

การตรวจวินิจฉัย ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’
 ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า
 Interception on ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’
 the quarantine pest Associated with imported Seed Potatoes

สุรศักดิ์ แสนโคตร^{1/} วันเพ็ญ ศรีชาติ^{2/} โสภามีอำนาจ^{1/}
 จันทร์พิศ เดชหามาศย์^{1/} วาสนา รุ่งสว่าง^{1/}

^{1/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 2

Abstract

Diagnosis of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ the cause of Zebra chip disease in seed potatoes. The sampling of imported seed potato during 2021 to 2023 has been imported from 6 countries: 1) Commonwealth of Australia imported 49 times, total weight 4,316,320,000.00 kilograms. 2) Canada imported 10 times, total weight 2,349,000,000.00 kilograms. 3) Kingdom of the Netherlands imported 7 times, total weight 337,500,000.00 kilograms. 4) Kingdom of New Zealand imported 3 times, total weight 175,000,000.00 kilograms, 5) Kingdom of Scotland, imported 62 times, total weight 12,422,750,000.00 kilograms, and 6) United States, imported 3 times, total weight 390 kilograms, by examining symptoms of Zebra chip disease from seed potato imported using the technique Biomolecules No symptoms of disease from the tubers and the causative agent were found using the Nested-PCR technique and monitoring of imported seed potato in the planting area. Wiang Pa Pao District, Thoeng District, Chiang Rai Province, Mae Chaem District, Chiang Mai Province, Phop Phra District, Tak Province, Chiang Kham District, Phayao Province, Phang Khon District, Mueang District, Sakon Nakhon Province and Wang Yang District Nakhon Phanom Province Zebra chip symptoms has not been found in potato fields.

Keywords : Potato Seed potato Zebra chip Nested-PCR

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัย ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ สาเหตุโรค Zebra chip ในหัวมันฝรั่งการสุ่มตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้าระหว่างปี พ.ศ. 2564 ถึง พ.ศ. 2566 มีการนำเข้าจาก 6 ประเทศ ได้แก่ 1) เครือรัฐออสเตรเลีย นำเข้าจำนวน 49 ครั้ง น้ำหนักรวม 4,316,320,000.00 กิโลกรัม 2) แคนาดา นำเข้าจำนวน 10 ครั้ง น้ำหนักรวม 2,349,000,000.00 กิโลกรัม 3) ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ นำเข้าจำนวน 7 ครั้ง น้ำหนักรวม 337,500,000.00 กิโลกรัม 4) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 175,000,000.00 กิโลกรัม 5) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ นำเข้าจำนวน 62 ครั้ง น้ำหนักรวม 12,422,750,000.00 กิโลกรัม และ 6) สหรัฐอเมริกา นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 390 กิโลกรัม โดยการตรวจสอบอาการของโรค Zebra chip จากหัวมันฝรั่งนำเข้าร่วมกับเทคนิคชีวโมเลกุล ยังไม่พบอาการของโรคจากหัวมันฝรั่งและเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิค Nested-PCR และการติดตามสำรวจแปลงปลูกหัวมันฝรั่งนำเข้าในพื้นที่แปลงปลูก อำเภอเวียงป่าเป้า อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา อำเภอพิงโคน อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร และอำเภอวังยาง จังหวัดนครพนม ยังไม่พบกลุ่มอาการของโรค Zebra chip ในแปลงปลูกมันฝรั่ง

คำหลัก : หัวมันฝรั่ง Zebra chip Nested-PCR

คำนำ

เชื้อ ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ ซึ่งเป็นสาเหตุโรค Zebra chip ในหัวมันฝรั่ง และมีพืชอาศัยในวงศ์มะเขือ (*Solanaceae*) และวงศ์ผักชี (*Apiaceae*) แต่พบว่าประเทศไทยมีการประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลพริกสดจากนิวซีแลนด์ พ.ศ. 2558 (กรมวิชาการเกษตร, 2558) รายชื่อศัตรูพืชกักกันของผลพริกสดจากนิวซีแลนด์ แนบท้ายประกาศกรมวิชาการเกษตร กำหนดให้เชื้อ ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ เป็นศัตรูพืชกักกัน ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการตรวจสอบเชื้อนี้กับหัวมันฝรั่งนำเข้าเพื่อป้องกันการติดเข้ามาของเชื้อกับหัวมันฝรั่ง และป้องกันการเข้ามาแพร่ระบาด สร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อได้แก่ มะเขือเทศ พริก แครอท และขึ้นฉ่าย ซึ่งเชื้อ ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียมีรูปร่างสัณฐานวิทยาแบบแท่งและมีขนาดประมาณ 0.2 ไมโครเมตร กว้างและยาว 4 ไมโครเมตร โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีเฉพาะในท่ออาหารพืช (phloem-limited) ในต่างประเทศพบรายงานครั้งแรกในรัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2551 โดยพบเชื้อนี้ในมะเขือเทศและมันฝรั่ง มีเพลี้ยไก่แจ้ (*Psyllid; Bactericera cockerelli*) เป็นแมลงพาหะนำโรค โดยนอกจากนี้มีการรายงานการตรวจพบเชื้อนี้ในมันฝรั่ง มะเขือเทศ และพริก รวมถึงมีการรายงานพบในแครอท โดยมีเพลี้ยไก่แจ้แครอท (*Psyllid, Trioza apicalis*) เป็นแมลงพาหะนำโรค

และพืชวงศ์ผักชี (Apiaceae) มีแมลงพาหะของโรคคือเพลี้ยไก่แจ้ *Trioza apicalis* และเพลี้ยไก่แจ้ *Bactericera trigonica*

ลักษณะอาการในมันฝรั่ง แสดงอาการเริ่มแรกกับมันฝรั่งสายพันธุ์ Atlantic มีลักษณะใบม้วนงอและบริเวณใบยอดเป็นสีม่วง การเข้าทำลายในหัวมันฝรั่งสดสายพันธุ์ Shepody แสดงอาการสีของเนื้อแป้งในหัวเข้มและจางสลับกันจนคล้ายลายสีก้นตัวของม้าลาย เมื่อนำมันฝรั่งไปทอดจะเห็นลักษณะเป็นลวดลายสีจางเข้มสลับกันชัดเจน แหล่งแพร่ระบาด โมร็อกโก อิสราเอล ออสเตรเลีย เบลเยียม เอสโตเนีย ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส เยอรมนี กรีซ อิตาลี นอร์เวย์ โปรตุเกส สเปน สวีเดน สหราชอาณาจักร สกอตแลนด์ เอลซัลวาดอร์ กัวเตมาลา ฮอนดูรัส สหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์ และเกาะนอร์ฟอล์ก ส่วนการจัดจำแนก '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' แบ่งได้เป็น 5 haplotypes ตามชนิดแมลงพาหะและพืชอาศัยจากพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ haplotype A B C D และ E นั้น เพื่อเป็นการป้องกันมิให้โรค Zebra chip ที่เกิดจากเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' เข้ามาระบาดในพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งและพืชอาศัยอื่นในประเทศไทย จึงได้นำเอาวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยที่รวดเร็ว มีความแม่นยำสูงและค่าใช้จ่ายต่อการตรวจที่เหมาะสม เพื่อเป็นการสกัดกั้นไม่ให้เชื้อสาเหตุโรคที่อาจติดมากับหัวพันธุ์จากต่างประเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ และใช้เป็นข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืชเพื่อใช้ปรับปรุงเงื่อนไขการนำเข้าให้ครอบคลุมทุกพืชอาศัยต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก มาร์กเกอร์ คัตเตอร์
3. วัสดุและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น สารเคมีต่างๆ ชุดสกัดดีเอ็นเอ ไปเปอร์ต ทิป ปีกเกอร์ ไมโครทิว เครื่อง PCR เครื่องส่องและบันทึกภาพจุล ฯลฯ
4. โรงเรือนปลูกพืช ถุงพลาสติกปลูกพืช ดินปลูก
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นพืชอาศัยที่แยกเชื้อได้

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ *Candidatus Liberibacter solanacearum* ที่มีรายงานการเข้าทำลายในหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศคู่ค้าที่ประเทศไทยมีการนำเข้า รวมทั้งข้อมูลเทคนิควิธีการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter solanacearum* และมาตรการการป้องกันการเข้ามาของเชื้อนี้

2. สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ที่มีการนำเข้าจำนวน 600 หัวต่อครั้ง
3. การตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า และผ่าหัวมันฝรั่งเป็นสังเกตอาการ zebra chip ภายในหัวมันฝรั่ง บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ หากตรวจพบลักษณะอาการเป็นลายน้ำสงสัย นำหัวมันฝรั่งไปปลูกเพื่อสังเกตอาการและเก็บตัวอย่างใบหรือกิ่งมาตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกต่อไป
4. การตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกเชื้อ *Candidatus Liberibacter solanacearum* โดยใช้เทคนิค Conventional PCR ตามวิธีการดังนี้
 - 4.1 สกัดสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ (Total DNA) จากใบและก้านที่ปลูกจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าที่แสดงอาการ zebra chip ที่หัวหรือส่วนของพืชโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปหรือการสกัดด้วยวิธี CTAB (Munyanza และคณะ, 2010)
 - 4.2 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Candidatus Liberibacter solanacearum* ด้วยเทคนิค Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อดังกล่าว และ ใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน 16S bacterial and Plant chromosomal เป็น Internal control ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR 1400-1500 bp
 - 4.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้วุ้นอะกาโรส (Agarose Gel) 2 เปอร์เซ็นต์ ให้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45-60 นาที
 - 4.4 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
 - 4.5 วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง โดยจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNASTAR และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank
5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงของบริษัทที่นำเข้าในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ตาก พะเยา สกลนคร และนครพนม
6. การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลการตรวจพบและไม่พบเชื้อ *Candidatus Liberibacter solanacearum* จำนวนครั้ง ปริมาณ และประเทศผู้ส่งออกหัวพันธุ์มันฝรั่ง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ตุลาคม 2564 ถึง 30 กันยายน 2566

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูก หัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าของบริษัทเอกชนหรือเกษตรกรในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ตาก พะเยา สกลนคร และ นครพนม

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'

ประเทศไทยมีเงื่อนไขอนุญาตให้นำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก 7 ประเทศ ได้แก่

- 1) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากแคนาดา พ.ศ. ๒๕๕๒
- 2) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากราชาอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ พ.ศ. ๒๕๕๒
- 3) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากนิวซีแลนด์ พ.ศ. ๒๕๕๒
- 4) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ พ.ศ. ๒๕๕๒
- 5) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสหรัฐอเมริกา (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๔
- 6) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากเครือรัฐออสเตรเลีย พ.ศ. ๒๕๕๒
- 7) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากรัฐอิสราเอล พ.ศ. ๒๕๕๒

เชื้อแบคทีเรีย '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' สาเหตุโรค Zebra chip ในมันฝรั่ง (EPPO, 2024)

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific Names) '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Liefting et al., 2009

ชื่อสามัญ (Common Name) Zebra chip

ชื่อวิทยาศาสตร์อื่น (Other Scientific Names) '*Candidatus Liberibacter psyllaurens*'

Hansen et al., 2008 *Liberibacter psyllaurens* *Liberibacter solanacearum*

แบคทีเรียชนิดนี้มีรายงานพบครั้งแรกก่อโรคในพืชตระกูลพริกมะเขือเทศ (Solanaceae) และมีความสัมพันธ์กับเพลี้ยไก่แจ้จากประเทศนิวซีแลนด์และสหรัฐอเมริกา ได้ถูกเสนอชื่อระบุเป็น '*Candidatus Liberibacter psyllaurens*' (Hansen et al., 2008) ในครั้งแรก และต่อมาได้ถูกเสนอชื่อใหม่เป็น '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Lso) (Liefting et al., 2009c) และถูกใช้เรียกเป็นชื่อวิทยาศาสตร์จนถึงปัจจุบัน ซึ่งจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้ จึงมีสถานะเรียกเป็น '*Candidatus*' (Ca.) เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถจัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ถึง 10 halotype ตามชนิดพืชอาศัยและแมลงพาหะ ซึ่งแต่ละ halotype มีความแตกต่างกันระหว่างพืชอาศัยและชนิดเพลี้ยไก่แจ้ที่เป็นพาหะ จากข้อมูลการ

รายงานพบว่าการระบาดของเชื้อโดยส่วนใหญ่พบกลุ่มของ haplotypes 4 ชนิด ได้แก่ A, B, F และ G ในพืชอาศัยมันฝรั่งและพืชชนิดอื่น ๆ ในตระกูลพริกมะเขือเทศ และอีก 4 ชนิด ได้แก่ haplotype C, D, E และ H-European ในแครอทและพืชชนิดอื่นในพืชตระกูลผักชี พร้อมกับมีการรายงานเพิ่มเติมว่า haplotype H-European พบในพืชวงศ์ผักไผ่ (Polygonaceae) เป็นพืชอาศัยของเชื้อด้วย และตรวจพบ haplotypes H-North America และ U ไม่ก่อโรคในพืชวงศ์ผักบุ้ง (Convolvulaceae) และ พืชวงศ์กะดังช้าง (Urticaceae) ตามลำดับ haplotype H-North America นั้นพบรายงานในประเทศเม็กซิโก ซึ่งมีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมจาก haplotype H-European ที่มีรายงานพบในยุโรปตอนเหนือ สำหรับข้อมูลการสำรวจในประเทศยุโรปพบ haplotypes หลายชนิดในพืชตระกูลผักชี เช่นเดียวกันกับการพบเชื้อในแมลงเพลี้ยไก่แจ้พาหะ (Psyllid) หลายชนิด แต่ชนิด haplotypes ที่ก่อโรคในพืชตระกูลพริกมะเขือเทศยังไม่พบรายงานในประเทศยุโรป

สัณฐานวิทยา

เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน (Liefting และคณะ., 2009a; Secor และคณะ., 2009) ขนาดความกว้างประมาณ 0.2 ไมโครเมตร และยาว 4 ไมโครเมตร (Liefting และคณะ., 2009a)

พืชอาศัย

‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ เป็นเชื้อก่อโรคในพืชตระกูลพริกมะเขือเทศ เช่น มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) พริก (*Capsicum annuum*) มะเขือ (*Solanum melongena*) tomatillo (*Physalis peruviana*) ทามาริลโล (*Solanum betaceum*) ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) และวัชพืชหลายชนิดในวงศ์ Solanaceae เชื้อสามารถถ่ายทอดได้ด้วยแมลงพาหะคือเพลี้ยไก่แจ้ชนิด *Bactericera cockerelli* และสามารถก่อโรคในพืชตระกูลผักชี (Apiaceae) เช่น แครอท (*Daucus carota*) คื่นฉ่าย (*Apium graveolens*) Celeriac (*A. graveolens rapaceum*) parsnip (*Pastinaca sativa*) ผักชีฝรั่ง (*Petroselinum crispum*) ยี่หระ (*Anthriscus cerefolium*) เซอร์วิล (*Anthriscus cerefolium*) และวัชพืชหลายชนิดในวงศ์ Apiaceae พบการระบาดของเชื้อในยุโรปตอนเหนือในพืชตระกูลผักชี โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ชนิด *Trioza apicalis* (carrot phyllid) เป็นแมลงพาหะ ส่วนพื้นที่ยุโรปตอนใต้และเมดิเตอร์เรเนียนพบเพลี้ยไก่แจ้ *B. trigonica* เป็นแมลงพาหะ

จากรายงานผลการวิจัยหลายแหล่งพบว่าเชื้อ ‘*Ca L. Solanacearum*’ มีพืชอาศัยกว้างไม่ได้จำกัดเฉพาะในพืชวงศ์พริกมะเขือเทศ (Solanaceae) และพืชวงศ์ผักชี (Apiaceae) พบผลการศึกษากการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า พืชในวงศ์ผักไผ่ (Convolvulaceae) มันเทศ (*Ipomoea batatas*) และหยู่สนาม (*Convolvulus arvensis*) ให้ผลปฏิกิริยาบวกในตัวอย่างที่มีการปลูกเชื้อด้วยแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ชนิด *B. cockerelli* และในปี ค.ศ. 2018 รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา มี

รายงานพบเชื้อ 'Ca L. Solanacearum' ในตำแย (*Urtica dioica*) ประเทศฟินแลนด์พบเพลี้ยไก่อั่วชนิด *Trioza urticae* ในเป็นพาหะของเชื้อ รายงานล่าสุดในแคริฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกาตรวจพบเชื้อ 'Ca L. Solanacearum' ในพืชวงศ์ Polygonaceae (*Fallopia convolvulus* และ *Persicaria lapathifolia*)

พืชอาศัยได้แก่: *Aegopodium podagraria*, *Anthriscus cerefolium*, *Anthriscus sylvestris*, *Apiumgraveolens* var. *rapaceum*, *Apium graveolens*, *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Daucus aureus*, *Daucus carota*, *Fallopia convolvulus*, *Foeniculum vulgare*, *Galium* sp., *Heracleum sphondylium*, *Lycium barbarum*, *Nicotiana tabacum*, *Pastinaca sativa*, *Persicaria lapathifolia*, *Petroselinum crispum*, *Physalis ixocarpa*, *Physalis peruviana*, *Physalis virginiana*, *Solanum americanum*, *Solanum betaceum*, *Solanum dulcamara*, *Solanum elaeagnifolium*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum melongena*, *Solanum pseudocapsicum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum umbelliferum*, *Urtica dioica*

ลักษณะทางชีววิทยา

เชื้อ 'Ca L. Solanacearum' จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณภายในท่ออาหารของพืช (phloem-limited) และมีการถ่ายทอดเชื้อไปยังต้นพืชอื่นด้วยแมลงพาหะกลุ่มเพลี้ยไก่อั่ว (psyllid) (Liefting *et al.*, 2009c)

เชื้อ 'Ca L. Solanacearum' halotypes A และ B ถ่ายทอดโดยเพลี้ยไก่อั่วชนิด *Bactericera cockerelli* ในตระกูลพริกมะเขือเทศ haplotype C ถ่ายทอดเชื้อโดยเพลี้ยไก่อั่วชนิด *Trioza apicalis* ในพืชตระกูลผักชี และสำหรับ halotype D และ E ถ่ายทอดเชื้อโดย *Bactericera trigonica* แม้ว่า *B. tremblayi* (หัวหอม/ต้นหอม psyllid) และ *B. nigricornis* อาจได้รับ 'Ca. L. solanacearum' โดยการเข้าทำลายพืชวงศ์ Apiaceae ในประเทศสเปนพบรายงานว่าเพลี้ยไก่อั่วชนิด *B. Tremblayi* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังแครอทได้ และไม่น่าที่จะเป็นแมลงพาหะในแครอท การถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยไก่อั่ว *B. nigricornis* ยังอยู่ระหว่างการศึกษา และมีการตรวจพบ haplotype U ในเพลี้ยไก่อั่วชนิด *Trioza urticae* จากต้นตำแยที่เข้าทำลาย ข้อมูลปัจจุบันจากการศึกษาพบว่าเชื้อ Ca L. solanacearum ส่วนใหญ่ถ่ายทอดระหว่างต้นโดยแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่วชนิด *B. cockerelli* และยังไม่พบข้อมูลการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุระหว่างต้นพืชโดยเพลี้ยไก่อั่ว 2 ชนิด คือ *T. apicalis* และ *B. trigonica*

Pitman และคณะ (2011) ผลการศึกษาพบว่าการถ่ายทอดของเชื้อผ่านหัวพันธุ์ที่ติดเชื้อ มีผลกระทบน้อย แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาการถ่ายทอดของเชื้อจะยังไม่มากพอแต่ก็แสดงให้เห็นว่าเชื้อไม่ถ่ายทอดผ่านเมล็ดพันธุ์ในพืชตระกูลพริกมะเขือ สำหรับพืชตระกูลผักชี (Apiaceae) อย่างเช่นแครอท และพืชตระกูลผักชีชนิดอื่น ๆ จากผลการศึกษาของ Bertolini และคณะ (2014) ยังไม่

สามารถสรุปผลได้แน่ชัดว่ามีการถ่ายทอดของเชื้อผ่านเมล็ดเช่นเดียวกับผลการศึกษาของหลายท่าน เช่น Loiseau และคณะ., 2017a,b; Oishi และคณะ., 2017; Mawassi และคณะ., 2018; Haapalainen และคณะ., 2018b; Carminati และคณะ., 2019; Denton และคณะ 2019) ดังนั้น ข้อมูลปัจจุบันพบว่าเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' ยังไม่พบการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด มีเพียงแต่การถ่ายทอดเชื้อระหว่างต้นพืชได้โดยอาศัยแมลงพาหะเท่านั้น และการถ่ายทอดเชื้อจากหัวพันธุ์ที่เป็นโรคไปยังหัวพันธุ์อื่นได้น้อยมากหรือไม่มีการติดเชื้อมาก่อนหัวพันธุ์เป็นลักษณะการปนเปื้อนของเชื้อ

อย่างไรก็ตามการศึกษาความรุนแรงอาการบนพืชที่เกิดจากเชื้อที่ต่างชนิด halotype กันพบว่าชนิด halotype B จะมีความรุนแรงของโรครุนแรงกว่าชนิด halotype A ในมะเขือเทศ แต่ในมันฝรั่งความรุนแรงของชนิด B จะรุนแรงน้อยกว่า A และจากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อด้วยลักษณะทางพันธุกรรม ก็พบว่า halotype ที่ก่อโรคในพืชวงศ์เดียวกันก็ไม่ได้ถูกจัดในกลุ่มเดียวกัน มีรายงานพบว่าเชื้อชนิด halotype C ในประเทศฟินแลนด์ และ halotype E ทั้งสองชนิดสามารถก่อโรคในมันฝรั่งได้ แต่การแพร่ระบาดของเชื้อแตกต่างกันเนื่องจากความสามารถของแมลงพาหะที่เข้าทำลายพืชอาศัยแต่ละตระกูลแตกต่างกันสำหรับในพืชวงศ์พริกมะเขือ (Solanaceae) และวงศ์ผักชี (Apiaceae) เช่นการถ่ายทอดของเชื้อชนิด halotype B โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ *B. Cockerelli* เป็นแมลงพาหะ ซึ่งพบว่าเพลี้ยไก่แจ้มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อลดน้อยลง ประเทศฟินแลนด์พบว่าแปลงปลูกแครอท ที่ปลูกใกล้เคียงกับแปลงปลูกมันฝรั่งตรวจพบการติดเชื้อ halotype C แต่ต้นมันฝรั่งและหัวมันไม่พบอาการ สำหรับในประเทศสเปนเชื้อชนิด halotype E ซึ่งมีแมลงพาหะเป็นเพลี้ยไก่แจ้ *B. cockerelli* พบอาการของโรคในหัวมันฝรั่งในพื้นที่ปลูกเมือง Castilla y Leon และเมือง Cantabria (EPPO, 2017) อย่างไรก็ตามเพลี้ยไก่แจ้ชนิด *B. trigonica* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังมันฝรั่งได้ จากการศึกษาข้างต้นควรมีข้อมูลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ให้ดียิ่งขึ้นและจำเป็นต้องมีการระบุตัวแปรสำคัญของความหลากหลายทางพันธุกรรมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ต่อไป ซึ่งต้องมีการหารือกันในนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก

สภาวะแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' ยังไม่พบการรายงานมากนัก อย่างไรก็ตามอุณหภูมิมีผลอย่างมากต่อการพัฒนาของแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดที่ก่อโรคในส้ม และพบว่าเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' ไม่สามารถทนต่อสภาพอุณหภูมิที่สูงกว่า 32 องศาเซลเซียส

โดยทั่วไปแล้วลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' จะขึ้นอยู่กับวงจรชีวิตของแมลงพาหะ โดยเชื้อสามารถปรับเปลี่ยนไปได้ตามสรีรวิทยาของแมลงพาหะ และสภาพแวดล้อมที่ส่งเสริมต่อการพัฒนาของเชื้อแบคทีเรียและการถ่ายทอดที่สมบูรณ์ของแมลง จากกรณีเพลี้ยไก่แจ้ชนิด *T. apicalis* และ *B. trigonica* ซึ่งเป็นพาหะในการถ่ายทอดเชื้อชนิด halotype C ตัวเต็มวัยสามารถทนอยู่ข้ามฤดูในฤดูหนาวบนต้นสนได้นาน เพลี้ยไก่แจ้ชนิด *B.*

Trigonica ที่เป็นแมลงพาหะในพืชตระกูลผักชี ในเขตยุโรปใต้และแถบเมดิเตอร์เรเนียน สามารถขยายพันธุ์ได้ 2 - 3 รุ่นต่อปีและตัวเต็มวัยสามารถอยู่ข้ามฤดูได้โดยอาศัยกับพืชอื่น ๆ ดังนั้นแมลงพาหะที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการแพร่ระบาดของเชื้อและชนิดแมลงพาหะที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ ก็จะมีความสามารถในการติดเชื้อได้นานและสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยพร้อมกับการถ่ายทอดโรคต่อไปได้อย่างกว้างขวางและยากการป้องกันกำจัดสำหรับแมลงพาหะชนิดดังกล่าว

ลักษณะอาการของโรค

ลักษณะอาการของต้นพืชที่เป็นโรคในพืช มันฝรั่ง มะเขือเทศ และพืชชนิดอื่นในวงศ์พริก มะเขือเทศ จะมีลักษณะอาการคล้ายอาการติดเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งพบอาการแคระแกร็น ใบยอดชี้ตรง ใบซีดเหลือง มีอาการใบสีม่วงและม้วน ปลายใบสั้นลงและหนาขึ้น ขอบปล้องขยายบวมพองที่ซอกตาใบเกิดการงอกหัว ใบไหม้ มีผลขนาดเล็กรูปร่างผิดปกติ สำหรับอาการในหัวมันฝรั่งทอลำเลียงมีสีน้ำตาลร่วมกับรอยจุดของเนื้อเยื่อตายเป็นเส้นตามระบบทอลำเลียง เมื่อนำหัวมันฝรั่งไปแปรรูปจะแสดงรอยอาการเนื้อเยื่อตายสีที่เข้มจางสลับกับเนื้อเยื่อปกติจนมองดูคล้ายลายของม้าลายจึงถูกเรียกอาการของโรคว่า Zebra chip และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งไม่สามารถแปรรูปผลิตได้เนื่องจากไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

สำหรับอาการของโรคในแครอทจะพบอาการใบง้วนงอ ใบเหลืองซีด ใบสีม่วง ระบบรากแคระแกร็นส่งผลให้ผลผลิตหัวแครอทขนาดเล็กไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวคล้ายคลึงกับอาการของการติดเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะในแครอท และพืชที่ไม่แสดงอาการก็สามารถตรวจพบเชื้อได้เช่นกัน

ลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ

เป็นเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีความสัมพันธ์กับแมลงพาหะที่มีความซับซ้อนและก่อให้เกิดความเสียหายร้ายแรงต่ออุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งและมะเขือเทศในสหรัฐอเมริกาและนิวซีแลนด์

เชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' ถูกพบครั้งแรกในปี 2008 (Hansen *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2008a,b) และมีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าเกี่ยวข้องกับอาการ zebra chip ในมันฝรั่งโรคนี้พบครั้งแรกเริ่มในปี 1990 โดยมีผลกระทบเพิ่มขึ้น และมีข้อมูลความเชื่อมโยงถึงเพลี้ยไก่แจ้ *B. cockerelli* เป็นครั้งแรกในปี 2007 (Munyanza *et al.*, 2007a,b) ประเทศเม็กซิโกรายงานการพบโรค zebra chip ในปี 1990 ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างร้ายแรง และพบบางส่วนของรัฐเท็กซัสตอนใต้ในปี 2004 - 2005 ในมันฝรั่งสำหรับมันฝรั่งที่เป็นโรคจะมีแถบของเนื้อเยื่อตายสีเข้มชัดเจนเมื่อนำไปทอดจึงไม่เป็นที่นิยมสำหรับผู้บริโภค ทำให้เกิดผลกระทบรุนแรงในผู้ปลูกมันฝรั่งเพื่อแปรรูปและบริโภคเนื่องจากไม่สามารถขายได้ หัวพันธุ์ที่ติดเชื้อจะไม่งอก และหากงอก

จะเป็นต้นที่อ่อนแอ และสร้างผลกระทบอย่างมากในพืชตระกูลพริกมะเขือ อื่น ๆ เช่น มะเขือเทศ พริกมะเขือ ทามาโรโล และยาสูบ ซึ่งในปี 2013 รัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา และนิวซีแลนด์ สูญเสียผลผลิตมันฝรั่งจากโรค zebra chip ประมาณ 33 ล้านเหรียญสหรัฐ และ 50 ล้านเหรียญนิวซีแลนด์ ตามลำดับ

การตรวจพบเชื้อสาเหตุในประเทศอาจส่งผลกระทบต่อตลาดส่งออกได้เช่นกัน ในประเทศนิวซีแลนด์การส่งออกพริกผลสดมีปริมาณลดลงมูลค่า 5.22 ล้านเหรียญนิวซีแลนด์ ในปี 2008 และอุตสาหกรรมผลิตมะเขือเทศสูญเสียรายได้ไปเกือบ 3 ล้านเหรียญนิวซีแลนด์ ในยุโรปรายงานความเสียหายที่เกิดกับผลผลิตแครอทเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์

การควบคุม

ควรใช้สารป้องกันกำจัดแมลงโดยมุ่งเป้าไปที่แมลงพาหะกลุ่มเพลี้ยไก่แจ้ในมันฝรั่งและแครอท การใช้ตาข่ายเป็นวิธีเดียวในการจัดการโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Munyaneza, 2012; De Winter, 2019)

มาตรการด้านสุขอนามัยพืช

มาตรการการป้องกันการเข้ามาของเชื้อนี้ หัวพันธุ์มันฝรั่งควรมาจากพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของเชื้อนี้และหัวพันธุ์มันฝรั่งควรคัดเลือกเกรดสูง หากมีการนำเข้ามาแล้วควรอยู่ภายใต้การกักกันภายหลังการกักกัน (post-entry quarantine) ส่วนมันฝรั่งที่นำเข้าเพื่อการแปรรูปทางอุตสาหกรรมเท่านั้น นอกจากนี้ยังแนะนำให้ประเทศต่างๆ จัดตั้งระบบควบคุมการกำกับดูแลระดับชาติสำหรับแมลง *Bactovera cockerelli* และ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับ haplotypes A และ B) เพื่อป้องกันการระบาดของโรคนี้ในมันฝรั่งและต้องมีการดำเนินการอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพหากเกิดการระบาดของโรคนี้

2. สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด้านตรวจพืชต่าง ๆ ที่มีการนำเข้า 600 หัวต่อครั้ง

3. หัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีการนำเข้าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2564 ถึง พ.ศ. 2566 มีการนำเข้าจาก 6 ประเทศ ได้แก่ 1) เครือรัฐออสเตรเลีย นำเข้าจำนวน 31 ครั้ง น้ำหนักรวม 2,806,750.00 กิโลกรัม 2) แคนาดา นำเข้าจำนวน 8 ครั้ง น้ำหนักรวม 1,936,000.00 กิโลกรัม 3) ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ นำเข้าจำนวน 7 ครั้ง น้ำหนักรวม 10,025,750.00 กิโลกรัม 4) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 513,000.00 กิโลกรัม 5) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ นำเข้าจำนวน 4 ครั้ง น้ำหนักรวม 12,422,750.00 กิโลกรัม 6) สหรัฐอเมริกา นำเข้าจำนวน 2 ครั้ง น้ำหนักรวม 375.5 กิโลกรัม และ 7) สหราชอาณาจักร นำเข้าจำนวน 6 ครั้ง น้ำหนักรวม 9,115,500.00 กิโลกรัม โดยทำการสุ่มหัวพันธุ์มัน

ฝรั่งจำนวน 600 หัวต่อครั้ง เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบโรคกับหัวพันธุ์ การตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า และผ่าหัวมันฝรั่งเป็นสังเกตอาการ zebra chip ภายในหัวมันฝรั่ง บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ หากตรวจพบลักษณะอาการเป็นลายน้ำสงสัย นำหัวมันฝรั่งไปปลูกเพื่อสังเกตอาการและเก็บตัวอย่างใบหรือกิ่งมาตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกต่อไป จากการตรวจสอบตัวอย่างนำเข้าจากทั้ง 6 ประเทศ ได้แก่ 1) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ 2) แคนาดา 3) เครือรัฐออสเตรเลีย 4) ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ 5) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ 6) สหรัฐอเมริกา บริเวณรอบหัวพันธุ์มันฝรั่งมีลักษณะรอยกระแทกหรือรอยที่เกิดจากของมีคม และมีอาการเน่าและบางหัว มีเศษดินติดมาเล็กน้อย และหัวพันธุ์ที่นำเข้าจากสกอตแลนด์ พบลักษณะอาการ powdery scab แต่ไม่เก็นเงื่อนไขที่ประเทศไทยกำหนด และเมื่อผ่าหัวพันธุ์เพื่อสังเกตลักษณะอาการ zebra chip (ภาพที่ 2) ไม่พบลักษณะอาการที่สงสัย เนื้อหัวมีลักษณะปกติไม่มีลาย (ภาพที่ 3) นำหัวพันธุ์ไปปลูกทดสอบในโรงเรือนปลูกพืชเพื่อสังเกตอาการต่อไป

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' โดยใช้เทคนิค Nested-PCR ตามวิธีการดังนี้

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าที่แสดงอาการ zebra chip และสุ่มตรวจจากหัวพันธุ์ที่ไม่พบอาการ ด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการมาตรฐานของ PM 7/143 (1) '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (EPPO, 2020) ที่อ้างอิงโดย Munyaneza และคณะ, 2010 การสกัดดีเอ็นเอจากหัวพันธุ์มันฝรั่งบริเวณเนื้อเยื่อ vascular ring (ภาพที่ 1 และ 7) ด้วยวิธี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ตามวิธีการของ European and Mediterranean Plant Protection Organization (Munyaneza *et al.*, 2010) โดยนำเนื้อเยื่อพืชส่วนท่อน้ำหนัก 0.5 กรัมต่อสารละลาย CTAB 1 มิลลิลิตร (100 mM Tris, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0, 2% (w/v) CTAB, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP)-40 and 0.2 % (v/v) 2-mercaptoethanol) บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน และดูดสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสในหลอดใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Chloroform: isoamyl (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับหลอดไปมา และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใสในหลอดใหม่ แล้วเติมด้วยสารละลาย isopropanol ที่แช่เย็นปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสและกลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากันจะสังเกตเห็นการตกตะกอนของโมเลกุลดีเอ็นเอถ้าความเข้มข้นของโมเลกุลดีเอ็นเอสูง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนสารละลายใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็นจัดเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ สองครั้ง และนำตะกอนดีเอ็นเอไปตากไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายเอลกอฮอล์ระเหยจนแห้งสนิท จึงนำตะกอนดีเอ็นเอมาละลายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อปริมาณ 20 – 50

ไมโครลิตร เมื่อตะกอนดีเอ็นเอละลายดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' ด้วยเทคนิค Nested-PCR ต่อไป

4.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' ด้วยเทคนิค Nested-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ และคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน 16S bacterial and Plant chromosomal เป็นชุดควบคุมภายใน Internal control ด้วยวิธีการของหน่วยงาน Prepared for Subcommittee on Plant Health Diagnostic Standards (SPHDS) , 2012 ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งใช้ในการทำปฏิกิริยา Nested-PCR ครั้งที่ 1 ด้วยคู่ไพรเมอร์ OA2 (GCGCTTATTTTAATAGGAGCGGCA) และ OI2c (GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT) ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1160 bp ปฏิกิริยาครั้งที่ 2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Lib16S01F (TTCTACGGGATAACGCACGG) และ Lib16S01R (CGTCAGTATCAGGCCAGTGAG) ให้ผลิตภัณฑ์ PCR 580 bp โดยใช้สารละลายในการทำปฏิกิริยา PCR ดังต่อไปนี้คือ สารละลายสำเร็จรูปสำหรับทำปฏิกิริยา PCR DreamTaq Green Master mix 2X (Thermo Scientific™) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร (μl) สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (μM) ใช้สารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมดในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร (μl) นำสารละลายทำปฏิกิริยาครั้งที่ 1 จากคู่ไพรเมอร์ OA2 และ OI2c ด้วยเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมดจำนวน 40 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที และ นำสารละลายทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Lib16S01F และ Lib16S01R ด้วยเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมดจำนวน 40 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

4.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ตามขั้นตอนดังนี้

4.3.1 เตรียมอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งผงวุ้นอะกาโรส 2 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำให้เดือดและละลายเป็นสารละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟ จากนั้นนำสารละลายวุ้นผสมสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ลงในสารละลายเจลก่อนการเทเจลบนถาดสำหรับเตรียมแผ่นเจล

4.3.2 นำสารละลายผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR-Product) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในเจลที่เตรียมไว้และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp DNA ladder เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ และให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

4.3.3 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพ แล้วนำไปวิเคราะห์ผล

4.3.4 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.3.5 นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลของ GenBank

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงของบริษัทที่นำเข้าในอำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเวียงป่าเป้า อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา อำเภอพังโคน อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร และอำเภอวังยาว จังหวัดนครพนม ผลการติดตามในแปลงปลูกยังไม่พบอาการสงสัยของโรค zebra chip ในพื้นที่

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการตรวจสอบลักษณะอาการของโรค Zebra chip บนหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้ายังไม่พบกลุ่มอาการของโรค และการตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิค Nested-PCR จากเนื้อเยื่อท่อน้ำเลี้ยงส่วนหัวยังตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' จากการศึกษาค้นพบว่า การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Nested-PCR เป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity of detection) ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุได้ในระดับ 10^{-6} เนื่องจากเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' เป็นศัตรูพืชที่ยังไม่ปรากฏในประเทศไทยและมีความเสี่ยงสูงที่จะติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากแหล่งปลูกที่มีการอนุญาตนำเข้าจาก 7 ประเทศ ณ ปัจจุบันจึงนำสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคที่ได้จากการสังเคราะห์เลียนแบบจำลองจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อเป็น positive control เป็นตัวแทนของเชื้อสาเหตุจากธรรมชาติ โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI No. EU935004.1 '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence; and tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence 2,049 bp และการติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้าในแหล่งปลูกหัวพันธุ์นำเข้า ยังไม่พบลักษณะอาการกลุ่มของโรค Zebra chip บนต้นมันฝรั่ง สำหรับวิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุจากตำแหน่งที่พบมากที่สุดคือส่วนเนื้อเยื่อท่อน้ำเลี้ยง vascular ring นั้นยังพบการปนเปื้อนของอนุภาคเม็ดแป้งจากหัวมันฝรั่งสูง หลังจากการสกัดดีเอ็นเอก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Nested-PCR ควรเจือจางสารละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ซึ่งระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่ 1:10 หรือ 1:100 เพื่อช่วยลดปริมาณอนุภาคแป้งจากหัวมันฝรั่งทำให้ลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และปฏิกิริยาของสารเคมีในระหว่างกระบวนการเพิ่มขึ้นส่วนปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งหากสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชนิดคอลัมน์จะช่วยกำจัดปริมาณแป้งที่ปนเปื้อนมาทำให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์กว่าวิธีการสกัดด้วยสารละลาย CTAB แต่จะมีต้นทุนต่อหน่วย

สูงต่อการตรวจตัวอย่าง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาพัฒนาอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างขึ้นเนื้อเยื่อหัวพันธุ์มันฝรั่งได้สะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้นกว่าการใช้ใบมีดผ่าตัดตัดตามท่อน้ำท่อลำเลียงจากหัวมันฝรั่ง และควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิค Quantitative real time-PCR (qPCR) พร้อมด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่สะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามจากรายงาน Takashi และคณะ (2020) พบว่าเชื้อ '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' ไม่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ของแครอทจากตัวอย่างที่สุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์นำเข้าเพื่อปลูกของประเทศญี่ปุ่น หากเป็นเพียงการปนเปื้อนติดมากับเมล็ดพันธุ์เท่านั้น (seed contamination) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชือดังกล่าวยังถูกจำกัดการแพร่ระบาดไปยังระหว่างต้นพืช หรือระหว่างพืชอาศัยอื่นยังคงต้องอาศัยแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้เป็นแมลงให้การแพร่กระจายของเชื้อ เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายให้กับผลผลิตยังคงให้ความสำคัญในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะเป็นหลักและวิธีอื่นร่วมด้วย และหากจะยกระดับสถานะศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยก็ยิ่งมีความสำคัญทั้งในแง่การเฝ้าระวังและการติดตามสำรวจชนิดแมลงเพลี้ยไก่แจ้ชนิดที่รายงานเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดโรคปรากฏในแหล่งปลูกหรือไม่ แต่จากข้อมูลการสืบค้นพบว่าชนิดของเพลี้ยไก่แจ้ที่เป็นแมลงพาหะของโรคไม่ปรากฏการรายงานพบในประเทศไทย ดังนั้นเห็นสมควรเป็นอย่างยิ่งว่าจะต้องมีการศึกษาสำรวจแมลงพาหะ พร้อมการตรวจสอบและติดตามอาการโรคในแปลงปลูกมันฝรั่ง พืชตระกูลพริกมะเขือเทศ และพืชตระกูลผักชี และศึกษาวิจัยวิธีการบำบัดเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีกล เช่น การแช่น้ำร้อน หรือสารเคมีที่สามารถป้องกันกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์หากพบการปนเปื้อนมากับชิ้นส่วนของพืชที่นำเข้า

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ด้านตรวจพืชลาดกระบังและด้านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการสุ่มตรวจตัวอย่างในเบื้องต้นและนำส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักพืชและอนุเคราะห์ให้ข้อมูลการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเสมอมา และขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัยทุกท่านที่อนุเคราะห์อุปกรณ สถานที่และให้คำปรึกษาข้อมูลด้านศัตรูพืชและวิธีการตรวจสอบได้จนสำเร็จครบตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2552ก. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก นิวซีแลนด์ พ.ศ. 2558 ประกาศ ณ วันที่ 9 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 110 ง. ลงวันที่ 6 สิงหาคม 2552. หน้า 19

กรมวิชาการเกษตร. 2552ข. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 13 พฤศจิกายน 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 182 ง. ลงวันที่ 21 ธันวาคม 2552. หน้า 68.

- กรมวิชาการเกษตร. 2552ค. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก สกอตแลนด์ พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 9 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 110 ง. ลงวันที่ 6 สิงหาคม 2552. หน้า 33.
- กรมวิชาการเกษตร. 2552ง. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก สหรัฐอเมริกา พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 13 ตุลาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 170 ง. ลงวันที่ 23 พฤศจิกายน 2552. หน้า 55-56.
- กรมวิชาการเกษตร. 2552จ. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก เครือรัฐออสเตรเลีย พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 15 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 114 ง. ลงวันที่ 14 สิงหาคม 2552. หน้า 56.
- กรมวิชาการเกษตร. 2552ฉ. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก รัฐอิสราเอล พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 9 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 110 ง. ลงวันที่ 6 สิงหาคม 2552. หน้า 54.
- กรมวิชาการเกษตร. 2559. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก แคนาดา พ.ศ. 2559 ประกาศ ณ วันที่ 28 กันยายน 2559 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 133 ตอนพิเศษ 221 ง. ลงวันที่ 30 กันยายน 2559. หน้า 32-33.
- Binoy Babu, Mathews L. Paret, Nicholas Dufault, and Carrie L. Harmon. 2019. ‘*Candidatus Liberibacter Solanacearum*’: An Emerging Pathogen Infecting Potato And Tomato. The Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension. Original publication date August 2015. Reviewed February 2019. Visit the EDIS website at <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Bertolini E, Teresani GR, Loiseau M, Tanaka FAO, Barbé S, Martínez C, Gentit P, López MM, Cambra M. 2015. Transmission of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot seeds. *Plant Pathology* 64, 276-285.
- CABI. ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (zebra chip). [ออนไลน์] 2024. แหล่งที่มา: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.109434> สืบค้นเมื่อ 1 มีนาคม 2567
- Denton G, Yao C, Preston J, Gawthrop F. 2019. Laboratory and field investigations into vertical transmission of CaLsol in parsnips, and practical application in seed production.
- De Winter C. 2019. Economic impact of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot farming in the EU. Master thesis business economics. Available online: <https://edepot.wur.nl/496773> (last access 31 March 2024)

- Erik J. Wenninger and Arash Rashed. 2022. Insect Pests of Potato (Second Edition).
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2020. Diagnostic, PM 7/143 (1) 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*'. OEPP/EPPO Bulletin. 50 (1), 49–68.
- EPPO (2024) 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' Available online:
<https://gd.eppo.int/taxon/LIBEPS> (last access 31 March 2024)
- EPPO (2017) 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' haplotype E detected on potatoes in Spain. EPPO Reporting Service article 2017/134
<https://gd.eppo.int/reporting/article-6102>
- Haapalainen M, Wang J, Latvala S, Lehtonen MT, Pirhonen M, Nissinen AI. 2018b. Genetic variation of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' haplotype C and identification of a novel haplotype from *Trioza urticae* and stinging nettle. *Phytopathology* 108(8), 925-934.
- Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R, Paine TD. 2008. A new huanglongbing species, 'Candidatus *Liberibacter psyllaeus*' found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied Environmental Microbiology* 74, 5862– 5865.
- Liefting LW, Perez-Egusquiza ZC, Clover GRG, Anderson JAD. 2008a. A new 'Candidatus *Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92, p 1474.
- Liefting LW, Ward LI, Shiller JB, Clover GRG. 2008b. A new 'Candidatus *Liberibacter*' species in *Solanum betaceum* (tamarillo) and *Physalis peruviana* (Cape gooseberry) in New Zealand. *Plant Disease* 92, p 1588.
- Liefting, L.W.; Weir, B.S.; Pennycook, S.R.; Clover, G.R.G. 2009. 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(9): 2274-2276. Parent reference *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; DOI:10.1099/ijs.0.007377-0
- Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS, Clover GRG. 2009a. A new 'Candidatus *Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease* 93, 208–214.
- Liefting LW, Veerakone S, Ward LI, Clover GRG. 2009b. First report of 'Candidatus *Phytoplasma australiense*' in potato. *Plant Disease* 93, p 969.

- Liefting LW, Weir BS, Pennycook SR, Clover GRG. 2009c. '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 59, 2274–2276.
- Mawassi M, Dror O, Bar-Joseph M, Piasezky A, Sjolund JM, Levitzky N, Shoshana N, Meslenin L, Haviv S, Porat C, Katsir L, Kontsedalov S, Ghanim M, Zelinger-Reichert E, Arnsdorf YM, Gera A, Bahar O. 2018. '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' is tightly associated with carrot yellows symptoms in Israel and transmitted by the prevalent psyllid vector *Bactericera trigonica*. *Phytopathology* 108(9), 1056–1066.
- Munyanzeza JE, Crosslin JM, Upton JE. 2007a. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with 'zebra chip', a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100, 656–663.
- Munyanzeza JE, Goolsby JA, Crosslin JM, Upton JE. 2007b. Further evidence that zebra chip potato disease in the lower Rio Grande Valley of Texas is associated with *Bactericera cockerelli*. *Subtropical Plant Science* 59, 30–37.
- Munyanzeza JE, Fisher TW, Sengoda VG, Garczynski SF, Nissinen A, Lemmetty A. 2010a. First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in carrots in Europe. *Plant Disease* 94, p 639.
- Munyanzeza JE, Sengoda VG, Buchman JL, Fisher TW. 2012a. Effects of temperature on '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease* 96, 18–23.
- Oihi M, Hoshino S, Fujiwara Y, Ushiku S, Kobayashi Y, Namba I. 2017. A comparison of protocols to detect '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' from carrot seeds. Research on the effectiveness of propidium monoazide treatment and evaluation of seed transmission in carrot. *Research Bulletin of the Plant Protection Service* 53, 111–117.
- Oey, I., Faridnia, F., Leong, S.Y., Burritt, D.J., Liu, T. 2016. Determination of Pulsed Electric Fields Effects on the Structure of Potato Tubers. In: Miklavcic, D. (eds) *Handbook of Electroporation*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_151-1
- Piman AR, Drayton GM, Krabberger SJ, Genet RA, Scott IAW. 2011. Tuber transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' and its association with zebra chip on potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 129, 389–398.
- SPHDS. Diagnostic Protocol for the Identification and Detection of '*Candidatus Liberibacter Solanacearum*', the Causal Agent of Zebra Chip of Potatoes. Subcommittee on Plant Health

Diagnostic Standards. Australian Government, Department of Agriculture. [ออนไลน์]. 2023.
<https://www.plantbiosecuritydiagnostics.net.au/app/uploads/2018/11/NDP-18-Zebra-chip-Candidatus-Liberibacter-solanacearum-V1.2.pdf>. สืบค้นเมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2566

Takashi Fujikawa, Kohji Yamamura, Kohei Osaki, Nobuya Onozuka, Mariko Taguchi, Akane Sasaki, Masatoshi Sato. 2020. Seed transmission of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ is unlikely in carrot. *Journal of General Plant Pathology* 86 p: 266-273.

Table 1 Volume and value of seed potato imports from Thailand during 2021 - 2023

importing country	Year 2021		Year 2022		Year 2023	
	Quantity (Ton)	Value (Million Bath)	Quantity (Ton)	Value (Million Bath)	Quantity (Ton)	Value (Million Bath)
Australia	1,917.00	56.24	1,650.00	54.92	749.32	24.69
Canada	513.00	11.26	729.00	18.51	1,107.00	32.18
Netherlands	137.50	3.81	125.00	3.83	75.00	2.50
Scotland	4,433.00	133.18	5,011.75	165.42	2,899.84	90.38
New Zealand	-	-	25.00	0.96	150.00	5.80
United States of America	-	-	0.37	0.34	0.02	0.13
รวม	7,000.50	204.49	7,541.12	243.98	4,981.18	155.68

Table 2 List of important pests in potatoes (EPPO, 2024)

Type of Pest	Quantity	Pest
Acari	3	1) <i>Aculops lycopersici</i> 2) <i>Aculops lycopersici</i> (as Solanaceae) 3) <i>Tetranychus evansi</i>
Bacteria	20	1) <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 2) ' <i>Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus</i> ' 3) <i>Clavibacter michiganensis</i> 4) <i>Erwinia chrysanthemi</i> 5) <i>Potato marginal flavescence agent</i> (as Solanum) 6) <i>Potato purple-top roll agent</i> 7) <i>Potato purple-top roll agent</i> (as Solanum) 8) ' <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ' 9) <i>Clavibacter sepedonicus</i> 10) <i>Dickeya dianthicola</i>

Type of Pest	Quantity	Pest
		11) <i>Pectobacterium polaris</i> 12) <i>Potato marginal flavescence agent</i> 13) <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> 14) <i>Ralstonia solanacearum</i> 15) <i>Ralstonia solanacearum</i> race 1 (no longer in use) 16) <i>Ralstonia solanacearum</i> race 3 (no longer in use) 17) <i>Ralstonia solanacearum</i> species complex 18) <i>Ralstonia syzygii</i> 19) <i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>indonesiensis</i> 20) <i>Xanthomonas vesicatoria</i> (as <i>Solanum</i>)
Fungi	21	1) <i>Dematophora bunodes</i> 2) <i>Fusarium foetens</i> 3) <i>Phymatotrichopsis omnivora</i> 4) <i>Phytophthora cryptogea</i> 5) <i>Phytophthora erythroseptica</i> 6) <i>Septoria malagutii</i> (as <i>Solanum</i>) 7) <i>Stagonosporopsis crystalliniformis</i> 8) <i>Synchytrium endobioticum</i> (as <i>Solanum</i>) 9) <i>Aecidium cantense</i> 10) <i>Boeremia foveata</i> 11) <i>Polyscytalum pustulans</i> 12) <i>Puccinia pittieriana</i> 13) <i>Rhizoctonia solani</i> 14) <i>Septoria malagutii</i> 15) <i>Spongospora subterranea</i> 16) <i>Stagonosporopsis andigena</i> 17) <i>Synchytrium endobioticum</i> 18) <i>Thecaphora solani</i>

Type of Pest	Quantity	Pest
		19) <i>Stagonosporopsis andigena</i> (as Solanaceae) 20) <i>Stagonosporopsis andigena</i> (as Solanum) 21) <i>Thecaphora solani</i> (as Solanum)
Insect	88	1) <i>Agrius convolvuli</i> 2) <i>Agrotis segetum</i> 3) <i>Anthonomus eugenii</i> (as Solanum) 4) <i>Aonidomytilus albus</i> (as Solanum) 5) <i>Asproparthenis punctiventris</i> 6) <i>Bagrada hilaris</i> 7) <i>Beastie the Bug</i> 8) <i>Bemisia tabaci</i> (as Solanaceae) 9) <i>Brachyplatys subaeneus</i> 10) <i>Cacoecimorpha pronubana</i> 11) <i>Ceratothripoides brunneus</i> 12) <i>Chrysodeixis eriosoma</i> 13) <i>Circulifer tenellus</i> 14) <i>Clavigralla tomentosicollis</i> 15) <i>Conoderus rufangulus</i> 16) <i>Dacus bivittatus</i> 17) <i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> 18) <i>Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata</i> 19) <i>Diabrotica virgifera zea</i> (as Solanum) 20) <i>Epicaerus cognatus</i> 21) <i>Epilachna vigintioctomaculata</i> (as Solanaceae) 22) <i>Epiphyas postvittana</i> 23) <i>Epitrix hirtipennis</i> 24) <i>Helicoverpa armigera</i> 25) <i>Helicoverpa zea</i>

Type of Pest	Quantity	Pest
		26) <i>Jacobiasca lybica</i> 27) <i>Keiferia lycopersicella</i> 28) <i>Leucinodes orbonalis</i> 29) <i>Leucinodes ugandensis</i> (as <i>Solanum</i>) 30) <i>Liriomyza bryoniae</i> 31) <i>Liriomyza huidobrensis</i> 32) <i>Liriomyza trifolii</i> 33) <i>Listroderes costirostris</i> 34) <i>Listroderes difficilis</i> 35) <i>Lobesia botrana</i> 36) <i>Megalurothrips usitatus</i> 37) <i>Naupactus leucoloma</i> 38) <i>Naupactus xanthographus</i> 39) <i>Neoceratitis cyanescens</i> 40) <i>Opogona sacchari</i> 41) <i>Pentastiridius leporinus</i> 42) <i>Phenacoccus solenopsis</i> 43) <i>Phthorimaea operculella</i> (as <i>Solanaceae</i>) 44) <i>Phyrdenus muriceus</i> 45) <i>Premnotypes latithorax</i> (as <i>Solanum</i>) 46) <i>Premnotypes sanfordi</i> (as <i>Solanum</i>) 47) <i>Premnotypes solani</i> (as <i>Solanum</i>) 48) <i>Premnotypes suturicallus</i> (as <i>Solanum</i>) 49) <i>Premnotypes vorax</i> (as <i>Solanum</i>) 50) <i>Prodiplosis longifila</i> 51) <i>Rhigopsidius tucumanus</i> 52) <i>Scirtothrips dorsalis</i> 53) <i>Spodoptera eridania</i> 54) <i>Spodoptera frugiperda</i> 55) <i>Spodoptera litura</i> 56) <i>Spodoptera ornithogalli</i>

Type of Pest	Quantity	Pest
		57) <i>Spodoptera praefica</i> 58) <i>Thrips angusticeps</i> 59) <i>Thrips palmi</i> 60) <i>Thrips parvispinus</i> 61) <i>Thrips setosus</i> 62) <i>Trialeurodes ricini</i> 63) <i>Tuta absoluta</i> 64) <i>Bactericera cockerelli</i> 65) <i>Diabrotica speciosa</i> 66) <i>Epilachna vigintioctomaculata</i> 67) <i>Epitrix cucumeris</i> 68) <i>Epitrix papa</i> 69) <i>Epitrix similaris</i> 70) <i>Epitrix subcrinita</i> 71) <i>Epitrix tuberis</i> 72) <i>Heteronychus arator</i> 73) <i>Leptinotarsa decemlineata</i> 74) <i>Limonius californicus</i> 75) <i>Liriomyza sativae</i> 76) <i>Melanotus communis</i> 77) <i>Omophlus lepturoides</i> 78) <i>Phthorimaea operculella</i> 79) <i>Premnotypes latithorax</i> 80) <i>Premnotypes sanfordi</i> 81) <i>Premnotypes solani</i> 82) <i>Premnotypes suturicallus</i> 83) <i>Premnotypes vorax</i> 84) <i>Pseudococcus viburni</i> 85) <i>Russelliana solanicola</i> 86) <i>Spodoptera littoralis</i> 87) <i>Tecia solanivora</i>

Type of Pest	Quantity	Pest
		88) <i>Spodoptera praefica</i> (as Solanum)
Nematode	17	1) <i>Radopholus similis</i> 2) <i>Ditylenchus dipsaci</i> 3) <i>Meloidogyne enterolobii</i> 4) <i>Meloidogyne graminicola</i> 5) <i>Meloidogyne luci</i> 6) <i>Meloidogyne minor</i> 7) <i>Rotylenchus buxophilus</i> 8) <i>Trichodorus viruliferus</i> 9) <i>Xiphinema americanum</i> sensu stricto 10) <i>Xiphinema rivesi</i> 11) <i>Ditylenchus destructor</i> 12) <i>Globodera pallida</i> 13) <i>Globodera rostochiensis</i> 14) <i>Meloidogyne chitwoodi</i> 15) <i>Meloidogyne ethiopica</i> 16) <i>Meloidogyne fallax</i> 17) <i>Nacobbus aberrans</i> sensu lato
Phytoplasma	7	1) ' <i>Candidatus Phytoplasma americanum</i> ' (as Solanum) 2) ' <i>Candidatus Phytoplasma australiense</i> ' 3) ' <i>Candidatus Phytoplasma fraxini</i> ' 4) ' <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> ' 5) ' <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> ' (as Solanum) 6) ' <i>Candidatus Phytoplasma americanum</i> ' 7) ' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> '
Viroid	6	1) <i>Columnnea latent viroid</i> 2) <i>Potato spindle tuber viroid</i> (as Solanum) 3) <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> 4) <i>Pepper chat fruit viroid</i>

Type of Pest	Quantity	Pest
		5) <i>Pepper chat fruit viroid</i> (as Solanaceae) 6) <i>Potato spindle tuber viroid</i>
Virus	60	1) <i>Cheravirus arracaciae oca strain</i> (as Solanaceae) 2) <i>Pepino mosaic virus</i> 3) <i>Tobacco streak ilarvirus potato strain</i> (as Solanaceae) 4) <i>Tomato brown rugose fruit virus</i> 5) <i>Tomato infectious chlorosis virus</i> 6) <i>Tomato yellow vein streak virus</i> 7) <i>Alfalfa mosaic virus</i> 8) <i>Alphanucleorhabdovirus tuberosum</i> 9) <i>Beet curly top virus</i> 10) <i>Cheravirus arracaciae oca strain</i> (as Solanum) 11) <i>Cheravirus avii</i> 12) <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> 13) <i>Lucerne enation virus</i> 14) <i>Nepovirus arabis</i> 15) <i>Nepovirus betasolani</i> 16) <i>Nepovirus nigranuli</i> 17) <i>Nepovirus nigranuli</i> (as Solanum) 18) <i>Orthotospovirus arachianuli</i> 19) <i>Orthotospovirus impatiensnecromaculae</i> 20) <i>Orthotospovirus tomatozonae</i> 21) <i>Pepper ringspot virus</i> 22) <i>Phenacoccus peruvianus</i> 23) <i>Potato deforming mosaic virus</i> (Argentina) (as Solanum) 24) <i>Potato leaflet stunt agent</i> 25) <i>Potato leaflet stunt agent</i> (as Solanum)

Type of Pest	Quantity	Pest
		26) <i>Potato mop-top virus</i> 27) <i>Potato mop-top virus</i> (as <i>Solanum</i>) 28) <i>Potato virus P</i> 29) <i>Potato virus Y tobacco veinal necrosis strain</i> 30) <i>Potato virus Y tobacco veinal necrosis strain</i> (as <i>Solanum</i>) 31) <i>Potato yellow mosaic virus</i> 32) <i>Potato yellow vein virus</i> (as <i>Solanum</i>) 33) <i>Tobacco rattle virus</i> 34) <i>Tobacco streak ilarvirus potato strain</i> (as <i>Solanum</i>) 35) <i>Tobacco streak virus</i> 36) <i>Tomato chlorosis virus</i> 37) <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> 38) <i>Tymovirus dulcamarae</i> (as <i>Solanum</i>) 39) <i>Alphanucleorhabdovirus melongenae</i> 40) <i>Cheravirus arracaciae oca strain</i> 41) <i>Comovirus andesense</i> 42) <i>Nepovirus solani</i> 43) <i>Orthotospovirus tomatomaculae</i> 44) <i>Potato deforming mosaic virus</i> (Argentina) 45) <i>Potato latent virus</i> 46) <i>Potato leafroll virus</i> 47) <i>Potato rugose stunting virus</i> 48) <i>Potato virus H</i> 49) <i>Potato virus T</i> 50) <i>Potato yellowing virus</i> 51) <i>Potato yellow vein virus</i> 52) <i>Tobacco streak ilarvirus potato strain</i> 53) <i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>

Type of Pest	Quantity	Pest
		54) <i>Tomato yellow mosaic virus</i> 55) <i>Tymovirus dulcamarae</i> 56) <i>Tymovirus latandigenum</i> 57) <i>Tymovirus mosandigenum</i> 58) <i>Alphanucleorhabdovirus tuberosum</i> (as Solanaceae) 59) <i>Alphanucleorhabdovirus tuberosum</i> (as Solanum) 60) <i>Potato yellowing virus</i> (as Solanum)

Table 3 The status of pest of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (EPPO, 2024)

Countries that allow the import of seed potato	Status of ‘ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ’ in country	Reported
Australia	Absent	-
Canada	Present	-Alberta Present, few occurrences -Saskatchewan Present, no details
Netherlands	Absent	Absent, confirmed by survey
Scotland UK	Present	Present, no details
New Zealand	Present	Present, restricted distribution
United States of America	Present	-Arizona Present, no details -California Present, no details -Colorado Present, no details -Idaho Present, no details -Kansas Present, no details -Montana Absent, unreliable record

		-Nebraska Present, no details -Nevada Present, no details -New Mexico Present, no details -North Dakota Absent, unreliable record -Oregon Present, no details -Texas Present, no details Absent, unreliable record -Washington Present, no details -Wyoming Present, no details
Israel	Present	Present, restricted distribution

Table 4 Diagnosis of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ infected from imported seed potato between 2021 to 2023.

Country	Quantity of sample	Quantity (Ton)	Zebra chip	Other Pest	Pest of status in Thailand	Frequency
Australia	49	4,316.32	Not	<i>Rhizoctonia solani</i>	Present	2
Canada	10	2,349.00	Not	Not	-	0
Netherlands	7	3,37.50	Not	Not	-	0
Scotland	62	12,344.59	Not	<i>Streptomyces scabies</i>	Present	1
New Zealand	3	175.00	Not	Not	-	0
United States of America	3	0.39	Not	Not	-	0
Total	134	19,522.80				

Table 5 Monitoring of Zebra chip disease from imported seed potato in the field.

No.	ID sample	Area		Location (X,Y : GPS)	Results of a survey of zebra chip disease
		District	Province		
1	PVP1	Wiang Pa Pao	Chiang Rai	19.209906,99.524330	Not
2	PVP2	Wiang Pa Pao	Chiang Rai	19.212894,99.533905	Not
3	PMC1	Mae Chaem	Chiang Mai	18.505785,98.348495	Not
4	PMC2	Mae Chaem	Chiang Mai	18.516085,98.356354	Not
5	PMC3	Mae Chaem	Chiang Mai	18.516088,98.356400	Not
6	PMC4	Mae Chaem	Chiang Mai	18.503693,98.355118	Not
7	PCH1	Chiang Kham	Phayao	19.460657,100.336754	Not
8	PCH2	Chiang Kham	Phayao	19.458719,100.336143	Not
9	PCH3	Chiang Kham	Phayao	19.463728,100.340408	Not
10	PCH4	Chiang Kham	Phayao	19.470993,100.337334	Not
11	PTT1	Thoeng	Chiang Rai	19.680710,100.264610	Not
12	PTT2	Thoeng	Chiang Rai	19.707636,100.286598	Not
13	PPT1	Phop Phra	Tak	16.593417,98.776481	Not
14	PPT2	Phop Phra	Tak	16.593586,98.775317	Not
15	PPT3	Phop Phra	Tak	16.529611,98.746911	Not
16	PPT4	Phop Phra	Tak	16.554108,98.823697	Not

No.	ID sample	Area		Location (X,Y : GPS)	Results of a survey of zebra chip disease
		District	Province		
17	SKH1	Muang	Sakon Nakhon	17.125953,104.290058	Not
18	SKH2	Muang	Sakon Nakhon	17.131453,104.287633	Not
19	SKH3	Muang	Sakon Nakhon	17.131328,104.302286	Not
20	SKH4	Muang	Sakon Nakhon	17.131447,104.287642	Not
21	SKH5	Phang Khon	Sakon Nakhon	17.354119,103.760042	Not
22	NKH1	Wang Yang	Nakhon Phanom	17.063889,104.368097	Not
23	NKH2	Wang Yang	Nakhon Phanom	17.062417,104.373553	Not

Figure

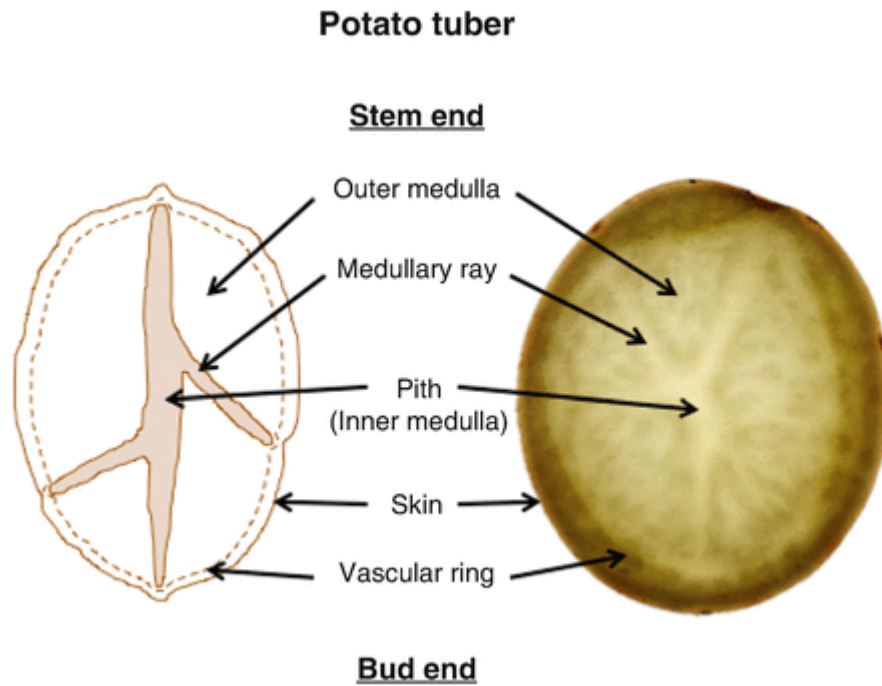


Figure 1 Vascular ring of Potato tuber (Oey, 2016)

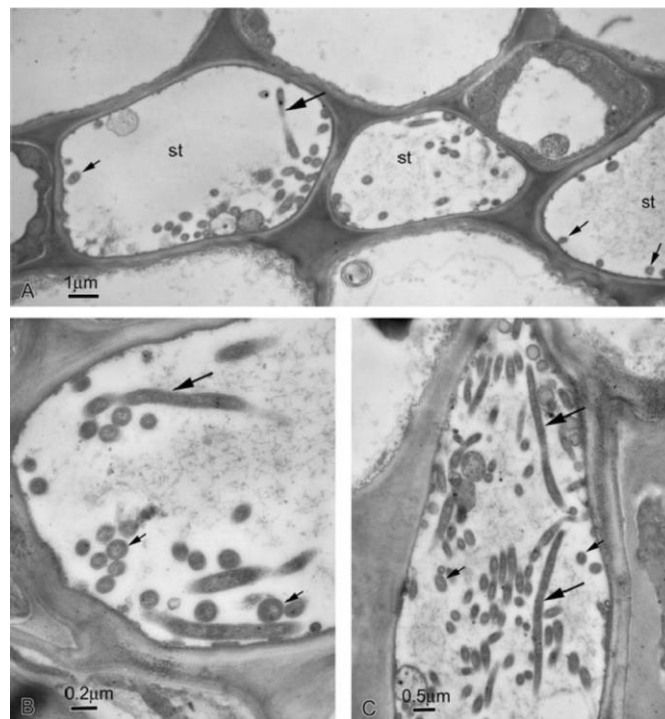


Figure 2 Transmission electron micrograph of bacteria-like organisms in phloem cells in the stem of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Lieftin *et al.*, 2009)

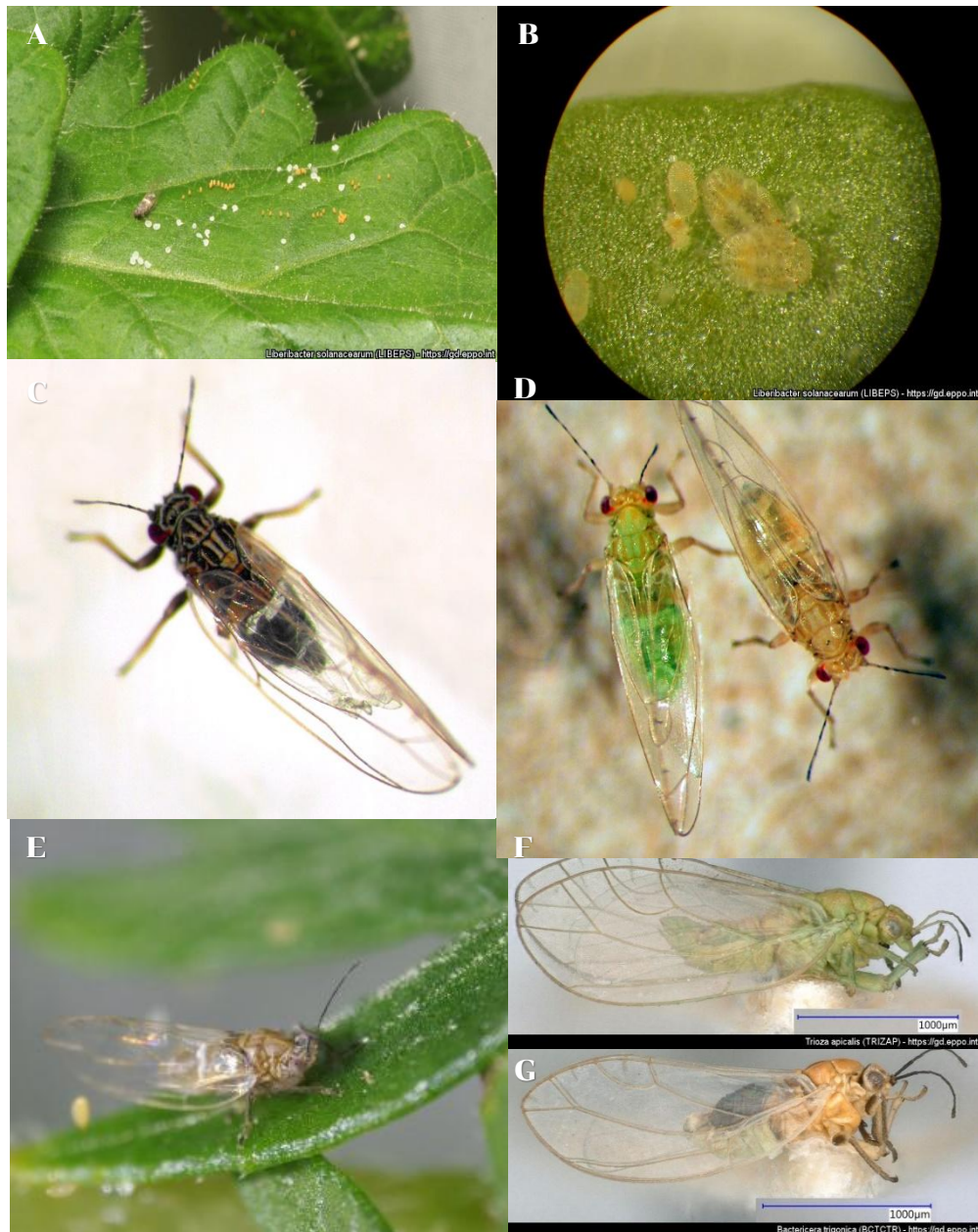


Figure 3 A) and B) *Bactericera cockerelli* adults with eggs and white granule excrements (EPPO, 2024) C) and D) 3-4 th instar potato psyllid (*Bactericera cockerelli*, vector of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*') (CABI, 2024) E) Psyllid *Bactericera nigricornis* vector (Erik J. W. and Arash R., 2022) F) Psyllid *Bactericera trigonica* (EPPO, 2024) and G) Psyllid *Trioza apicalis* vector (EPPO, 2024)

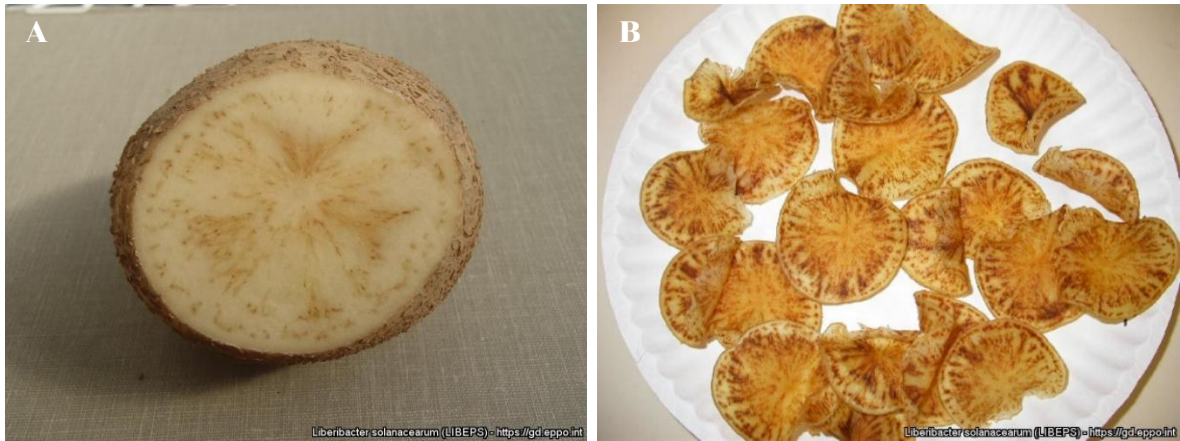


Figure 4 Symptoms of zebra chip disease on potato tuber A) Zebra chip infected potato tuber shows brown color in vascular tube B) Zebra chip symptoms on fried chips (EPPO, 2024)



Figure 5 Symptoms of zebra chip on Potato
 A) Potato plant infected with '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' the shoot show purple (EPPO, 2024)
 B) Aerial tuber formation in potato plants infected with '*Ca. L. solanacearum*'. (Binoy, 2022; credits: Dr. Lia Liefing)
 C) Potato plants mortality due to zebra chip (EPPO, 2024)
 D) "Pink belly", sign of severe zebra chip damage (Pink belly) (EPPO, 2024)



Figure 6 A and B Symptoms of zebra chip on Carrot (EPPO, 2024)
 C and D Symptoms of zebra chip on Celery (EPPO, 2024)
 E Symptoms of zebra chip on Cape gooseberry (EPPO, 2024)

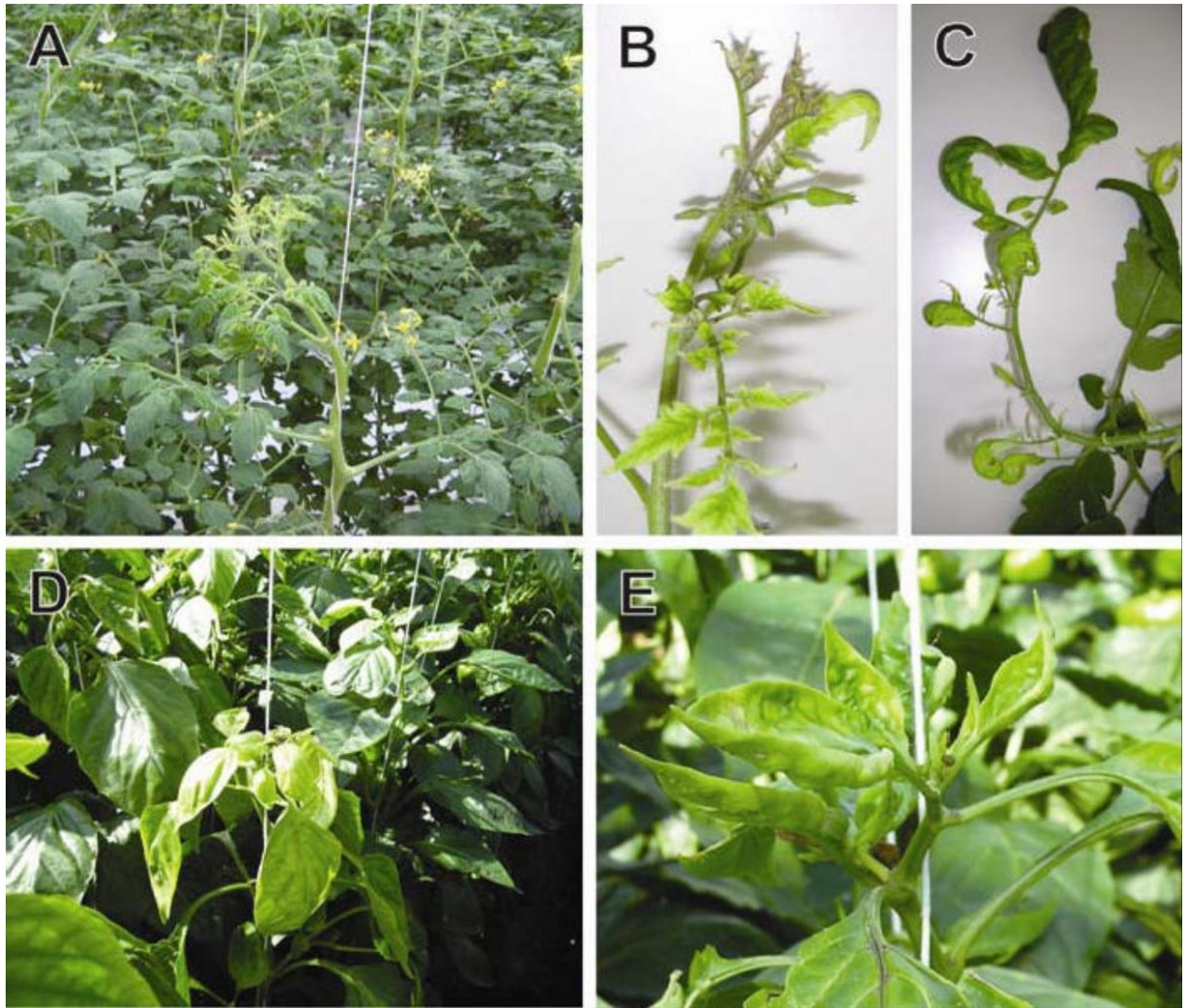


Figure 7 A B and C Symptoms of zebra chip on tomato (Liefting *et al.*, 2009)
D and E Symptoms of zebra chip on peper (Liefting *et al.*, 2009)

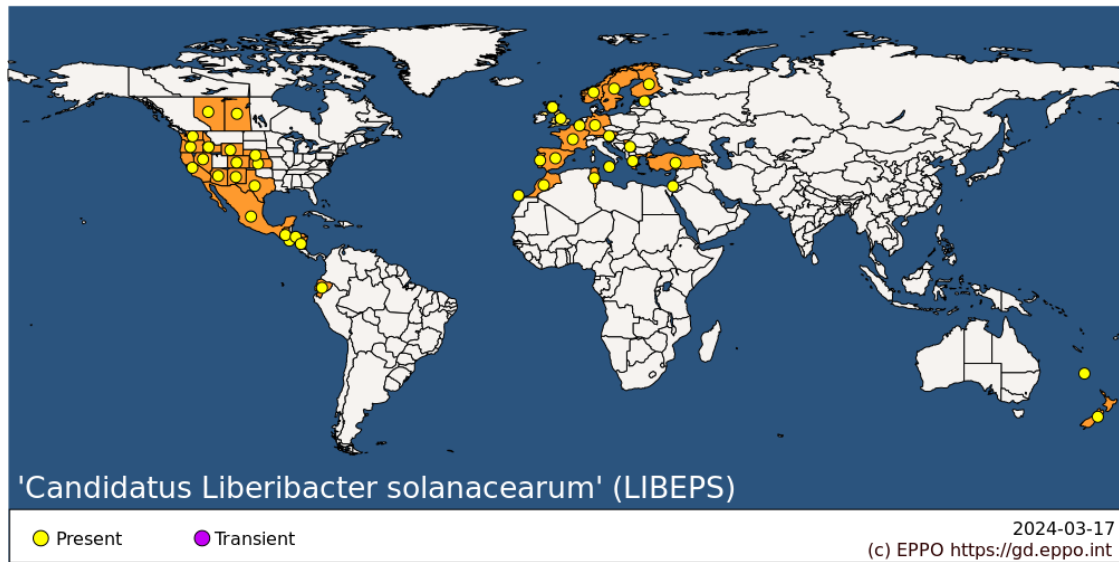


Figure 7 Distribution map of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'

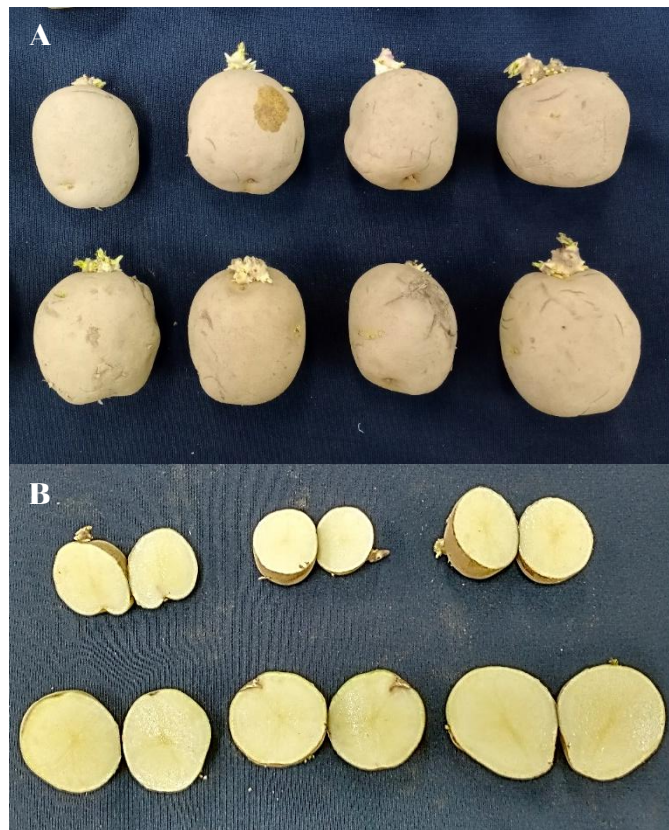


Figure 8 Seed potato imported from Scotland UK
A) Seed potato B) Healthy of seed potato



Figure 9 The cutting of Vascular ring for detected by Nested-PCR

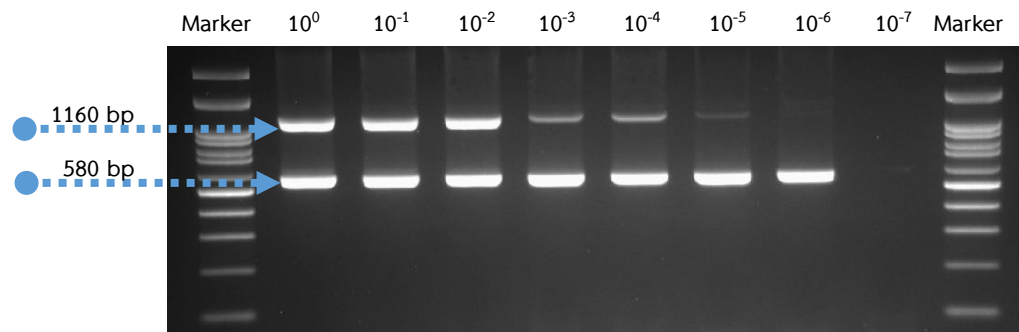


Figure 10 : Dilution of Synthesis of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Lso) positive DNA by Nested-PCR

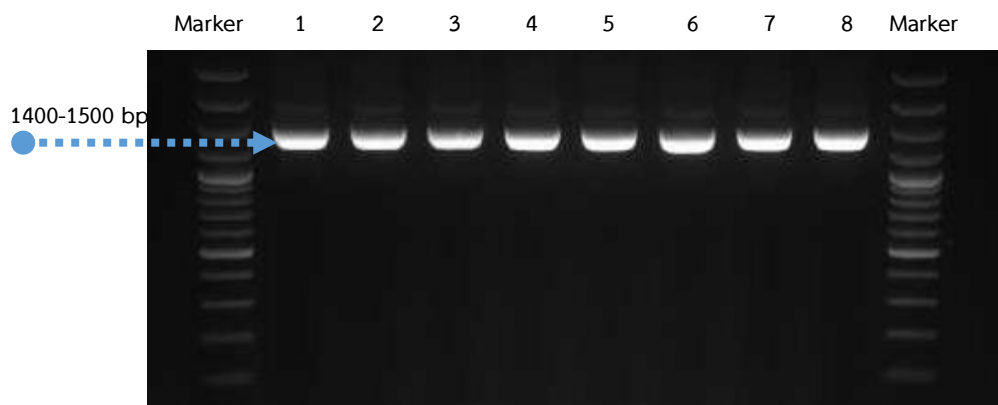


Figure 11 : PCR Product of 16S bacterial and plant chromosomal by CTAB Extraction from Vascular ring of Potato seed

Lane 1 and 2 : DNA of Potato seed form Kingdom of Scotland

Lane 3 : DNA of Potato seed form Australia

Lane 4 : DNA of Potato seed form Canada

Lane 5 : DNA of Potato seed form Kingdom of Netherlands

Lane 6 : DNA of Potato seed form New Zealand

Lane 7 : DNA of Potato seed form United States



Figure 12 Sampling of seed potato imported from the Kingdom of Scotland.



Figure 13 Potato planting plot from imported seed potatoes A) Wiang Pa Pao District Chiang Rai Province B) Theing District, Chiang Rai Province C) Chiang Kham District, Phayao Province D) Phop Phra District, Tak Province E) Mae Chaem District, Chiang Rai Province F) Phop Phra District, Tak Province G) Mueang Sakon Nakhon District