

台灣火鶴花細菌性葉枯病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)之血清偵測

許秀惠* 林俊義

臺中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植病系

(接受日期：民國 89 年 3 月 17 日)

摘 要

許秀惠、林俊義 2000 台灣火鶴花細菌性葉枯病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae*)之血清偵測 植保會刊 42: 97-106

以菌體固定法將葉枯病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) A008 及 A072 二個菌株製備成抗原，分別注射於紐西蘭大白兔內製作多元抗體，再以此二種抗血清測試臺灣火鶴花葉枯病菌，結果顯示臺灣火鶴花葉枯病菌具有至少二種之血清型 (serovar)。以瓊脂免疫擴散法測試，發現 A008 抗血清只與由台灣分離之葉枯病菌 177 個供試菌株中之 A003 及 A008 二個菌株形成明顯反應帶，所佔比率為 1.1%，而 A072 抗血清則與供試菌株中之 168 個菌株間均形成明顯反應帶，所佔比率為 94.9%。以瓊脂免疫擴散法測試，此二種抗血清與供試之 *Agrobacterium tumefaciens*、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*、*E. chrysanthemi*、*E. herbicola*、*E. herbicola* pv. *gypsophylae*、*Pseudomonas fluorescens*、*P. putida*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas albilineans*、*X. campestris* pv. *campestris*、*X. c.* pv. *citri*、*X. c.* pv. *glycines*、*X. c.* pv. *mangiferaeindicae*、*X. c.* pv. *phaseoli*、*X. c.* pv. *uppalii*、*X. c.* pv. *vesicatoria*、*X. fragariae* 及 *X. oryzae* pv. *oryzae* 等菌株均無反應，但以直接酵素聯結抗體免疫法 (direct DAS-ELISA) 測試時，則顯示 A008 抗血清與來自柑橘之 *X. c.* pv. *citri* 菌株有反應，而 A072 抗血清則與來自彩色海芋之 *E. c.* subsp. *carotovora* 菌株有反應。利用 direct DAS-ELISA 可檢測到 10^4 cfu/ml 菌量之抗原。將接種 A072 之火鶴花病葉直接以 direct DAS-ELISA 方法進行偵測，則可檢測的菌量約 10^6 cfu/ml。若以 ET 培養基 (esulin-trehalose medium) 先增量培養後再利用 direct DAS-ELISA 方法進行偵測，則可檢測的菌量約 10^2 cfu/ml。

(關鍵辭：葉枯病菌、多元抗體、診斷、鑑定、偵測)

緒 言

火鶴花細菌性葉枯病 (bacterial blight of anthurium) 是由 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (原名 *X. campestris* pv. *dieffenbachiae*) 所引起^(16, 22)，此病害已遍及全世界的火鶴花產區^(3, 23, 24, 25, 31, 36)，對夏威夷火鶴花生產造成五百多萬美元之損失^(17, 33)，而臺灣栽培之火鶴花最早於 1991 年發現此病害⁽³⁾，但於 1994 年時已遍及台灣各火鶴花產區，調查發現臺灣的氣候下本病全年均可發生，尤其在夏季高溫多風雨時，發生相當普遍且嚴重，推究本病在台灣之所以傳播快速，除氣候適合外，花農常使用分株苗亦是主因，由於葉枯病菌具系統性感染之特性，因此只要繁殖用母株帶葉枯病菌，則病菌易被傳播；且由 Norman 等人報告顯示，葉枯病菌能在組培苗中潛伏感染⁽²⁷⁾，只要繁殖用母株帶葉枯病菌，雖然在瓶中不易發現，但移至園中則容易出現病害，加上葉枯病菌已對銅劑及鏈黴素等藥劑產生耐性或抗性^(3, 6, 18, 25)，防治相當不易。另外，臺灣葉枯病之病徵型態頗多，且有些病徵與疫病、青枯病、營養問題或線蟲危害所造成之病徵容易混淆⁽³⁾，若能發展出一套正確地診斷或檢測的方法，就能即早去除病株，再配合實施嚴格田間衛生^(5, 7, 8, 9, 25)，不但可達防治效果，亦可避免農民過度噴藥造成無謂的浪費與環境污染。

一般細菌病害之診斷或病原菌之偵測，雖有選擇性培養基法，但卻有不具時效性且靈敏度不高之缺失，而血清學的方法較快速，但靈敏度仍不高。Norman 及 Alvarez 結合了選擇性培養基 (esculin-trehalose medium, ET) 方法與血清 (ELISA) 的方法，可使靈敏度大為提高⁽²⁸⁾。本研究之目的在利用本土分離之火鶴花葉枯病菌株製備多元抗體及了解所得抗血清之特性及偵測效率，並探討以 ET 培養基增量培養結合本土發展之血清學方法偵測葉枯病菌之可能

性，供日後本病在田間發生偵測之參考。

材料與方法

菌株來源及分離

收集全台灣北、中、南等處各火鶴花產區具葉枯病病徵之火鶴花標本，包括葉片、葉柄、苞片或花柄等，切取罹病組織置於無菌蒸餾水中，經振盪後以移植環 (loop) 沾取懸浮液，劃線於馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar, PDA) 平板上，置 28℃ 下 3-5 天後挑取黃色、圓形、突起、具光澤之單菌落，再劃線於 PDA 平板上，重覆三次後移至 PDA 斜面並置 4℃ 下保存備用，共收集 177 株菌株。

抗原及抗血清之製作

抗原製備：選取 A008 及 A072 二個菌株，分別培養在 mineral base broth⁽¹²⁾ 中，於 28℃ 下振盪培養 48 小時，經 12000 rpm 離心 10 分鐘後，除去上清液，沈澱物以 0.01 M 磷酸生理食鹽水緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS, pH7.0) 予以懸浮，重覆上述二步驟 5 次之後，將懸浮液裝入透析膜內，置於含 2% 戊二醛 (Glutaraldehyde, GA, Sigma) 的 0.01 M PBS 中透析 3 小時，以固定菌體，之後再移入 0.01 M PBS 中透析 3 次，每次 4 小時，以去除多餘的戊二醛，最後以波長 620 nm 測其吸光值，將菌液濃度調至 10^8 cfu/ml，此即為用於製作抗血清之抗原。

抗血清製備：將上述之抗原分別取 1 ml 與等量之不完全補助劑 (Freud's incomplete adjuvant) 混合，均勻乳化後以多點肌肉注射法打入紐西蘭大白兔大腿內，共注射四次，每次間隔一星期，第四次注射前先由耳靜脈採少量血液，測試抗體反應力價 (titre)，之後每次間隔一星期以耳靜脈採血約 40-50 ml 的血量，所採得血液先靜置 37℃ 水浴中 1 小時，再移入冰箱中 1 小時，取出後小心吸取血清，經 8000g 離心 10 分鐘後，取上澄液

加入 0.1% 疊氮化鈉 (sodium azide, NaN_3)，再以每管 1ml 的量分管後置 -20°C 下保存，此即為抗血清。

抗血清力價測定

以玻片凝聚反應 (slide agglutination test) 測定抗血清之力價⁽³⁴⁾，先將供試之 A008 及 A072 抗血清，分別以無菌水 2 倍系列稀釋，再分別取一滴與一滴 10^8 cfu/ml 之原來抗原均勻混合於載玻片上，置保溼盒內約 30 分鐘，取出以光學顯微鏡鏡觀察是否有棉絮狀沉降產生，以確定其血清力價。

免疫球蛋白 (IgG) 及酵素聯結免疫球蛋白 (phosphatase conjugated IgG) 之製作

A008 及 A072 抗血清中免疫球蛋白 (IgG) 之抽取步驟仿照 Clark 及 Adams⁽¹⁴⁾ 及 Lister⁽²⁰⁾ 所述之方法進行，以過飽和硫酸銨沉降，再以 DEAE cellulose 管柱 (DE-52 cellulose) 純化 IgG，所得 IgG 再利用 1% 戊二醛與鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 聯結，此即為酵素聯結免疫球蛋白。

直接酵素聯結抗體免疫法 (direct DAS-ELISA)

直接酵素聯結抗體免疫法是用 direct ELISA 方法中之三明治法 (double antibody sandwich method)，方法乃仿照 McLaughlin & Chen⁽²¹⁾ 所述進行，主要分四步驟，(1) 先將免疫球蛋白覆於微量盤中，每個穴加入 200 μl ，置 37°C 定溫箱中培養 4 小時，以 PBST (含 Tween 80 之 phosphate saline buffer, 0.5ml/1L) 洗三次，(2) 加入抗原，每個穴加入 200 μl ，置 4°C 定溫箱中過夜，以 PBST 洗三次，(3) 加入酵素聯結免疫球蛋白，每個穴加入 200 μl ，置 37°C 定溫箱中培養 4 小時，以 PBST 洗三次，(4) 加入溶於磷酸基質緩衝液 (phosphate substrate buffer) 之鹼性磷酸酵素反應基質 (p-nitrophenyl phosphate)，每個穴加入 200 μl ，置室溫下反

應 30 分鐘，之後以 ELISA 測讀儀 (Microplate Reader, Labsystems Multiskan Plus) 測讀在波長 405 nm 之吸收值，其吸收值超過對照組讀值兩倍以上者視為正反應。本試驗先將抗原濃度固定在 10^8 cfu/ml，以測定免疫球蛋白 (IgG) 及酵素聯結免疫球蛋白 (conjugate IgG) 之適當反應濃度。之後以同樣方法再固定抗體濃度，以測定 10 倍系列稀釋之抗原濃度。

抗血清專一性測定

以 SDS - 雙向瓊脂免疫擴散試驗 (double-diffusion test, Ouchterlony test) 分析 A008 及 A072 二種抗血清與火鶴花葉枯病菌 177 個菌株及其他細菌 34 個菌株之血清關係，其方法仿 Bouzar & Moore⁽¹¹⁾ 所述進行，中央穴加入 A008 或 A072 抗血清，周圍孔穴中則分別加入火鶴花葉枯病菌及其他細菌菌株之細胞懸浮液，細胞懸浮液之製備乃先將各菌株分別培養於 PDA 培養基二天後，以無菌水懸浮並調整濃度為 10^8 cfu/ml。供試的其他細菌菌株為常見之病原菌及腐生菌包括 *Agrobacterium tumefaciens* (AA-14, 85007, chung2-2)、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Zan 001, Zan 009 及 Zan 023)、*E. chrysanthemi*、*E. herbicola* (Eh112y)、*E. herbicola* pv. *gypsophylae* (Gp2-1, Gp11-1 及 Gp50-1)、*Pseudomonas fluorescens*、*P. putida* (YLFP1, YLFP3, YLFP37)、*Ralstonia solanacearum* (Ps95)、*Xanthomonas albilineans* (NCPPB2969)、*X. campestris* pv. *Campestris*、*X. c.* pv. *citri* (XW23, XW32, XW35, XW47)、*X. c.* pv. *glycines* (Xps1)、*X. c.* pv. *mangiferaeindicae* (Xm42)、*X. c.* pv. *phaseoli* (Xp1, Xp4)、*X. c.* pv. *uppalii* (T-12-1) 及 *X. c.* pv. *vesicatoria* (Xv12, Xv30, Xv42, Xv48)、*X. fragariae* (NCPPB1469) 及 *X. oryzae* pv. *oryzae*^(21, 84, 117)。菌株來源為中興大學黃秀珍博士及本實驗室所收集之菌株。

此外，也應用 direct DAS-ELISA 的方

法,將已純化之 A008 及 A072 二種抗血清免疫球蛋白及酵素免疫球蛋白分別稀釋 1000 倍,測試其與上述常見之病原菌及腐生菌之血清反應,供試細胞懸浮液之製備如上法所述,濃度均為 10^8 cfu/ml。

血清方法及培養基分離法偵測效率之比較

取 10 個接種葉枯病菌之火鶴花病株樣品(包括出現水浸狀斑點之葉片,黃化葉片及黃化之葉柄),並以健康火鶴花葉片當對照,分別切取 1 cm^2 之葉片或葉柄,加少量無菌水研磨之後,所得粗汁液過濾後應用 SDS-雙向瓊脂免疫擴散法,分別與 A072 抗血清反應,同時以移植環將一耳量(loop)的粗汁液劃線至 PDA(Potato Dextrose Agar)平板培養基上,比較血清法與培養基分離法測試樣品之效率。

增量培養配合 direct DAS-ELISA 方法可偵測之菌量

將接種 A072 菌株之火鶴花病葉組織 2 克置於研钵中,加入 20 ml 無菌水研磨並以紗布過濾,所得之粗汁液經 10 倍系列稀釋,之後分別從各 10 倍系列稀釋懸浮液中取 0.1 ml 以平板法在 PDA 培養基上測定罹病組織內所含的葉枯病菌之菌量。同時從 10 倍系列稀釋懸浮液中分別取 100 ul 直接進行 direct DAS-ELISA 測試(抗血清免疫球蛋白及酵素免疫球蛋白均稀釋 1000 倍),並以健康火鶴花葉片 1 克置於研钵中,加入 10 ml 無菌水研磨所得粗汁液及無菌水當對照。另外,分別從 10 倍系列稀釋懸浮液中取 10 ul 滴在 ET 培養基上,置 28°C 培養 3 - 4 天後,分別以移植環取菌落直接懸浮於 100 ul 無菌水中,進行 direct DAS-ELISA 測試(抗血清免疫球蛋白及酵素免疫球蛋白均稀釋 1000 倍),以探討培養基結合 ELISA 方法可偵測到之菌量。

結 果

葉枯病菌抗血清力價

以玻片凝聚反應法測試 A072 及 A008 抗血清力價,發現此二種抗血清稀釋 2048 倍時分別與 10^8 cfu/ml 之原來抗原仍能產生棉絮狀沉降,此二種血清之力價均為 2^{11} (2048)。

葉枯病菌抗血清特性分析

供試 177 個火鶴花葉枯病菌株分別與 A008 及 A072 抗血清在雙向瓊脂免疫擴散試驗測定結果,發現 A072 抗血清與其中之 168 個菌株均有明顯反應帶形成,且所形成的反應帶為完全融合未見任何叉狀(spur)反應出現,但與供試 A003、A008、A089、A092、A131、A149、A159、A166、A193 等菌株則無血清反應(圖一)。另外, A008 抗血清只與供試菌株中之 A003 及 A008 二個菌株有反應帶形成(圖一)。顯示 A072 抗血清與大部份的臺灣葉枯病菌有血清類源關係,其比率達 94.9%。

以雙向瓊脂免疫擴散法測試, A008 及 A072 抗血清與葉枯病菌以外的其他供試病原菌及腐生菌間均無反應帶形成(圖二)。但以直接酵素聯結抗體免疫法測試,則顯示 A008 抗血清與供試來自柑橘之 *X. c. pv. citri* XW23、XW27、XW35 及 XW47 等菌株有反應, A072 抗血清與供試來自彩色海芋之 *E. c. subsp. carotovora* Zan 001、Zan 009 及 Zan 023 等菌株亦有反應,但與其他供試細菌均無反應。

血清方法與培養基分離法之偵測效率

以 SDS-雙向瓊脂免疫擴散試驗法測定之結果,供試火鶴花接種病株之 10 個樣品均與 A072 抗血清有明顯反應帶形成,而健康火鶴花汁液則無。以 PDA 平板分離法測試供試 10 個樣品僅有 8 個產生似葉枯病菌之菌落,而且 PDA 平板上因雜菌干擾,需

經多次 PDA 平板劃線純化。應用 SDS-雙向瓊脂免疫擴散試驗法反應所需的時間約 16

小時（隔夜），以 PDA 平板分離法測試所需時間需 2-3 天。

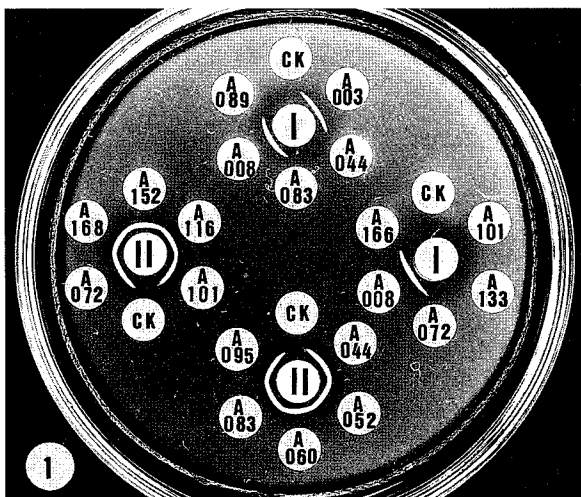


圖 1、雙向瓊脂免疫擴散反應試驗。

Fig. 1. Agar gel double diffusion tests. The central wells contained antiserum against A072 (II), and antiserum against A008 (I). The peripheral wells contained antigens from *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains (A003, A008, A044, A052, A060, A072, A083, A089, A095, A101, A116, A133, A152, A166, A168).

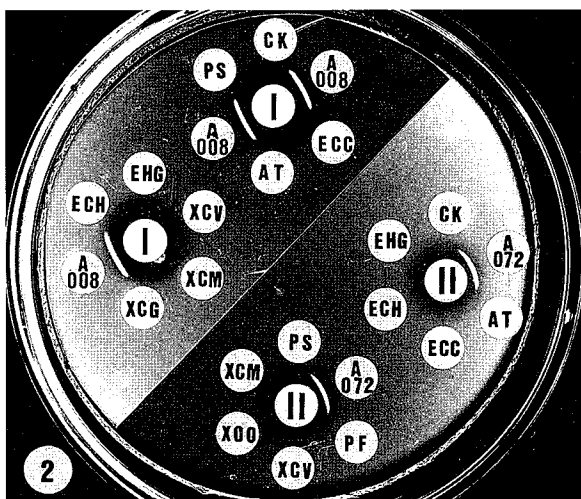


圖 2、雙向瓊脂免疫擴散反應試驗。

Fig. 2. Agar gel double diffusion tests. The central wells contained antiserum against A072 (II), and antiserum against A008 (I). The peripheral wells contained antigens from *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains (A072, A008), *Agrobacterium tumefaciens* (AT), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ECC), *E. chrysanthemi* (ECH), *E. herbicola* pv. *gypsophilae* (ENG), *Pseudomonas fluorescens* (PF), *Ralstonia solanacearum* (PS), *X. campestris* pv. *glycines* (XCG), *X. c.* pv. *magniferaeindicae* (XCM), *X. oryzae* pv. *oryzae* (XOO), and *X. c.* pv. *vesicatoria* (XCV).

直接酵素聯結抗體免疫法 (direct DAS-ELISA) 偵測培養菌體之效率

應用 direct DAS-ELISA 的方法, 將已純化之 A008 及 A072 二種抗血清免疫球蛋白及酵素免疫球蛋白分別稀釋 1500 倍時, 可分別與 A072 及 A008 抗原呈現明顯黃色陽性反應, 以此 IgG 稀釋濃度分別與 10 倍系列稀釋之抗原反應, 於抗原濃度為 10^4 cfu/ml 時仍呈現黃色陽性反應, 酵素基質加入 60 分後 ELISA Reader 反應讀值分別為 0.431 及 0.424, 當抗原濃度為 10^8 cfu/ml 時, 酵素基質加入 60 分之反應讀值達 1.7。

培養基增量配合直接酵素聯結抗體反應法 (direct DAS-ELISA) 之偵測效果

罹葉枯病之火鶴花葉片組織粗汁液經 10 倍系列稀釋後, 以 PDA 平板測定罹病組織葉枯病菌之菌量為 10^{12} cfu/g fresh tissues。當罹病汁液細菌含量為 10^{11} 、 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 cfu/ml 時, 其 direct DAS-ELISA 偵測結果顯示當酵素基質加入 30 分後 ELISA Reader 反應讀值各別為 >2 、 >2 、 >2 、1.646、1.150、0.317, 但當菌量為 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 及 10^0 cfu/ml 時, 其 direct DAS-ELISA 讀值均低於 0.2, 顯示 10^5 至 10^0 cfu/ml 之菌量均無反應。另外, 從 10 倍系列稀釋懸浮液中分別取 10 ul 滴至 ET 培養基上增量培養 3-4 天後, 所得菌量直接懸浮於 100 ul 無菌水中進行 direct DAS-ELISA 偵測, 結果顯示當增量前之菌量為 10^{11} 、 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 cfu/ml 時, 增量後之反應吸收值為 >2 、 >2 、 >2 、 >2 、 >2 、 >2 、1.9165、1.198、0.727 及 0.409。但當增量前之菌量為 10^1 、 10^0 時, 在 ET 培養基上無菌落形成。

結 論

用於植物病原細菌之鑑定、診斷或偵測的方法頗多^(1, 2, 4, 10, 13, 15, 19, 29, 32, 35), 其中病徵

觀察法是最便捷的推定診斷法, 如能由病徵推斷病害種類, 並迅速地給予適當的處理, 應可降低病害發生, 但是火鶴花葉枯病之病徵相當多樣化⁽³⁾, 且部份病徵與營養問題、線蟲問題、機械傷害甚至其他病徵易混淆, 造成診斷上的困擾^(5, 26)。Norman & Alvarez⁽²⁶⁾ 所發展的選擇性培養基, 即 CS 培養基 (含 cellobiose 及 starch 二種碳源) 與 ET 培養基 (含 esculin 及 trehalose 二種碳源) 可用於分離葉枯病菌, 但由於臺灣氣候濕熱, 表生及腐生之雜菌極多, 常會干擾選擇性培養基之偵測效率, 尤其是後期病徵或老的病斑處常不易分到病原菌, 因此若單以選擇性培養基偵測病原細菌常達不到預期的高效率。Norman 等人也指出以培養基分離葉枯病菌常受表生菌及腐生菌干擾^(26, 28), 而血清及核酸技術之發展可改善其缺失^(10, 30, 32), Lipp 等人⁽¹⁹⁾ 研究指出, 他們所製造的八種葉枯病菌 (Xcd) 的單株抗體, 可與分離自天南星科的所有 Xcd 菌株中之 91% 的菌株反應, 並將來自天南星科的所有 Xcd 區分為 12 種血清型, 而分離自火鶴花的 Xcd 菌株則分為七個血清型, 但實際將此八種抗血清應用於田間樣品偵測, 因每次所需使用之血清種類太多, 面對於大量樣品之偵測相當繁瑣, 因此 Norman 與 Alvarez 針對火鶴花葉枯病菌另外製作單株抗體, 所得抗體 (編號 Xcd 108) 可偵測火鶴花葉枯病菌達 95%, 具極高的專一性, 因此已將此種抗體應用於火鶴花葉枯病菌之檢測⁽²⁸⁾。

本研究製備之葉枯病菌 (*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) 多元抗體 A008 及 A072, 可將臺灣葉枯病菌株至少分為二種血清型。應用雙向瓊脂免疫擴散法, 此二種抗血清與供試之其他病原菌並沒有血清的關係, 因此, 此二種抗血清以此方法可區分葉枯病菌與其他病原菌, 而且此二種抗血清與菌落型態類似的其他 *X. campestris* 之病原型細菌也無血清關係, 縱使培養基長出類似葉枯病菌之黃色細菌, 或樣品中含 *X.*

campestris 其他病原型之細菌，也可應用此二種抗血清經由雙向瓊脂免疫擴散法加以區別。另外，A008 及 A072 抗血清與一般常見的表生或腐生細菌如 *E. herbicola*, *P. fluorescens*, *P. putida* 之間也無任何血清反應，雖然由火鶴花植株上經常可分離到 *E. herbicola* 及 *P. fluorescens* 細菌⁽²⁸⁾，也能以此抗血清加以區別，顯示應用雙向瓊脂免疫擴散法測試時，此二種抗血清對葉枯病菌具高專一性，且其中 A072 抗血清可與 94.9% 供試葉枯病菌的菌株反應，應可用於實驗室內葉枯病菌之鑑定。但是若以 direct DAS-ELISA 方法測試，發現 A008 抗血清與來自柑橘之 *X. c. pv. citri* 菌株有反應，而 A072 血清則與來自彩色海芋之 *Ecc* 菌株有反應，雖然在火鶴花植株上尚未發現這些細菌，但以 direct DAS-ELISA 方法測試時仍需留意。

以時效性而言，利用培養基分離法需 2-3 天的時間，而免疫擴散法約需 16 小時，顯然免疫擴散法在時間上較為經濟，但免疫擴散法所需之反應菌量頗高，約需 10^8 cfu/ml，若病斑內菌量過低則不易出現反應帶，是其缺失。一般應用 ELISA 的方法可提高靈敏度，所需的菌量約 10^{4-5} cfu/ml^(13, 28)，因此本研究分別抽取抗血清之 IgG，並與鹼性磷酸酵素聯結，應用於直接抗體法 (direct DAS-ELISA) 來測試葉枯病菌，雖然反應所需的時間與擴散法差異不大，但所需的菌量約需 10^4 cfu/ml，從反應所需使用之菌量而言，顯然 ELISA 的方法較靈敏，且所需的反應抗體量亦較少，是 ELISA 方法的優點。一般應用 ELISA 方法直接用於田間樣品偵測，則樣品所帶之菌量約需 10^6 cfu/ml⁽¹³⁾ 較容易偵測到，因此將 A072 抗血清實際應用於田間偵測仍有靈敏度不高的缺失。所以，就靈敏度的觀點而言，不論 A072 或 A008 抗血清，仍不適合直接應用於田間樣品之偵測。

爲了增加血清偵測之靈敏度，學者利用

immunofluorescence colony (IFC) stain technique 的方法，確實可提高靈敏度，甚至可偵測單一菌落⁽³⁵⁾，但此方法花費過高，較不適合大量樣品之偵測。Norman & Alvarez^(26, 28) 應用選擇性培養基先將樣品增量培養數天，再配合應用 ELISA 分析法偵測，不但可達選擇性增量，又可提高其靈敏度到原來樣品菌量爲 1 cfu/10 ul，約爲 10^2 cfu/ml，其偵測效率已與 PCR 相近^(26, 28)，雖然所需的時間加長，但靈敏度增加，且適合大量樣品之檢測。本研究以接種葉枯病菌之火鶴花葉片爲材料，直接應用 ELISA 方法僅能偵測到含 10^6 cfu/ml 菌量的火鶴花樣品，但若以 ET 培養基先增量培養 3-4 天後再以所製作之免疫球蛋白進行 ELISA 檢測，則可檢測到含 10^2 cfu/ml 菌量之樣品，其偵測效率顯著提高，因此本研究所製作之本土性葉枯病菌抗血清若配合培養基增量培養法當可應用於火鶴花葉枯病菌之檢測。

謝 辭

感謝中興大學黃秀珍博士提供菌株及徐世典教授細心斧正。

引用文獻

1. 林長平。1992。生物技術在植物細菌性病害診斷上之應用與展望。臺灣糖研所成立九十週年紀念演講論文專集。p131-139 頁。
2. 徐世典。1991。細菌檢疫技術之現況與展望。邁入廿一世紀臺灣之植物保護研討會專刊 47-55 頁。
3. 許秀惠、林俊義。1998。臺灣火鶴花細菌性葉枯病及其病菌對藥劑之感受性植保會刊 40: 409 ~ 417。
4. Alvarez, A. M., Benedict, A. A., and Mizumoto, C. Y. 1985. Identification of xanthomonads and grouping of

- Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 75: 722-728.
5. Alvarez, A., Lipp, R., and Norman, D. 1988. Detection and serological studies, pp. 11-15. *In: Proceedings of the First Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.*
 6. Alvarez, A., Lipp, R., and Bushe, B. 1989. Resistance of bacteria to antibiotics used for control of anthurium blight, pp. 11-13. *In: Proceedings of the Second Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.*
 7. Alvarez, A., Lipp, R., Norman, D., and Gladstone, L. 1990. Epidemiology and control of anthurium blight, pp. 27-30. *In: Proceedings of the Third Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.*
 8. Alvarez, A., Norman, D., and Lipp, R. 1991. Epidemiology and control of anthurium blight, pp. 12-18. *In: Proceedings of the Fourth Hawaii Anthurium Industry Conference held at Hilo, Hawaii.*
 9. Berthier, Y., Thierry, D., Lemattre, M., and Gueston, J. L. 1994. Isolation of an insertion sequence (IS1051) from *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* with potential use for strain identification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 377 - 384.
 10. Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3522 - 3526.
 11. Bouzar, H., and Moore, L. W. 1993. Ouchterlony double diffusion, plates: bacteria, pp. 129-140. *In: R. Hampton, E. Ball, and S. De Boer eds. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual, 2nd printing, APS Press, Amer. Phytopathol. Soci., St. Paul, Minnesota.*
 12. Charudattan, R., Stall, R. E., and Batchelor, D. L. 1973. Serotypes of *Xanthomonas vesicatoria* unrelated to its pathotypes. *Phytopathology* 63: 1260 - 1265.
 13. Civerolo, E. L., and Fan, F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* 66: 231 - 236.
 14. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characterizations of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475 - 483.
 15. Fahy, P. C., and Hayward, A. C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests, pp. 337 - 338. *In: P. C. Fahy, and G. J. Persley eds. Plant Bacterial Disease, A Diagnostic Guide. Academic Press Australia, N.S.W., Australia.*
 16. Hayward, A. C. 1972. A bacterial disease of anthurium in Hawaii. *Plant Dis. Rep.* 56: 904 - 908.
 17. Inouye, G. 1988. Impact of bacterial blight on the anthurium industry, pp. 2-3. *In: Proceedings of the First Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.*
 18. Knauss, J. F. 1972. Resistance of *Xanthomonas dieffenbachiae* isolates to streptomycin. *Plant Dis. Rep.* 56: 394 - 397.
 19. Lipp, R. L., Alvarez, A. M., Benedict, A.

- A., and Berestecky, J. 1992. Use of monoclonal antibodies and pathogenicity tests to characterize strains of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* from aroids. *Phytopathology* 82: 677 - 682.
20. Lister, R. M. 1978. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in soybean seed and plants. *Phytopathology* 68: 1393 - 1400.
21. McLaughlin, R. J., and Chen, T. A. 1993. ELISA methods for plant pathogenic prokaryotes, pp. 197 - 204. *In*: R. Hampton, E. Ball, and S. De Boer eds. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual*, 2nd printing, APS Press, Amer. Phytopathol. Soci., St. Paul, Minnesota.
22. McCulloch, L., and Pirone, P. P. 1939. Bacterial leaf spot of Dieffenbachia. *Phytopathology* 29: 956 - 962.
23. Mu, L. 1990. Anthurium culture and blight in Tahiti, pp. 37. *In*: Proceedings of the Third Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.
24. Natural, M. P., Tabo, G. A., and Telebanco, M. J. G. 1990. Bacterial blight of *Anthurium andreaeanum* Lind in the Philippines. *Phil. Phytopathol.* 26: 25 - 35.
25. Nishijima, W. T. 1988. Anthurium blight an overview, pp. 6 - 8. *In*: Proceedings of the First Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.
26. Norman, D., and Alvarez, A. 1989. A rapid method for the presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other xanthomonads. *Plant Dis.* 73: 654 - 658.
27. Norman, D., Alvarez, A., and Lipp, R. 1993. Latent infections of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in tissue cultured anthurium, pp. 12 - 14. *In*: Proceedings of the Sixth Hawaii Anthurium Industry Conference held at Manoa, Hawaii.
28. Norman, D., and Alvarez, A. 1994. Rapid detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in anthurium plants with a miniplate enrichment/ELISA system. *Plant Dis.* 78: 954 - 958.
29. Robin, A. 1993. Serological detection of *Pseudomonas solanacearum* by ELISA, pp. 54-61. *In*: G. L. Hartman, and A. C. Hayward eds. *Bacterial Wilt. ACIAR Proc.* 45, ACIAR, Canberra.
30. Saettler, A. W., Schaad, N. W., and Roth, D. A. 1989. Detection of plant pathogenic bacteria in seed and plant propagative parts. *American Phytopathological Society, St. Paul. MN.* 122 pp.
31. Sakai, W. 1994. Anthurium production in the Netherlands, pp. 49. *In*: Proceedings of the Seventh Hawaii Anthurium Industry Conference held at Manoa, Hawaii.
32. Schaad, N. W. 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17: 123 - 147.
33. Shehata, S. A., Nishimoto, M., and Hamilton, M. 1990. The impact of anthurium blight on the profitability of the industry, pp. 3 - 6. *In*: Proceedings of the Third Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.
34. Slack, S. A., and Ball, E. M. 1993. Latex agglutination for viruses and bacteria, pp. 307 - 312. *In*: R. Hampton, E. Ball, and S. De Boer eds. *Serological methods for detection and identification of viral and*

- bacterial plant pathogens. A laboratory manual, 2nd printing, APS Press, Amer. Phytopathol. Soci., St. Paul, Minnesota.
35. van Vuurde, J. W. L. 1993. Immunofluorescence colony staining, pp. 299 - 305. *In*: R. Hampton, E. Ball, and S. De Boer eds. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual, 2nd printing, APS Press, Amer. Phytopathol. Soci., St. Paul, Minnesota.
36. Young F. 1990. Anthurium blight in Jamaica, pp. 37. *In*: Proceedings of the Third Anthurium Blight Conference held at Hilo, Hawaii.

ABSTRACT

Hseu, S. H.*, and **Lin, C. Y.** 2000. Serological detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 42: 97 - 106 (Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan)

Two strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (A008 and A072) were used for producing polyclonal antisera against *X. a.* pv. *dieffenbachiae* (Xcd). At least two serovars were identified among Xcd strains collected from Taiwan based on the results of Ouchterlony tests. The antiserum against A072 was able to react with 168 out of 177 (94.9%) strains of Xcd but antiserum against A008 reacted only with strains A003 and A008. In the specificity test through a double diffusion method, the two antisera did not cross reacted with *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. herbicola* pv. *gypsophilae*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas albilineans*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. c.* pv. *citri*, *X. c.* pv. *glycines*, *X. c.* pv. *magniferaeindicae*, *X. c.* pv. *phaseoli*, *X. c.* pv. *uppalii*, *X. c.* pv. *vesicatoria*, *X. fragariae* and *X. oryzae* pv. *oryzae*. However, A008 antiserum reacted with *X. c.* pv. *citri* and A072 antiserum reacted with *E. c.* subsp. *carotovora* in the specificity test through direct DAS-ELISA method. The direct DAS-ELISA with these two antisera detected 10^4 cfu/ml of Xcd. However, the sensitivity of detection could be increased to 10^2 cfu/ml when Xcd was pre-enriched in ET medium for 3 - 4 days. The results indicate that a pre-enrichment of bacteria with esculin-trehalose medium together with ELISA test could be used as a diagnostic method for Xcd detection in Taiwan.

(Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, polyclonal antisera, detection)

*Corresponding Author. E-mail: shhseu@wufeng.tari.gov.tw