無微生物產生。



圖四、醱酵菌液施用於拌藥甘藍‘初秋’種子後供試菌 WG 6-14,TKS 1-1,TCB 9407 與 TCB 102-B7 殘存檢測。

Fig. 4. Population dynamics of *Bacillus subtilis* WG 6-14、TKS 1-1,TCB 9407and TCB 102-B7 on cabbage ‘K-Y cross’ after application. A total of 1 gram seed were sampled from each treatment, the survival count of test bacteria was determined by dilution plate method. Bars indicate standard deviation.





圖五、甘藍種子拌種黑腐病菌後處理枯草桿菌對其之抑制效果。

Fig. 5. Population dynamics of *Bacillus subtilis* WG 6-14、TKS 1-1,TCB 9407, TCB 102-B7 and Xcc on cabbage seed Taichung No.1, after application. A total of 1 gram seed were sampled from each treatment, the survival count of test bacteria was determined by dilution plate method. Bars indicate standard deviation.

#### 四、甘藍種子混拌黑腐病菌對枯草桿菌醱酵製劑菌量之影響

各菌株之醱酵菌液製劑處理混拌黑腐病菌之甘藍種子後，以 TKS 1-1 之抑制效果最好，可將其種子上的黑腐病菌完全抑制，其餘 WG6-14、TCB 9407 及 TCB 102-B7 次之，與對照組比較，模擬接菌種子上帶黑腐病菌可高達  $10^5$ cfu/ml 以上，而處理組可降低種子上黑腐病菌帶菌量至  $10^3$ cfu/ml。而各菌株的數量在種子上以 TKS 1-1 及 TCB 102-B7 二者最高，每粒種子上帶菌量可達  $10^6$ cfu/ml 以上，其次為 WG6-14 及 TCB 9407，二者每粒種子上帶菌量亦達  $10^5$ cfu/ml 以上(圖五)。

### 討 論

在測試不同芽孢桿菌屬菌株拮抗甘藍黑腐病菌能力時，拮抗能力強的菌株WG6-14、TKS1-1及SP4-17在培養基上生長半徑低於其它菌株，但有較高之抑制指數，枯草桿菌在抑制病原時抗生作用為最主要的作用機制，已知桿菌屬細菌所產生抗生物質中Iturin A可對抗*Xanthomonas oryzae*及*Pseudomonas lachrymans*等植物病原細菌，WG6-14及TKS1-1在研究室之前的研究已闡明其代謝產物中有抗菌物質iturin A的產生，其它菌株抑制黑腐病菌的代謝物質則需進一步分析。

十字花科種子調製處理時會使用熱風短時間乾燥，而減少種子上之黑腐病菌亦會使用  $52^{\circ}\text{C}$  的溫湯浸種處理。本試驗以 $50^{\circ}\text{C}$ 溫度熱風乾燥處理各菌株之甘藍種子，結果顯示各處理時間下種子上的各枯草桿菌菌量皆可維持在  $1.5 \times 10^6$ cfu/ml 以上，顯示  $50^{\circ}\text{C}$  的處理溫度對供試菌株的菌量影響不大。枯草桿菌菌種特性在當細胞遇惡劣環境或化學藥劑(如硫酸錳等)時可產生抵抗力極強的內生孢子(endospore)，以作為求生存的方法，不同菌種的內生孢子有不同的抗熱性，以抵抗惡劣環境；當遇適當的生長環境時，內生孢子可萌發形成營養細胞。本試驗所測試之三菌株在之前培養過程中內生孢子轉換率極高，此在調製種子上為具耐高溫優勢的添加菌種。

本研究將WG6-14與TKS1-1二株已知抗菌特性之枯草桿菌依之前所建立之醱酵方式將其製劑化外，並挑選液化澱粉芽孢桿菌TCB9407與TCB102-B7二菌株依同樣配方與培養方式進行製劑化，以探討各菌株醱酵製劑做為種子種苗處理製劑之可行性。各菌株的醱酵製劑與甘藍種子混拌後，在 $50^{\circ}\text{C}$ 下熱風乾燥處理不同時間下，各製劑的菌量在每粒種子上皆可維持在 $10^5$ cfu/ml以上，顯示 $50^{\circ}\text{C}$ 下乾燥時間的長短對種子上所攜帶的枯草桿菌數量影響不大，此對未來應用在種子調製過程中做為種子拌種製劑頗具應用潛力。

國內甘藍種子來源除進口外亦有種苗業者自行生產採種，國外進口的甘藍種子以日本的‘初秋’(K-Y cross)為主要品種，進口種子生產廠商一般皆會先予以拌藥處理以減少其上夾雜病原菌而影響發芽率，國內生產的甘藍種子則因廠商的設備或委託採種而較少拌藥。在拌藥種子與黑腐病菌混拌試驗時發現，甘藍種子上所拌的得恩地(Thiram)屬有機硫磺劑類藥劑，對多種真菌類病原有抑制效果，試驗發現該藥劑對各枯草桿菌醱酵製劑的菌量略有影響，但每粒種子平均帶菌量仍可達  $2 \times 10^5$ cfu/seed，而 TKS1-1 與 TCB102-B7 二菌株製劑則受影響情形較低，每粒種子平均帶菌量可達

$1 \times 10^6$  cfu/seed 以上。而混拌黑腐病菌之甘藍種子處理各醱酵製劑後皆未測得黑腐病菌，Bridier 研究所分離會產生生物膜(biofilm)的枯草桿菌發現其會保護 *Staphylococcus aureus* 避免殺菌劑的作用<sup>(15)</sup>。本研究各菌株醱酵製劑則無此結果，顯示所處理之製劑菌株不會保護黑腐病菌而影響種子拌藥的殺菌效果，相關處理皆可有效抑制黑腐病菌。而用未拌藥的‘台中 1 號’甘藍種子，人工模擬接菌後其每粒種子上帶黑腐病菌可高達  $10^5$  cfu/seed 以上，而處理組可降低種子上黑腐病菌帶菌量，其中以 TKS 1-1 的處理效果最好，種子上 TKS1-1 菌量若達  $10^6$  cfu/seed 以上時，可抑制其上所夾雜的黑腐病菌。綜合上述種子處理結果，各菌株皆可當種子拌種或消毒劑，但以 TKS 1-1 防治效果最佳。

綜合試驗結果顯示所篩選之芽孢桿菌屬各菌株可减少種子之黑腐病菌為害，未來配合甘藍種苗生產作業流程在種子調製時施用各醱酵製劑將可培育出健康種苗，減輕與降低種子攜帶黑腐病菌的發生與危害。

## 參考文獻

1. 王淳禾 2006 枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 懸浮培養增量菌液製作及其病害管理之應用 國立中興大學植物病理學系碩士論文 59 頁。
2. 林俊義 1981 台灣十字花科黑腐病之研究 植保會刊 23: 157-168。
3. 黃穗昌 1988 十字花科黑腐病防治研究 豐年 38(7): 48-51。
4. 黃穗昌、李惠鈴 1987 熱酸性硫酸鋅浸漬法防治種帶十字花科黑腐病菌 植保會刊 29: 422 (摘要)。
5. 黃穗昌、李惠鈴 1987 酸、熱及銅、鋅、錳離子對十字花科黑腐病菌之致死效應 植保會刊 29: 421-422(摘要)。
6. 黃穗昌、李惠鈴 1988 熱酸性硫酸鋅種子浸漬法防治十字花科蔬菜黑腐病 植保會刊 30: 245-258。
7. 黃穗昌 1988 台灣十字花科黑腐病防治研究近況 蔬菜品種改良研討會專輯 p.29-43 台灣省政府農林廳臺東區農業改良場編印。
8. 許涵鈞、吳雅芳、謝明憲、鄭安秀 2011 十字花科蔬菜品種抗黑腐病篩選之研究 臺南區農業改良場研究彙報 57: 11-19。
9. 謝明憲、林棟樑、鄭安秀、王仕賢 2001 甘藍抗黑腐病篩選之研究 臺南區農業改良場研究彙報 38: 45-53。
10. Anonymous. 1966. International rules for seed testing. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 31: 1-150.
11. Alvarez, A.M. and J.J.Cho. 1978. Black rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and disease incidence. *Phytopathology* 68: 1082-1086。
12. Bain, D.C. 1952. Reaction of brassica seedling to blackrot. *Phytopathology* 42: 497-500.

13. Bain, D.C. 1955. Resistance of cabbage to blackrot. *Phytopathology* 45: 35-37.
14. Bhat, N. A., N. Syeed, K. A. Bhat and S. A. Mir., 2010. Pathogenicity and host range of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - incitant of black rot of crucifers. *J. Phytopathology* 2: 01-05.
15. Bridier, A., MdP. Sanchez-Vizuete, D. Le Coq, S. Aymerich, T. Meylheuc, J.-Y. Maillard, V. Thomas, F. Dubois-Brissonnet and R. Briandet. 2012. Biofilms of a *Bacillus subtilis* Hospital Isolate Protect *Staphylococcus aureus* from biocide action. *PLoS ONE* 7(9): e44506. doi:10.1371/journal.pone.0044506
16. Chang, I. P. and T. Kommedahl. 1968. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganism. *Phytopathology* 58: 1395-1401.
17. Clayton, E.E. 1924. Control of blackrot and black leg of cruciferous crop by seed and seed bed treatments. *Phytopathology* 14: 24-25 (Abstr.)
18. Clayton, E.E. 1934. A progress report on blackrot investigations, with special reference to cauliflower on Long Island. *Phytopathology* 14: 24(Abstr.).
19. Cook, A.A., R.H. Larson and J.C Walker. 1952. Relation of the black rot pathogen to cabbage seed. *Phytopathology* 42: 316-320.
20. Cook, A.A., J.C.Walker and R.H.Larson. 1952. Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. *Phytopathology* 42: 162-167.
21. Doherty, M. A. and T. F. Preece. 1978. *Bacillus cereus* prevents germination of uredospore of *Puccinia allii* and the development of rust disease of leek, *Allium porrum*, in controlled environments. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 123-132.
22. Dunleavy, J. 1954. Control of damping-off of sugarbeet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 45: 252-258.
23. Fravel, D. R. and H. W. Spurr. 1977. Biocontrol of tobacco brownspot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. *Phytopathology* 81: 283-287.
24. Harman, G.H., J.M.Norton, T.E.Stasz and H.S.Humaydan. 1987. Nyolate seed treatment of *Brassica* spp. to eradicate or reduce black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Dis.* 71: 27-30.
25. Humaydan, H.S., G.E.Harman, B.L.Nedrow and L.V.DiNitto. 1980. Eradication of *Xanthomonas campestris*, the causal agent of black rot, from *Brassica* seeds with antibiotics and sodium hypochlorite. *Phytopathology* 70: 127-131.
26. Klisiewicz, J.M. and G.S.Pound. 1961. Studies on control of black rot of crucifers by treating seeds with antibiotics. *Phytopathology* 51: 495-500.

27. Kuan, T.L., G.V.Minsavage and N.W. Schaad. 1986. Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. Plant Dis. 70: 409-413.
28. Liu, Z. L. and J. B.Sinclair. 1990. Biocontrol of Rhizoctonia root and crown rot of soybeans by *Bacillus megaterium* ATCC-55000. Phytopathology 80: 1051 (Abstr.).
29. Moneith, J.Jr. 1921. Seed transmission and overwintering of cabbage black rot. Phytopathology 11: 53-54.
30. McSpadden Gardner, B. B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In agricultural system. Phytopathology.94: 1252-1258.
31. Morgan, F. L. 1963. Infection inhibition and germ tube lysis of three cereal rusts by *Bacillus pumilus*. Phytopathology 53: 1346-1348.
32. Nemeč, S., L. E.Datnoff and J.Strandberg. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. Crop protection.15: 735-742.
33. Obagwu, J. and L.Korsten. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biology and Technology.28: 187-194.
34. Schaad, N.W. and J.C.Dianese. 1981 Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. Phytopathology 71: 1215-1220.
35. Schaad, N.W., R.L.Gabrielson and N.W. Mulanax. 1980. Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of *Xanthomonas campestris* from crucifer seed. Appl. Envir. Microbiol. 39: 803-807.
36. Schaad, N.W., W.R.Sitterly and H.Humaydan. 1980. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. Plant Dis. 64: 91-92.
37. Schaad, N.W. and N. Thaveechai. 1983. Black rot of crucifers in Thailand. Plant Dis. 67: 1231-1234.
38. Schaad, N.W. and W.C.White. 1974. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. Phytopathology 64: 1518-1520.
39. Schultz, T. and R.L.Gabrielson. 1986. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in western Washington crucifer seed fields: occurrence and survival. Phytopathology 76: 1306-1309.
40. Schultz, T., R.L.Gabrielson and S.Olson. 1986. Control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seed with slurry treatment of calcium hypochlorite. Plant Dis.70: 1027-1030.
41. Sutton, M.D. and W.Bell. 1954. The use of aureomycin as a treatment of swede seed for the control of black rot (*Xanthomonas campestris*). Plant Dis. Repr. 38: 547-549.
42. Umechuruba, C.I.2004. Inhibition of growth of some seed-borne fungal pathogens by extract from *Bacillus subtilis*. Global Jnl Pure & Applied Sciences 10: 17-21.

43. Verschuer, L., G.Rombaut, P. Sorgeloos and W.Verstrete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Bio. R.* 64: 655-671.
44. Vicente, J. G., B.Everett and S. J. Roberts. 2006. Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology* 96: 735-745.
45. Walker, J.C. and W.B.Tisdale. 1920. Observation on seed transmission of the cabbage black rot organism. *Phytopathology* 10: 175-177.
46. Williams, P.H. 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifer. *Plant Dis.* 64:736-742.
47. Williams, P.H., T.Staub and J.C.Sutton. 1972. Inheritance of resistance in cabbage to black rot. *Phytopathology* 62: 247-252.
48. Xiaojia, H.Daniel,P.R.,Lihua,X.,Lu, Q.,Yinshui L., Xiangsheng, L., Peipei,H., Y.Changbing and Xing,L. 2019. Seed treatment containing *Bacillus subtilis* BY-2 in combination with other *Bacillus* isolates for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Biological Control* 133: 50-57.
49. Young, J.M. 1969. An alternative weed host for *Xanthomonas campestris*. *Plant Dis.* 53: 820-821.

# Study the Control Effect of *Bacillus* strains on Black Rot of Cabbage Seeds<sup>1</sup>

Chein-Wei Chen<sup>2</sup>, Tzu-Pi Huang<sup>3</sup> and Dean Der-Syh Tzeng<sup>3</sup>

## ABSTRACT

Cabbage black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc) is an important disease of cruciferous vegetables in the world. It can be spread over long distances by seeds, causing serious damage all over the world. At present, chemical control and seed disinfection treatments cannot effectively control the occurrence and spread of this disease. Xcc strains have also developed resistance, and the currently commonly used cabbage cultivars on the market have weak disease resistance. Therefore, biological pesticides are a new way to prevent and control this disease. This study intends to screen *Bacillus subtilis* that can antagonize black rot bacteria and apply it to cruciferous vegetable seeds and seedlings to reduce the occurrence of seedling black rot. The collected *B. subtilis* strains and the black rot bacteria use the dual culture technique to test, and the results showed that the three strains WG6-14, TKS1-1 and SP4-17 had the strongest antagonistic ability, followed by TCB9407 and TCB102-B7. *Bacillus amyloliquefaciens* TCB102-B7, TCB9407 and WG6-14, *B. subtilis* TKS1-1 and other strains were mass-produced fermented fermentation. After the preparation was completed, samples were taken to analyze the amount of bacteria and fermented ferment culture. Part of the ingredients, and use the dual culture technique to test black rot pathogen, the radius of the inhibition zone is more than 1cm. The fermented fermentation broth of each strain and the cabbage 'Taichung No. 1' seed were tested for seed dressing. The preliminary detection of the *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* strains on the seeds was 100%, and the bacterial load of the seeds was TCB 102-B7, which was the highest, per gram The seed can reach more than  $4 \times 10^5$  cfu/seed, and each strain also has the effect of inhibiting the occurrence of seed black rot and increasing the germination rate of seedlings. The comprehensive test results show that the screened *Bacillus subtilis* can reduce the black rot bacteria carried on the seeds, and can be used as a biological preparation for seed dressing after the cabbage seeds are harvested in the future.

Key words: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* strains, seed treatment.

---

<sup>1</sup> Contribution No.1043 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup> Researcher of Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA.

<sup>3</sup> Professor and Adjunct Professor of Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan.