

不同選擇性培養基偵測台灣十字花科 蔬菜黑腐病菌之效率¹

黃德昌 徐世典²

關鍵字：黑腐病菌、選擇性培養基、拮抗細菌、偵測

摘 要

台灣黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 在 SX agar, nutrient-starch-cycloheximide agar (NSCA), nutrient starch cycloheximide antibiotic agar (NSCAA), basal starch cychohemide antibiotic agar (BSCAA), starch methionine medium (SM) 及 soluble starch medium (DSX) 等六種現有之黑腐病菌選擇性培養基上之平板效率雖可達 75% 或更高，但這些培養基應用於偵測十字花科種子洗出液及土壤抽出液中之黑腐病菌時，其效果均不理想，其主要原因為各培養基上出現雜菌及拮抗菌之數目偏多，影響回收黑腐病菌之效率。這些培養基中，以 DSX 及 NSCA 培養基之效果最差，而其他四種培養基之表現隨土壤及種子樣品之不同而有很大差異，從土壤中之回收效率為 2.2 ~ 17.7%，從種子上則為 0 ~ 57.4%。自種子及土壤中常可分離到對黑腐病菌生長具抑制作用之拮抗細菌，其中屬於 *Bacillus spp* 者在 BSCAA, SM 及 SX 培養基上不能生長，但屬於 *fluorescent pseudomonads* 者，多數之菌株在 SX 培養基上却具有極強之抑制黑腐病菌生長之能力，嚴重影響黑腐病菌之回收，在 BSCAA 及 SM 培養基上，尤其在 SM 培養基抑制力則極弱，對病菌回收之影響亦輕微，這些 *fluorescent pseudomonads* 拮抗細菌在選擇性培養基上之抑制能力與其產生之螢光色素無關，而可能起因於其他拮抗機制，由於黑腐病菌在 SM 培養基上最容易被鑑別，且其回收受拮抗細菌之影響最輕微，因此，SM 培養基在六種供試培養基中表現最佳。

-
1. 本研究承農委會經費補助及農友種苗公司惠贈部份種子，特此致謝。
 2. 台東區農業改良場助理研究員與國立中興大學植物病理學研究所教授。

前 言

Xanthomonas campestris pv. *campestris* 引起之黑腐病(*black rot*) 是十字花科作物世界性之重要病害，在亞熱帶及熱帶地區發生尤其猖獗(19.)，本病病原細菌早經證實，可能由種子傳播(6. 17. 19.)，而在某些地區，土壤也被懷疑是重要之感染源(4. 5. 16. 17.)，因此，長久以來，偵測種子及土壤中之病菌，被認為是研究本病菌生態、流行病學、檢疫及防治之重要課題(4. 12. 16. 19.)，本病菌之偵測方法頗多(12.)，而其中以採用選擇性培養基行直接分離之偵測法，優點最多(12.)，分離本病菌之選擇性或半選擇性培養基，至今，已有多種被發展出(5. 7. 8. 11. 12. 14. 15.)，這些培養基究竟以何者偵測效率最高，因無人綜合比較過，而缺乏具體數據，僅知偵測土壤中植物殘體上之病菌時，*starch-methionine medium* 之效率高於 *SX agar* (5.)，而 *D-5* 培養基用於偵測土壤中的黑腐病菌時效率極低(15.)，各培養基之偵測效率常因供試樣品、菌株之不同而有差異，而雜菌及拮抗細菌為影響回收效率之重要因子(11. 13.)。

台灣地處亞熱帶，溫、濕度均適宜本病之發生，因此，黑腐病一直是台灣十字花科蔬菜普遍而嚴重之病害，但至今，除林(1.)曾對病菌在種子上之存活、種子處理及甘藍品種之抗病檢定有研究外，台灣有關該病之資料却甚為有限，因此，黑腐病菌在台灣土壤中生存之情形，種子、土壤及雜草在發生流行學上所扮演角色如何，種子檢疫系統之設計等，均亟待研究，而此類之研究，顯見均須以偵測技術之確立為基礎。本研究之目的，即在比較現有之各選擇性培養基，用於台灣偵測黑腐病菌之優劣，並探討不同之拮抗細菌，在不同培養基上，對黑腐病菌生長及回收之影響，俾供爾後應用之參考。

材料與方法

黑腐病菌及拮抗細菌之來源：

黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) *XC35* 及 *XC38* 菌株分別由彰化及台南採集之甘藍病葉分離而得。拮抗細菌 *FP17*、*FP32*、*FP43* 及 *FP45* 等菌株(均屬於 *fluorescent pseudomonads*)取自本研究室保存之菌種，其餘菌株則於本研究期間由不同地區採集之土壤中及不同來源之十字花科蔬菜種子上分離而得，分離時將土壤及種子樣品分別以 1:10(*w/v*) 及 1:25 (*w/v*) 之比例在生理食鹽水(0.85% *NaCl* 溶液)中強烈振盪一分鐘，取其土壤

抽出液或種子洗出液，經稀釋後，分別展佈於NGA與SX培養基平板上，置室溫培養兩天後，以色層分析用噴霧器 (*chromatographic sprayer*) 將每毫升含約 5.0×10^7 個菌落形成單位 (*colony forming unit/ml*, *CFU/ml*) 之黑腐病菌XC38 菌株的懸浮液均勻噴佈於平板上，於 30°C 經二天培養後，觀察生長抑制圈之有無 (11.)，將具有抑制黑腐病生長之拮抗細菌經二次單菌落分離法予以純化。由此法分離選出 *An P1*、*An P2*、*An P3*、*An P4*、*An B1*、*An B2* 及 *An B3* 等七個拮抗細菌株供試。初步鑑定結果 *AnP1*~*AnP4* 屬於 *Pseudomonas (fluorescent pseudomonads)*，而 *An B1* - *An B3* 屬於 *Bacillus* (2)。

所有供試細菌均在 523 培養基斜面上，於 30°C 培養 2 - 3 天後，除另有指明外，都懸浮於生理食鹽水中，再以 *Spectronic 20 spectrophotometer* 在 620nm 波長下調整適當 OD 值，並經適當稀釋及在 NGA 平板上測定菌落數，依此所得之懸浮液及按試驗所需之細菌濃度而稀釋之懸浮液作為各項試驗之接種源。

培養基：

用於比較其偵測效率 (*detection efficiency*) 之黑腐病菌選擇性或半選擇性培養基包括 *Schaad* 及 *White* 之 *SX agar (SX)* (15)、*Shaad* 及 *Kendrick* 之 *nutrient-starch cycloheximide agar (NSCA)* (11, 14)、*Randhawa* 及 *Schaad* 之 *nutrient starch cycloheximide antibiotic agar (BSCAA)* (11.)、*Chun* 及 *Alvarez* 之 *starch-methionine medium (SM)* (5.)、及 *Dhanvantari* 之 *soluble starch medium (DSX)* (7)。另外，*McGuire* 及 *Jones* 發展對 *X. campestris pv. vesicatoria* 具有選擇性之培養基，本文簡稱 T80 (10)，也一併加以比較。*Nutrient glucose agar (NGA)* 為含 0.25% *glucose* 的 *nutrient agar*，作為各選擇性培養基比較時之對照培養基。*523 agar* (8) 用於培養細菌之普通培養基，*King's B medium (KB)* (4) 用於測定拮抗細菌之螢光色素形成及其與拮抗作用之關係。

黑腐病菌在不同選擇性培養基上之平板效率：

將黑腐病菌XC35 及XC38 菌株之懸浮液 (1.0×10^3 *CFU/ml*) 各取 0.1ml 分別展佈於NGA及各選擇性培養基—SX、NSCA、NSCAA、BSCAA、SM、DSX、及T80—平板上，置於 30°C 培養三至五天後計算各培養基上的菌落數目，並由此數目換算各選擇性培養基之平板效率 (*plating efficiency*)，平板效率 (%) = 選擇性培養基上之菌落數 / NGA 培養基上之菌落數 $\times 100$ 。

不同選擇性培養基自土壤抽出液及種子洗出液中回收黑腐病菌之效率：

將分別採自台中大里甘藍及芥藍菜園之坩質壤土 (*silt loam*) 及黏質壤土 (*clay loam*)，各取濕重 1 克，加入 10. ml 生理食鹽水，強力振盪 1 分鐘後，取上澄抽出液以生理食鹽水再稀釋成 10 倍液，並加入 0.1ml 之黑腐病菌XC38 菌

株懸浮液，使土壤抽出液中含約 $1.1 \times 10^3 \text{CFU/ml}$ 之菌量，隨即依上述方法在各選擇性培養基及 *NGA* 培養基平板上測定所形成之黑腐病菌及其他細菌菌落數。黑腐病菌在 *T80* 培養基上不能生長，其在此其他選擇性培養基上之認定，主要以菌落形態及澱粉水解圈之有無為依據，遇可疑菌落時，則在甘藍植株上以剪葉接種法（4）確定其病原性，由各培養基上出現之黑腐病菌菌落數計算各培養基回收黑腐病菌之效率。回收效率 (*recovery efficiency*) (%) = 選擇性培養基回收之病菌量 / 加入樣品中之病菌量 $\times 100$ 。種子洗出液之試驗，則選深葉芥藍、高峯甘藍及高陽結球白菜種子各 4 克，加入 10ml 生理食鹽水，強力振盪 1 分鐘後，再加入 10ml 黑腐病菌 *XC38* 菌株之懸浮液，使種子洗出液中含約 $1.0 \times 10^3 \text{CFU/ml}$ 之病菌量，其餘測試方法及回收效率之計算均同上述。

拮抗細菌在不同培養基上對黑腐病菌生長及回收之影響：

將拮抗細菌菌株在 523 培養基斜面上，於室溫培養二天後，以無菌蒸餾水配成約 10^8CFU/ml 懸浮液，取 1ml 懸浮液分別點於 *NGA*、*KB*、*SX*、*SM* 及 *BS-CAA* 等培養基平板上，於 30.°C 經 24 小時培養後，再將黑腐病菌 *XC38* 菌株之懸浮液 ($5.0 \times 10^7 \text{CFU/ml}$) 噴佈於其上，經 2—4 天培養後測量各拮抗細菌在不同培養基上造成之抑制圈半徑。另外選取 *An P1* 及 *FP43* 二個拮抗細菌菌株，各配製 $5.0 \times 10^3 \text{CFU/ml}$ 之懸浮液，再將此懸浮液作二倍系列之稀釋，而後每 5ml 之各個稀釋懸浮液中分別加入 0.1ml 黑腐病菌 *XC38* 菌株之懸浮液 ($6.0 \times 10^5 \text{CFU/ml}$)，均勻混合後，各取 0.1ml 分別展佈於 *SM*、*SX* 及 *BSCAA* 培養基平板上，置於 30.°C 培養 3—5 天後，計算各培養基上拮抗細菌及黑腐病菌 *XC38* 之菌落數。

不同培養基中添加鐵離子對螢光性拮抗細菌產生螢光色素及其對抑制黑腐病菌生長之影響：

在 *KB*、*NGA*、*SM* 及 *SX* 培養基中分別加入 1、10 及 100 $\mu\text{M FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，並以不添加者為對照，依上述方法，測試螢光性拮抗細菌在添加與不添加 FeCl_3 之培養基上抑制黑腐病菌 *XC38* 菌株生長之能力，培養基並置於波長 366nm 之紫外光下觀察拮抗細菌產生螢光色素之強弱或有無。

結 果

黑腐病菌在選擇性培養基上之平板效率：

黑腐病菌 *XC35* 及 *XC38* 二個菌株，除 *T80* 培養基外，都可在其他測試培養基上生長。*XC38* 在各選擇性培養基上之平板效率則因培養基之不同而具有顯著差異，其中以在 *NSCA* 及 *DSX* 培養基上之效率最高（表一）。黑腐病菌在

NSCA 及 DSX 培養基上形成黃色，在 NSCAA 及 BSCAA 上形成白色透明，在 SX 上形成中心紫藍，周緣乳白，在 SM 上形成中心暗紅，周緣乳白，而均呈突起，具光澤之菌落，並均造成澱粉水解圈。

選擇性培養基之偵測效率：

各培養基自土壤抽出液回收黑腐病菌之效率，以 NGA、NSCA、DSX 及 T80 培養基最低，在兩種土壤樣品均為 0；NSCAA、BSCAA、SM 及 SX 培養基在質壤土樣品中差異不大，但 SX 在另一黏質壤土中則較差，而一般而言，各培養基上出現雜菌之數量均偏多，回收效率則偏低（表二）。黑腐病菌在 SM 及 SX 培養基上，仍呈上述之菌落，容易與其他雜菌區別；在 BSCAA 及 NSCAA 培養基上形成之菌落，則較不易與其他雜菌區別，同時，在該二種培養基上會出現流狀之雜菌，不利於結果之判斷，自種子洗出液回收黑腐病菌之效率與土壤抽出液者相近，仍以 NSCAA、BSCAA、SM 及 SX 培養基較高，但回收效率之高低隨種子樣品之不同而有極大差異，自芥藍種子上以 SM 培養基最高為 15.8%，甘藍種子上則以 BSCAA 培養基最高，達 57.4%，結球白菜種子上，因各培養基出現之雜菌太多，回收效率均為 0（表三）。

拮抗細菌對黑腐病菌生長及回收之影響：

各拮抗細菌在不同培養基上對黑腐病菌之抑制能力不盡相同（表四）。

Bacillus 屬之 *An B1*、*An B2* 及 *An B3* 菌株在 SM、SX 及 BSCAA 培養基上均不生長，無抑制圈，但在 NGA 及 KB 培養基上則明顯抑制黑腐病菌 XC38 菌株之生長，其中以 *An B3* 菌株之抑制力較弱，屬於 *fluorescent pseudomonads* 之 *An P1*、*An P2* 及 *An P3* 菌株，除 *An P3* 在 BSCAA 培養基上具有強抑制作用外，在 NGA、KB、SM 及 BSCAA 培養基上抑制能力均弱或無，但在 SX 培養基上却都有極強之抑制作用，抑制圈半徑分別達 20.18、及 16. mm，另外同屬於 *fluorescent pseudomonads* 之拮抗細菌 FP17、FP32、FP43 及 FP45 菌株中，FP43 菌株在所有供試培養基上都能產生抑制圈，而其他菌株在不同培養基上或無抑制能力或抑制能力強弱不一。由上述結果顯示，如以 SX、SM、BSCAA 等選擇性培養基而言，黑腐病菌之生長在 SX 上受 *fluorescent pseudomonads* 拮抗菌之影響最大，其次為在 BSCAA 上，在 SM 上較不受影響，而在這三種培養基上都不受 *Bacillus spp* 拮抗細菌之影響。

拮抗細菌在不同培養基上對黑腐病菌回收之影響，隨培養基之不同也有很大差異，以拮抗細菌 *An P1* 測試時（圖一），黑腐病菌之回收，在 SM 培養基上受到之影響最小，當一培養皿上出現 115 個 *An p1* 菌落時，黑腐病菌 XC38 之菌落數由原來之 321.3 降為 136.7，減少 57.5%，但在 SX 培養基上，當 *An P1* 之菌落數為 60.0 時，XC38 之菌落數即由原無 *An P1* 時之 262.0 變為 0；在 BSCAA 培養基上黑腐病菌 XC38 菌株之回收比在 SM 培養基上略差，又

以拮抗細菌 *FP43* 測試時，其結果與 *AnP1* 者相近（圖二），在 *SX* 培養基上，當 *FP43* 菌落數為 122.0 時，*XC38* 即不出現，但在 *SM* 及 *BSCAA* 培養基上，*FP43* 之菌落數要高達 512.3 及 501.7 時，才會完全抑制 *XC38* 菌落之出現。

螢光色素與拮抗作用之關係：

供試六個螢光性拮抗細菌菌株在 *KB* 及 *NGA* 上會產生螢光色素，一般在 *KB* 上強於 *NGA* 上；在 *SM* 及 *SX* 培養基上則都不產生（表五），添加鐵離子至 *NGA* 或 *KB* 培養基中，一般濃度達 $10\mu M$ 時螢光色素有減弱現象，至 $100\mu M$ 時會完全抑制螢光色素之產生，拮抗細菌螢光色素之產生對其抑制黑腐病菌生長之影響隨菌株不同而異，其中 *FP43* 菌株不論在 *KB* 或 *NGA* 培養基上，當不產生螢光色素時，即失去抑制能力，但 *FP45* 菌株在 *KB* 或 *NGA* 培養基上，及 *AnP3*、*AnP4* 菌株在 *NGA* 培養基上，即使不產生螢光色素，抑制圈仍與螢光色素時相同。各螢光性拮抗細菌菌株之抑制作用在 *SM* 及 *SX* 培養基不受添加鐵離子之影響。

討 論

選擇性培養基為直接分離偵測法之基礎，通常優良之選擇性培養基，不論營養成分或抑制物質之選用，均須符合於有利標的細菌生長，易於鑑別標的細菌，而又能有效抑制其他雜菌之原則，但因每一地區之種子上或土壤中之微生物相不盡相同，標的細菌之菌系亦會有所差異，因此，選擇性培養基之偵測效率，可能隨使用地區之不同而有極大差異，本研究以在國外發展對黑腐病菌具有較佳效果之六種選擇性培養基，比較其在台灣由十字花科蔬菜種子及土壤中偵測黑腐病菌之效率，結果顯示 *NSCA* 及 *DSX* 培養基之效果極差，*NSCAA*、*BSCAA*、*SM* 及 *SX* 培養基雖較佳，但一般而言，出現之雜菌數量偏多，回收黑腐菌之效率仍偏低，因此效果均不理想。*NSCA*(14) 及 *DSX*(7) 培養基所含之營養成份豐富，添加之抑菌物質甚少，以往被用於種子上黑腐病菌之偵測，但顯然不適用於台灣，*NSCAA*(11) 及 *BSCAA*(11) 培養基添加之抗生素較多，也被用於偵測種子上之黑腐病菌；*SM*(5) 及 *SX*(15) 培養基所含營養成分較有限，並以染料一甲基綠 (*methyl green*)、甲基紫 (*methyl violet*) 為抑制物質，以往被用於土壤中黑腐病菌之偵測，但上述四種培養基消除台灣土壤或種子上雜菌之效果並不理想，為因應台灣特殊之微生物相，偵測黑腐病菌之選擇性培養基，顯然仍待另行改良或發展。

一般雜菌，由於養分及菌落形成位置之競爭，為影響黑腐病菌回收之重要因子，如果雜菌對黑腐病菌具拮抗作用，其影響勢必更為嚴重。*Schaad* 與 *Donaldson*(13) 及 *Randhawa* 與 *Schaad*(11) 曾報告黑腐病菌之拮抗菌普

遍存在於種子上，尤其以 *Bacillus spp* 最多，當採用 NSCA 培養基偵測種子時，此類細菌會明顯影響該病菌之回收，於培養基中加入 10ppm nitrofurantoin 及 0.5 ppm vancomycin 即可抑制此類拮抗菌之生長。因此，選擇性培養基之開發與利用時，拮抗菌之干擾更應列為首要考慮因子之一。本研究發現，在台灣也常可由十字花科蔬菜種子及土壤中分離到黑腐病菌之拮抗細菌。拮抗細菌菌株中，除 *Bacillus spp* 外，尚有螢光性細菌 (*fluorescent pseudomonads*)，而不同菌株在不同培養基上對黑腐病菌之生長或回收則大不相同。*Bacillus* 菌株在 SX、SM 及 BSCAA 選擇性培養基上不能生長，故不影響。但屬於 *fluorescent pseudomonad* 之拮抗細菌菌株，在 SX 培養基上對黑腐病菌之生長大多具有很強之抑制能力，並能大為降低黑腐病菌之回收，在 BSCAA 及 SM 培養基上則其拮抗能力較弱甚或無，且對黑腐病菌回收之影響較輕微，由此可見，偵測種子或土壤時，如用 SX 選擇性培養基，黑腐病菌之回收必大受此類拮抗細菌之影響，而用 SM 及 BSCAA 培養基時則較不受拮抗菌之干擾。黑腐病菌在 BSCAA 培養基上之菌落形態較不易區別，而雜菌之污染也較 SM 培養基為嚴重，因此 SM 培養基在數種選擇性培養基中表現較佳，或可作為一步改良之基礎，以適用於台灣之情況。

Fluorescent pseudomonads 之拮抗作用機制，有起因於螢光色素之靜菌作用，此作用在含鐵豐富之條件下會喪失 (18.)，亦有起因於抗生素之產生 (18.)。本研究選出之螢光性拮抗菌，雖然在一般非選擇性培養基上，其拮抗能力可能有的來自螢光色素，有的來自其他拮抗機制，但在各選擇性培養基上不論是否添加鐵離子，都不形成螢光色素，但仍具有拮抗現象，顯然其抑菌作用與螢光色素無關，而可能與抗菌物質之產生最有關連。

引用文獻

1. 林俊義 1981 台灣十字花科黑腐病之研究。 植保會刊 23:157-168.
2. 黃穗昌 1986 台灣十字花科黑腐病菌偵測技術之研究。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。
3. 黃穗昌、徐世典 1986 台灣十字花科黑腐病菌之直接分離偵測技術。 植保會刊 28:441 (摘要)。
4. Alvarez, A. M., and J. J. Cho. 1978. Black rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and disease incidence. *Phytopathology* 68:1456-1459.
5. Chun, W. W. C., and A. M. Alvarez. 1983. A starch-methionine medium for isolation of Xanthomonas campestris pv. campestris from plant debris in soil. *Plant Dis.* 67:632-635.
6. Cook, A. A., R. H. Larson, and J. C. Walker. 1952. Relation of the black rot pathogen to cabbage seed. *Phytopathology* 42:316-320.
7. Dhanvantari, B. N. 1981. Semi-selective media for detection and monitoring of some Xanthomonas campestris pathovars. Proc. 5th Int. Conf. Plant Pathog. Bacteria, Cali, Colombia, P. 135-136.
8. Kado, C. I., and M. G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas, and Xanthomonas. *Phytopathology* 60:969-976.
9. King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
10. McGuire, R. G., and J. B. Jones. 1984. Evaluation of a selective medium for the isolation of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria from seeds and foliage. *Phytopathology* 74:882. (Abstr.)
11. Randhawa, P. S., and N. W. Schaad. 1984. Selective isolation of Xanthomonas campestris pv. campestris from crucifer seeds. *Phytopathology* 74:268-272.
12. Schaad, N. W. 1982. Detection of seedborne bacterial plant

- pathogens. *Plant Dis.* 66:885-890.
13. Schaad, N. W., and R. C. Donaldson. 1981. Bacteria of crucifer seeds antagonistic to Xanthomonas campestris. *Phytopathology* 71:902. (Abstr.)
 14. Schaad, N. W., and R. Kendrick. 1975. A qualitative method for detecting Xanthomonas campestris in crucifer seed. *Phytopathology* 65:1034-1036.
 15. Schaad, N. W., and W. C. White. 1974. A selective medium for soil isolation and enumeration of Xanthomonas campestris. *Phytopathology* 64:876-880.
 16. Schaad, N. W., and W. C. White. 1974. Survival of Xanthomonas campestris in soil. *Phytopathology* 64:1518-1520.
 17. 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.
 18. Suslow, T. V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth, in *Phytopathogenic Prokaryotes* (M. S. Mount and G. H. Lacy, eds.), Vol. 1, P. 187-223. Academic Press, Inc., New York, U.S.A
 19. Williams, P. H. 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifer. *Plant Dis.* 64:736-742.

表一. 黑腐病菌 XC35 及 XC38 菌株在不同選擇性培養基上之平板效率

Table 1. Plating efficiencies of Xanthomonas campestris pv. campestris XC35 and XC38 on various selective media

Medium ¹⁾	XC38		XC35	
	CFU/plate ²⁾ on medium	Plating ³⁾ efficiency(%)	CFU/plate ²⁾ on medium	Plating ³⁾ efficiency(%)
NGA	107	100.0a	105	100.0a
NSCA	102	95.0a	95	90.0ab
NSCAA	97	90.1a	84	79.7bc
BSCAA	83	77.5a	82	77.4c
DSX	103	95.7a	102	97.6a
SM	91	84.9a	79	74.9c
SX	87	81.2a	86	81.3bc
T80	0	0.0b	0	0.0d

1) NGA: Nutrient glucose agar, NSCA: Nutrient starch cycloheximide agar (11, 14), NSCAA: Nutrient starch cycloheximide antibiotic agar (11), BSCAA: Basal starch cycloheximide antibiotic agar (11), SX: SX agar (15), DSX: Soluble starch medium (7), SM: Starch-methionine medium (5), T80: McGuire and Jones' medium for X. campestris pv. vesicatoria (10).

2) A volume of 0.1 ml of bacterial suspension containing 1.0×10^3 CFU/ml was spread onto each plate of each medium.

3) Numbers are the mean of three replicates, three plates per replicate. Means within the same column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) after angular transformation. Plating efficiency (%) = (CFU per plate on test medium / CFU per plate on NGA) $\times 100$.

表二. 不同選擇性培養基自土壤抽出液中回收黑腐病菌之效率

Table 2. Efficiencies of selective media for recovery of Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 from soil extracts

Medium	Recovery from soil extract of ²⁾					
	Silt loam ³⁾			Clay loam ⁴⁾		
	XC38 (CFU/ml) ×10 ²	Other ⁵⁾ bacteria (CFU/ml)	Recovery ⁶⁾ efficiency for XC38(%)	XC38 (CFU/ml) ×100	Other ⁵⁾ bacteria (CFU/ml)×10 ²	Recovery ⁶⁾ efficiency for XC38(%)
NGA	0.0	N	0.0b	0.0	N	0.0c
NSCA	0.0	N	0.0b	0.0	N	0.0c
NSCAA	1.4	N	10.9a	5.7	2.0	5.3a
BSCAA	1.6	N	11.8a	6.7	2.1	6.2a
DSX	0.0	N	0.1b	0.0	N	0.0c
SM	1.9	N	17.7a	4.0	1.0	3.7ab
SX	1.7	N	16.5a	2.3	4.9	2.2b
T 80	0.0	N	0.0b	0.0	0.0	0.0c

1) See the footnote in Table 1.

2) Soil was extracted in saline at the ratio of 1:100(w/v), and XC38 was added to make 1.1×10^3 CFU/ml.

3) Collected from a cabbage field at Ta-Li, Taichung.

4) Collected from a kale field at Ta-Li, Taichung.

5) N= Numerous (too numerous to count).

6) Numbers are the mean of three replicate samples, three plates per sample. Means within the same column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) after angular transformation. Recovery efficiency (%) = (CFU per ml recovered on medium / CFU per ml added to soil extract) × 100.

表三. 不同選擇性培養基自種子洗出液中回收黑腐病菌之效率

Table 3. Efficiencies of selective media for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* XC38 from seed washings

Medium	Recovery from seed washing of ²⁾								
	Kale			Chinese cabbage			Cabbage		
	XC38 (CFU/ml)	Other ³⁾ bacteria (CFU/ml)	Recovery ⁴⁾ efficiency for XC38(%)	XC38 (CFU/ml)	Other ³⁾ bacteria (CFU/ml)	Recovery ⁴⁾ efficiency for XC38(%)	XC38 (CFU/ml)	Other ³⁾ bacteria (CFU/ml)	Recovery ⁴⁾ efficiency for XC38(%)
NGA	0	N	0.0b	0	N	0.0	0	N	0.0c
NSCA	0	N	0.0b	0	N	0.0	15	N	14.6b
NSCAA	113	N	11.2a	0	N	0.0	48	12.6	47.2a
BSCAA	150	N	14.9a	0	N	0.0	58	12.0	57.4a
DSX	0	N	0.0b	0	N	0.0	6	N	6.3b
SM	160	N	15.8a	0	N	0.0	46	5.3	45.8a
SX	97	N	9.6a	0	N	0.0	55	13.0	54.5a
T80	0	16	0.0b	0	N	0.0	0	1.7	0.0c

1) See the footnote in Table 1.

2) Seeds were washed in saline at the ratio of 1:2.5(w/v), and XC38 was added to make 1.0×10^3 CFU/ml.

3) N= Numerous (too numerous to count).

4) Numbers are the mean of three replicate samples, three plates per sample. Means within the same column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) after angular transformation. Recovery efficiency = (CFU per ml recovered on medium / CFU per ml added to seed washing) $\times 100$.

表四. 拮抗細菌在不同培養基上抑制黑腐病菌之能力

Table 4. The inhibitory effect of antagonistic bacteria on growth of Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 on different media

Antagonistic ¹⁾ bacterium	Inhibition zone (mm) on ²⁾				
	NGA	KB	SX	SM	BSCAA
AnP1	0.0	1.0	20.0	0.0	0.0
AnP2	0.0	1.0	18.0	0.0	3.0
AnP3	3.1	0.0	16.0	0.0	17.3
FP17	2.3	0.0	6.2	4.2	0.0
FP32	0.0	0.1	0.0	1.7	0.0
FP43	2.3	5.8	5.1	6.0	1.5
FP45	3.2	3.7	0.0	0.0	0.0
AnB1	4.8	4.9	0.0	0.0	0.0
AnB2	4.6	4.5	0.0	0.0	0.0
AnB3	1.3	1.0	0.0	0.0	0.0

1) Strains AnP1 and AnP2 were isolated from broccoli seeds on SX agar, AnP3 from broccoli seeds on NGA medium, AnB1, AnB2 and AnB3 from cauliflower, kale and broccoli seeds, respectively, on NGA medium. Strains FP17, FP32, FP43 and FP45 were obtained from our collection of fluorescent pseudomonads isolated from roots of various plants on King's B medium.

2) Inhibition zone = The diameter of area inhibited - diameter of colony of antagonistic bacterium / 2. Figures are the mean of three replicate samples, three plates per sample.

表五. 不同培養基中添加鐵離子對螢光性拮抗菌螢光色素產生及抑制黑腐病菌能力之影響

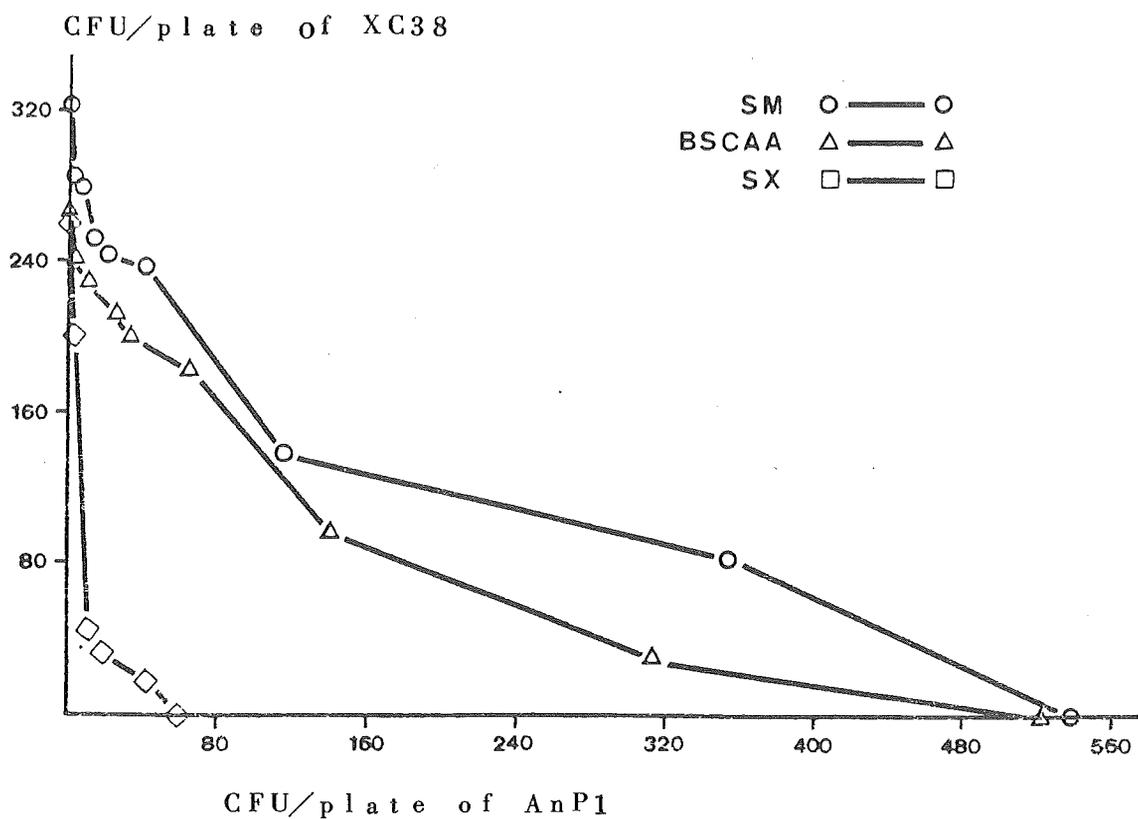
Table 5. Effect of addition of iron to media on the fluorescent pigment production and growth inhibition of *Xanthomonas carpestris* pv. *carpestris* XC38 by antagonistic fluorescent pseudomonads

Antagonistic bacterium	Concentration of FeCl ₃ added	Inhibition zone(mm) ¹⁾ and fluorescence ²⁾ on			
		KB	NGA	SM	SX
AnP1	100	0.0-	0.0-	0.0-	16.0-
	10	0.0+	0.0-	0.0-	18.0-
	1	0.4+++	0.0++	ND ³⁾	19.5
	0	1.0+++	0.0++	0.0-	19.5-
AnP2	100	0.0-	0.0-	0.0-	16.5-
	10	0.0-	0.0-	0.0-	16.0-
	1	0.5+	0.0-	ND	ND
	0	1.0++	0.0+	0.0-	18.0-
AnP3	100	0.0-	3.2-	0.0-	16.0-
	10	0.0+++	3.1+++	0.0-	16.5-
	1	0.0+++	3.2+++	ND	ND
	0	0.0+++	3.1+++	0.0-	16.0-
AnP4	100	0.0-	3.0-	0.0-	16.3-
	10	0.0+	3.0-	0.0-	16.7-
	1	0.0+++	3.0+	ND	ND
	0	0.0+++	3.0+	0.0-	16.3-
FP43	100	0.0-	0.0-	5.8-	4.8-
	10	3.7+	0.0+	5.8-	4.6-
	1	5.3+++	1.0++	ND	ND
	0	5.3+++	2.1++	5.9+	4.9-
FP45	100	2.8-	3.6-	0.0-	0.0-
	10	3.0+	3.6+	0.0-	0.0-
	1	2.9+++	3.6+++	ND	ND
	0	2.9+++	3.6+++	0.0-	0.0-

1) Inhibition zone= The diameter of area inhibited-diameter of colony of antagonistic bacterium/2. Figures are the mean of three replications, three plates per replication.

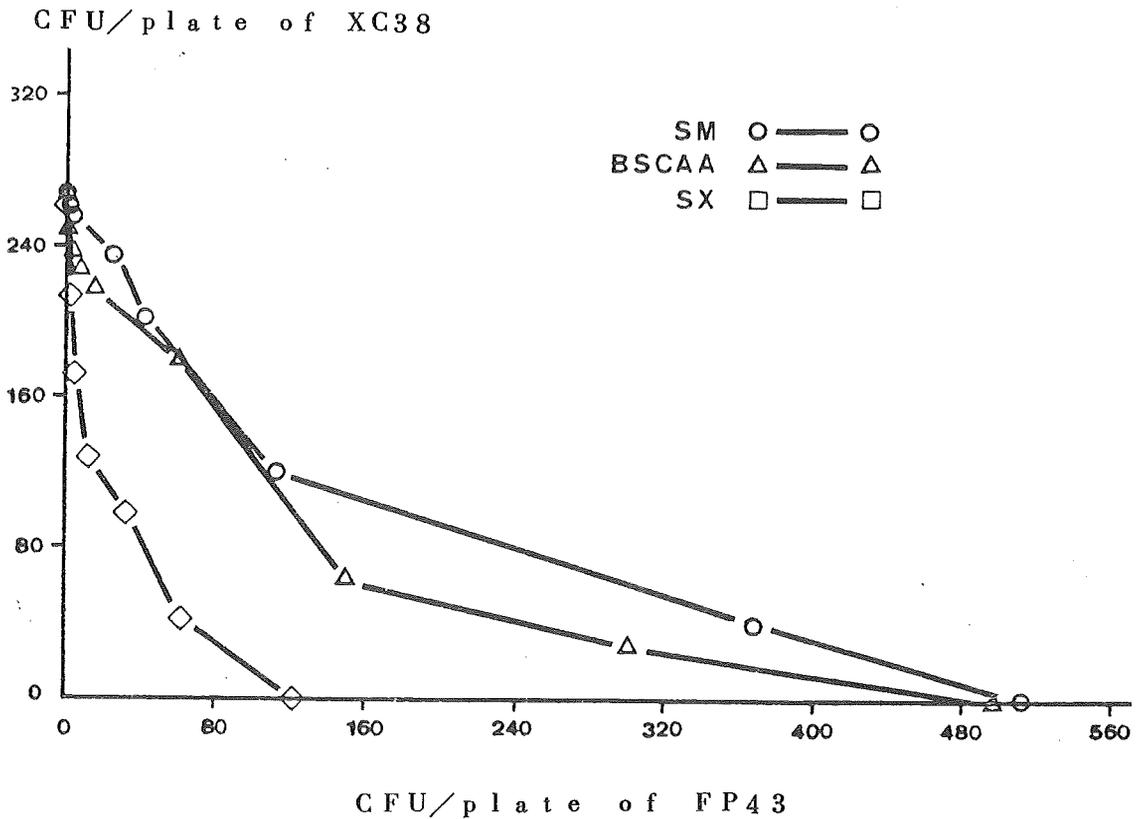
2) —+++ (intensity of fluorescence)= No fluorescence-strong fluorescence.

3) ND= Not determined.



圖一 拮抗菌 AnP1 在 SM、BSCAA 及 SX 培養基上對 Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 回收之影響。

Fig. 1. The effect of antagonist AnP1 on the recovery of Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 on SM, BSCAA, and SX media. Figures are the mean of triplicates, three plates per replicate.



圖二 拮抗菌 FP43 在 SM、BSCAA 及 SX 培養基上對 Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 回收之影響。

Fig.3. The effect of antagonist FP43 on the recovery of Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 on SM, BSCAA, and SX media. Figures are the mean of triplicates, there plates per replicate.

Efficiency of Various Selective Media for Detection of Xanthomonas campestris pv. campestris in Taiwan¹⁾

Tze-Chung Huang and Shin-Tien Hsu

Key Words: Xanthomonas campestris pv. campestris, Selective media, Antagonists, Detection.

SUMMARY

Six available selective isolation media, i.e., SX agar, nutrient-starch-cycloheximide agar (NSCA), nutrient starch-cycloheximide antibiotic agar (NSCAA), basal nutrient cycloheximide antibiotic agar (BSCAA), starch-methionine medium (SM) and soluble starch medium (DSX), were compared for their detection of Xanthomonas campestris pv. campestris (abbreviated to Xcc) in Taiwan. Although plating efficiencies of Xcc on these media were 75 % or higher, the recovery of Xcc from crucifer seed washings and soil extracts was very inefficient due to the appearance of high number of other bacteria including antagonistic bacteria on these media. Media DSX and NSCA were least effective among those tested. Recovery efficiencies of Xcc on the other four media varied with soil types and seed sources, ranged from 2.2 to 17.7 % from soil samples and 0 to 57.4 % from seed samples. Bacillus spp. and fluorescent pseudomonads inhibitory to the growth of Xcc were frequently isolated from seeds or soils. Bacillus spp. did not grow on medium of BSCAA, SM or SX, but most strains of fluorescent pseudomonads strongly inhibited the growth of Xcc on SX agar and greatly reduced the recovery of Xcc when the antagonistic bacteria present. Fluorescent pseudomonads, however, were only slightly antagonistic to Xcc on

1) Acknowledgements to Council of Agricultural Development for financial responding.

2) Assistant pathologist, Taitung D.A.I.S. and professor of plant pathology, NCU.

SM and BSCAA media especially on SM medium, and also slightly reduced the recovery of xcc. The antagonism of fluorescent pigments, was not related to the formation of fluorescent pigments, but was possibly caused by other antagonistic mechanisms. SM medium performed best among the six selective media tested, since the colony of Xcc could be easily distinguished from other bacteria and the recovery of Xcc was less affected by the antagonists on the medium.