

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

趙永椿^{1,2,3} 徐世典² 曾國欽²

¹屏東縣內埔鄉 國立屏東科技大學植物醫學系

²台中市 國立中興大學植物病理系

³聯絡作者，電子郵件：chaoyc@mail.npust.edu.tw，傳真：+886-8-7740-293

接受日期：中華民國 99 年 7 月 6 日

摘要

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.

本研究測試二氧化氯 (chlorine dioxide, ClO₂) 溶液對三種種傳植物病原細菌，十字花科蔬菜黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、茄科細菌性斑點病菌 (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) 及瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 之殺菌效率及應用於種子處理對去除這些種媒細菌之效果。以 ClO₂ 溶液 10 ppm 處理黑腐病菌及 5 ppm 處理斑點病菌各 20 分鐘或 50 ppm 處理果斑病菌 30 分鐘，可完全抑制所有供試菌株之生長。ClO₂ 溶液以 10 ppm 浸漬處理人工污染黑腐病菌 Xcc52 菌株之花椰菜種子 30 分鐘，5 ppm 浸漬處理人工污染細菌性斑點病菌 XVT-28 菌株之甜椒種子 10 分鐘及 50 ppm 浸漬處理人工污染或自然帶有果斑病菌之西瓜種子 30 分鐘，均可有效去除各病菌，達到無病菌污染之種子，且此處理不會影響或可提高種子之發芽率。在人工污染及自然帶有果斑病菌之西瓜種子試驗上，ClO₂ 之處理亦可完全防治幼苗果斑病之發生，使發病率由 66.6% (人工帶菌) 或 29.2% (自然帶菌) 降低至 0%，且對幼苗之生長或無影響或可促進。

關鍵詞：二氧化氯、種子處理、防治、十字花科蔬菜黑腐病菌、茄科細菌性斑點病菌、瓜類細菌性果斑病菌

緒言

由 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 引起之十字花科蔬菜黑腐病 (black rot)^(11, 43)、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 引起的茄科細菌性斑點病 (bacterial spot)⁽¹⁰⁾ 及 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 引起的瓜類細菌性果斑病 (bacterial fruit blotch)^(2, 3, 21, 35) 為台灣重要的細菌病害。黑腐病菌主要藉由污染種子傳播^(32, 34)，且可在種子上存活 3 年以上⁽²⁵⁾，種子只要有 0.03% 帶菌率，在田間即可造成本病害的流行⁽³³⁾。斑點病菌亦可藉由病株收穫之種子而存活及傳播⁽³⁴⁾，田間種子帶菌量可檢測到 10² cfu/g seed⁽³⁹⁾，雖然種子帶菌低，但在實驗室測試之高濕條件下，病菌在污菌種子上的族群量可增加 40 至 8 萬倍⁽¹⁷⁾。果斑病菌主要亦藉由病果收穫之污

染種子而存活，在罹病田之種子帶菌率有時可達 54.3-72.6%⁽³⁵⁾，而在西瓜移植苗生產的溫室內，只要發現一株病株就足以宣告拋棄溫室內所有的幼苗⁽⁷⁾。因此，開發有效、安全而簡易可行之種子處理滅菌技術，在植物種傳細菌病害的防治上是相當重要的工作。

二氧化氯 (Chlorine dioxide, 以下簡稱 ClO₂) 為一強氧化劑，氧化能力為氯氣之 2.5 倍，易溶於水，穩定性高，且不會與有機化合物反應作用，形成可誘發突變的三鹵甲烷等物質，故無致癌物產生之虞⁽⁴²⁾。美國環境保護署 (Environmental Protection Agency) 及食品藥物管理局 (Food and Drug Administration) 已認可 ClO₂ 作為消毒劑之使用^(6, 38)，為目前國際上公認之安全廣效抗菌劑、高效氧化劑和優良漂白劑。在污水處理研究中，

ClO₂ 溶液殺死水中 *Staphylococcus aureus* 與 *Bacillus* 所需之劑量，均較液氯 (liquid chlorine) 為低，且在 pH 3-11 的範圍下，與相同濃度之液氯比較，ClO₂ 溶液對水中 *S. aureus* 與 *Bacillus* 之殺菌效果較不受 pH 之影響⁽¹⁴⁾。又 1.0 mg/L ClO₂ 即可完全殺滅或不活化 6 種測試病毒，其效果明顯較液氯為佳⁽¹³⁾。其殺菌機制為對細胞膜的穿透能力強，且可有效氧化細胞中之胺基酸及核酸，能於短時間內有效達到殺菌效果。目前 ClO₂ 廣範圍應用於環境衛生、飲用水、游泳池、食品加工、廢水處理、醫療衛生等之消毒、殺菌、除臭處理及紡織品、紙漿、纖維之漂白處理⁽⁴²⁾。

ClO₂ 運用於防除蔬果、農畜產品及海鮮食品上有害人體微生物之污染，已有良好效果^(1, 4, 5, 19, 20, 22, 23, 27, 28, 29, 36, 44, 45)。美國食品藥物管理局已核准 ClO₂ 水溶液可運用於未切及未去皮之蔬菜水果沖洗消毒，殘留允許量上限為 5 ppm^(6, 23)。在植物病原細菌方面，ClO₂ 對 *Erwinia carotovora* 具有良好殺菌力，以 ClO₂ 處理採收後番茄或馬鈴薯，能有效降低由 *E. carotovora* 引起之軟腐病^(30, 31, 36)。

ClO₂ 對其他植物病原細菌的殺菌效果如何，及其能否用於種子處理以去除種媒病原菌尚無研究。本研究目的在探討 ClO₂ 對上述三種種媒病原細菌 *X. campestris* pv. *campestris*、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 及 *A. avenae* subsp. *citrulli* 之殺菌效率及用於種子處理對去除病菌之效果及對種子發芽及植株生長之影響，以便作為日後實際運用於種子處理之參考。

材料與方法

供試藥劑、種子及菌株之來源

本研究所使用之 ClO₂ 溶液，由汲鑫科技股份有限公司 (高雄縣鳳山市) 提供新鮮製備之產品，該產品之生產係將食鹽電解產生 ClO₂ 氣體後存放水中，原液濃度為 1,000 ppm，盛裝於白色不透明塑膠桶內，取得後立即進行測試，使用時不需要活化，直接加水稀釋至測試所需之濃度即可。次氯酸鈉溶液為由美國進口之 CLOROX 濃縮清潔漂白水，購買自大買場，原液濃度為 6%。花椰菜種子 (綠王品種)、甜椒種子 (藍星品種) 及西瓜種子 (朱蘭品種)，係由農友種苗股份有限公司所提供；另測試使用之自然帶有 *A. avenae* subsp. *citrulli* 之西瓜種子係由中興大學植病系植物病原細菌研究室提供之種子商送檢含該菌樣品。*X. campestris* pv. *campestris* Xcc 34、45、71、78 及 158 菌株係中興大學植物病原細菌研究室保存之菌株，*X. campestris* pv. *campestris* Xcc52 與 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT-

28、48 及 XVP-197 菌株係由亞洲世界蔬菜研發中心細菌研究室王肇芬博士提供。*A. avenae* subsp. *citrulli* Aac153、33 及 19 菌株 (分離自西瓜) 與 Aac21 菌株 (分離自洋香瓜)，係國立中興大學植物病原細菌研究室保存之菌株。

培養基

523 培養基：sucrose 10 g，casein hydrolysate (N-Z-AMINEA) 8 g，yeast extract 4 g，K₂HPO₄ 2 g，MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g，agar 20 g 及蒸餾水 1000 ml⁽¹⁸⁾。YPDA：yeast extract 7 g，Bacto peptone 7 g，dextrose 7 g，agar 20 g 及蒸餾水 1000 ml⁽⁴¹⁾。Aac 半選擇性培養基 WFB68：peptone 5 g，CaCl₂ · 2H₂O 0.25 g，Tween80 10 ml，methyl violet B 0.0001 g，agar 15 g，berberine 0.2 g，carbenicillin 0.05 g，cefoperezone 0.05 g，cycloheximide 0.2 g 及蒸餾水 1000 ml⁽³⁷⁾。

ClO₂ 之殺菌效率

將測試之 *X. campestris* pv. *campestris* 及 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 培養於 YPDA 培養基，*A. avenae* subsp. *citrulli* 培養於 WFB68 培養基，於 28°C 培養 24-48 小時後懸浮於無菌水，再利用光電比色計於波長 600 nm 下，調整 OD 值至 0.45，此濃度約含 10⁸ CFU ml⁻¹。後將濃度為 1,000 ppm 之 ClO₂ 溶液以 0.22 μm millipore 過濾滅菌後，配製濃度分別為 2、10、20、100 及 200 ppm 之 ClO₂ 溶液。於 2.0 ml 滅菌螺旋蓋冷凍小管 (labcon) 中分別加入各濃度之 ClO₂ 溶液 500 μl 及測試菌株懸浮液 500 μl，使其二氧化氯最終濃度分別為 1、5、10、50 及 100 ppm，另以細菌懸浮液添加至無菌水之處理作為對照。利用震盪培養器 (HIPOINT OS-54，巨興化學儀器，高雄市前鎮區) 於 150 rpm 下，震盪共養 20 或 30 分鐘，隨即置入離心機以 3,000 rpm 離心 2 分鐘，以便將細菌和藥劑分離，倒掉上層液並加入 1 ml 無菌水懸浮後，以微量吸管吸取 10 μl 懸浮液，滴至培養皿底蓋外劃有井形之 523 培養基平板小區內，每處理四重複，於 30°C 培養 24-48 小時，觀察細菌是否生長而形成菌落，並以“+”表示細菌生長；“-”表示細菌不生長紀錄之。依上述同樣的方法，另將測試菌株與不同濃度 ClO₂ 溶液分別震盪共養 1、5、10 及 20 分鐘後，利用稀釋平板法測定存活之細菌菌落數，並以無菌水處理者為對照。

ClO₂ 溶液處理種子去除病菌之效果及對種子發芽與植株生長之影響

如前述製備濃度約為 10⁸ CFU ml⁻¹ 之 *X. campestris*

pv. *campestris* Xcc52、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT-28 及 *A. avenae* subsp. *citrulli* Aac153 菌株懸浮液。另將花椰菜、甜椒及西瓜種子以 0.6% 次氯酸鈉浸漬消毒 5 分鐘後，以無菌水漂洗三次，置於無菌濾紙上風乾，再將風乾後的花椰菜種子與 Xcc52、甜椒種子與 XVT-28 及西瓜種子與 Aac153 之懸浮液以 100 粒種子/10 ml 懸浮液之比例混合振盪 30 分鐘，取出置於無菌濾紙上自然風乾 20 分鐘，以製備人工污染病菌之種子。如前述配製濃度分別為 5、10 或 50 ppm 之 ClO_2 溶液(依測試菌株使用不同濃度)，利用吸管吸取 10 ml 分裝於 20 ml 滅菌之螺旋蓋玻璃瓶 (National Scientific Company) 中，再分別加入上述風乾後的人工污菌種子 100 粒，後利用震盪培養器於 150 rpm 下，將污菌種子與 5、10 或 50 ppm ClO_2 溶液均勻混合震盪 1、5、10 或 30 分鐘(依測試菌株使用不同時間處理)，後取出置於無菌濾紙上自然風乾 20 分鐘，逢機選取 10 粒 ClO_2 處理過之花椰菜或甜椒種子貼於 YPDA 培養基平板上，西瓜種子則貼於 Aac 半選擇性培養基平板上，置於 30°C 培養 24-48 小時後，觀察種子發芽及由種子周圍長出菌落之情形，並以後述的 PCR 方法鑑定長出之菌落是否為測試的病菌。各項試驗另以無菌水處理浸菌種子及未做任何處理之種子為對照，每一處理三重複。在西瓜種子實驗中另將種子播種於含滿地王二號培養土之直徑四吋黑色栽培盆中，每盆 10 粒種子，置於 28°C 溫控溫室中，定期觀察種子發芽、幼苗生長及發病情形。此外，西瓜種子也使用自然帶有細菌性果斑病菌之樣品做相同之 ClO_2 溶液處理，並以未做任何處理之種子為對照，每一處理三重複；處理後播種在培養土中，置於 28°C 溫控溫室中，於 14 天後除觀察發芽率及發病率外，也觀察植株生長情形，並將植株由培養土中取出清洗及吸乾後逢機選取各處理之植株 10 棵，測量植株之主根根長、莖長、根鮮重及莖鮮重。

病原菌之 PCR 檢測

試驗中各病菌均以 PCR 檢測法加以確認。培養基上不論是純培養或由種子長出之菌落，都先配製成濃度為 10^8 CFU ml^{-1} 細菌懸浮液後，再以 GeneMark 公司的 DNA 純化試劑組 (GeneMark DP021) 進行 DNA 純化。鑑定黑腐病菌時，將純化之 DNA 液 10 μl 、專一性引子 C11-534L1 (5'-TTT CAC CTT GAG TGC GTC C-3') 和 C11-534R1 (5'-GTG CAA CAT TTC GTT GAT AAC C-3') (曾國欽，未發表) 各 1 μl 、5X PCR Master Mix 10 μl 和去離子水 28 μl 混合後，使反應混合液總量達 50 μl ，將反應混合液置入溫度循環器中進行 PCR 反應，其反應條件為先以 94°C 預跑 5 分鐘；再以 94°C，

1 分鐘，55°C，45 秒，72°C，1 分鐘進行 30 次循環；最後再以 72°C 反應 10 分鐘。再將 10 μl PCR 產物與 1 μl 染劑均勻混合並進行膠體電泳 30 分鐘，並利用電泳照相及分析系統觀察及照相，以確認是否增幅出 543bp 之專一性條帶。鑑定細菌性斑點病菌時，將前述純化之 DNA 液 10 μl 、Leite 等人⁽²⁴⁾ 設計之專一性引子 RST2 (5'-AGG CCC TGG AAG GTG CCC TGG A-3') 和 RST3 (5'-ATC GCA CTG CGT ACC GCG CGC G-3') 各 1 μl 、5X PCR Master Mix 10 μl 和去離子水 28 μl 混合後，使反應混合液總量達 50 μl ，將反應混合液置入溫度循環器中進行 PCR 反應，其反應條件由 Leite 等人⁽²⁴⁾ 原設定條件，修改為先以 94°C 預跑 5 分鐘；再以 94°C，1 分鐘，63.6°C，55 秒，72°C，1 分鐘進行 30 次循環；最後再以 72°C 反應 10 分鐘。再將 10 μl PCR 產物與 1 μl 染劑均勻混合並進行膠體電泳 30 分鐘，並利用電泳照相及分析系統觀察及照相，以確認是否增幅出 840bp 之專一性條帶⁽²⁴⁾。鑑定果斑病菌時，將純化之 DNA 液 10 μl 、專一性引子 SL1 (5'-CCA TTG TTG CCA GGT CCG AT-3') 和 SR1 (5'-ATA CGC CCT CGC CAA TCT CCA-3') 各 1 μl 、5X PCR Master Mix 10 μl 和去離子水 28 μl 混合後，使反應混合液總量達 50 μl ，將反應混合液置入溫度循環器中進行 PCR 反應，其反應條件為先以 94°C 預跑 5 分鐘；再以 94°C，1 分鐘，65°C，30 秒，72°C，1 分鐘進行 30 次循環；最後再以 72°C 反應 10 分鐘。再將 10 μl PCR 產物與 1 μl 染劑均勻混合並進行膠體電泳 30 分鐘，並利用電泳照相及分析系統觀察及照相，以確認是否增幅出 194 bp 之專一性條帶⁽³⁷⁾。西瓜種子檢測時，各處理組之種子逢機選取 10 顆放入 10 ml 液體的 Aac 半選擇性培養基內，以 150 rpm 震盪進行隔夜培養後，取 1 ml 經離心倒掉上層液，並加入 1 ml 無菌蒸餾水再懸浮，再以前述方法進行 DNA 純化及 PCR 檢測。

結 果

ClO_2 溶液對三種種媒病菌之殺菌效果

以不同濃度 ClO_2 溶液處理十字花科蔬菜黑腐病菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) 及茄科細菌性斑點病菌 (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) 20 分鐘或處理西瓜果斑病菌 (*A. avenae* subsp. *citrulli*) 30 分鐘，結果顯示濃度 10 ppm 時即可完全抑制黑腐病菌所有供試菌株之生長，5 ppm 時即可完全抑制細菌性斑點病菌供試菌株之生長，而對果斑病菌則需 50 ppm 濃度才能抑制所有四個供試菌株之生長 (表一)。以不同時間處理時，細菌性斑

點病菌(XVT28) 最為敏感，以 1 ppm ClO₂ 溶液處理 1 分鐘可由 8.17 降低至 4.15 log CFU ml⁻¹ 之菌量，處理 5 分鐘即可完全抑制其生長 (表二)。而黑腐病菌 (Xcc52) 則需以 10 ppm 處理 20 分鐘、50 ppm 處理 10 分鐘或 100 ppm 處理 5 分鐘，才能被完全抑制。至於細菌性果斑病菌 (Aac153) 以 50 ppm ClO₂ 溶液處理 20 分鐘亦可由 6.58 降低至 2.72 log CFU ml⁻¹ 之菌量，延長至30分鐘才可完全抑制該菌之生長 (表二)。

ClO₂ 溶液處理花椰菜種子對種子發芽之影響及去除種子上十字花科蔬菜黑腐病菌之效果

以 10 ppm ClO₂ 溶液處理人工污染黑腐病菌之花椰菜種子 30 分鐘可完全去除種子表面之黑腐病菌，而以次氯酸鈉溶液處理則須 100 ppm 才能得到與 ClO₂ 之處理在統計上無顯著差異 (表三) 之去除效果。與污菌種子相比，ClO₂ 之處理可提高種子發芽率，但與未經污菌的種子相比，則無顯著差異 (表三)。

ClO₂ 溶液處理甜椒種子對種子發芽率之影響及去除種子上茄科細菌性斑點病菌之效果

以 5 ppm ClO₂ 溶液處理 5 分鐘，即可完全去除甜椒種子上人工污染之細菌性斑點病菌，而次氯酸鈉溶液則需以 100 ppm 處理 10 分鐘才能夠得到相同結果 (表四)。甜椒種子經由 5 ppm ClO₂ 溶液處理各測試時間或以 100 ppm 次氯酸鈉溶液處理 10 分鐘後，與污菌種子相比雖可提高種子之發芽，但統計上無顯著差異，而供試且未經人工污菌及未經消毒處理之甜椒種子在平板上測試之其他雜菌污染率很高，嚴重影響種子之發芽率，且無法判別有無污染斑點病菌。

ClO₂ 溶液處理人工污菌與自然帶菌西瓜種子對種子發芽及幼苗植株生長之影響及對去除果斑病菌及降低幼苗果斑病發生之效果

本實驗分別在 Aac 半選擇性培養基平板上測試及在溫室栽培測試。市售西瓜種子經 PCR 偵測，沒有檢測出果斑病菌，經人工污菌後，於培養基平板上檢

表一、二氧化氯溶液對十字花科蔬菜黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、茄科細菌性斑點病菌 (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) 及西瓜果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 不同菌株之抑制效果

Table 1. Bactericidal efficacy of Chlorine dioxide against strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) in water

Bacterial strain	Chlorine dioxide (ppm) ¹					
	0	1	5	10	50	100
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>						
Xcc34	+ ²	+	-	-	-	-
Xcc45	+	+	+	-	-	-
Xcc52	+	+	+	-	-	-
Xcc71	+	+	+	-	-	-
Xcc78	+	+	+	-	-	-
Xcc158	+	+	+	-	-	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>						
XVT-28	+	-	-	-	-	-
XVT-48	+	+	-	-	-	-
XVP-197	+	+	-	-	-	-
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>						
Aac19	+	+	+	-	-	-
Aac 21	+	+	+	+	-	-
Aac33	+	+	+	+	-	-
Aac 153	+	+	+	+	-	-

¹ Five hundred µl of different concentrations of chlorine dioxide solution was mixed with 500 µl of 10⁸ CFU ml⁻¹ of a test bacterial suspension. The final concentrations of chlorine dioxide in the mixtures were 1, 5, 10, 50 and 100 ppm. After mixing and shaking for 20 min (for Xcc and Xac) or 30min (for Aac), the bacterial cells were separated by centrifugation and suspended in sterile distilled water. Aliquots (10 µl) of the suspension were placed on agar plates and incubated for 24 to 48 hr at 30°C.

² + indicates bacterial growth and - indicates no bacterial growth.

測之帶菌率達 91.65% (表五；圖一)。人工污菌種子經 50 ppm ClO₂ 溶液處理 30 分鐘後，可有效完全去除種子上之西瓜果斑病菌，且不會影響於培養基上測試之發芽率 (表五)。利用 PCR 反應偵測 50 ppm ClO₂ 溶液處理過之種子，不論是否經人工污菌皆無果斑病菌 194 bp 專一性條帶之產生。

人工污菌之種子播種於含滿地王二號培養土之直徑四吋黑色栽培盆中，於溫室培育 14 天後發芽率僅 33.34%，植株發病率達 66.67% (表六)；發病植株經光學顯微鏡下觀察其病斑切片有菌泥湧出 (Ooze) 之現象，由病斑分離之病原菌經 PCR 反應，均可增幅出一 194 bp 專一性 DNA 條帶，確認其為西瓜果斑病菌引起

表二、不同濃度二氧化氯溶液以不同時間處理十字花科蔬菜黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) Xcc52 菌株、茄科細菌性斑點病菌 (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) XVT-28 菌株及西瓜果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) Aac 153 菌株之殺菌效率¹

Table 2. Killing of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc52, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT-28 and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Aac 153 by treatment with different concentrations of chlorine dioxide for different times

Strain	Treatment time(min)	Chlorine dioxide (ppm) ¹					
		0	1	5	10	50	100
Xcc52	1	7.35 ²	7.82	6.22	4.99	3.54	3.40
	5	7.71	7.31	6.76	4.81	2.63	0.00
	10	8.15	7.35	6.02	2.40	0.00	0.00
	20	8.07	8.31	6.82	0.00	0.00	0.00
XVT28	1	— ³	4.15	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	—	2.76	0.00	0.00	0.00	0.00
	10	—	2.55	0.00	0.00	0.00	0.00
	20	8.17	1.84	0.00	0.00	0.00	0.00
Aac153	1	—	6.50	6.21	5.69	3.93	0.00
	5	—	6.42	6.10	5.51	3.70	0.00
	10	—	6.27	5.96	5.23	3.48	0.00
	20	—	6.20	5.89	4.53	2.72	0.00
	30	6.58	6.13	5.82	4.11	0.00	0.00

¹ Five hundred µl of different concentrations of chlorine dioxide solution was mixed with 500 µl of 10⁸ CFU ml⁻¹ of a test bacterial suspension, The final concentrations of chlorine dioxide in the mixtures were 1, 5, 10, 50 and 100 ppm. After mixing and shaking for different times, the bacterial cells were separated by centrifugation and suspended in sterile distilled water. The suspension was serially diluted and plated on agar plates for counting the survived bacterial cells.

² Population expressed as log CFU ml⁻¹.

³ — = not tested.

表三、二氧化氯溶液與次氯酸鈉溶液處理人工污染黑腐病菌 Xcc52 菌株之花椰菜種子對去除黑腐病菌之效果及對種子發芽之影響

Table 3. Effect of treatment of cauliflower seeds artificially infested with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc52 with chlorine dioxide solution (ClO₂) and sodium hypochlorite solution (NaOCl) on seed germination and seed contamination rates

Treatment ¹	Seed contamination (%)	Germination (%)
Infested seeds treated with ClO ₂	0.00 ± 0.00 b ²	86.67 ± 8.17 a
Infested seeds treated with NaOCl	5.55 ± 3.85 b	73.33 ± 36.40 ab
Infested seeds without treatment	78.90 ± 21.67 a	53.33 ± 23.38 b
Noninfested seeds without treatment	0.00 ± 0.00 b	81.67 ± 18.35 a

¹ After treatment with 10 ppm of chlorine dioxide solution for 30 min or with 100 ppm of sodium hypochlorite solution for 30 min, seeds were placed on YPDA plates for 24-48 hr to observe the rate of seed germination and the rate of contamination with *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc). The identity of Xcc was confirmed by PCR using primer pair C11-534L1/C11-534R1.

² Data are mean of 3 replications with 10 seeds per replication ± standard deviation, Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at P=0.05, according to Duncan's multiple range test.

之病株。人工污菌種子經 50 ppm ClO₂ 溶液處理 30 分鐘後，不僅提高發芽率達 75.00%，且降低幼苗發病率至 0% (表六)。ClO₂ 溶液處理人工污菌種子，在溫室內生長 14 天後，不會影響西瓜植株生長，其根長、莖長、根重及莖重與其他處理組無顯著差異 (表六)。

由中興大學植病系索取的一批自然帶菌種子經 PCR 反應後，可增幅產生果斑病菌 194 bp 專一性 DNA 條帶。自然帶菌種子用培養基平板檢測，果斑病菌帶菌率為 25.56% (表七)，在培養基平板上種子四周產生之似果斑病菌菌落，均經 PCR 反應確認為果斑病菌。

自然帶菌之種子於溫室播種後發芽率為 67.78%，幼苗發病率為 29.27% (表七)，其子葉病斑內的病原均經 PCR 反應確認，而經 50 ppm ClO₂ 溶液處理 30 分鐘者，發芽率為 75.55%，與自然帶菌不經處理者之發芽率比較，並無顯著之差異，但經 ClO₂ 溶液處理後，可完全防治幼苗的發病，且播種 14 天後之植株其根長、莖長、根重及莖重均較不經二氧化氯處理者為佳，其中兩項測量值具有顯著差異 (表七)。自然帶菌種子經 50 ppm ClO₂ 溶液震盪處理 30 分鐘後，不會增幅產生 194 bp 專一性 DNA 條帶。

表四、人工污染細菌性斑點病菌 XVT-28 菌株之甜椒種子經二氧化氯溶液與次氯酸鈉溶液不同時間處理對去除病原菌及對種子發芽之影響

Table 4. Effect of treatment of sweet pepper seeds artificially infested with *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT-28 strain with chlorine dioxide solution (ClO₂) and sodium hypochlorite solution (NaOCl) on seed germination and seed contamination rates

Treatment ¹	Time (min)	Seed contamination (%)	Germination (%)
Infested seeds treated with ClO ₂	1	16.67 ± 11.55 b ²	53.33 ± 5.77 c
	5	0.00 ± 0.00 a	63.33 ± 15.28 c
	10	0.00 ± 0.00 a	60.00 ± 20.00 c
Infested seeds treated with NaOCl	1	80.00 ± 20.00 c	50.00 ± 10.00 c
	5	30.00 ± 26.46 b	20.00 ± 17.32 ab
	10	0.00 ± 0.00 a	66.66 ± 15.28 c
Infested seeds treated with water		100.00 ± 0.00 c	43.33 ± 15.28 bc
Noninfested seeds without treatment		— ³	13.33 ± 5.77 a

¹ After treatment with 5 ppm of ClO₂ solution or 100 ppm of NaOCl solution for different times, seeds were placed on YPDA plates for 24-48 hr to observe seed germination and contamination with *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav). The identity of Xav was confirmed by PCR using primer pair RST2/RST3.

² Data are means of 3 replications ± standard deviation. Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at $P=0.05$, according to Duncan's multiple range test.

³ — = The number of seeds contaminated with Xav could not be counted because of heavy contamination with fungi and other bacteria.

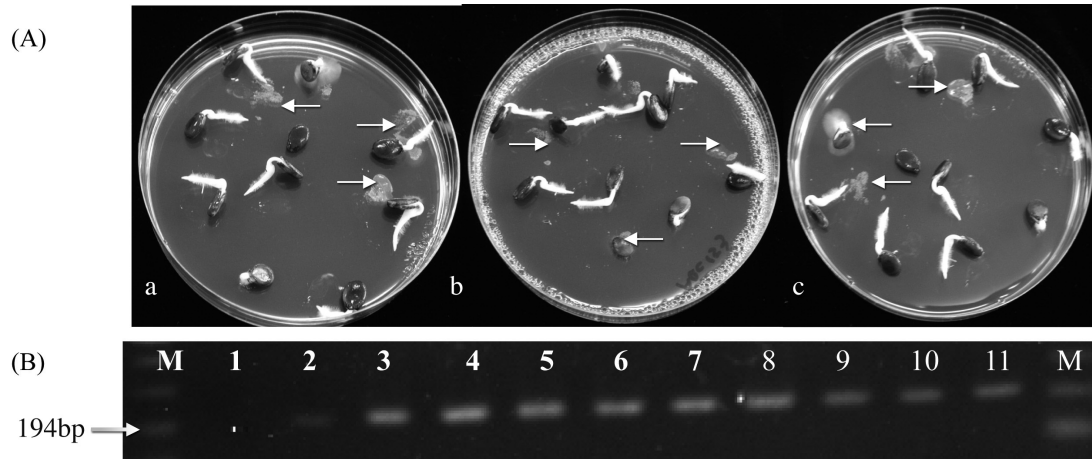
表五、二氧化氯溶液處理人工污染西瓜果斑病菌 Aac153 菌株之西瓜種子對去除果斑病菌之效果及對種子發芽之影響

Table 5. Effect of treatment of watermelon seeds artificially infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Aac153 with chlorine dioxide (ClO₂) solution on seed germination and seed contamination rates

Treatment ¹	Seed contamination (%)	Germination (%)
Infested seeds treated with ClO ₂	0.00 ± 0.00 b ²	93.33 ± 0.00 a
Noninfested seeds treated with ClO ₂	0.00 ± 0.00 b	94.99 ± 2.38 a
Infested seeds without treatment	91.65 ± 11.81 a	90.00 ± 5.48 a
Noninfested seeds without treatment	0.00 ± 0.00 b	86.67 ± 4.72 a

¹ After treatment with 50 ppm of ClO₂ solution for 30 min, seeds were placed on Aac semiselective agar plates for 24-48 hr to observe seed germination and contamination with *A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac). The identity of Aac was confirmed by PCR using primer pair SL1/SR1.

² Data are means of 3 replications ± SD. Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at $P=0.05$, according to Duncan's multiple range test.



圖一、人工污菌西瓜種子之 Aac 半選擇性培養基平板上產生之似果斑病菌菌落如箭頭所指 (A)，經 PCR 反應後，可增幅出一 194 bp 專一性 DNA 條帶 (B)。電泳圖列分別為 1，無菌蒸餾水；2，西瓜果斑病菌 Aac153 菌株之 DNA；3、4與5，人工污菌種子之菌落在平板a上產生之菌落；6、7與8，人工污菌種子之菌落在平板b上產生之菌落；9、10與11，人工污菌種子之菌落在平板c上產生之菌落及 M，Gen-100 bp DNA Ladder (禾鑫生技)。

Fig. 1. Colonies (arrowed) similar to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) from artificially infested watermelon seeds placed on the Aac semiselective medium plate (A) and identification of the colonies by PCR using primer pair SL1/SR1 specific to Aac (B). Lane 1, Sterile distilled water; lane 2, DNA of Aac153; lanes 3-5, colonies from Aac semiselective medium plate a; lanes 6-8, colonies from Aac semiselective medium plate b; lanes 9-11, colonies from Aac semiselective medium plate c; M, Gen-100 bp DNA Ladder (GeneMark).

表六、二氧化氯溶液處理人工污菌西瓜種子對種子發芽、幼苗生長與果斑病發病率之影響

Table 6. Effect of treatment of watermelon seeds artificially infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Aac153 with chlorine dioxide (ClO₂) solution on seed germination, seedling growth and disease incidence

Treatment ¹	Germination rate (%)	Root length (cm)	Stem length (cm)	Root weight (mg)	Stem weight (mg)	Disease incidence (%)
A	75.00 ± 7.07 ab ²	5.90 ± 0.11 a	8.61 ± 2.32 a	83.83 ± 25.69 a	358.50 ± 80.36 a	0.00 ± 0.00 b
B	86.69 ± 14.12 a	6.18 ± 0.63 a	8.93 ± 2.64 a	80.34 ± 8.96 a	360.17 ± 58.93 a	0.00 ± 0.00 b
C	33.34 ± 33.00 b	4.28 ± 2.38 a	5.61 ± 6.34 a	58.84 ± 17.20 a	148.33 ± 177.01 a	66.67 ± 23.56 a
D	46.67 ± 51.85 ab	4.85 ± 2.09 a	5.99 ± 6.53 a	46.84 ± 19.57 a	293.16 ± 26.63 a	0.00 ± 0.00 b

¹ After treatment with 50 ppm of ClO₂ solution for 30 min, seeds were sown in pots containing a growth medium in the greenhouse. Seed germination, root length, stem length, root fresh weight, stem fresh weight and disease incidence were recorded 14 days after sowing. A : Infested seeds treated with ClO₂ ; B : Noninfested seeds treated with ClO₂ ; C : Infested seeds without treatment ; D : Noninfested seeds without treatment.

² Data are means of 3 replications ± SD. Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at P=0.05, according to Duncan's multiple range test.

表七、二氧化氯溶液處理自然帶有細菌性果斑病菌西瓜種子對種子發芽、幼苗生長與果斑病發病率之影響

Table 7. Effect of treatment of watermelon seeds naturally infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with chlorine dioxide (ClO₂) solution on seed germination, seedling growth and disease incidence

Treatment ¹	Contamination (%)	Germination (%)	Root length (cm)	Stem length (cm)	Root weight (mg)	Stem weight (mg)	Disease incidence (%)
ClO ₂	0.00 ± 0.00 b ²	75.55 ± 19.53 a	5.84 ± 0.41 a	10.33 ± 2.29 a	43.28 ± 8.32 ab	242.15 ± 86.10 a	0.00 ± 0.00 b
Water(CK)	25.56 ± 1.93 a	67.78 ± 23.41 a	4.69 ± 0.05 b	9.29 ± 2.57 a	38.44 ± 12.33 b	209.77 ± 80.82 b	29.27 ± 11.15 a

¹ After treatment with 50 ppm of ClO₂ solution for 30 min, seeds were placed on Aac semiselective agar plates for 24-48 hr to observe contamination with *A. avenae* subsp. *citrulli* or were sown in pots containing a growth medium in the greenhouse. Seed germination, root length, stem length, root fresh weight, stem fresh weight and disease incidence were recorded 14 days after sowing.

² Data are means of 3 replications ± SD. Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at P=0.05, according to Duncan's multiple range test.

討 論

由於 ClO_2 之殺菌力及安全性，目前已被應用於多種項目之消毒、殺菌、除臭處理。在農漁牧產品上， ClO_2 可防除蔬果^(4, 5, 22)、農畜產品⁽⁴⁵⁾ 及海鮮食品⁽¹⁹⁾ 上 *E. coli* O157:H7、*Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. 等微生物之污染。 ClO_2 對植物病原菌的殺菌效果上，也有一些研究，例如運用在收穫後之番茄或馬鈴薯處理，能有效降低由 *E. carotovora* 引起之果實或塊莖軟腐病^(30, 31, 36)，而本研究結果也顯示 ClO_2 對三種種媒植物病原細菌有良好殺菌效率，且用於種子處理能去除污染之病菌。

種子為我國重要出口農產品，而種子是否污染重要病菌關係出口至為關鍵，因此開發有效的種子處理法是極為重要的工作。本研究測試的三種種媒病原細菌在適宜環境下，可造成其寄主作物生產上的重大經濟損失。種子若帶有這些病原菌，即使帶菌率很低也能引起病害的嚴重發生，以甘藍黑腐病為例只要有 0.03% 種子帶菌率，即可造成本病害的流行⁽³³⁾。又如西瓜細菌性果斑病，在西瓜移植苗生產的溫室內，只要發現一株病株就得廢棄溫室內所有的幼苗⁽⁷⁾，因此種子處理法必須達到完全去除病菌的效果。目前在台灣可應用的種子處理方法能否完全去除病菌，有待進一步確認。十字花科蔬菜種子之處理包括溫湯浸種、抗生素、銅劑、次氯酸鈉 (Nyolate) 浸種或次氯酸鈣 (calcium hypochlorite) 拌種，這些方法雖可減少或完全去除種子上之黑腐病菌，但應用時有些方法操作不便或安全堪慮或易影響種子發芽^(12, 16)。茄科種子雖可利用鏈黴素 (streptomycin) 消毒，但隨病原菌對其產生抗性後而失去效用⁽³⁴⁾。瓜類果斑病最佳防治策略，為使用無病原菌 (pathogen free) 種子，種子消毒之方法包括溫湯浸種⁽⁴¹⁾ 與過氧乙酸 (peroxyacetic acid)⁽⁹⁾，但溫湯浸種無法完全排除種子上的病原菌，而過氧乙酸則需要 1,600ppm 高濃度才能完全除去種子上的病原菌⁽⁹⁾。本研究發現以低濃度 ClO_2 溶液作短時間的處理，即可完全殺死水中的 *X. campestris* pv. *campestris*、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 及 *A. avenae* subsp. *citrulli*，也可完全去除種子上人工污染的這些病菌及西瓜種子自然帶有的細菌性果斑病菌，且 ClO_2 溶液浸漬處理對種子之發芽率及植株 (西瓜) 之生長無不良影響甚至有促進之作用，由此可見 ClO_2 具有很大的應用潛力。由於本研究除西瓜有使用自然帶菌種子外，均以人工污菌種子作為材料，有必要針對自然帶菌之甘藍或茄科種子進行評估 ClO_2 之除菌功效，以確認 ClO_2 對種子內感染之病菌是否有除菌效果。

多數研究報告以 ClO_2 消毒處理蔬果時，採用氣體

薰蒸方式^(4, 5, 8, 23, 27, 28, 29, 30)，而本研究使用其溶液作各項處理試驗。除種子可適用溶液浸漬而不致變質外， ClO_2 溶液浸漬處理之優點包括處理步驟較氣體為簡單，稀釋後即可使用，且不需如氣體薰蒸時，需要特殊的密閉設備；被處理之種子體積小、數量多，以溶液處理可完全接觸種子表面。種子在處理後，即可直接播種，不需增加如清洗等其他處理步驟。此外 ClO_2 的最佳儲存方法，即是以液體方式保存在 4°C，在這個狀態下它相當穩定。但 ClO_2 本身會緩慢地分解為氯 (chlorine) 和氧 (oxygen)，根據劉與賴⁽²⁶⁾ 之研究顯示 ClO_2 每日之衰退率達 11.6%，故亦不能儲存太長時間。Huang 等人⁽¹⁵⁾ 指出搭配 ClO_2 與超音波共同處理蔬果，不但除菌效果佳，且可加速 ClO_2 之分解，以降低 ClO_2 之殘留。故日後若使用 ClO_2 於種子處理時，可搭配超音波以增進其除菌效果及促進 ClO_2 之分解。與次氯酸鈉的效果比較，低濃度之 ClO_2 溶液處理對人工污染黑腐病菌之花椰菜種子之除菌效果優於或等同於高濃度之次氯酸鈉，與 Huang 等人⁽¹⁴⁾ 對枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 與大腸桿菌 (*E. coli*) 的研究結果相似。且根據 Huang 等人⁽¹⁴⁾ 的報告顯示 ClO_2 在水中之殺菌效果較不受水的 pH 值影響，且不需擔心如次氯酸鈉處理後氯的殘留及衍生有毒致癌物質等問題，故 ClO_2 溶液在應用上較次氯酸鈉更具安全。

謝 辭

本研究承行政院農委會動植物防疫檢疫局「94 農科 -13.4.2- 檢 -B1 與 95 農科 -13.4.2- 檢 -B1」經費補助及中興大學植病系植物病原細菌研究室提供甘藍黑腐病菌菌株及西瓜果斑病菌菌株及西瓜自然帶菌種子、亞洲世界蔬菜中心王肇芬博士提供茄科細菌性斑點病菌菌株、農友種苗股份有限公司提供花椰菜及甜椒種子、汲鑫科技股份有限公司提供二氧化氯溶液，以及屏東科技大學植醫學系植物病原細菌研究室參與研究同學協助實驗工作之進行，特致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Agius, G., Burkeen, S., and Mynatt, J. 2004. Benefits of using chlorine dioxide as an alternative to hot-water sanitation. *MBAATQ* 41: 42-44.
2. Cheng, A. H., Hsu, Y. L., Huang, T. C., and Wang, H. L. 2000. Susceptibility of cucurbits to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and control of fruit blotch on melon. *Plant Pathol. Bull.* 9: 151-156. (in Chinese with English abstract)
3. Cheng, A. H., and Huang, T. C. 1998. Bacterial fruit

- blotch on melon and bitter melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Pathol. Bull.7: 216. (Abstr.)
4. Du, J., Han, Y., and Linton, R. H. 2002. Inactivation by chlorine dioxide gas (ClO₂) of *Listeria monocytogenes* spotted onto different apple surfaces. Food Microbiol. 19: 481-490.
 5. Du, J., Han, Y., and Linton, R. H. 2003. Efficacy of chlorine dioxide gas in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on apple surfaces. Food Microbiol. 20: 583-591.
 6. Food and Drug Administration (FDA), US Department of Agriculture (USDA), and Centers for Disease Control and Prevention(CDC). 1998. Guidance for industry-guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables Oct. 26 (<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/prodguid.html>).
 7. Gitaitis, R., and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 45: 371-397.
 8. Han, Y., Sherman, D. M., Linton, R. H., Nielsen, S. S., and Nelson, P. E. 2000. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green pepper surfaces. Food Microbiol. 17: 521-533.
 9. Hopkins, D., Thompson, C. J. H., and Lovic, B. 2001. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. Phytopathology 91: S40.
 10. Hseu, S. H., and Hsu, S. T. 1991. Sensitivity of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Taiwan to copper and other agrochemicals. Plant Prot. Bull. 33: 410-419. (in Chinese with English abstract)
 11. Huang, T. C. 1988. Recent progress of research on crucifer black rot control in Taiwan. Pages 29-43 in: Proceeding of a Symposium on Variety Improvement of Vegetable. Taitung District Agricultural Research and Extension Station. (in Chinese with English abstract)
 12. Huang, T. C., and Lee, H. L. 1988. Hot acidified zinc sulfate as seed soaking agent for control of crucifer black rot. Plant Prot. Bull. 30: 245-258. (in Chinese with English abstract)
 13. Huang, J., Wang, L., Ren, N., Liu, X. L., Sun, R. N., and Yang, G. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. Water Res. 31: 455-460.
 14. Huang, J., Wang, L., Ren, N., Ma, F, and, Juli. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. Water Res. 31: 607-613.
 15. Huang, T. S., Xu, C., Walker, K., West, P., Zhang, S., and Weese, J. 2006. Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. J. Food Sci. 71: 134-139.
 16. Humaydan, H. S., Harman, G. E., Nedrow, B. L., and Dinitto, L. V. 1980. Eradication of *Xanthomonas campestris*, the causal agent of black rot, from brassica seeds with antibiotics and sodium hypochlorite. Phytopathology 70: 127-131.
 17. Jones, B. J., Pohronezny, K. L., Stall, R. E., and Jones, J. P. 1986. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. Phytopathology 76: 430-434.
 18. Kado, C. I., and Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60: 969-976.
 19. Kim, J. M., Huang, T. S., Marshall, M. R., and Wei, C. I. 1999. Chlorine dioxide treatment of seafoods to reduce bacterial loads. J. Food Sci. 64: 1089-1093.
 20. Kim, Y. J., Lee, S. H., Park, J., Park, J., Chung, M., Kwon, K., Chung, K., Won, M., and Song, K. B. 2008. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on stored iceberg lettuce by aqueous chlorine dioxide treatment. J. Food Sci. 73: 418-422.
 21. Latin, R. X., and Hopkin, D. L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical exam question becomes reality. Plant Dis. 79: 761-765.
 22. Lee, S. Y., and Baek, S. Y. 2008. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. Food Microbiol. 25: 582-587.
 23. Lee, S. Y., Costello, M., and Kang, D. H. 2004. Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer of lettuce leaves. J. Food Prot. 67: 1371-1376.
 24. Leite, R. P., Jr. Minsavage, G. V., Bonas, U., and Stall, R. E. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1068-1077.
 25. Lin, C. Y. 1981. Studies on crucifer black rot in Taiwan. Plant Prot. Bull 23: 57-168.(in Chinese with English abstract)
 26. Liu, M. J., and Lai, C. G. 2003. Environmental disinfectant- studied on the disinfection efficiency of chlorine dioxide. Environ. Analysis Commun. Mag. 48: 16-23.(in Chinese)
 27. Mahmoud, B. S. M., Bhagat, A. R., and Linton, R. H. 2004. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* on strawberries by chlorine dioxide gas. Food Microbiol. 24: 736-744.
 28. Mahmoud, B. S. M., and Linton, R. H. 2008. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli*

- O157:H7 and *Salmonella enterica* on lettuce by chlorine dioxide gas. *Food Microbiol.* 25: 244-252.
29. Mahmoud, B. S. M., Vaidya, N. A., Corvalan, C. M., and Linton R. H. 2008. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Poona* on whole cantaloupe by chlorine dioxide gas. *Food Microbiol.* 25: 857-865.
 30. Mahovic, M. J., Tenney, J. D., and Bartz, J. A. 2007. Applications of chlorine dioxide gas for control of bacterial soft rot in tomatoes. *Plant Dis.* 91: 1316-1320.
 31. Pao, S., Kelsey, D. F., Khalid, M. F., and Ettinger, M. R. 2007. Using aqueous chlorine dioxide to prevent contamination of tomatoes with *salmonella enterica* and *Erwinia carotovora* during fruit washing. *J. Food Prot.* 70: 629-634.
 32. Schaad, N. W., Gabrielson, R. L., and Mulanax, M. W. 1980. Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of *Xanthomonas campestris* from crucifer seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 803-807.
 33. Schaad, N. W., Sitterly, W. R., and Humaydan, H. 1980. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. *Plant Dis.* 64: 91-92.
 34. Swings, J. G., and Civerolo, E. L. 1993. *Xanthomomas*. Chapman & Hall Inc. Press. 399 pp.
 35. Tang, C. J. 1997. Studies on bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Master thesis, National Chung-Hsing University. 65 pp. (in Chinese with English abstract)
 36. Tsai, L. S., Huxsoll, C. C., and Robertson, G., 2001. Prevention of potato spoilage during storage by chlorine dioxide. *J. Food Sci.* 66: 472-477.
 37. Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 2002. Diagnosis of bacterial fruit blotch of cucurbits and identification of the causal organism. Pages 41-49 in: Workshop on Diagnosis and Identification Techniques of Plant Important Quarantine Pests. P. F. Chang, T. T. Tsay, K. C. Tzeng, and J. W. Huang, eds. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taipei, Taiwan, and Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 208 pp. (in Chinese)
 38. USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1999. EPA guidance manual alternative disinfectants and oxidants. 4. chlorine dioxide.
 39. Veena, M. S., and van Vuurde, J. W. L. 2002. Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. *J. Microbiol. Methods* 49: 11-17.
 40. Verniere, C., Devaux, M., Pruvost, O., Couteau, A., and Luisetti, J. 1991. Studies on the biochemical and physiological variations among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Fruits* 46: 162-170.
 41. Wall, G. C. 1989. Control of watermelon fruit blotch by seed heat-treatment. *Phytopathology* 79: 1191.
 42. Wang, C. H. 1990. Disinfection by the stabilized chloride dioxide solution. *Food Ind.* 22: 14-17. (in Chinese)
 43. Williams, P. H. 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifer. *Plant Dis.* 64: 736-742.
 44. Wu, V. C. H., and Kim, B. 2007. Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeasts and mold on blueberries. *Food Microbiol.* 24: 794-800.
 45. Yunhee, H., Ku, K., Kim, M., Won, M., Chung, K., and Song, K. B. 2008. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* inoculated on chicken by aqueous chlorine dioxide treatment. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 742-745.

ABSTRACT

Chao, Y. C.^{1,2,3}, Hsu, S. T.², and Tzeng, K. C.² 2010. Bactericidal Efficacy of Chlorine Dioxide Against Three Seed-borne Plant Pathogenic Bacteria and Application of Seed Treatment for Eradication of These Bacteria. *Plant Pathol. Bull.* 19: 19-29. (¹ Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan; R.O.C., ² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402 Taiwan; R.O.C. ³ Corresponding author, Email: c@mail.npust.edu.tw; Fax: +886-8-7740-293)

The efficacy of chlorine dioxide (ClO₂) solution in inhibition of growth of three seed-borne plant pathogenic bacteria: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), the causal agent of black rot of crucifers; *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), the causal agent of bacterial spot of tomato and pepper; and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits was evaluated, and its application on seed treatment for decontaminating these bacteria was also studied. The results showed that treatment of various strains of Xcc and Xav with 10 and 5 ppm ClO₂ solution, respectively, for 20 min, and strains of Aac with 50 ppm ClO₂ solution for 30 min, completely inhibited the growth of these bacteria on agar media. Treatments of cauliflower seeds artificially infested with Xcc with 10 ppm ClO₂ solution for 30 min, pepper seeds artificially infested with Xav with 5 ppm ClO₂ solution for 10 min, and watermelon seeds artificially infested or naturally infested with Aac with 50 ppm ClO₂ solution for 30 min, completely removed the contaminated bacteria from these seeds. The effective concentrations of ClO₂ solution did not affect or may increase the germination rate of the seeds. In the experiments with artificially or naturally infested watermelon seeds, the ClO₂ treatment not only eradicated the infested bacteria but also completely controlled the fruit blotch disease at the seedling stage, since no diseased seedlings were observed in the treated seeds in contrast to about 66.6% (artificially infested) or about 29.2% (naturally infested) diseased seedlings in the nontreated control. The ClO₂ treatment did not affect or may show better growth of the watermelon seedlings as compared with the nontreated control.

Key words: chlorine dioxide, seed treatment, control, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*