

# 十字花科蔬菜黑腐病菌血清偵測技術<sup>1</sup>

吳雅芳、陳紹崇、鄭安秀<sup>2</sup>

## 摘要

吳雅芳、陳紹崇、鄭安秀。2005。十字花科蔬菜黑腐病病原細菌血清偵測技術之研發。臺南區農業改良場研究彙報 46：10-19。

十字花科蔬菜黑腐病病原細菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 供試菌株分別分離自台灣各主要栽培區，並以甘藍分離菌株 XCC214 細菌全細胞製備抗血清。利用 SDS 免疫擴散反應進行抗血清力價測定，結果顯示未稀釋和稀釋 1/2 倍後的抗血清均能與十字花科蔬菜黑腐病菌供試菌株形成一條明顯弧形反應帶，但均不與檸檬黑斑病等 15 種病原細菌菌株形成任何反應帶。在間接酵素連結抗體檢測法(ELISA)試驗中，亦可偵測到所有黑腐病菌的供試菌株，而檸檬黑斑病等 15 種病原細菌菌株均無反應。在間接 ELISA 檢測法中，以 IgG 濃度 0.16 μg/ml 為最適宜，可偵測到 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> cfu/ml 濃度之黑腐病病原細菌。由西方墨點反應分析結果證實，*X. campestris* pv. *campestris* 菌株 XCC214 細菌全細胞製備之抗血清是由一種抗原蛋白免疫反應而製成，分子量大小約 63.6kDa。

**關鍵詞：**甘藍、黑腐病病原細菌、酵素連結抗體免疫檢測法

接受日期：2005 年 9 月 2 日

## 前言

由 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel Dows.) 所引起的黑腐病為十字花科蔬菜最主要病害之一，病原細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，降低蔬菜品質及產量至鉅。臺灣地處亞熱帶地區，溫度及濕度均適宜黑腐病的發生，尤以每年 6-10 月為發病高峰期；自 70 年代起推行蔬菜生產專業區，大量集中栽培之後，病害的發生逐漸加劇，已成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，病原細菌侵入或污染十字花科蔬菜種子，成為田間病害發生的初次感染源<sup>(2)</sup>，在目前國際間種子貿易交流頻繁的情形下，不帶黑腐病病原細菌之十字花科蔬菜種子已成為許多國家必要的檢疫條件。目前針對十字花科蔬菜種子帶黑腐病病原細菌的偵測方法包括選擇性培養基<sup>(4, 5)</sup>、核酸探針<sup>(1)</sup>、種子栽種觀察<sup>(12)</sup>、噬菌體檢測法<sup>(9)</sup>及血清檢測法<sup>(7, 8)</sup>等。本研究擬針對台灣地區十字花科蔬菜種子內外銷頻繁之現況，發展出簡便易操作的偵測方法，為符合進出口業者之需求，期避免內外銷種子因攜帶黑腐病病原細菌而成為田間初次感染源。

---

1. 行政院農業委員會台南區農業改良場研究報告第 312 號。本試驗承行政院農業委員會經費補助，謹此誌謝。

2. 第三作者為台南區農業改良場研究員、其餘為助理研究員。台南縣新化鎮牧場 70 號。

## 材料與方法

### 供試菌株收集與保存

十字花科蔬菜黑腐病病原細菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) 供試菌株分離及收集自台灣各蔬菜產區，在溫室內以剪葉接種方法測定病原性後，於室溫下保存於無菌蒸餾水中。本研究以由各地收集及分離得之 20 個十字花科蔬菜黑腐病病原細菌菌株(如表一)為供試菌株。

### 抗血清之製備

以甘藍黑腐病病原細菌菌株 XCC214 作為製備抗血清之菌株。取 1ml 細菌懸浮液( $10^8$  cfu/ml)加等量之 freund's complete adjuvant (Life Technologies, U.S.A.) 充分乳化後，注射於紐西蘭雌白兔之頸後皮下，第二、三週分別再取 1 ml 細菌懸浮液加等量之 freund's incomplete adjuvant 充分乳化後追加注射，共注射 3 次，最後一次注射後二週，自兔子耳朵採血。收集之血液於 37 靜置 1 小時，待凝塊後，再移置於 4 冰箱中過夜，次日取出泌於上層之抗血清，所得之抗血清以 5000 rpm 離心 8 分鐘，去除混入抗血清之血球，取上層液分裝於微量管中，置於 -20 冰箱中保存備用。

### 抗血清之力價測定

抗血清力價測定參照 Purcifull *et al.*<sup>(7)</sup> 的 SDS 免疫擴散反應測定法：在 5cm 之塑膠培養皿中倒入 5 ml 內含 0.5 % SDS 之 0.8 % 瓊脂(Difco noble agar)液，凝固後以制式打孔器在中央挖一穴，周圍等距離挖六穴，每穴直徑 7 mm，穴間距離 5 mm。抗原係以蒸餾水稀釋之菌株 XCC214 細菌懸浮液( $10^8$  cfu/ml) ，以 8000rpm 離心 10 分鐘，再加入 200  $\mu$ l 2 % SDS 回溶沉澱物作為抗原。中間穴加入抗原，周圍穴則加入原液及以蒸餾水逐倍稀釋之菌株 XCC214 抗血清，置於室溫下，16-24 小時後觀察結果，並拍照記錄。

### 抗血清與十字花科蔬菜黑腐病及其他植物病原細菌菌株之 SDS 免疫擴散反應

依上述方法，中間穴加入菌株 XCC214 之抗血清原液，周圍穴則分別加入由各地不同十字花科蔬菜寄主分離之黑腐病病原細菌菌株及其他植物病原細菌包括檸檬黑斑病 (*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*) 茄科細菌性斑點病 (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) 火鶴花細菌性葉枯病 (*X. axonopodis* pv. *differbachiae*) 水稻白葉枯病 (*X. oryzae* pv. *oryzae*) 楊桃細菌性斑點病 (*Pseudomonas syringae* pv. *averrhoi*) 木瓜黑腐病 (*Erwinia cypripedii*) 麻竹細菌性萎凋病 (*E. sinocalami*) 洋蔥細菌性軟腐病 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) 番茄細菌性軟腐病 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) 蝴蝶蘭細菌性軟腐病 (*E. chrysanthemi*) 洋香瓜細菌性果斑病 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 蝴蝶蘭褐斑病 (*A. avenae* subsp. *cattleyae*) 星辰花細菌性萎凋病 (*Burkholderia caryophylli*) 水稻細菌性穀枯病 (*B. glumae*) 及番茄青枯病 (*Ralstonia solanacearum*) 等病原菌菌株之 2% SDS 之細菌懸浮液 200  $\mu$ l ，置於室溫下，16-24 小時後觀察結果，並拍照記錄。

### 酵素結合抗體檢定法 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

#### 1. 免疫球蛋白製備：

抗血清 1 ml，加蒸餾水至 10 ml，再分別慢慢加入 10 ml 飽和之 ammonium sulfate，攪拌均勻後於室溫下靜置 30 60 分鐘，再以 9000 rpm 離心 10 分鐘，沈澱物以 2 ml 一半強度

(1/2-strength) 之 PBS 溶解，而後以 500 ml 一半強度之 PBS 透析三次，每次於 4°C 下透析 4 小時；之後將試料分別慢慢加入填有 preequilibrated DEAE cellulose 之 10 ml 的塑膠吸管，製備免疫球蛋白。待試料慢慢流入 preequilibrated column，全部進入 cellulose 後，以適量之 1/2-strength 之 PBS 加在 column 上端，流出物(effluent)以 eppendorf tube 收集，每管 1 ml，收集 16 管，以 Pharmacia U-2000 spectrophotometer 波長 280 nm 測每一管之 O.D.值，之後合併 O.D.值大於 0.8 之流出物，再以一半強度之 PBS 調整  $\gamma$ -globulin 之 O.D.值至 1.4 即為 1 mg/ml，保存於 -20°C 下備用。

## 2. 不同濃度的免疫球蛋白及酵素連結免疫球蛋白之 ELISA 反應試驗：

以 coating buffer 製備  $5 \times 10^6$  cfu/ml 菌株 XCC214 之懸浮液，取 200  $\mu$ l 加入微量盤中，另以分離自番茄之細菌性軟腐病菌株(*E. carotovora* subsp. *carotovora*) ECC14 作為對照。菌株 XCC214 免疫球蛋白以 conjugate buffer 系列稀釋成 0.44、0.33、0.22 及 0.16  $\mu$ g/ml 等濃度，配合山羊抗兔子酵素連結 IgG 1:6000 作間接法 ELISA 反應。

## 十字花科蔬菜黑腐病及其他植物病原細菌菌株之間接法 ELISA 反應

以 coating buffer 製備不同十字花科蔬菜寄主分離之黑腐病病原細菌菌株及其他植物病原細菌包括檸檬黑斑病、茄科細菌性斑點病、火鶴花細菌性葉枯病、水稻白葉枯病、楊桃細菌性斑點病、木瓜黑腐病、麻竹細菌性萎凋病、洋蔥細菌性軟腐病、番茄細菌性軟腐病、蝴蝶蘭細菌性軟腐病、洋香瓜細菌性果斑病、蝴蝶蘭褐斑病、星辰花細菌性萎凋病、水稻細菌性穀枯病及番茄青枯病等病原細菌菌株之懸浮液進行間接法 ELISA 反應，其中菌株 XCC214 免疫球蛋白濃度為 0.16  $\mu$ g/ml。

## 酵素連結抗體檢定法對十字花科蔬菜黑腐病病原細菌之靈敏度測定

將菌株 XCC214 細菌懸浮液以 coating buffer 稀釋成  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  cfu/ml 等濃度，進行靈敏度試驗，另以同樣處理之分離自番茄之細菌性軟腐病菌株 ECC14 作為對照。

## SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 分析蛋白質

細菌蛋白質之萃取，將黑腐病菌株 XCC214 及軟腐病菌株 ECC17 以 Nutrient broth 培養基培養 20 小時後，以 12000 rpm，離心 5 分鐘將細菌沉澱，加無菌水懸浮後再離心，重複三次，以無菌水將菌液量調整到 O.D. 620 nm 為 0.3，取 1ml 菌液離心後，將細菌懸浮於 100  $\mu$ l 1X 解離緩衝液 (50 mM Tris, pH 6.8; 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol; 2% SDS; 0.1% bromophenol blue; 10% glycerol) 中，接著在沸水中煮沸 5 分鐘，取出震盪 30 秒，置於冰上 5 分鐘冷卻，接著以 12000 rpm，離心 15 分鐘，取含適量蛋白樣品 5-8  $\mu$ l 之上層液注入 SDS-PAGE 電泳膠體中進行分析。電泳膠體為 12.5% 之解析凝膠 (1.6ml d.d.H<sub>2</sub>O, 2.1ml 30% acryamide solution, 1.25ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 50  $\mu$ l 10% SDS, 40  $\mu$ l 10% ammonium persulfate solution 及 3  $\mu$ l TEMED) 和 4% 之集膠凝膠 (3.05 ml d.d.H<sub>2</sub>O, 0.67 ml 30% acryamide solution, 1.25 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 50  $\mu$ l 10% SDS, 40  $\mu$ l 10% ammonium persulfate solution 及 5  $\mu$ l TEMED)。電泳膠體之分析，將凝膠玻璃片裝置放置電泳槽內，於槽內注入 1 X running buffer。將蛋白質樣品與分子量標誌吸取適量體積緩緩注入 stacking gel 之齒溝槽內，gel 兩邊注入相同樣品做重複分析，分子量標誌注入中間二個溝槽，於電壓為 60V 下先進行電泳 30 分鐘。再於

電壓為 120V 下進行電泳分離，分離至染劑下移到解析凝膠之底部，取出膠體進行西方墨點分析。

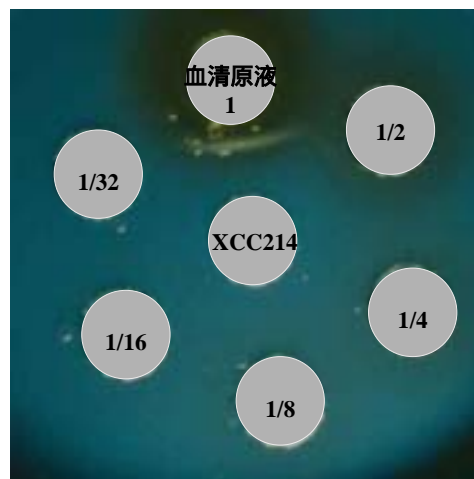
#### 西方墨點分析法( Western blot analysis )

細菌蛋白經 SDS-PAGE 電泳分離後，取下膠體，浸泡於轉漬緩衝液(semi-dry protein transfer buffer (48mM Tris ; 39mM glycine ; 20% methanol ) ) 15 分鐘，另準備濾紙浸泡於相同緩衝液中 15 分鐘，PVDF 膜先以甲醇漂洗，再浸泡於轉漬緩衝液 ( 10mMCAPS ( 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid ); 10%Methanol )15 分鐘。使用 Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)，以 15V 通電 45 分鐘，使膠體上的蛋白轉漬於 PVDF 膜上，轉漬完成後，將 PVDF 膜從二個分子量標誌中間處切開，其中半張進行染色( 1% coomassive blue ) 及退染 ( 40% methyl, 10% acetic acid )；另外半張則進行西方墨點法分析：將 PVDF 膜浸泡於 Blocking buffer ( 10% no fat milk in 1XPBST buffer ) 隔夜，以 PBST 洗三次，每次十分鐘，移至以 Blocking buffer 稀釋 8000 倍之甘藍黑腐病 IgG 中於 37 反應 1 小時，再以 PBST 洗三次，每次十分鐘後移至以 Blocking buffer 稀釋 5000 倍的鹼性磷酸酵素結合之 IgG 進行免疫反應，37 作用 1 小時，再以 PBST 洗三次，每次十分鐘後，加入 BCIP/NBT 呈色，此時須避免照光，待呈色後即以蒸餾水漂洗，停止反應後拍照保存。

## 結 果

#### 抗血清之力價測定

抗血清力價測定以 SDS 免疫擴散反應進行。結果顯示稀釋 1/4 倍後的抗血清未能與抗原形成反應帶；但是未稀釋和稀釋 1/2 倍後的抗血清均能與甘藍黑腐病菌菌株 XCC214 形成一條明顯弧形反應帶。(圖一)



圖一、血清力價測定。中心為甘藍黑腐病病原細菌菌株 XCC214 之細菌懸浮液( $10^8$ cfu/ml)，周圍為不同稀釋濃度之菌株 XCC214 抗血清

Fig1. The titer of strain XCC214 antiserum against antigen determined by SDS-immunodiffusion test. Center well was strain XCC214 bacteria suspension. The antiserum used in 1 was undiluted. The antiserum used in 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 and 1/32 were 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 and 1/32 diluted, respectively.

### 抗血清與十字花科蔬菜黑腐病及其他植物病原細菌菌株之 SDS 免疫擴散反應

抗血清與供試之十字花科蔬菜黑腐病之病原細菌菌株、椶果黑斑病、茄科細菌性斑點病、火鶴花細菌性葉枯病、水稻白葉枯病、楊桃細菌性斑點病、木瓜黑腐病、麻竹細菌性萎凋病、洋蔥細菌性軟腐病、番茄細菌性軟腐病、蝴蝶蘭細菌性軟腐病、洋香瓜細菌性果斑病、蝴蝶蘭褐斑病、星辰花細菌性萎凋病、水稻細菌性穀枯病及番茄青枯病等十五種植物病原細菌等作雙重擴散反應，菌株 XCC214 抗血清與供試之十字花科蔬菜黑腐病病原細菌菌株均可形成一條明顯弧形反應帶，而與其他植物病原細菌並不出現此弧形反應帶。

### 不同濃度免疫球蛋白及酵素連結免疫球蛋白之 ELISA 反應試驗

黑腐病細菌菌株 XCC214 免疫球蛋白以 conjugate buffer 系列稀釋成 0.44、0.33、0.22 及 0.16  $\mu\text{g/ml}$  等濃度，配合山羊抗兔子酵素連結 IgG1:6000 作間接法 ELISA 反應。結果以 IgG 濃度 0.16  $\mu\text{g/ml}$  最為適宜。

### 酵素連結抗體檢定法對十字花科蔬菜黑腐病病原細菌之靈敏度測定

將黑腐病細菌菌株 XCC214 以 coating buffer 稀釋成  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  cfu/ml 等濃度，以 ELISA 進行靈敏度試驗，結果顯示稀釋至  $10^4$  仍有反應。至於對照菌株 ECC14 則均無反應。

### 十字花科蔬菜黑腐病及其他植物病原細菌菌株之間接法 ELISA 反應

以供試之十字花科蔬菜黑腐病之細菌菌株、椶果黑斑病、茄科細菌性斑點病、火鶴花細菌性葉枯病、水稻白葉枯病、楊桃細菌性斑點病、木瓜黑腐病、麻竹細菌性萎凋病、洋蔥細菌性軟腐病、番茄細菌性軟腐病、蝴蝶蘭細菌性軟腐病、洋香瓜細菌性果斑病、蝴蝶蘭褐斑病、星辰花細菌性萎凋病、水稻細菌性穀枯病及番茄青枯病等病原菌菌株之懸浮液進行間接 ELISA 反應，結果如表二所示，20 個黑腐病病原細菌供試菌株 ELISA 讀值介於 1.527-0.337，其他植物病原細菌 53 個菌株 ELISA 讀值介於 0.293-0.083，無菌水 ELISA 讀值為 0.13、負對照組 ELISA 讀值為 0.112，顯示 20 個黑腐病病原細菌供試菌株以 ELISA 檢測均為正反應，而其他植物病原細菌菌株為負反應。

### SDS-PAGE 蛋白質與西方墨點分析

將 *X. campestris* pv. *campestris* 菌株 XCC214 及 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 菌株 ECC17 萃取之全量細菌蛋白質，經由 SDS-PAGE 電泳膠體進行分析，菌株 XCC214 和菌株 ECC17 之全量細菌蛋白質分子分析圖譜如圖二、A。西方墨點分析結果，在菌株 XCC214 中可以明顯看到一條反應帶(圖二、B)，此反應帶之位置與圖二、A 之細菌全量蛋白質大小及標記蛋白質分子量(由 10kDa 至 250kDa)比對，其分子量大小經估算約 63.6kDa，此結果顯示本試驗所製備之抗血清，是由此種蛋白質反應製備而得；亦證明在 SDS 免疫擴散反應試驗中，抗血清均與所有由十字花科蔬菜分離之黑腐病菌株形成一條明顯弧形反應帶(圖一)。

表一、十字花科蔬菜黑腐病原細菌供試菌株

Table 1、The strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Strain	Host	Location	Date	Source
XCC20	broccoli	Tainan	82.1	AVRDC
XCC35	cabbage	Nantou Qingjing	83.9	AVRDC
XCC36	cabbage	Nantou Qingjing	83.9	AVRDC
XCC52	cabbage	Tainan Shanhwa	83.2	AVRDC
XCC122	cabbage	Natou Tsuifeng1	83.9	AVRDC
XCC126	cabbage	Natou Tunzulin	83.9	AVRDC
XCC135	cabbage	Ilan Ssuchi	83.10	AVRDC
XCC148	Chinese cabbage	Ilan Nanshan	83.10	AVRDC
XCC151	cabbage	AVRDC	83.10	AVRDC
XCC155	cabbage	Taipei Yangmingshan	84.11	AVRDC
XCC210	cabbage	Taidong Luye	85.011	Taidong DARES
XCC214	cabbage	Taidong Luye	85.11	Taidong DARES
XCC220	cabbage	Taoyuan Chungli	85.11	Taidong DARES
XCC401	cabbage	Taidong Guanshan	92.10	Tainan DARES
XCC410	cabbage	Yulin Chitong	92.11	Tainan DARES
XCC420	cabbage	Yulin Chitong	92.11	Tainan DARES
XCC427	cauliflower	Tainan city	93.12	Tainan DARES
XCC428	cauliflower	Tainan city	93.12	Tainan DARES
XCC429	cabbage	Yulin Chitong	93.9	Tainan DARES
XCC430	cabbage	Yulin Chitong	93.9	Tainan DARES

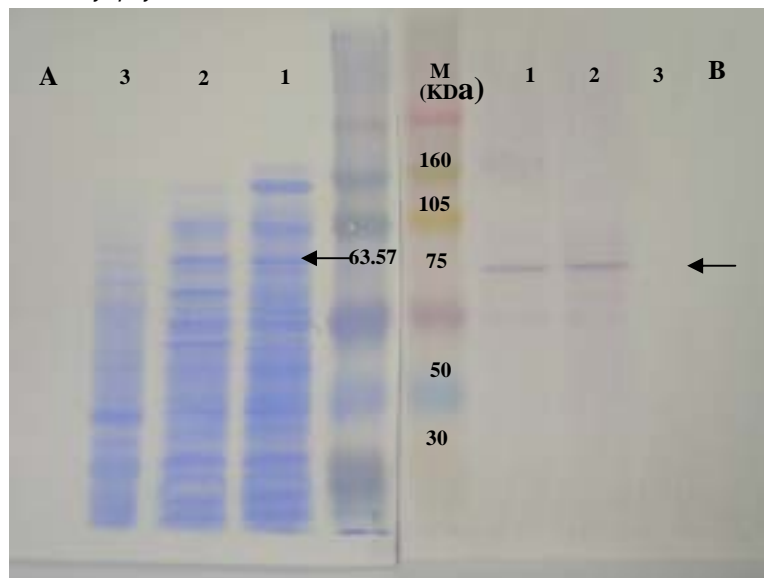
表二、利用間接法 ELISA 偵測十字花科蔬菜黑腐病原細菌

Table 2、Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by indirect ELISA

Strain*	ELISA	Strain	ELISA	Strain	ELISA	Strain	ELISA
XCC20	1.063	XCM5	0.194	XVT108	0.209	A235	0.219
XCC35	0.408	XCM10	0.089	XVT175	0.223	Aa9	0.119
XCC36	0.947	XCM13	0.18	XVP40	0.217	Aa401	0.144
XCC52	0.386	XCM24	0.25	XVP50	0.226	Aac1	0.125
XCC122	1.409	XCM25	0.184	XVP56	0.244	RS20	0.091
XCC126	1.151	XCM41	0.184	XVP97	0.221	RS12	0.085
XCC135	1.044	XCV1	0.229	XVP180	0.166	Bg1	0.151
XCC148	0.337	XCV7	0.228	XVP199	0.231	Bg2	0.156
XCC151	0.956	XCV24	0.178	XVP200	0.235	Bg3	0.152
XCC155	0.985	XCV27	0.236	Xoo	0.097	Bg4	0.21
XCC210	1.106	XCV31	0.114	Xoo1-2	0.112	Bg5	0.124

Strain*	ELISA	Strain	ELISA	Strain	ELISA	Strain	ELISA
XCC214	1.461	XCV33	0.22	SP1	0.133	Bg6	0.133
XCC220	1.152	XCV35	0.212	SP2	0.13	Bg7	0.138
XCC401	0.569	XCV38	0.198	SP31	0.12	S4	0.145
XCC410	1.527	XCV39	0.293	PA1	0.106	S10	0.156
XCC420	1.226	XCV42	0.197	ECC14	0.086	S18	0.083
XCC427	1.183	XCV43	0.2	ECC16	0.162	water	0.13
XCC428	1.062	XVT16	0.204	Ech2	0.139	-(ECC17)	0.112
XCC429	1.151	XVT20	0.245	ES1	0.136	+(XCC214)	0.911
XCC430	1.206	XVT36	0.221				

\* XCC: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ; XCM : *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* ; XCV,XVT,XVP: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ; Xoo: *X. oryzae* pv. *oryzae* ; A : *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* ; SP: *Pseudomonas syringae* pv. *averrhoi* ; PA: *Erwinia cyripedii* ; ECC: *E. carotovora* subsp. *carotovora* ; Ech: *E. chrysanthemi* ; ES: *E. sinocalami* ; Aa: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ; Aac : *A. avenae* subsp. *cattleyae* ; RS : *Ralstonia solanacearum* ; Bg: *Burkholderia glumae* ; S: *B. caryophylli*



圖二、十字花科蔬菜黑腐病原菌株 XCC214 全量蛋白質分析(A)及西方轉漬反應結果(B)

Fig.2. The determination of molecular weight of total proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain XCC214 ( lane 1 and 2 ) and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain ECC17 (lane 3) by a 12.5% slab SDS-PAGE. Lane M: 10-250 kDa protein markers(Amersham Life Science Rainbow RPN 800) (A) and the western blot analysis of total proteins of *X. campestris* pv. *campestris* strain XCC214 (B). One band in lane 1 and 2 in B represented the reaction in western blot by using antiserum to *X. campestris* pv. *campestris* strain XCC214. Arrows in A and B indicated one protein which inducing immunization.

## 討 論

黑腐病為十字花科蔬菜重要病害之一，病原細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。種子傳染為本病害之重要傳播途徑，病原細菌侵入或污染十字花科蔬菜種子，可經由維管束系統感染種臍或種皮，並在種子內殘存達三年之久，污染種子表面的病原細菌也可殘存近三個月，待種子發芽後直接感染子葉及幼葉，成為田間病害發生的初次感染源<sup>(2, 6)</sup>，即使一批帶菌比率低的種子 (0.03%) 也能造成病害的流行<sup>(12, 14)</sup>。

黑腐病田間防治工作較為困難，種植健康種子為預防病害發生之重要措施<sup>(11, 15)</sup>，目前針對十字花科蔬菜種子帶黑腐病病原細菌的偵測方法有很多種，包括選擇性培養基<sup>(4, 5)</sup>、核酸探針<sup>(1)</sup>、種子栽種觀察<sup>(12)</sup>、噬菌體檢測法<sup>(9)</sup>及血清檢測法<sup>(7, 8)</sup>等，各種方法均有其優缺點，如費時耗工、專一性靈敏度不盡理想或是成本過高等。種子栽種觀察法典型病徵於播種後 10-21 天出現<sup>(13)</sup>，而目前最常應用的選擇性培養基法，雖然偵測人為添加黑腐病病原細菌之土壤時，最低可偵測到之病原細菌量為  $2.4 \times 10^2$  cfu/g<sup>(5)</sup>，亦需時間 3-5 天<sup>(6, 7)</sup>，以上兩種方法均可以偵測得到病原細菌的活細胞，但費時又耗工。而利用黑腐病病原細菌抗血清進行的雙層夾心式酵素連結抗體法(double-antibody sandwich(DAS)-ELISA)專一性最高，但偵測帶病原細菌種子或土壤，靈敏度一般不及選擇性培養基<sup>(3)</sup>，但所需時間短約 5 小時<sup>(7)</sup>，且其反應較不受雜菌多寡之影響，在大量種子之偵測上不失為可行之方法<sup>(3)</sup>。

本研究利用黑腐病病原細菌菌株 XCC214 製備之抗血清具有高專一性，在 SDS 免疫擴散反應試驗中，可以與不論由甘藍、花椰菜、青花菜或結球白菜分離之病原細菌菌株反應(表一)，而且形成一條明顯反應沈澱帶(圖一)，此抗血清並不與其他十五種不同植物病原細菌菌株，形成任何反應帶(圖一)。此結果亦顯示抗血清是由一種抗原蛋白，免疫反應而製成，且由西方墨點反應分析結果得到證實(圖二)，其分子量估算約 63.6kDa。除了 SDS 免疫擴散反應法外，利用間接酵素連結抗體檢測法(ELISA)，亦可快速準確來偵測本病原細菌(表二)，可以偵測到  $10^4$  cfu/ml 濃度之病原細菌，與黃及徐氏以雙層夾心式酵素連結抗體法可偵測到的  $3.3 \times 10^4$  cfu/ml 相近<sup>(5)</sup>，可在一天內完成偵測步驟，尤其是在檢驗種子帶菌上，比較目前常用的生物檢驗方法如利用選擇性培養基的稀釋平板法，或經由種子播種再觀察其發病情形的種子栽種觀察法，敏感度高，且省時間、省空間、不易受環境溫度、溼度影響而造成不準確，方便於大量樣品的檢測，因此利用血清偵測法來偵測本病原細菌，有其可取之處，唯一需要注意之處，為血清檢驗方法，無法分辨檢驗之病原細菌的活性及是否具有感染力，因此當利用血清檢驗法而得到正反應結果時，亦應將病原細菌加以培養觀察其活性。由本試驗結果顯示，血清偵測法不僅可以作為田間病害之檢驗用，在檢疫上亦可提供快速準確之檢驗方法。本研究已獲得具高專一性之抗血清，將進一步評估如何取樣及擴增檢定樣品中病原細菌之濃度以增加血清之靈敏度，以提高種子帶菌偵測之準確性。



## 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。台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。台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台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台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。台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. Alvarez, A. M., and Lou, K. 1985. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. Plant Dis. 69 : 1082-1086.
8. 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. Phytopathology 75: 722-728.
9. Liew, K. W., and Alvarez, A. M. 1981. Phage typing and lysotype distribution of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology 72 : 274-276.
10. 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.
11. 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.
12. Schaad, N. W., and Kendrick, R. 1975. A qualitative method for detection *Xanthomonas campestris* on crucifer seed. Phytopathology 65 : 1034-1036.
13. Schaad, N. W. 1978. Use of direct and indirect immunofluorescence tests for identification of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology 68:249-252.
14. 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.
15. 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.

# Development of a Serum Methodology For of the Detection Bacteria Causing Black Rot in Crucifers<sup>1</sup>

Wu., Y. F., S. C. Chen, and A. S. Cheng<sup>2</sup>

## Summary

Cabbage black rot disease was infected by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. To collect the cabbage black rot bacteria strains from the different area in Taiwan and detect the pathogenicity in green house. The high pathogenicity strain XCC214 was used for producing antiserum. The titer of antiserum was 1/2 dilution of crude antiserum in SDS-double diffusion test with one visible reaction band. The optimum concentrations of immunoglobulin G ( IgG ) was 0.16 µg/ml in indirect enzyme-linked immunosorbent assay ( indirict ELISA ). The concentrations of sensitivity assay were 10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> cfu/ml of strain XCC214 in indirect ELISA. All isolates of *X. campestris* pv. *campestris* from different brassica crops were also reacted to antiserum with one precipitation band in SDS-double diffusion test and indirect ELISA. However the antiserum did not react with other kinds of bacteria including *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *averrhoi*, *Erwinia cypripedii* , *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. sinocalami*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia glumae*, *B. caryophylli* in SDS- double diffusion test and indirect ELISA . The result of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western bolting showed that one reacting band was observed with protein molecular weight about 63.6 kDa. The result was also consistent with that of in SDS-double diffusion test.

Key words : cabbage、 black rot disease、 ELISA

Accepted for publication: 2 September , 2005

---

1. Contribution No. 312 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

2. Assistnat Researchers, Assistnat Researchers, and Plant Pathologist, respectively, Tainan DARES. 70, Muchang, Sinhua, Tainan, 712, Taiwan, R.O.C.