ชนิดของแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริกในประเทศไทย

Xanthomonas Species Causing Bacterial Spot on Tomato and Chili in Thailand

ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] วันเพ็ญ ศรีชาติ[2/]
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1/] รุ่งนภา ทองเครั่ง[1/] กาญจนา ศรีไม้[1/]
Tippawan Kanhayart[1/] Nuttima Kositcharoenkul[1/] Wanpen Srichart[2/]
Buranee Puawongphat[1/] Rungnapha Thong kreng[1/] Kanchana Srimai[1/]

ABSTRACT

Bacterial spot disease in chili and tomato plants is a significant problem for producers worldwide, causing yield reductions and seed-borne transmission. The disease is caused by several *Xanthomonas* species, which exhibit similar symptoms and have undergone multiple taxonomic revisions. Thus, this study aims to identify *Xanthomonas* species associated with bacterial spot disease in chili and tomato plants in Thailand and to provide updated information on pathogen classification. The study was conducted from October 2022 to March 2025. During this period, *Xanthomonas* isolates were collected from diseased chili and tomato plants in cultivation areas across the country, as well as from the Plant Pathogen Microbial Collection Center. A total of 96 isolates were obtained, including 77 from chili and 19 from tomato. Isolates from tomato infected only tomato plants, whereas isolates from chili were capable of infecting both chili and tomato plants. Most isolates from tomato produced both amylolytic and pectolytic enzymes, whereas the majority of isolates from chili did not. PCR analysis revealed a 173 base pairs (bp) DNA band specific to *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* in chili isolates and a 300 bp band specific to *X. euvesicatoria* pv. *perforans* in tomato isolates. Maximum likelihood analysis of concatenated partial sequences of the *atpD, dnaK, efp,* and *gyrB* genes confirmed two major genetic groups closely related to type strains: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, predominantly from chili, and *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, exclusively from tomato. This study confirms that *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* and *X. euvesicatoria* pv. *perforans* are the primary causal agents of bacterial spot disease in Thailand. *X. euvesicatoria* pv. *perforans* was specific to tomato, while *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* primarily affected chili but was also able to infect tomato. The absence of *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri*, *X. campestris* pv. *raphani* and *X. arboricola* in Thailand was also noted.

Keywords: identification, leaf spot, chili, tomato

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[1/] Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000, Thailand

[2/] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 กรมวิชาการเกษตร อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130

[2/] Agricultural Research and Development Regional Office 2, Department of Agriculture, Wang Thong, Phitsanulok 65130, Thailand

*** Corresponding author : t.kanhayart@gmail.com**

บทคัดย่อ

โรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศผู้ผลิตพริกและมะเขือเทศทั่วโลก เนื่องจากทำให้ปริมาณผลผลิตลดลงและสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ โดยโรคนี้มีเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* หลายชนิดเป็นสาเหตุและก่อให้เกิดอาการของโรคคล้ายคลึงกัน อีกทั้งมีการจัดจำแนกและเปลี่ยนชื่อใหม่หลายครั้ง ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศที่พบระบาดในประเทศไทยให้ข้อมูลชนิดของเชื้อเป็นปัจจุบัน โดยดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2565 - มีนาคม 2568 รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคจากพื้นที่ปลูกพริกและมะเขือเทศทั่วประเทศและศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์โรคพืช ได้ 96 ไอโซเลต จากพริก 77 ไอโซเลต และมะเขือเทศ 19 ไอโซเลต เชื้อไอโซเลตจากมะเขือเทศก่อโรคเฉพาะมะเขือเทศ ส่วนไอโซเลตจากพริกก่อโรคได้ทั้งพริกและมะเขือเทศ ไอโซเลตจากมะเขือเทศส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ amylolytic และ pectolytic ได้ ขณะที่ไอโซเลตจากพริกส่วนใหญ่ไม่สร้าง ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าไอโซเลตจากพริกให้แถบดีเอ็นเอขนาด 173 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ส่วนไอโซเลตจากมะเขือเทศให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *atp*D, *dna*K, *efp* และ *gyr*B พบว่าประเทศไทยมีสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศใกล้ชิดกับเชื้อต้นแบบใน 2 กลุ่มหลัก คือ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* พบในพริกทั้งหมดและไอโซเลตเดียวจากมะเขือเทศ และ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* พบเฉพาะในมะเขือเทศ การศึกษานี้ยืนยันว่า *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* และ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* เป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศในประเทศไทย โดยพบว่า *X. euvesicatoria* pv. *perforans* มีความจำเพาะกับมะเขือเทศ ขณะที่ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* พบได้ในพริกเป็นหลักแต่สามารถพบในมะเขือเทศได้เช่นกัน นอกจากนี้ ไม่พบการระบาดของ *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri*, *X. campestris* pv. *raphani* และ *X. arboricola* ในประเทศไทย

คำสำคัญ: จำแนกชนิด ใบจุด พริก มะเขือเทศ

บทนำ

โรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* เป็นปัญหาสำคัญของประเทศผู้ผลิตทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและกึ่งร้อนชื้น เนื่องจากสามารถทำให้ผลผลิตลดลงได้ถึง 50% (Pohronezny and Volin, 1983) ทั้งนี้แบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวมีหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุด และก่อให้เกิดอาการของโรคที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โรคใบจุดของมะเขือเทศพบรายงานระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1914 ที่แอฟริกาใต้ โดยมีการจำแนกเชื้อสาเหตุเป็น *Bacterium vesicatorium* (Doidge, 1921) ขณะที่ในยูโกสลาเวีย Sutic (1957) ได้จำแนกเชื้อสาเหตุอาการจุดขอบสีขาวบนผลมะเขือเทศว่าเกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas gardneri* ในเวลาต่อมามีการจัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดที่เกิดจากแบคทีเรียของพริกและมะเขือเทศและเปลี่ยนชื่อใหม่อีกหลายครั้ง โดยเริ่มจาก *B. vesicatorium* เปลี่ยนชื่อเป็น *X. vesicatoria* และ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ตามลำดับ (Young et al., 1978) แต่เมื่อศึกษาข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอนและ DNA-DNA hybridization ทำให้แบ่งเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A และ B โดยกลุ่ม A มีดีเอ็นเอคล้ายคลึงกับ *X. axonopodis* และได้เปลี่ยนชื่อเป็น *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ในขณะที่กลุ่ม B ได้ชื่อใหม่เป็น *X. vesicatoria* (Stall et al., 1994; Vauterin et al., 1995) ต่อมา

ในปี 2000 Jones et al. ได้แบ่งเชื้อเพิ่มเติมอีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม C และ D โดยกลุ่ม C คือ *X. perforans* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดกลุ่มใหม่ที่พบรายงานที่รัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา (Jones et al., 1995) และกลุ่ม D คือ *X. gardneri* ซึ่งมีชื่อเดิมคือ *P. gardneri* (Jones et al., 2000) ต่อมาในปี 2004 Jones et al. พบความแตกต่างภายในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ และได้จำแนกเชื้อใหม่เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *X. euvesicatoria* (กลุ่ม A เดิม), *X. perforans*, *X. vesicatoria* และ *X. gardneri* (Jones et al., 2004) โดยในปัจจุบันได้มีการเสนอเปลี่ยนชื่อเชื้อทั้ง 4 ชนิดใหม่อีกครั้ง เป็น *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria X. euvesicatoria* pv. *perforans X. hortorum* pv. *gardneri* และ *X. vesicatoria* ตามลำดับ (Constantin et al., 2016; Morinière et al., 2020) สำหรับประเทศไทยมีรายงานเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศเกิดจากเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Uematsu et al., 1983) และรายงานการจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่งพบเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ *X. euvesicatoria* และ *X. perforans* (สันติพงศ์และคณะ, 2563)

โรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ทั้ง 4 ชนิด จัดเป็นศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศ และเป็นกลุ่ม complex species ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้เบื้องต้นจากอาการของโรคเมื่อพบการระบาดในแปลงหรือข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ด้วยเหตุนี้การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศที่พบระบาดในประเทศไทย เพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของเชื้อเป็นปัจจุบันและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืชและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดพริกและมะเขือเทศ

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชและทำการสำรวจเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศจากแหล่งปลูกที่สำคัญ บันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรค วันที่เก็บ และแหล่งที่พบ จากนั้นนำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร Potato Semisynthetic Agar (PSA) หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชม. เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในกลีเซอรอล 15% และ 50%

2. ทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่รวบรวมได้ มาทดสอบการเกิดโรคกับพริกและมะเขือเทศ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชม. ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml พ่นเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชม. จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเปล่า และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

3. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการ ตามวิธีการของ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad et al., 2001) ได้แก่ การย้อมสีแกรม การเคลื่อนที่ (motility) ทดสอบ oxidation-fermentation การเจริญที่อุณหภูมิ 40°ซ. การสร้างสาร fluorescence การสร้าง levan การเจริญบนอาหาร TTC การสร้างเอนไซม์ oxidase เอนไซม์ amylolytic และเอนไซม์ pectolytic

4. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadt et al. (2009) และ Ning (2012) โดยในการทำ PCR ใช้ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10 ng/µl, 1X OnePCR Master Mix (GeneDireX Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra TAdvanced (Analytik Jena GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิดังแสดงใน Table 1 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง อุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) โดยมีดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียต้นแบบ (type strain) ได้แก่ *Xanthomonas vesicatoria* NCPPB422, *X. hortorum* pv. *gardneri* NCPPB881, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* NCPPB4321 และ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* NCPPB2968 จากสถาบัน The National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB) สหราชอาณาจักร เป็นชุดควบคุม (positive control)

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีน *atp*D, *dna*K, *ef*P และ *gyr*B ตามรายงานของ Roach et al. (2017) โดยในการทำ PCR ใช้ปริมาตรรวม 50 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10 ng/µl, OnePCR Master Mix (GeneDirex Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra TAdvanced (Analytik Jena GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95°ซ. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ดังแสดงใน Table 1 เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

Table 1 PCR primers for *Xanthomonas* species - specific identification and MLSA assay

Primers	Sequence (5'–3')	Annealing Temperature	PCR product	Reference
BS-XeF	CATGAAGAACTCGGCGTATCG	66°C	173 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XeR	GTCGGACATAGTGGACACATAC			
BS-XvF	CCATGTGCCGTTGAAATACTTG	66°C	138 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XvR	ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC			
BS-XpF	GTCGTGTTGATGGAGCGTTC	66°C	197 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XpR	GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG			
BS-XgF	TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC	66°C	154 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XgR	TGACCGATAAAGACTGCGAAAG			
HpaF-f	GTGGCAGGCAGGCAATCGACG	65°C	300 bp	Ning (2012)
HpaF-r	CCGGCACGTCGACGCCTGGAAACC			
dnaK-F	TGGGCAAGATCATTGGTATT	67°C	765 bp	Roach et al. (2017)
dnaK-R	ACCTTCGGCATACGGGTCTG			
atpD-F	GGGCAAGATCGTTCAGAT	66°C	768 bp	Roach et al. (2017)
atpD-R	GCTCTTGGTCGAGGTGAT			
gyrB-F	GCCGAGGTGATCCTCACCGT	69°C	774 bp	Roach et al. (2017)
gyrB-R	GGCCGAGCCACCTGCCGAGT			
efp-F	GTCAAGAACGGCATGAAGA	65°C	387 bp	Roach et al. (2017)
efp-R	TCGTCCTGGTTGACGAAC			

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ชนิด fasta และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรีย

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียใช้วิธี multilocus sequence analysis (MLSA) โดยจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 12 (Kumar et al., 2024) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจัดจำแนกชนิดเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v 8.1.15 (Stamatakis, 2014) โดยกำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA และกำหนดค่า maximum likelihood bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดพริกและมะเขือเทศ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศจากแหล่งปลูกที่สำคัญ ตั้งแต่ตุลาคม 2564 - มีนาคม 2568 นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการได้เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ซึ่งมีลักษณะโคโลนีกลมนูน สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาว จำนวน 69 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัด

หนองคาย บึงกาฬ สกลนคร นครพนม มุกดาหาร ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม อุบลราชธานี ศรีสะเกษ ชัยภูมิ สุรินทร์ บุรีรัมย์ เลย เพชรบูรณ์ พิษณุโลก สระบุรี นครราชสีมา นครปฐม สุพรรณบุรี นครสวรรค์ สุโขทัย กาญจนบุรี ตาก ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ แพร่ น่าน เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งทำการฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์กลุ่มวิจัยโรคพืช ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 - 2564 จำนวน 27 ไอโซเลต รวมแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมด จำนวน 96 ไอโซเลต โดยเป็นไอโซเลตจากพริก จำนวน 77 ไอโซเลต และจากมะเขือเทศ จำนวน 19 ไอโซเลต

2. ทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 96 ไอโซเลต สามารถก่อโรคในพริกขี้หนูและมะเขือเทศพันธุ์สีดาได้ (Table 1, Figure 1) โดยไอโซเลตจากมะเขือเทศก่อให้เกิดโรคเฉพาะมะเขือเทศ ในขณะที่ไอโซเลตจากพริกก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในพริกและมะเขือเทศ

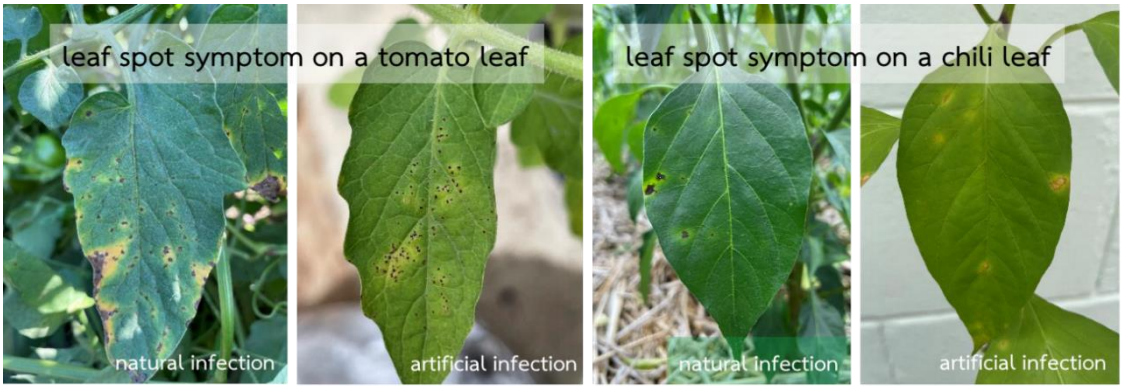

Figure 1 The pathogenicity test results of *Xanthomonas* spp. on chili and tomato plants

3. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี บางประการของแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศตามวิธีการของ Schaad et al. (2001) พบว่าแบคทีเรีย *Xanthomonas* ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศมีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมีของแบคทีเรียในสกุล *Xanthomonas* ซึ่งใช้แยกความแตกต่างจากแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเหลืองอื่น ๆ คือ แบคทีเรียเป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ เจริญโดยใช้ออกซิเจน สามารถสร้าง Levan และเจริญบนอาหาร 0.1% TTC ได้ แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 40°ซ. ไม่สร้างสารเรืองแสง (fluorescence) และไม่สร้างเอนไซม์ oxidase

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดโดยใช้คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ amylolytic และ pectolytic พบว่าสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้ทั้งสองชนิด จำนวน 15 ไอโซเลต พบในมะเขือเทศ กลุ่มที่สองเป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิด จำนวน 73 ไอโซเลต พบในพริก โดยทั้งสองกลุ่มนี้สอดคล้องกับรายงานของ Vauterin et al. (1990) และ Stall et al. (1994) (Table 2) ส่วนกลุ่มที่สามเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง จำนวน 8 ไอโซเลต พบทั้งในพริกและมะเขือเทศ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bouzar et al. (1994) ที่รายงานการจำแนกเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มในลักษณะเดียวกัน

4. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบด้วย PCR ตามรายงานของ Koenraadt et al. (2009) พบว่าไอโซเลตจากพริกทั้งหมด และ DOAC-B2179 ซึ่งแยกได้จากมะเขือเทศ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 173 bp (Figure 2A) ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรีย *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ส่วนไอโซเลตจากมะเขือเทศไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่เมื่อตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลตจากมะเขือเทศด้วยไพรเมอร์ HpaF-f/HpaF-r ตามรายงานของ Ning (2012) พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรีย *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Table 2, Figure 2B) ปัญหาการตรวจสอบเชื้อด้วย PCR ตามรายงานของ Koenraadt et al. (2009) ในการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดสอบโดย Roach et al. (2017) ที่พบว่าไพรเมอร์ Bs-XpF/BS-XpR (Koenraadt et al., 2009) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* ในทุกสายพันธุ์ทดสอบ

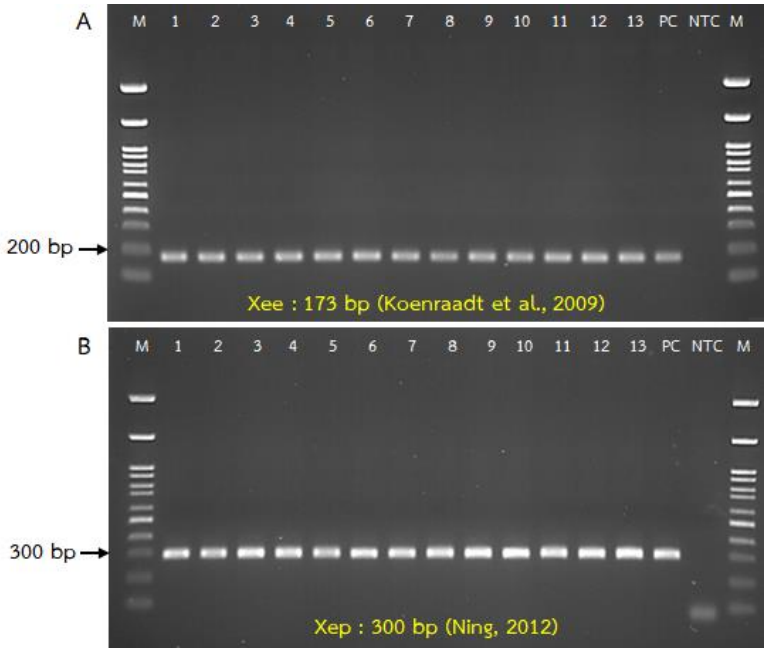

Figure 2 Polymerase chain reaction (PCR) amplicons of pathogenic bacteria causing leaf spot disease in chili and tomato. (A) Isolates from chili plants. (B) Isolates from tomato plants. PC: Positive control (type strain DNA); NTC: Non-template control; M: OneMark 100 DNA ladder (Bio-Helix Co., Ltd., Taiwan).

Table 2 Results of biochemical and PCR assays conducted in this study

Test	Chili isolates	Tomato isolates
Gram stain	Negative	Negative
Cell shape	Rod	Rod
Aerobic metabolism of glucose	+	+
Anaerobic metabolism of glucose	–	–
Motility test	+	+
Oxidase test	–	–
Levan from sucrose	+	+
Fluorescence	–	–
Growth on 0.1% TTC	+	+
Growth at 40°C	–	–
Amylolytic activity	– (99%)	+ (83%)
Pectolytic activity	– (95%)	+
PCR	Xee[1/]	Xep[2/]

+ = Positive reaction, - = Negative reaction

[1/] Positive reactions for *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee) were detected (chili: 77 isolates; tomato: 1 isolate) using primers by Koenraadt et al. (2009).

[2/] Positive reactions for *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) were detected (tomato: 18 isolates) using primers by Ning (2012).

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ จำนวน 96 ไอโซเลต โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *atpD*, *dnaK*, *efp* และ *gyrB* รวมความยาวทั้งสิ้น 2,251 bp จากนั้นสร้าง Phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศสายพันธุ์ต้นแบบ ได้แก่ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* NCPPB 2968^{T}, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* NCPPB4321^{T}, *X. vesicatoria* LMG911^{T} และ *X. hortorum* pv. *gardneri* NCPPB881^{T} รวมถึงข้อมูลสายพันธุ์ที่มีรายงานในประเทศต่าง ๆ และเชื้อชนิดอื่น ๆ จากฐานข้อมูล GenBank (Hamza et al., 2010; Hamza et al., 2012; Roach et al., 2017)

ผลการศึกษา พบว่าเชื้อทั้ง 96 ไอโซเลต แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก (Figure 3) ดังนี้

1. กลุ่ม *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee) จำนวน 78 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลตจากพริกทั้งหมด และ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศ กลุ่มนี้แบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

กลุ่มย่อยที่ 1 ไอโซเลตจากพริกและมะเขือเทศ โดยไอโซเลตจากพริกในไทยส่วนใหญ่และ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ต้นแบบ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* NCPPB 2968^{T} (สหรัฐอเมริกา) และสายพันธุ์จากต่างประเทศ เช่น LMG909 (ไอวอรี่โคสต์), ICMP9086 (ฮังการี), LA127-1 (เรอูนียง), LD128-2 (เซเชลส์), LE82-2 (มอริเชียส), ICMP5051 (นิวซีแลนด์), BRIP38997 (ออสเตรเลีย) และสายพันธุ์อื่น ๆ รวมถึงสายพันธุ์จากมะเขือเทศ เช่น CFBP5597 (French West Indies), LMG922 (สหรัฐอเมริกา), JW6 (เรอูนียง), LB226-1 (คอโมโรส), LMG914 (เซเนกัล) และ NCPPB1227 (พอร์โทรีโก)

กลุ่มย่อยที่ 2 พบเฉพาะในพริก ได้แก่ ICMP3381 (อินเดีย), LMG918 (อินเดีย) และ LD53 (เกรเนดา) โดยมี DOAC-B1685 เพียงไอโซเลตเดียวจากไทยที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิด

กลุ่มย่อยของ Xee ที่พบในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาโดย Hamza et al. (2010) และ Roach et al. (2017) ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ต้นแบบ ส่วนกลุ่มสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากอินเดียและเกรเนดาที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนจากสายพันธุ์ต้นแบบนั้น พบว่าในยีน *atpD* ของกลุ่มนี้ไม่มีบริเวณที่เกิดการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม (recombinant region) ในขณะที่สายพันธุ์ต้นแบบมีบริเวณดังกล่าว (Hamza et al., 2010; Hamza et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่ามีไอโซเลตจากพริกในประเทศไทยเพียงไอโซเลตเดียวจัดอยู่ในกลุ่มย่อยนี้ ซึ่งบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ของการเคลื่อนย้ายเชื้อระหว่างประเทศผ่านการผลิตหรือการค้าเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากอินเดีย

2. กลุ่ม *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) จำนวน 18 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลตจากมะเขือเทศทั้งหมด โดยไอโซเลตจากมะเขือเทศในไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ต้นแบบ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* NCPPB4321^{T} (สหรัฐอเมริกา) และสายพันธุ์จากต่างประเทศ เช่น BRIP62398 (ออสเตรเลีย), LB273-2 (มายอต), LB101-1(เซเชลส์), LH3 (มอริเชียส) และสายพันธุ์อื่น ๆ สอดคล้องกับการศึกษา Roach et al. (2017) และกลุ่มย่อยซึ่งมีเฉพาะไอโซเลตจากประเทศไทย

การศึกษานี้พบว่าเชื้อ Xee และ Xep เป็นสาเหตุหลักของโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศในประเทศไทย โดยเชื้อ Xep พบเฉพาะในมะเขือเทศ ส่วนเชื้อ Xee พบระบาดในพริกเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้พบ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศเพียงไอโซเลตเดียวที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ Xee ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถเข้าทำลายได้ทั้งพริกและมะเขือเทศ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Jones et al. (1998) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศในฟลอริดา โดยเดิมเชื้อ Xee เป็นสาเหตุเพียงชนิดเดียว แต่ในช่วงปี 1991-1994 ซึ่งเป็นระยะเวลาเพียง 3 ปี พบว่าเชื้อ Xep กลายเป็นสาเหตุหลักแทนการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดจากความสามารถของเชื้อ Xep ในการผลิตแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ Xee ส่งผลให้ Xep มีความได้เปรียบในการแข่งขันเหนือเชื้อชนิดอื่น (Hert et al., 2005; Lue et al., 2010) นอกจากนี้ เชื้อ Xep ยังมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 30°ซ. (Araújo et al., 2011) ความสามารถในการปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิสูงนี้จึงอาจช่วยสนับสนุนการแพร่ระบาดของเชื้อ Xep ได้ดีในพื้นที่เขตร้อน จากปัจจัยทั้งสองนี้อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้พบเชื้อ Xee เพียงไอโซเลตเดียวที่ก่อโรคใบจุดมะเขือเทศในประเทศไทย

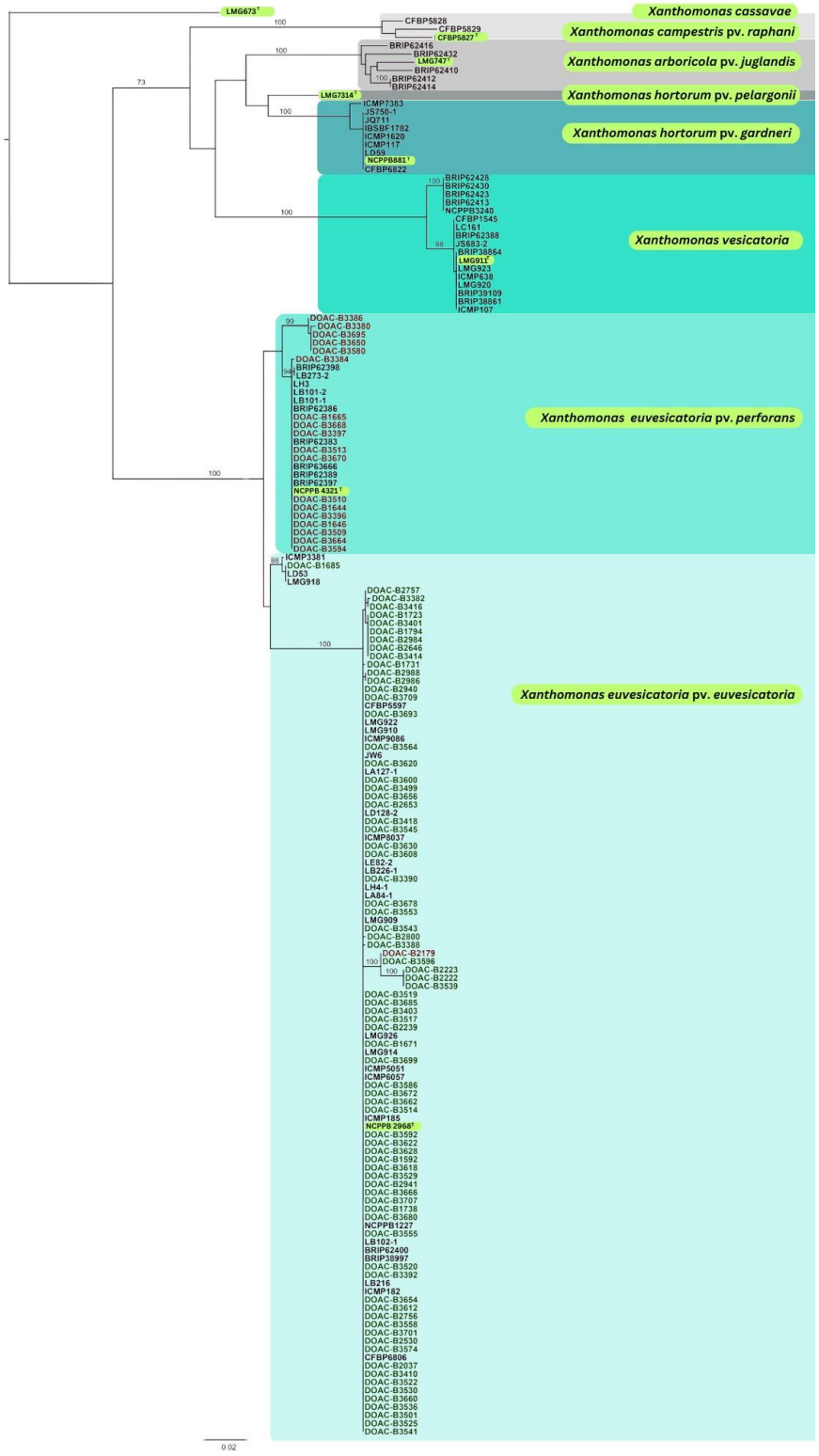

Figure 3 A maximum - likelihood tree, based on concatenated nucleotide sequences of *atpD*, *dnaK*, *efp,* and *gyrB*, illustrates the relationships among *Xanthomonas* spp. 96 isolates from Thailand and the type strains of various species. Bootstrap values, calculated from 1,000 replicates, are indicated at the branch nodes. The bacterial strains in this study from chili are represented by green text, while the strains from tomato are represented by red text.

เชื้อ Xep เป็นสาเหตุหลักของโรคใบจุดในมะเขือเทศ โดยมีรายงานครั้งแรกในรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา เมื่อปี 1991 และปัจจุบันได้แพร่กระจายไปทั่วโลก รวมถึงในพื้นที่ที่ไม่เคยพบโรคมาก่อนจากการศึกษาของ Timilsina et al. (2025) ได้ทำการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ Xep จำนวน 270 ไอโซเลต จาก 13 ประเทศ พบว่ามีการแบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็นหลาย cluster โดยเชื้อ Xep จากพื้นที่ผลิตเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทยจัดอยู่ใน cluster 10 ร่วมกับเชื้อจากไนจีเรีย สอดคล้องกับการศึกษาของ Preangtong et al. (2025) และยังพบใน cluster 5 (ซึ่งประกอบด้วยไอโซเลตจากไทย สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก และบราซิล) เชื้อใน cluster 10 มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic divergence) อย่างชัดเจน และมีการตรวจพบ effector xopAJ ซึ่งไม่พบใน cluster อื่น ๆ ลักษณะนี้ทำให้เชื้อกลุ่มนี้ต้องได้รับการเฝ้าระวังเป็นพิเศษ เนื่องจากอาจพัฒนาไปสู่สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงขึ้น หรือหลบเลี่ยงภูมิต้านทานได้ทำให้การควบคุมโรคยากขึ้น

อย่างไรก็ตาม พบข้อมูลการศึกษาของ Jibrin et al. (2022) ระบุเชื้อ Xep สายพันธุ์ NI1 ในไนจีเรียเป็น race T5 สายพันธุ์ใหม่ของ Xep โดยพบว่า LPS cluster ของสายพันธุ์ NI1 มีความคล้ายกับ *X. translucens* pv. *translucens* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในข้าวบาร์เลย์ และพบ effector ที่เดิมพบเฉพาะใน *X. hortorum* pv. *gardneri* เช่น AvrHah1 และ XopAQ ในสายพันธุ์ NI1 ซึ่งแบคทีเรียชนิดดังกล่าวไม่เคยพบระบาดในประเทศไทย การพบ effector ผสมลักษณะนี้ยืนยันการเกิด recombination หลายครั้งและมีการแลกเปลี่ยนกับหลายชนิดไม่ใช่แค่ Xep และ Xee แต่รวมถึง xanthomonads อื่น ๆ ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และก่อให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากสายพันธุ์เดิม

การพบเชื้อ Xep ในประเทศไทยบ่งชี้ว่าประเทศไทยอาจเป็นหนึ่งในแหล่งกำเนิด หรือเป็นแหล่งสะสมความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อกลุ่มนี้ เนื่องจาก cluster 10 ยังพบการกระจายตัวในวงจำกัด แต่มีความเสี่ยงที่จะแพร่กระจายไปยังภูมิภาคอื่น ๆ ผ่านเมล็ดพันธุ์หรือการค้าระหว่างประเทศ การที่เชื้อจากประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง แสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการเฝ้าระวังและตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้ออย่างต่อเนื่อง ทั้งในแปลงผลิตผลสดและแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ ควบคู่ไปกับมาตรการควบคุมและตรวจสอบเมล็ดพันธุ์นำเข้า–ส่งออกอย่างเข้มงวด เพื่อป้องกันการแพร่กระจายข้ามทวีป อีกทั้งควรสนับสนุนการวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศที่ต้านทานหรือทนทานต่อเชื้อในกลุ่มนี้

ทั้งนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบการระบาดของเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *X. vesicatoria* และ *X. hortorum* pv. *gardneri* ในประเทศไทย โดยเชื้อ *X. vesicatoria* มีรายงานการกระจายตัวออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์จากนิวซีแลนด์และเอธิโอเปีย กลุ่มสายพันธุ์จากอเมริกาใต้และเอธิโอเปีย และกลุ่มสายพันธุ์จากมหาสมุทรอินเดียตะวันตกเฉียงใต้ (Timilsina et al., 2015) สำหรับเชื้อ *X. hortorum* pv. *gardneri* พบได้ในพื้นที่ที่มีความสูงกว่าระดับน้ำทะเล (Araújo et al., 2017) และมีความรุนแรงมากกว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดชนิดอื่น ๆ ที่อุณหภูมิ 20°ซ. (Araújo et al., 2011) ปัจจุบันพบว่าเชื้อ *X. hortorum* pv. *gardneri* และ *X. vesicatoria* มีการแพร่กระจายเพิ่มขึ้นในภูมิภาคใกล้เคียง โดยเชื้อ *X. hortorum* pv. *gardneri* พบในแหล่งปลูกมะเขือเทศเพื่อการค้าในมาเลเซีย (Rashid et al., 2016) ขณะที่เชื้อ *X. vesicatoria* พบในไต้หวัน (Lue et al., 2010; Burlakoti et al., 2018) และออสเตรเลีย (Roach et al., 2017) นอกจากนี้ ยังไม่พบเชื้อในกลุ่ม *X. campestris* pv. *raphani* และ *X. arboricola* ซึ่งมีรายงานในต่างประเทศว่าสามารถก่อให้เกิดโรคในพริกและมะเขือเทศได้ (Punina et al., 2009; Myung et al., 2010; Roach et al., 2017)

ผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ amylolytic และ pectolytic ไม่สามารถใช้แยกชนิดของเชื้อได้อย่างชัดเจนตามรายงานของ Jones et al.

(2004) อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ MLSA โดยไอโซเลตจากมะเขือเทศส่วนใหญ่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะของ Xep เมื่อใช้วิธีตามรายงานของ Ning (2012) ขณะที่ไอโซเลตจากพริก รวมทั้งไอโซเลต DOAC - B2179 จากมะเขือเทศ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะของ Xee ตามวิธีการของ Koenraadt et al. (2009) ซึ่งทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกับการจำแนกชนิดด้วย MLSA แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบด้วย PCR ตามวิธีที่มีการรายงานดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ

สรุปผลการทดลอง

จากการรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ โดยการสำรวจพื้นที่ปลูกทั่วประเทศไทยและจากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2544 - 2568 พบเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 96 ไอโซเลต แยกได้จากพริก 77 ไอโซเลต และจากมะเขือเทศ 19 ไอโซเลต เชื้อทั้งหมดสามารถก่อโรคในพืชได้ โดยไอโซเลตจากพริกสามารถก่อโรคได้ทั้งในพริกและมะเขือเทศ ขณะที่ไอโซเลตจากมะเขือเทศก่อโรคได้เฉพาะในมะเขือเทศ

การตรวจสอบคุณสมบัติด้านเอนไซม์พบว่าไอโซเลตจากมะเขือเทศส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ amylolytic และ pectolytic ได้ ส่วนไอโซเลตจากพริกส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าไอโซเลตจากมะเขือเทศให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* ขณะที่ไอโซเลตจากพริกและ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศ ให้แถบขนาด 173 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

ผลการจำแนกชนิดเชื้อด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) พบว่าเชื้อจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* จำนวน 78 ไอโซเลต พบในไอโซเลตจากพริกทั้งหมด และ 1 ไอโซเลตจากมะเขือเทศ และ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* จำนวน 18 ไอโซเลต พบเฉพาะในมะเขือเทศ ไม่พบเชื้อในกลุ่ม *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri*, *X. campestris* pv. *raphani* และ *X. arboricola* ในประเทศไทย ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* และ *X. euvesicatoria* pv. *Perforans*

ข้อมูลจากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญในการสนับสนุนการปฏิบัติงานขององค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ที่เกี่ยวข้องกับการติดตามและเฝ้าระวังศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช และการปรับปรุงบัญชีศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สันติพงศ์ สิทธิธนสิน จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์ ชัญญานุช กอรักงาม ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล วิชัย โฆสิตรัตน และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2563. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศในประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร. 36: 80-88.

Araújo, 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 Pathology. 66: 159-168. doi: 10.1111/ppa.12543.

Araújo, E.R., R.C. Pereira, M.A.S.V. Ferreira, A.C. Café-Filho, A.W. Moita and A.M. Quezado-Duval. 2011. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato

bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. Acta Horticulturae. 914: 39-42.

Bouzar, H., J.B. Jones, G.V. Minsavage, R.E. Stall and J.W. Scott. 1994. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. Phytopathology. 84(1): 39-43.

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 Disease. 102: 1348-1356. doi: 10.1094/PDIS-04-17-0465-RE.

Constantin, E.C., I. Cleenwerck, M. Maes, S. Baeyen, C. Van Malderghem and P. De Vos. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. Plant Pathology. 65: 792-806. doi: 10.1111/ppa. 12461.

Doidge, E.M. 1921. A tomato canker. Ann. Appl. Biol. 7: 407-430.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.

Hamza, A.A., I. Robene-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 Disease. 94: 993-999. http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0993.

Hamza, A.A., I. Robene-Soustrade, E. Jouen, P. Lefeuvre, F. Chiroleu, M. Fisher- Le Saux, L. Gagnevin and O. Pruvost. 2012. Multilocus sequence analysis-and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. Systematic and Applied Microbiology. 35: 183-190.

Hert, A.P., P.D. Roberts, M.T. Momol, G.V. Minsavage, S.M. Tudor-Nelson, and J.B. Jones. 2005. Relative importance of bacteriocin- like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* Tomato race 1 strains.Applied and Environmental Microbiology Journal. 71: 3581-3588.

Jibrin, M.O., S. Timilsina, G.V. Minsavage, G.E. Vallad, P.D. Roberts, E.M. Goss and J.B. Jones. 2022. Bacterial spot of tomato and pepper in Africa: diversity, emergence of T5 race, and management. Frontiers in Microbiology. 13: 835647. doi: 10.3389/ fmicb. 2022.835647.

Jones, J.B., H. Bouzar, G.C. Somodi, R.E. Stall, K. Pernezny, G. El-Morsy and J.W. Scott. 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. Phytopathology. 88: 33-38.

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 Systematic and Applied Microbiology. 27: 755-762.

Jones, J.B., H. Bouzar, R.E. Stall, E.C. Almira, P.D. Roberts, B.W. Bowen, J. Sudberry, P.M. Strickler and J. Chun. 2000. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50: 1211-1219. doi: 10.1099/ 00207713-50-3-1211.

Jones, J.B., R.E. Stall, J.W. Scott, G.C. Somodi, H. Bouzar and N.C. Hodge. 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Plant Disease. 79: 395-398.

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, pp. 99-102. In: II International Symposium on Tomato Diseases 808. International Society for Horticultural Science. Belgium.

Kumar, S., G. Stecher, M. Suleski, M. Sanderford, S. Sharma and K. Tamura. 2024. Molecular evolutionary genetics analysis version 12 for adaptive and green computing. Molecular Biology and Evolution. 41: 1-9.

Lue, Y.S., W.L. Deng, Y.F. Wu, A.S. Cheng, S.T. Hsu and K.C. Tzeng. 2010. Characterization of Xanthomonas associated with bacterial spot of tomato and pepper in Taiwan. Plant Pathology Bulletin. 19: 181-190.

Morinière, L., A. Burlet, E.R. Rosenthal, X. Nesme, P. Portier and C.T. Bull. 2020. Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol *et al*. 2000 emend. Timilsina *et al*. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin *et al*. 1995. Systematic and Applied Microbiology. 43: 126087.

Myung, I.-S., I.H. Jeong, S.Y. Moon, S.W. Lee and H.S. Shim. 2010. A new disease, Arboricola leaf spot of bell pepper, caused by *Xanthomonas arboricola*. Plant Disease. 94(2): 271.

Ning, F.Y. 2012. Identification and detection of *Xanthomonas perforans* by the polymerase chain reaction technique and characterization of *X. perforans* strains in Taiwan by DNA polymorphism. Master's thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan.

Pohronezny, K., and R.B. Volin. 1983. The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. Hort Science. 18: 69-70.

Preangtong, Y., S. Patarapuwadol, P. Phiriyangkul, T. Kanhayart, N. Kositcharoenkul, W. Kositratana and J. Watcharachaiyakup. 2025. Characterisation and genomic diversity of *Xanthomonas* species causing bacterial spot disease of tomato and pepper in Thailand. Plant Pathology. 74: 1315-1334. https://doi.org/ 10.1111/ ppa.14094.

Punina, N.V., A.N. Ignatov, E.S. Pekhtereva, K.P. Kornev, E.V. Matveeva, V.A. Polityko, N.I. Budenkov and N.W. Schaad. 2009. Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* on tomato plants in the Russian federation. Acta Horticulturae. 808: 287-290.doi:10.17660/actahortic. 2009.808.44.

Rashid, T.S., S. Kamaruzaman, E. Golkhandan, A. Nasehi and H.K. Awla. 2016. First report of *Xanthomonas gardneri* causing bacterial spot of tomato in Malaysia. Plant Disease. 100: 854.

Roach, R., R. Mann, C.G. Gambley, R.G. Shivas and B. Rodoni. 2017. Identification of Xanthomonas species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. European Journal of Plant Pathology. 150: 595-608.

Schaad, N.W., J.B. Jones and G.H. Lacy. 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. Minnesota 373 p.

Stall, R.E., C. Beaulieu, D. Egel, N.C. Hodge, R.P. Leite, G.V. Minsavage, H. Bouzar, J.B. Jones, A.M. Alvarez and A.A. Benedict. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. International journal of systematic bacteriology. 44: 47-53.

Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies". Bioinformatics. 30: 1312-1313.

Sutic, D. 1957. Bakterioze crvenog patlidzana (tomato bacteriosis). Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd) 6, 1-65. English summary. Review of Applied Mycology. 36: 734-735.

Timilsina, S., F. Iruegas - Bocardo, M.O. Jibrin, A. Sharma, A. Subedi, A. Kaur, G.V. Minsavage, J.C. Huguet-Tapia, J. Klein-Gordon, P. Adhikari, T.B. Adhikari, G. Cirvilleri, L.B.T. de la Barrera, E. Bernal, T.C. Creswell, T.T.K. Doan, T.A. Coutinho, D.S. Egel, R. Félix-Gastélum, D.M. Francis, M. Kebede, M.L. Ivey, F.J. Louws, L. Luo, E.T. Maynard, S.A. Miller, N.T.T. Nguyen, E. Osdaghi, A.M. Quezado-Duval, R. Roach, F. Rotondo, G.E. Ruhl, V.M. Shutt, P. Thummabenjapone, C. Trueman, P.D. Roberts, J.B. Jones, G.E. Vallad and E.M. Goss. 2025. Diversification of an emerging bacterial plant pathogen; insights into the global spread of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. PLoS Pathogens. 21(4) : e1013036. https://doi.org/10.1371/ journal.ppat.1013036.

Timilsina, S., M.O. Jibrin, N. Potnis, G.V. Minsavage, M. Kebede, A. Schwartz, R. Bart, B. Staskawicz, C. Boyer, G.E. Vallad, O. Pruvost, J.B. Jones and E.M. Goss. 2015. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. Applied and Environmental Microbiology Journal. 81: 1520-1529.

Uematsu, T., S. Chuenchitt, S. Kanjanarat, S. Vitithajinda, N. Napheerong, S. Benjathikul, S. Nilmanee, W. Dhirabhava and D. Buangsuwon. 1983. Bacterial diseases on economic crops in Thailand. Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Thailand. 266 p.

Vauterin, L., J. Swings, L. Vauterin, J. Swings, K. Kersters, M. Gillis, T.W. Mew, M. N. Schroth, N.J. Palleroni, D.C. Hildebrand, D.E. Stead, E.L. Civerolo, A.C. Hayward, H. Maraite, R.E. Stall and J.F. Bradbury. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. International journal of systematic bacteriology. 40: 312-316.

Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International journal of systematic bacteriology. 45(3): 472-489.

Young, J.M., D.W. Dye, J.F. Bradbury, C.G. Panagopoulos and C.F. Robbs. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research. 21: 153-177.