

การจัดจำแนกชนิดเชื้อขานโทโมนาสสาเหตุโรคน้ำจุดมะเขือเทศและพริกในประเทศไทย

Characterization of *Xanthomonas* causing of Bacterial Leaf Spot of Tomato and Pepper in Thailand

สันติพงศ์ ลิทธิธนสิน^{1/*} ชัญญานุช กอรั้งงาม^{2/ 3} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{4/} ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล^{4/}

สุจินต์ ภัทรภูวadol^{1/ 2/ 3/} วิชัย โฆสิตรัตน^{2/ 3/} จุฑาทิพย์ วัชรไชยคุปต์^{2/ 3/}

Santipong Sitthitanasin^{1/} Chanyanut Korakngam^{2/ 3/} Tippawan Kanhayat^{4/} Nuttima Kositcharoenkul^{4/}

Sujin Patarapuwadol^{1/ 2/ 3/} Wichai Kositratana^{2/ 3/} Jutatape Watcharachaiyakup^{2/ 3/}

Received 3 Oct 2019/Revised 23 Dec 2019/Accepted 26 Feb 2020

ABSTRACT

Bacterial leaf spot is an important disease of tomato and pepper, and is a threat to seed industry in particular. Lately, *Xanthomonas* species causing bacterial leaf spot disease of tomato and pepper had been re-classified, using molecular techniques, into four species, namely *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, and *X. vesicatoria*. In this study we characterized bacterial pathogens of leaf spot disease of tomato and pepper in Thailand. A total of 38 isolates of disease causing bacteria were used in this study, 24 of which were obtained from Department of Agriculture's Culture Collection Center. They were collected during 1987-2018 and already identified as *X. vesicatoria*. The other 14 isolates we collected from the fields in Khon Kaen and Chaiyaphum provinces in 2018. These bacterial isolates were identified as *Xanthomonas* sp. based on morphology, physiological and biochemical properties. The selected 18 isolates were further identified by using multilocus sequence analysis (MLSA) of *gyrB*, *efp*, *dnaK* and *atpD* genes and specific primer set of each species. As a result, two species were identified. Ten isolates from pepper were identified as *X. euvesicatoria*, and the other 7 from 8 isolates from tomato were *X. perforans*. However, PCR amplification from Bs-XpF/ Bs-XpR primers specific to *X. perforans* was no found. None of the isolates in this study were *X. gardneri* or *X. vesicatoria*.

Keywords : *Xanthomonas*, bacterial leaf spot disease, tomato, pepper, multilocus sequence, housekeeping genes

^{1/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

^{2/} ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

^{3/} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนานวัตกรรมและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

^{4/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

^{2/} Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

^{3/} Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

^{4/} Plant Pathology Research group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900

* Corresponding author: agrwc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โรคใบจุดมะเขือเทศและพริกที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เป็นโรคที่สำคัญโดยเฉพาะกับอุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริก เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ได้แก่ เชื้อขานโทโมนาส (Genus *Xanthomonas*) 4 สปีชีส์ ที่จำแนกออกจากกันด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล คือ *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, และ *X. vesicatoria* วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้า เพื่อจำแนกชนิดเชื้อขานโทโมนาสสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริก สายพันธุ์ไทยจำนวน 38 ไอโซเลท โดย 24 ไอโซเลทเป็นเชื้อที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2530 - 2561 จากหน่วยเก็บรักษา สายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (DOA) ที่แยกเชื้อจากตัวอย่างในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง และเชื้อแบคทีเรียขานโทโมนาสที่แยกได้อีก 14 ไอโซเลท โดยจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี จากนั้นคัดเลือกเชื้อจำนวน 18 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ชนิดด้วยเทคนิควิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนพื้นฐาน หรือ Multilocus sequence analysis (MLSA) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gyrB*, *efp*, *dnaK* และ *atpD* มาเรียงต่อกัน ร่วมกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อขานโทโมนาสสาเหตุโรคทั้ง 4 ชนิด ผลการศึกษาสามารถจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศที่พบในประเทศไทยได้ 2 ชนิด ได้แก่ *X. euvesicatoria* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่แยกมาจากพริก และเชื้อ *X. perforans* เกือบทั้งหมด จำนวน 7 ใน 8 ไอโซเลท พบในมะเขือเทศ แต่เชื้อ *X. perforans* ทุกไอโซเลทที่แยกได้นี้ไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ Bs-XpF/ Bs-XpR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *X. perforans* ทั้งนี้ไม่พบเชื้อ *X. gardneri* และ *X. vesicatoria* จากตัวอย่างที่นำมาศึกษา

คำสำคัญ: เชื้อขานโทโมนาส, โรคใบจุด, มะเขือเทศ, พริก, ลำดับนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่ง, ยีนพื้นฐาน

บทนำ

โรคใบจุดมะเขือเทศมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มขานโทโมนาสหลายชนิด (Genus *Xanthomonas*) โรคนี้พบได้ในแหล่งปลูกมะเขือเทศและพริกทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตสภาพอากาศร้อนชื้น เชื้อเข้าทำลายในพริกและมะเขือเทศทำให้เกิดอาการแผลจุดขนาดเล็กสีน้ำตาล ข้ำน้ำที่ใบ ลำต้นและผล จุดแผลมีสีเหลืองล้อมรอบ ซึ่งอาจเป็นจุดแผลตายขนาดเล็กเชื่อมต่อกันทำให้เกิดลักษณะใบไหม้ และใบร่วงก่อนกำหนดได้ ทำให้ผลผลิตลดลงทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ และเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อเป็นแหล่งที่จะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ (EPPO, 2013) เชื้อสาเหตุโรคนี้จัดเป็นศัตรูพืชควบคุม (Quarantine pest) ใน EPPO A2 list ของประเทศสหภาพยุโรป (EPPO, 2019) และหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย

โรคใบจุดมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1914 ที่แอฟริกาใต้ และจำแนกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเชื้อ *Bacterium vesicatorium* (Doidge, 1921) ต่อมา มีการจัดจำแนกเชื้อนี้ใหม่ และเปลี่ยนชื่ออีกหลายครั้ง (Dye, 1966; Stall et al., 1994; Vauterin et al., 1995; Jones et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดลักษณะจุดแผลบนผลมะเขือเทศ รอบบริเวณแผลมีสีขาวและจำแนกว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas gardneri* (Sutic, 1957) และต่อมาได้มีการจัดเชื้อ *P. gardneri* เข้าอยู่ในกลุ่มของเชื้อขานโทโมนาสด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี (Dye et al., 1966) Vauterin et al., (1995) ได้เสนอการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อขานโทโมนาสใหม่ โดยใช้คุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอน และ DNA:DNA hybridization จัดแบ่งเชื้อเป็น 21 กลุ่มย่อย รวมทั้งชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type A และ type B ซึ่งมีความแตกต่างกันในปฏิกิริยาย่อยแป้ง (amylolytic) และการย่อยเพคติน (pectolytic) โดยเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* type A มีความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอกับเชื้อ

ในกลุ่ม *X. axonopodis* สูงถึง 77% จึงเสนอเปลี่ยนชื่อกลุ่ม type A เป็น *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ส่วนเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* type B ดีเอ็นเอมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *X. vesicatoria* สูงถึง 99% จึงเสนอเปลี่ยนชื่อเป็น *X. vesicatoria* ต่อมา Jones et al., (2004) ได้ศึกษาจัดจำแนกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดพริกและมะเขือเทศใหม่ โดยอาศัยความแตกต่างกันในการใช้แหล่งคาร์บอน (Metabolic proles) และการทดสอบ DNA:DNA hybridization แล้วจำแนกเชื้อเป็น 4 ชนิด ได้แก่ *X. euvesicatoria* (Xe), *X. perforans* (Xp) (กลุ่ม type A เดิม) *X. vesicatoria* (Xv) และ *X. gardneri* (Xg) โดยเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีความสัมพันธ์ของ DNA hybridization ระหว่างชนิดที่ต่ำกว่า 70%

ในประเทศไทยเคยมีรายงานถึงการพบและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศและพริกว่าเกิดจากเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* (บงกชโพธิ์, 2537; วัลลา, 2539) จึงมีความจำเป็นต้องจำแนกเชื้อให้เป็นปัจจุบันด้วยการใช้คุณสมบัติด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อสนับสนุนมาตรการกักพืชสำหรับการค้าระหว่างประเทศ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริกที่พบในประเทศไทยโดยใช้นุกรมวิธานแบบโพลีฟาสิก (Polyphasic taxonomy) รวมถึงวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่ง (Multilocus Sequence Analysis; MLST) ของยีนพื้นฐาน (housekeeping gene)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ใช้ในการศึกษา

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *vesicatoria* จำนวน 24 ไอโซเลท ที่แยกเชื้อได้ระหว่างปี พ.ศ. 2530-2561 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

(DOA) และเชื้อแบคทีเรีย 14 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) และพริก (*Capsicum annuum*) ที่แสดงอาการใบจุด โดยเก็บตัวอย่างจาก จ.ขอนแก่น และ จ.ชัยภูมิ ในปีพ.ศ. 2561 ทำการแยกเชื้อโดยตัดชิ้นส่วนพืชตรงบริเวณที่เป็นรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นแผลจุดกับส่วนที่ปกติ ใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดชิ้นส่วนพืชด้วยแท่งแก้ว จากนั้น ใช้ลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อและน้ำบาดพิชนำมา cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชม. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง กลมใส ที่คล้ายเชื้อชานโทโมนาส นำมา cross streak บนอาหาร NA ทำซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จนได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ (วิชัย, 2549)

2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชม. จากนั้น นำเชื้อมาเตรียมเซลล์แขวนลอยโดยผสมกับน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ปลุกเชื้อลงบนพืชทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศราชินี (*S. lycopersicum* 'Cherry154') และพริกมันบางช้าง (*C. annuum* 'Bang chang') อายุประมาณ 1 เดือน ที่โรยผงคาร์บอนรันด์เล็กน้อยบนใบพืช โดยใช้ไม้ก้านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ ทาลงไปที่ด้านบนใบของมะเขือเทศและพริก หลังจากนั้นประมาณ 2-3 นาที ล้างผงคาร์บอนรันด์ออกจากใบพืชด้วยน้ำ คลุมต้นพืชด้วยถุงพลาสติกในช่วงเย็นถึงเช้า เป็นเวลา 2 วัน ทำการตรวจสอบอาการที่เกิดขึ้นหลังจากการปลูกเชื้อเป็นระยะ ๆ เป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ แยกเชื้อแบคทีเรียจากใบที่ปลูกเชื้อตามขั้นตอนการแยกเชื้อข้างต้น และตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NA (EPPO, 2013)

3. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลา 2 วัน และนำมาใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ การติดสีแกรม การเจริญบนอาหาร yeast dextrose calcium carbonate (YDC) การสร้างรงควัตถุ xanthomonadin รวมไปถึงคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ urease การสร้างเอนไซม์ catalase การเจริญบนอาหารที่มี 5% NaCl และการรื้อตัวในเตรท ตามวิธีการของ Schaad *et al.*, (2001)

4. การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลา 2 วัน นำเชื้อที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan) และเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอให้ได้ 1 ng/μl นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 1 μl โดยใช้ส่วนผสมและขั้นตอนการทำปฏิกิริยาตามรายงานของ Koenraadt *et al.*, (2009) และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดในมะเขือเทศและพริก ทั้ง 4 ชนิด ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bs-XvF/ Bs-XvR, Bs-XeF/ Bs-XeR, Bs-XgF/ Bs-XgR และ Bs-XpF/ Bs-XpR (Koenraadt *et al.*, 2009) ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 x TBE buffer ที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ในการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอควบคุมเป็น genomic DNA (gDNA) ของเชื้ออ้างอิง (Type strain) แต่ละชนิดที่นำเข้าจากสถาบัน The National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB) ประเทศสหราชอาณาจักร

5. การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยเทคนิค Multilocus sequence analysis

นำดีเอ็นเอของเชื้อมาเป็นต้นแบบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *ATP synthase subunit beta (atpD)*, *chaperone protein dnaK (dnaK)*, *DNA gyrase subunit (gyrB)* และ *elongation factor (efp)* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะของแต่ละยีน เติมส่วนผสมของปฏิกิริยา และใช้ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาตามที่รายงานโดย Roach *et al.*, (2018) สกัดแถบดีเอ็นเอผลผลิตจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Axil Scientific Pte Ltd. ประเทศมาเลเซีย)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 4 ยีนมาเรียงต่อกันตามลำดับ ดังนี้ *gyrB* (654 bp), *efp* (300 bp), *dnaK* (621 bp) และ *atpD* (676 bp) จากนั้น เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศที่เป็นเชื้ออ้างอิง (Type strain) ได้แก่ *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* และ *X. gardneri* และเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ จากฐานข้อมูล GenBank (Roach *et al.*, 2018; Hamza *et al.*, 2010) โดยการนำมาจัดเรียงด้วยวิธีการ Muscle ด้วยโปรแกรม MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) นำข้อมูลที่จัดเรียงแล้วมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MrBayes ver. 3.2.7a (Window version) (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) คำนวณตามวิธี Likelihood จำนวน substitution แบบ GTR rates=gamma จำนวนการวิเคราะห์ 1,100,000 ครั้ง จำนวน burn-in 100,000 ครั้ง nchains=4, nruns=2 (Roach *et al.*, 2018) และแสดงภาพ Dendrogram ด้วยโปรแกรม FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2016)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เชื้อแบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการก่อโรค

จากตัวอย่างมะเขือเทศและพริกใน จ.ขอนแก่น และ จ.ชัยภูมิ ที่แสดงอาการโรคใบจุด สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายกับ เชื้อ *Xanthomonas tominasii* ได้จำนวน 14 ไอโซเลต นำมาทดสอบการก่อโรค พร้อมกับเชื้อ *Xanthomonas tominasii* จำนวน 24 ไอโซเลต ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กรมวิชาการเกษตร ซึ่งแยกได้จากมะเขือเทศและพริกในพื้นที่ภาคเหนือ

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง (Table 1) พบว่า เชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่ทดสอบทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศและพริก สามารถแยกเชื้อได้จากต้นพืชทดสอบที่เป็นโรค และมีลักษณะโคโลนีเหมือนกับไอโซเลตตั้งต้น ที่นำมาใช้ในการปลูกเชื้อ เชื้อจำนวน 25 ไอโซเลต ทำให้เกิดอาการใบจุดได้กับทั้งมะเขือเทศและพริก (Figure 1) เชื้ออีก 12 ไอโซเลต เกิดโรคได้เฉพาะกับมะเขือเทศ และมีเชื้อ 1 ไอโซเลต ที่แยกได้จากพริก สูญเสียความสามารถในการก่อโรคใบจุดกับทั้งพริกและมะเขือเทศ

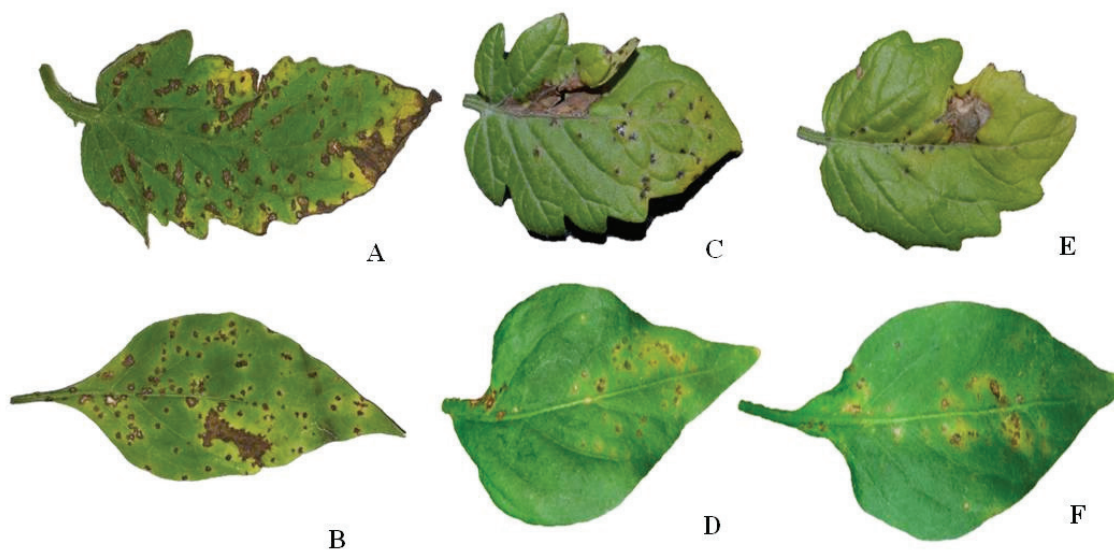


Figure 1 Symptoms of bacterial leaf spot of tomato (A, C, E) and chilli (B, D, F) at 21 days post inoculation. A and B samples from naturally infected plants; C and D samples from artificial inoculation with *Xanthomonas perforans*; E and F samples from artificial inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria*

Table 1 Bacterial isolates used in this study and their characteristics

Isolate	Host ¹	Province	Year isolated	Gram stain ²	Urease	Catalase	5% NaCl	Pigment	Nitrate	Pathogenicity test		PCR ²	MLST ³
										To ¹	P ¹		
XCVKKT-1	To	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	-	0	ND
XCVKKT-2	To	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	-	0	ND
XCVKKT-3	To	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	-	0	ND
XCVKKT-4	To	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	-	0	ND
XCVKKT-5	To	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	-	0	ND
XCVKKT-1	P	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
XCVKKT-2	P	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
XCVKKT-3	P	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
XCVKKT-4	P	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
XCVKKT-5	P	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
XCVKKT-29	To	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	-	0	Xp
XCVKKT-31	To	Khon Kaen	2018	-	-	+	-	+	-	+	-	0	ND
XCVKKT-43	P	Chaiyaphum	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
XCVKKT-51	P	Chaiyaphum	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-691	To	Sakon Nakhon	1987	-	-	+	-	+	-	+	-	0	ND
DOA-1642	To	Nakhon Ratchasima	2003	-	-	+	-	+	-	+	-	0	Xp
DOA-1643	To	Saraburi	2003	-	-	+	-	+	-	+	-	0	Xp
DOA-1663	To	Saraburi	2003	-	-	+	-	+	-	+	+	0	ND
DOA-1664	To	Saraburi	2003	-	-	+	-	+	-	+	+	0	Xp
DOA-1668	P	Tak	2003	-	-	+	-	+	-	-	-	0	ND
DOA-1692	P	Bangkok	2003	-	-	+	-	+	-	+	+	0	Xp
DOA-1721	P	Tak	2004	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-1725	P	Phichit	2004	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-1726	P	Lampang	2004	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-1728	To	Kanchanaburi	2004	-	-	+	-	+	-	+	-	0	Xp
DOA-1729	To	Kanchanaburi	2004	-	-	+	-	+	-	+	-	0	Xp
DOA-1793	P	Buri Ram	2004	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-2028	To	Khon Kaen	2008	-	-	+	-	+	-	+	+	0	ND
DOA-2030	To	Khon Kaen	2008	-	-	+	-	+	-	+	+	0	ND
DOA-2033	To	Khon Kaen	2008	-	-	+	-	+	-	+	+	0	ND
DOA-2034	To	Khon Kaen	2008	-	-	+	-	+	-	+	+	0	Xp
DOA-2036	P	Sa Kaeo	2008	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-2225	P	Si Sa Ket	2012	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-2983	P	Loei	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-2985	P	Loei	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	Xe
DOA-2987	P	Chaiyaphum	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
DOA-2989	P	Chaiyaphum	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
DOA-2990	P	Chaiyaphum	2018	-	-	+	-	+	-	+	+	Xe	ND
Xe NCPB2968												Xe	
Xe NCPB2573												Xe	
Xv NCPB422												Xv	
Xv NCPB1332												Xv	
Xv NCPB1421												Xv	
Xg NCPB881												Xg	
Xg NCPB4323												Xg	
Xp NCPB4321												Xp	
Xp NCPB4322												Xp	

¹ To: Tomato, P: Pepper, ² symbol - means Gram's negative type, ³ Positive reaction in the species-specific PCR for *Xeuvesicatoria* (Xe), *X. perforance* (Xp), *X. vesicatoria* (Xv), *X. gardneri* (Xg), negative reaction in all four PCRs was indicated by 0, ³ Species designed by Multilocus sequence typing (MLST), Isolates with initial XCV were those isolated in this study, initial DOA were obtained from the Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, and initial Xe, Xv, Xg, Xp with NCPB code were DNA of isolates obtained from the National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK. + means positive reaction, - means negative reaction

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสมบัติทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 38 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน มีขนาดประมาณ $0.4-0.6 \times 1.0-2.9 \mu\text{m}$ โคโลนีที่เจริญบนอาหาร NA มีสีเหลือง ลักษณะกลม ขอบเรียบ ผิวมัน บนอาหาร YDC โคโลนีมีสีเหลือง ลักษณะกลมขรุขระ ขอบเรียบ เป็นเมือกเยิ้ม มีสารรงควัตถุ xanthomonadins ไม่เจริญเติบโตบนอาหารที่มี 5% NaCl ไม่พบปฏิกิริยาการใช้ไนเตรท (nitrate reduction) ไม่มีการสร้างเอนไซม์ urease มีการสร้างเอนไซม์ catalase (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับสมบัติของเชื้อในสกุลชานโทโมนาส (วิชัย, 2549)

3. การจำแนกชนิดเชื้อด้วยเทคนิค PCR

ในกรรมวิธีควบคุมที่ใช้ gDNA ของเชื้ออ้างอิง (type strain) และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *Xanthomonas* แต่ละชนิด พบว่า ให้ผลบวกโดยผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มีความสอดคล้องกับชนิดของเชื้อ จากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 38 ไอโซเลท ที่นำมาทดสอบครั้งนี้ พบว่ามีเชื้อ 18 ไอโซเลท จากพริก ซึ่งแยกได้ในการวิจัยนี้ 7 ไอโซเลท และเชื้อจากกรรมวิธีการเกษตร (DOA) 11 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยการใช้ไพรเมอร์ Bs-XeF/ Bs-XeR ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ *X. euvesicatoria* ในขณะที่เชื้ออีก 10 ไอโซเลทจากมะเขือเทศ ซึ่งได้จากการวิจัยนี้ 6 ไอโซเลทและจาก DOA 4 ไอโซเลท ไม่พบการสร้างแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะของเชื้อทั้ง 4 ชนิด (Table 1)

เชื้อชานโทโมนาสสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริกในประเทศไทยจำนวน 38 ไอโซเลท ที่นำมาจำแนกชนิดด้วยเทคนิค PCR พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ 4 ชนิด จำแนกเชื้อ 18 ไอโซเลท ได้เป็นเชื้อชนิดเดียวกัน คือ *X. euvesicatoria* และมีอีก 10 ไอโซเลท ที่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดนั้น ทำนองเดียวกับรายงานของ Roach *et al.* (2018) ที่จำแนกเชื้อโรคใบจุดสายพันธุ์ออสเตรเลีย จำนวน 64 ไอโซเลท พบว่า ไพรเมอร์ Bs-XeF/ Bs-XeR

และ Bs-XvF/ Bs-XvR ให้ผลการตรวจ 39 ไอโซเลทที่จำแนกได้เป็นเชื้อ *X. euvesicatoria* และ *X. vesicatoria* และมีเชื้อ 25 ไอโซเลท ที่ไม่สร้างแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่นี้ โดยไพรเมอร์ Bs-XpF/ Bs-XpR ที่จำเพาะกับเชื้อ *X. perforans* ไม่ให้ผลบวกในการตรวจกับเชื้อ *X. perforans* ทุกไอโซเลท ของออสเตรเลีย ซึ่งผู้วิจัยให้ข้อสังเกตว่าการพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจจำแนกเชื้อ 4 ชนิดดังกล่าวยังไม่ได้ทดลองใช้งานกับเชื้อสายพันธุ์ออสเตรเลีย ซึ่งอาจจะเป็นข้อจำกัดต่อการตรวจสอบเชื้อสายพันธุ์ไทยด้วยเช่นกัน ส่วนเชื้อ *X. gardneri* ซึ่งเข้าทำลายมะเขือเทศได้ดีในสภาพการเพาะปลูกที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ มีรายงานพบเชื้อนี้เฉพาะแหล่งปลูกในประเทศบราซิลที่มีระดับที่สูงกว่า 900 เมตร และมีอุณหภูมิต่ำ (Araujo *et al.*, 2017) จึงอาจทำให้ไม่พบเชื้อนี้ในประเทศไทยซึ่งมีสภาพอากาศร้อนชื้น เช่นเดียวกับที่ตรวจไม่พบเชื้อนี้ในประเทศไต้หวันที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น (Burlakoti *et al.*, 2018)

4. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Multilocus sequence analysis (MLSA)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *gyrB*, *efp*, *dnaK*, และ *atpD* ที่นำมาเรียงต่อกันมีความยาว 2,251 bp ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MrBayes ver. 3.2.7a เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* และ *X. gardneri* ที่เป็นเชื้ออ้างอิง และตัวแทนเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ได้มีการจัดจำแนกชนิดแล้วจากฐานข้อมูล GenBank ตามรายงานของ Roach *et al.*, (2018) (accession no. KY658725-KY658788, KY658789-KY658853, KY658853-KY658916, KY658917-KY658975, KY364014-Ky364018) และ Hamza *et al.*, (2010) (accession no. GU322672-3, GU322757-8, GU322587-8, GU322502-3, GU322677-8, GU322762-3, GU322592-3, GU322507-8) พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากพริกจำนวน 18 ไอโซเลท ที่ศึกษา

แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Figure 2) กลุ่มแรก 8 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *X. perforans* สายพันธุ์อ้างอิง NCPBB4321^T และสายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลีย ได้แก่ DOA-1642, DOA-1643, DOA-1664, DOA-1692, DOA-1728, DOA-1729, DOA-2034, และ XCVKKT-29 กลุ่มที่สองจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ DOA-1721,

DOA-1725, DOA-1726, DOA-1793, DOA-2036, DOA-2225, DOA-2983, DOA-2985, XCVKKC-4, และ XCVCP-51 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *X. euvesicatoria* สายพันธุ์อ้างอิง NCPBB 2968^T และเชื้อนี้เป็นเชื้อที่พบในประเทศไทย (Roach *et al.*, 2018) ในการทดลองนี้ไม่พบเชื้อ *X. vesicatoria* และ *X. gardneri*

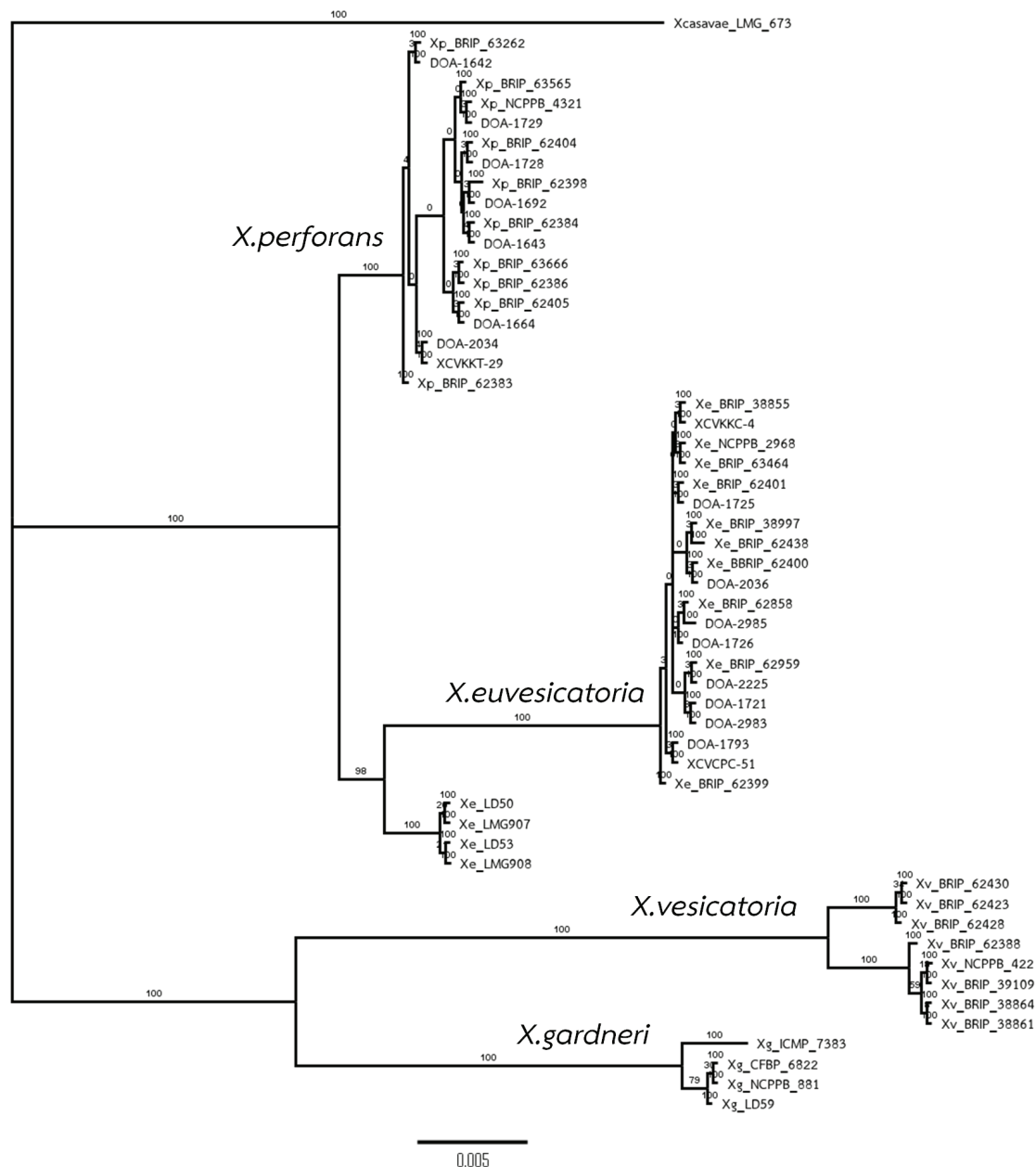


Figure 2 Phylogenetic Bayesian inference tree of concatenated gene sequences (in the order of *gyrB*, *efp*, *dnaK*, *atpD*) of *Xanthomonas* associated bacterial leaf spot disease with GenBank reference isolates and posterior probability (percent) branch support values. Xe= *Xanthomonas euvesicatoria*, Xv=*X. vesicatoria*, Xp= *X. performance* and Xg= *X. gardneri*

เมื่อวิเคราะห์กลุ่มเชื้อร่วมกับชนิดของพืชอาศัยที่พบโรค พบว่า เชื้อ *X. perforans* 7 ไอโซเลท แยกได้จากมะเขือเทศ และมี 1 ไอโซเลท (DOA-1692) แยกได้จากพริก ส่วนเชื้อ *X. euvesicatoria* 10 ไอโซเลท แยกได้จากพริกเท่านั้น แต่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งกับมะเขือเทศและพริก

สรุปผลการทดลอง

เชื้อขานโทโมนาสสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริก ที่แยกได้จากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย ในระหว่างปี พ.ศ. 2530 – 2561 จำนวน 38 ไอโซเลท ที่นำมาศึกษาถึงคุณลักษณะของสรีรวิทยา ชีวเคมี และเทคนิค PCR เพื่อยืนยันเชื้อในระดับจีโนม และจำแนกตัวแทนเชื้อ 18 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค MLSA ของยีน *gyrB*, *efp*, *dnaK* และ *atpD* เรียงต่อกัน พบว่า เชื้อ 8 ไอโซเลท ที่แยกได้จากมะเขือเทศ จำแนกเป็นเชื้อ *X. perforans* และเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากพริก จำแนกเป็นเชื้อ *X. euvesicatoria* โดยตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศอีก 2 ชนิด คือ *X. vesicatoria* และ *X. gardneri* จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR กรรมวิธีควบคุมที่ใช้คู่มือเฉพาะแต่ละชนิด ให้ผลบวกในการตรวจ gDNA ของเชื้ออ้างอิงชนิดเดียวกัน แต่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *X. perforans* ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อในการศึกษานี้ จึงจำเป็นต้องศึกษาเชื้อที่จำแนกเป็น *X. perforans* ด้วยเทคนิคอื่น ๆ เช่น การวิเคราะห์เปรียบเทียบ whole genome sequencing เพื่อเป็นการยืนยันการตรวจพบ และออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้ตรวจสอบเชื้อ *X. perforans* ที่ครอบคลุมมากขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนสถานที่อุปกรณ์เครื่องมือวิจัยและงบประมาณประจำปี 2561 ภายใต้โครงการ “การพัฒนาวิธีการมาตรฐานสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas vesicatoria* ในมะเขือเทศ” รหัสโครงการ AG-BIO/61-003-001 จากศูนย์ความเป็นเลิศด้าน

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ในการอนุเคราะห์เชื้อทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

- บงกชไพโร ศรีวิไล. 2537. การจำแนกและตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ (รายงานผลงานวิจัย). มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- วัลลา ดิษฐพงษ์พิชญ์. 2539. การวิเคราะห์ plamid และการจำแนก races ของ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วิชัย ไฉลรัตน์. 2549. โรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย: บทปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- Arajo, E. R., J.R. Costa, M. A. S.V. Ferreira and A. M. Quezado-Duval., 2017. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathol.* 66: 139-168.
- Burlakoti, R. R., C. F. Hsu, J.R. Chen and J. F. Wang. 2018. Population dynamics of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper during 27 years across Taiwan. *Plant Dis.* 102: 1348-1356.
- Doidge, E. M. 1921. A tomato canker. *Ann. Appl. Biol.* 7(4): 407-430.

- Dye D. 1966. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. *NZ J. Forestry Sci.* 9: 913–919.
- EPPO. 2013. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *EPPO Bulletin* 43: 7-20.
- EPPO. 2019. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests, version 2019-09. Available at : https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant__quarantine/A2__list. Accessed: 10 Sept 2019
- Hamza, A. A., I. Robne-Soustrade, E. Jouen, L.Gagnevin, P. Lefeuvre, F. Chiroleu and O. Pruvost. 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Dis.* 94: 993-999.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall and N. W. Schaad. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbio.* 27(6): 755-762.
- Koenraadt, H., B. Van Betteray, R. Germain, G. Hiddink, J. B. Jones, J. Oosterhof, A. Rijlaarsdam, P. Roorda and B. Woudt. 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Hort.* 808: 99-102.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Rambaut, A. 2018. FigTree v1.4.4. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Accessed: 22 July, 2019
- Roach, R., R. Mann, C. G. Gambley, R. G. Shivas, and B. Rodoni. 2018. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *Eur. J. Plant Path.* 150(3): 595-608.
- Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3rd Ed.). APS Press, Minnesota. 398p.
- Stall, R. E., C. Beaulieu, D. Egel, N. C. Hodge, R. P. Leite, G. V. Minsavage, H. Bouzar, J. B. Jones and A. A. Benedict. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 44(1): 47-53
- Sutic, D. 1957. *Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato Bacteriosis)*. Posebna Izdanja Institut za zastitu bilja Beograd (Special Edition Institute for Plant Protection Belgrade), 66p.
- Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 45(3): 472-489.