รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช

2. โครงการวิจัย : วิจัยการศึกษาสถานภาพศัตรูพืชกักกันในประเทศไทย

กิจกรรม : การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

กิจกรรมย่อย : -

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การศึกษาสถานภาพเชื้อไวรัส *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* ในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on the Status *of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายภูวนารถ มณีโชติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววาสนา รุ่งสว่าง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายภานุวัฒน์ มูลจันทะ	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
	นางสาวประภาพร แพงดา	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
	นางสาวศิริลักษณ์ ล้านแก้ว	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
	นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ :

โรคใบด่างมันสำปะหลังเป็นโรคที่มีก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตมันสำปะหลังในหลายประเทศในทวีปแอฟริกา คาบสมุทรอินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเชื้อ *Cassava mosaic virus* ที่เป็นสาเหตุของโรคนี้มีรายงานทั้งหมด 12 ชนิด ในปี 2559 มีรายงานการพบโรคใบด่างมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ในประเทศกัมพูชาและเป็นการพบครั้งแรกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การวิจัยนี้ต้องการศึกษาสถานภาพการปรากฏหรือไม่ปรากฏในประเทศ โดยได้เริ่มดำเนินการสำรวจตามหลักการสำรวจ ISPM No.6 ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 จากการสำรวจพบอาการคล้ายโรคใบด่างมันสำปะหลังในจังหวัดศรีสะเกษ สุรินทร์ และปราจีนบุรี จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของตัวอย่างจากศรีสะเกษและปราจีนบุรีด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS), Illumina Hiseq 150PE platform ปรากฏว่า

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับนิวคลิโอไทด์เหมือนกับเชื้อ SLCMV ของประเทศกัมพูชา 99.8% จึงได้ทำการสำรวจในแปลงปลูกมันสำปะหลังใน 51 จังหวัด โดยเก็บตัวอย่างที่คล้ายโรคใบด่างมันสำปะหลังรวมทั้งสิ้น 5,143 ตัวอย่าง มาตรวจสอบด้วยด้วยเทคนิค PCR พบตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ SLCMV ใน 32 จังหวัด รวมจำนวน 3,860 ตัวอย่าง คิดเป็น 75% ของตัวอย่างทั้งหมด ปัจจุบันยังได้ทำลายหมดแล้ว 9 จังหวัด และยังพบการระบาดใน 23 จังหวัด อย่างไรก็ตามการเฝ้าระวังการระบาดของโรคยังคงต้องดำเนินการต่อไป

คำสำคัญ: โรคใบด่างมันสำปะหลัง เชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง มันสำปะหลัง การตรวจสอบโรคใบด่าง-มันสำปะหลัง

Abstract :

Cassava mosaic disease (CMD), caused by *Cassava mosaic virus*, is the one of most important viral disease in cassava production in the African continent, the Indian subcontinent and Southeast Asia. The twelve distinct cassava mosaic geminiviruses (CMGs) have been documented as the causal agents of CMD. In Southeast Asia, *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) have been recorded as first reported in Cambodia in 2015. To determine the presence and incidence of SLCMV in Thailand, the official surveys in line with ISPM No.6 were conducted during 2017-2020. In August 2018, the symptomatic plants associated with CMD were observed in the cassava plantation in Srisaket, Surin and Prachinburi provinces. Two samples from Srisaket and Prachinburi provinces were identified by Next generation sequencing (NGS), Illumina Hiseq 150PE platform. By NGS result, viral sequences obtained from the assemble reads were identical to SLCMV in Cambodia at 99.8% and identified to be SLCMV. During August 2018- September 2020, the detection surveys to cover 51 provinces in Thailand, the total of 5,143 cassava samples were collected from plantations to diagnose for SLCMV infection by PCR. By PCR-based diagnostics, out of 3,860 samples were found infected by SLCMV, indicating 75% of the total number of tested samples. By the official surveys, CMD was spread in 32 provinces, nowadays CMD was eliminated from fields in 9 provinces and still found in 23 provinces. Nevertheless, the surveillance program for SLCMV in cassava plantation areas will be continued.

Key words: Cassava mosaic disease, Cassava mosaic virus, *Sri Lankan cassava mosaic virus,* SLCMV

6. คำนำ

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic Disease : CMD) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Cassava mosaic virus* ที่จัดอยู่ในจีนัส *Begomovirus* มีรายงานทั้งหมด 12 ชนิด (ตารางผนวกที่ 1) โดย 10 ชนิด ก่อความเสียหาย 20-100% ในหลายประเทศทางแอฟริกา เช่น ยูกันดา ทานซาเนีย และ มาดากัสคา เป็นต้น ส่วนทวีปเอเชียพบรายงานอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) และ *Sri Lankan cassava mosaic virus*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

(SLCMV) โดยก่อความเสียหายต่อผลผลิตของปลูกมันสำปะหลังในประเทศอินเดียและศรีลังกามากถึง 88% (Brown *et al*., 2015; Jose et al., 2008) โรคใบด่างมันสำปะหลังสามารถเข้าทำลายมันสำปะหลังได้ทุกระยะ มันสำปะหลังที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบด่าง เหลือง ใบเสียรูปทรง และยอดที่แตกใหม่จะแสดงอาการด่างอย่างรุนแรง ลำต้นแคระแกร็น ทั้งนี้ความรุนแรงของโรคขึ้นอู่กับสายพันธุ์ของไวรัสและพันธุ์พืช ทั้งนี้เชื้อไวรัสสามารถติดมากับท่อนพันธุ์มันสำปะหลังและมีแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci* Gennadius) เป็นแมลงพาหะซึ่งทำให้มีการแพร่กระจายและระบาดได้ การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยอาศัยแมลงพาหนะ (vector) จัดว่าเป็นการถ่ายทอดเชื้อระหว่างต้นพืชที่มีความสำคัญมากเพราะสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและควบคุมได้ยาก (Byrne *et al*., 1990; Dubern *et al*., 1994; Duraisamy *et al*., 2013)

ในช่วงปี 2558 - 2563 พบมีรายงานการระบาดโรคใบด่างมันสำปะหลังในประเทศกัมพูชา (Wang *et al*., 2016) เวียดนาม (Uke *et al*.,2018) จีน (Wang *et al*., 2019) และประเทศไทย จากการวิเคราะห์และตรวจสอบพบว่าโรคใบด่างมันสำปะหลังที่ระบาดเกิดจากเชื้อ SLCMV เพียงชนิดเดียวเท่านั้น

เนื่องจากเชื้อไวรัส SLCMV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มเดียวกับ ACMV ประเทศไทยกำหนดให้เป็นศัตรูพืชกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักกัน พ.ศ. 2550 และห้ามนำเข้าท่อนพันธุ์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของมันสำปะหลัง ยกเว้นหัวมันสดและมันเส้น ถึงแม้ว่าในประเทศไทยพบโรคใบด่างมันสำปะหลังแล้ว จึงยังมีความจำเป็นต้องเฝ้าระวังการแพร่ระบาดไปยังแหล่งปลูกอื่น ๆ ในประเทศ ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงต้องมีการสำรวจและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดในประเทศอย่างต่อเนื่องต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง
2. สารเคมี
    - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
    - ไนโตรเจนเหลว
    - ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
    - One Step RT-PCR kit (Biotechrabbit, Germany)
    - 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotechrabbit, Germany)
    - Agarose gel (SeaKem, USA)
    - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
    - 1X TAE Buffer

กรมวิชาการเกษตร

3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- เครื่องปั่นตกตะกอน Mini Spin (Eppendorf, USA)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ Pipetman Kit (Gilson, France)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermo cycler
- เครื่องแยกสารพันธุกรรม Wide Mini-Sub Cell GT Basic System (Biorad, USA)
- เครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, USA)
- เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
- หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

7. วิธีดำเนินการ

1. ขั้นตอนการสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง

1.1 กำหนดพื้นที่สำรวจ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง และเก็บแมลงหวี่ขาวยาสูบ ที่พบในพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 51 จังหวัด ดังนี้

1. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่ติดกับชายแดนประเทศกัมพูชา ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ และจันทบุรี

2. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน พะเยา แพร่ น่าน ตาก กำแพงเพชร สุโขทัย อุตรดิตถ์ พิษณุโลก พิจิตร เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี ชัยนาท อุทัยธานี นครสวรรค์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง ตราด ชลบุรี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด มหาสารคาม อำนาจเจริญ ยโสธร มุกดาหาร หนองบัวลำภู นครพนม เลย สกลนคร บึงกาฬ ชัยภูมิ หนองคาย อุดรธานี ขอนแก่น และกาฬสินธุ์ โดยความร่วมมือกับสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ และศูนย์วิจัยเมล็ดพันธุ์พืช หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาค ได้แก่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร ที่ 1-6 และหน่วยงานกรมส่งเสริมการเกษตร

1.2 วางแผนการสำรวจตามมาตรฐาน ISPMs No. 6 (Guidelines for surveillance)

ในการสำรวจในแต่ละพื้นที่โดยมีขั้นตอนและอัตราการสุ่มตัวอย่างที่เหมาะสมให้กระจายตลอดพื้นที่ปลูกตามมาตรฐาน ISPMs No. 6 ดังนี้

พื้นที่ปลูก 1-25,000 ไร่	สำรวจจำนวน 5 จุด
พื้นที่ปลูก > 25,000 ไร่ - 30,000 ไร่	สำรวจจำนวน 10 จุด
พื้นที่ปลูก > 30,000 ไร่ - 40,000 ไร่	สำรวจจำนวน 15 จุด
พื้นที่ปลูก > 40,000 ไร่	สำรวจจำนวน 20 จุด

กรมวิชาการเกษตร

1.3 การสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลัง

สุ่มเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคใบด่างมันสำปะหลังให้กระจายตลอดพื้นที่ที่ปลูกในแต่ละจังหวัดไม่น้อยกว่า 10 จุด จุดละ 5 ไร่ โดยเก็บข้อมูล 1 แถวทุกต้น เว้น 3 แถว และสำรวจทุกต้น โดยการเดินสุ่มแบบตัวยู ถ้ามีอาการที่สงสัยให้เก็บตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ

1.4 การบันทึกข้อมูล

ลักษณะข้อมูลที่เก็บได้แก่ ลักษณะอาการที่สงสัย แมลงหวี่ขาวยาสูบทุกระยะ ปริมาณที่พบ พิกัดภูมิศาสตร์ วันที่เก็บข้อมูล สถานที่พบ และบันทึกภาพอาการ

2. การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค PCR

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง

สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่เก็บมาด้วย Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, Taiwan) มีขั้นตอนดังนี้

1. บดใบมันสำปะหลังแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ FAPG1 ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและเติม RNase A ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 °C นาน 10 นาที

2. เติมบัฟเฟอร์ FAPG1 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นดูดทิ้งส่วนของเหลวใสใส่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร

3. เติมบัฟเฟอร์ FAPG3 ปริมาตร 1.5 เท่าของทิ้งส่วนของเหลวใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายมาใส่ใน FAPG Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส

4. เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลวใสแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที

5. นำ FAPG Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บ DNA ที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

2.2 การตรวจหาเชื้อ SLCMV ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่สงสัยด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อ SLCMV จากตัวอย่างที่ได้รับมาด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ SLCMV โดยใช้ส่วนผสมของ Green PCR Master Mix (Biotechrabbit, Germany) ทำปฏิกิริยาในหลอด PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

2x master mix buffer	10 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

SLCMV-F (10 pmole)	1 ไมโครลิตร
SLCMV-R (10 pmole)	1 ไมโครลิตร
Nuclease-free water	5 ไมโครลิตร
DNA template	3 ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermo cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีการของ Makeshkumar *et al*. (2005) ดังนี้

1) Predenaturation	94 °C	5 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	94 °C	20 วินาที
Annealing	56 °C	20 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	7 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้ว ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม RedSafe Nucleic Acid Staining Solution, 2000x (iNtRON Biotecnology, Korea) ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (Biorad, USA)

3. การเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อSLCMV ด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA)

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากมันสำปะหลังในขั้นตอน 2.1 มาเพิ่มปริมาณจีโนมด้วยเทคนิค RCA โดยใช้ส่วนผสมของชุด TempliPhi Amplification Kit (GE Healthcare, England) ทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 1.5 มล. ปริมาตรรวม 10.7 ไมโครลิตร มีส่วนผสมและขั้นตอน ดังนี้

Semple buffer	5 ไมโครลิตร
DNA template	0.5 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาที แล้วบ่มบนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที

Reaction buffer	5 ไมโครลิตร
Enzyme mix	0.2 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 15 ชั่วโมง และยังบั้งปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 65 °C นาน 10 นาที

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีโนมเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) และการวิเคราะห์ข้อมูล

นำดีเอ็นเอที่จากการทำ RCA มาตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความบริสุทธิ์ (A260/A280) ให้อยู่ระหว่าง 1.8 - 2.2 สำหรับความเข้มข้นต้อง ≥ 2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับความเข้มข้นสำหรับการวิเคราะห์ต้อง ≥ 300 นาโนกรัม เมื่อเตรียมดีเอ็นเอตามข้อกำหนดแล้ว จึงส่งไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วยเครื่อง illuminar Hiseq 150 PE และวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศโดย บริษัท วิชูโอไบโอเมดิคอล (ไทยแลนด์) จำกัด

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree

เมื่อได้ลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีโนมเชื้อ SLCMV ทั้ง Segment A และ Segment B แล้วจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อ SLCMV ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากข้อมูลนิวคลิโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของเชื้อ SLCMV กับไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al*., 2018)

เวลาที่ทำการทดลอง ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังใน 6 จังหวัด ที่มีอาณาเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ และจันทบุรี
3. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน พะเยา แพร่ น่าน ตาก กำแพงเพชร สุโขทัย อุตรดิตถ์ พิษณุโลก พิจิตร เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี ชัยนาท อุทัยธานี นครสวรรค์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง ชลบุรี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด มหาสารคาม อำนาจเจริญ ยโสธร มุกดาหาร หนองบัวลำภู นครพนม เลย สกลนคร บึงกาฬ ชัยภูมิ หนองคาย อุดรธานี ขอนแก่น และกาฬสินธุ์

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลัง

การสำรวจพื้นปลูกมันสำปะหลังใน 50 จังหวัด โดยความร่วมมือกับสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ และศูนย์วิจัยเมล็ดพันธุ์พืช หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาค ได้แก่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร ที่ 1-6 และหน่วยงานกรมส่งเสริมการเกษตร จากการสำรวจพบมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลังใน 32 จังหวัด ดังนี้

1. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังใน 6 จังหวัด ที่มีอาณาเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา พบโรคใบด่างมันสำปะหลังใน 5 จังหวัดได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ และจันทบุรี

2. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย พบโรคใบด่างมันสำปะหลังใน 26 จังหวัดได้แก่ จังหวัดกาญนบุรี กาฬสินธุ์ กำแพงเพชร ขอนแก่น ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ชัยนาท ชัยภูมิ เชียงราย นครราชสีมา นครสวรรค์ ปราจีนบุรี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แพร่ มหาสารคาม มุกดาหาร ยโสธร ร้อยเอ็ด ระยอง ลพบุรี ลำปาง สระบุรี สุพรรณบุรี อำนาจเจริญ และอุทัยธานี

กรมวิชาการเกษตร

2. ลักษณะอาการโรคใบด่างมันสำปะหลัง

1. ลักษณะอาการบนยอด ส่วนของยอดอ่อนหรือยอดที่เกิดใหม่จะแสดงอาการด่างเขียวอ่อนหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม มีขนาดเรียวเล็ก หงิกงอ และเสียรูปทรง (ภาพที่ 1)

2. ลักษณะอาการบนใบ ส่วนใบที่ถัดลงมาจากยอดหรือใบแก่จะพบอาการด่างเขียวอ่อนหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม หงิกงอ และเสียรูปทรง (ภาพที่ 2)

3. ลักษณะการเกิดโรคที่มีเชื้อไวรัสติดมากับท่อนพันธุ์หรือส่วนของเหง้า

ลักษณะการเกิดโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์จะเกิดขึ้นเป็นแหล่ง ๆ ตามที่ท่อนพันธุ์นั้นปลูกอยู่ในแปลง โดยทั่วไปแล้วถ้าหากเป็นการติดเชื้อที่ติดมากับท่อนพันธุ์จะแสดงอาการใบด่างทั้งต้น ส่วนต้นมันสำปะหลังจะมีลักษณะแคระแกร็นหรือต้นจะเตี้ยกว่ามันสำปะหลังปกติ แต่บริเวณลำต้นจะไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น

3.1 อาการบนยอดหรือส่วนที่งอกใหม่ ยอดและใบที่แตกหรือเกิดมาใหม่จะแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน หรือสีเขียวสลับสีเหลือง ใบหงิกงอ และเสียรูปทรงตั้งแต่เริ่มงอก (ภาพที่ 3)

3.2. อาการบนใบแก่และลำต้น ใบมันสำปะหลังที่ถัดลงมาจากไปยอดจะแสดงอาการอาการด่างหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม ซึ่งอาการใบด่างจะเห็นได้ชัดทุกใบทั่วทั้งลำต้น และต้นมันที่เป็นโรคจะแคระแกร็นกว่าต้นมันปกติ (ภาพที่ 4)

4. ลักษณะการเกิดโรคที่มีแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นพาหะ

ลักษณะการแพร่ระบาดที่เกิดจากแมลงหวี่ขาวยาสูบมักจะเป็นการแพร่ลุกลามจากจุดที่มีต้นเป็นโรคออกไปเป็นบริเวณกว้าง หรือถ้าหากแมลงหวี่ขาวยาสูบบินมากจากแปลงข้างเคียงก็มักจะเกิดการแพร่จากขอบแปลงเข้าสู่กลางแปลง หากมันสำปะหลังได้รับเชื้อช่วงอายุน้อย หรือ 1-2 เดือน จะเห็นอาการด่างในใบล่างคล้ายกับกรเกิดโรคจากท่อนพันธุ์ (ภาพที่ 5) แต่ถ้าหากติดในระยะ 5-6 เดือน หรือลงหัวแล้ว อาการมักจะเห็นแค่ส่วนยอดและใบล่างถัดลงมาจากยอด จะไม่พบอาการใบด่างทั่วทั้งต้น (ภาพที่ 6) ส่วนต้นมันสำปะหลังจะมีลักษณะแคระแกร็นหรือต้นจะเตี้ยกว่ามันสำปะหลังปกติ บริเวณลำต้นจะไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น

4.1 อาการในต้นมันสำปะหลังที่ยังเล็ก หลังจากที่ต้นมันสำปะหลังได้รับเชื้อจากแมลงหวี่ขาวประมาณ 2-3 สัปดาห์ การพัฒนาการของโรคจะเริ่มจากใบยอดแสดงอาการซีด (ลูกศรสีเหลือง) หรือ อาการด่าง (ลูกศรสีแดง) จากนั้นใบล่างที่ถัดลงมาจากยอดจึงจะแสดงอาการใบด่าง (ภาพที่ 5)

4.2 อาการในต้นมันสำปะหลังที่ลงหัวแล้วหรืออายุมาก การพัฒนาการของโรคจะคล้ายกับต้นมันสำปะหลังที่ยังเล็กโดยหลังจากที่ต้นมันสำปะหลังได้รับเชื้อจากแมลงหวี่ขาว ใบยอดจะเริ่มแสดงอาการซีดหรือด่าง จากนั้นใบล่างที่ถัดลงมาจากยอดจึงจะแสดงอาการใบด่าง (ภาพที่ 6)

ศรีวิชัยการเกษตร

5. การตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์

การตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคใบด่างมันสำปะหลังและอาการต้องสงสัยจากแปลงปลูกมันสำปะหลังใน 32 จังหวัด รวมจำนวนทั้งสิ้น 5,143 ตัวอย่าง ตรวจพบเป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 3,860 ตัวอย่าง และไม่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 1,283 ตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) ได้ใช้เชื้อไวรัส จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่พบในจังหวัดศรีสะเกษ (ไอโซเลต Srisaket) และจังหวัดปราจีนบุรี (ไอโซเลต Prachinburi) ซึ่งได้ผลการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังศรีสะเกษ (ไอโซเลต Srisaket)

- นิวคลิโอไทด์ของ segment A (Accession no. MN026160) มีจำนวนทั้งสิ้น 2,758 นิวคลิโอไทด์ สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนทั้งหมด 6 โปรตีน และนิวคลิโอไทด์ของ segment B (Accession no. MN026162) มีจำนวนทั้งสิ้น 2,737 นิวคลิโอไทด์ สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนทั้งหมด 2 โปรตีน (ภาพที่ 7)

2. ตัวอย่างมันสำปะหลังปราจีนบุรี (ไอโซเลต Prachinburi)

- นิวคลิโอไทด์ของ segment A (Accession no. MN026159) มีจำนวนทั้งสิ้น 2,758 นิวคลิโอไทด์ สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนทั้งหมด 6 โปรตีน และนิวคลิโอไทด์ของ segment B (Accession no. MN026161) มีจำนวนทั้งสิ้น 2,737 นิวคลิโอไทด์ สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนทั้งหมด 2 โปรตีน (ภาพที่ 8)

นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง segment A และ segment B ของเชื้อ SLCMV เพิ่มอีก 8 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตสระแก้ว สุรินทร์ ขอนแก่น ฉะเชิงเทรา ชลบุรี นครราชสีมา ระยอง และอุบลราชธานี (ตารางผนวกที่ 2)

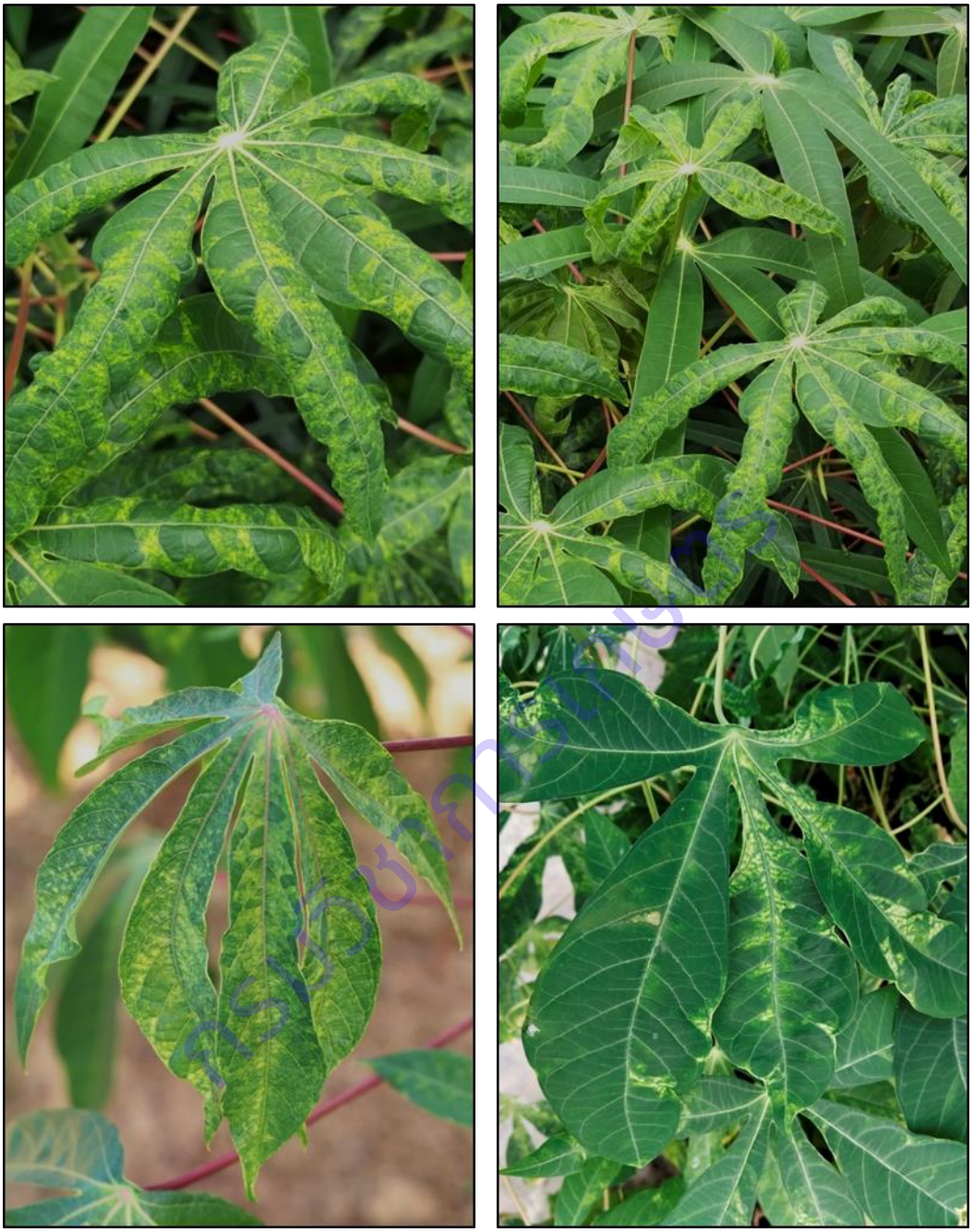
6. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์และความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลิโอไทด์จีโนมของเชื้อ SLCMV ทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่า segment A มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.1% - 100% และ segment B ที่ระดับ 98.1% - 100% (ตารางผนวกที่ 3)

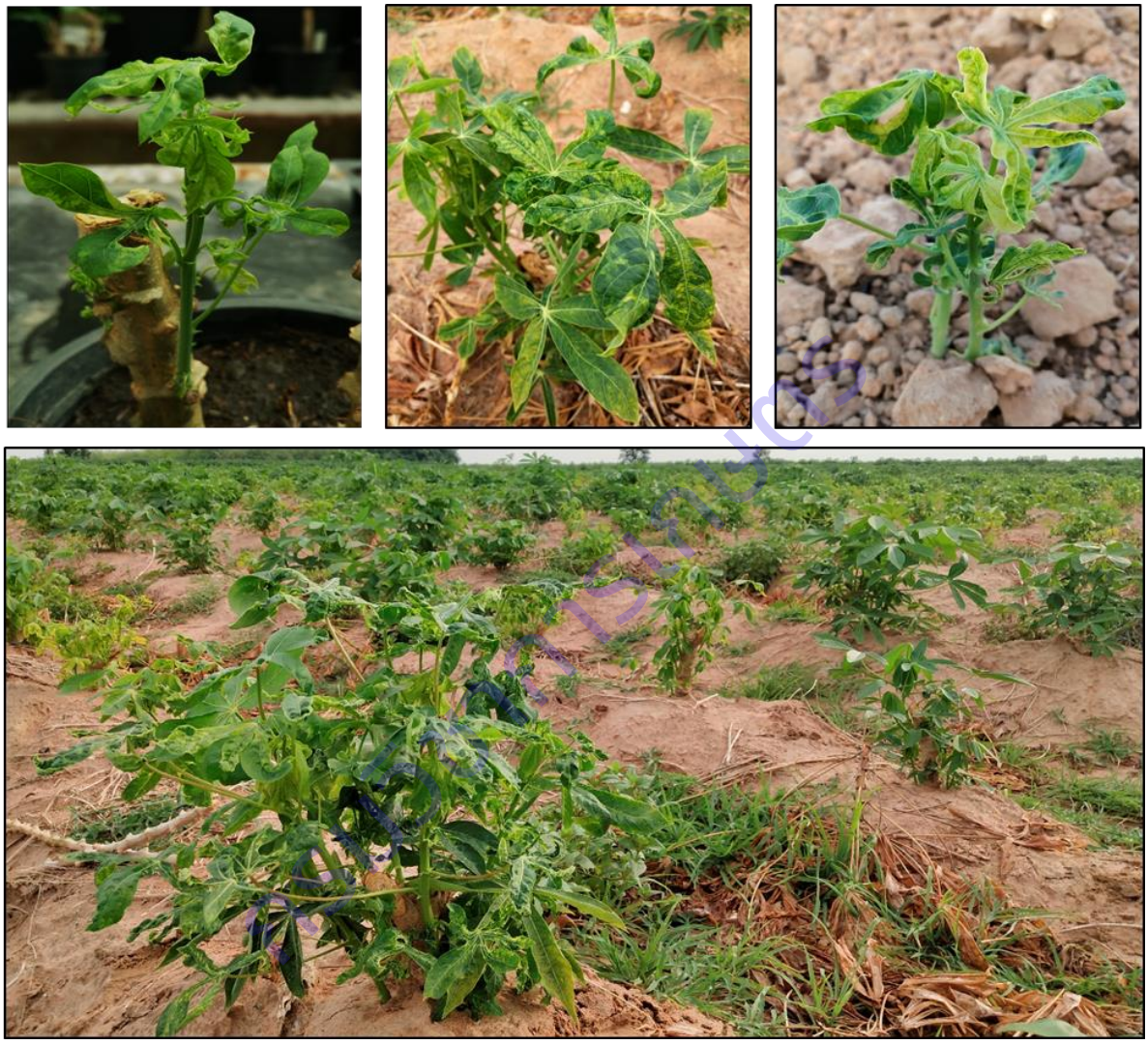
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree ทั้ง 10 ไอโซเลต ด้วยลำดับนิวคลิโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง segment A (ภาพที่ 9) และ segment B (ภาพที่ 10) ของเชื้อ SLCMV จำนวน 10 ไอโซเลตของประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม และจีน

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1 ยอดอ่อนหรือยอดที่เกิดใหม่จะแสดงอาการด่างเขียวอ่อนหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม มีขนาดเรียวเล็ก หงิกงอและเสียรูปทรง



ภาพที่ 2 ใบมันสำปะหลังที่แสดงอาการด่างเขียวอ่อนหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม มีขนาดเรียวเล็ก หงิกงอ และเสียรูปทรง

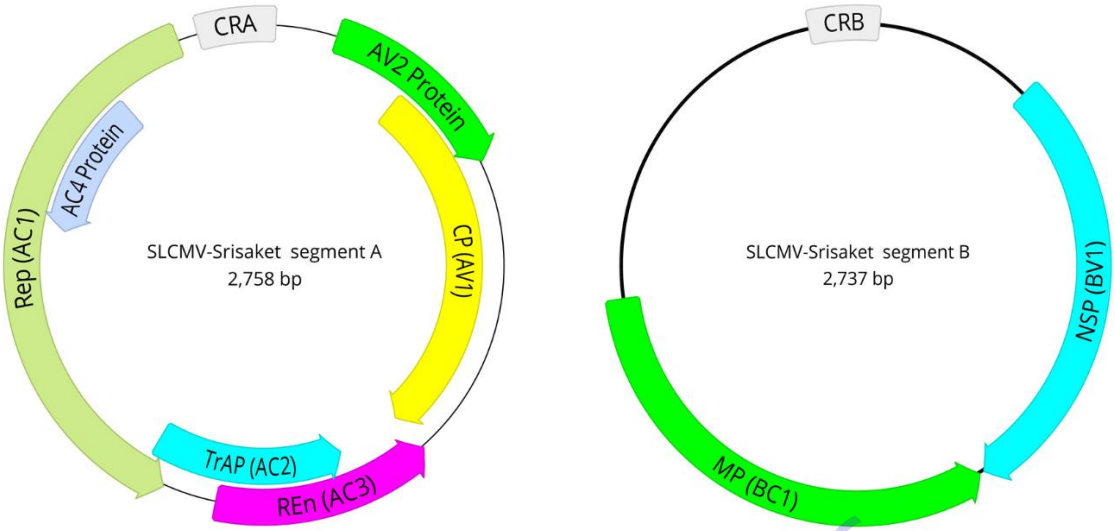


ภาพที่ 3 ยอดและใบที่แตกหรือเกิดมาใหม่จากท่อนพันธุ์หรือเหง้า แสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม ใบหงิกงอ และเสียรูปทรงตั้งแต่เริ่มงอก

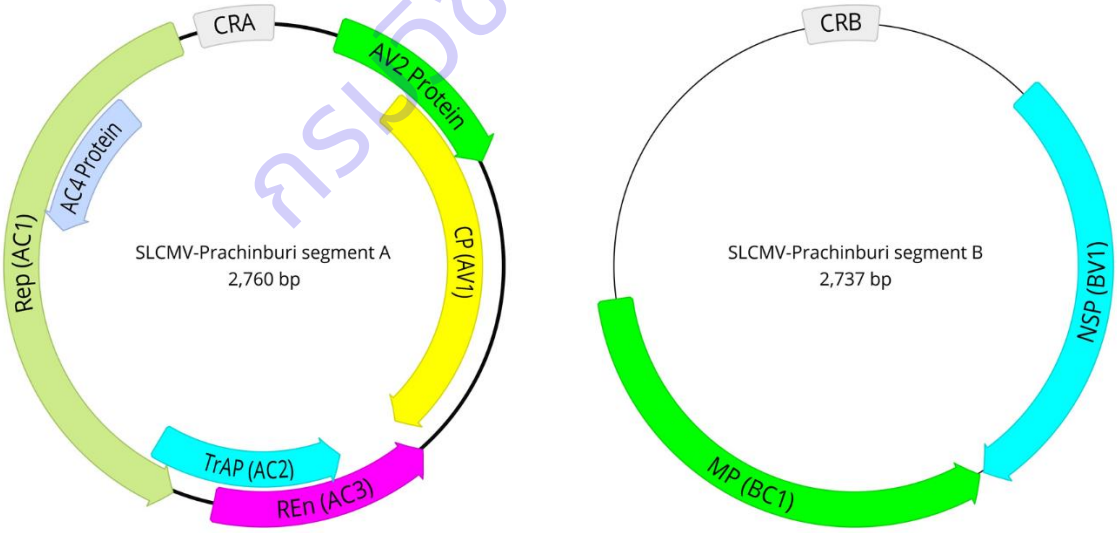
ภาพที่ 4 ใบมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างจากท่อนพันธุ์หรือเหง้า แสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนหรือเหลือง สลับเขียวเข้ม ใบหงิกงอ และเสียรูปทรงทั่วทั้งต้น

ภาพที่ 5 การพัฒนาการของโรคใบด่างที่ถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหวี่ขาวยาสูบ จะพบใบยอดแสดงอาการใบซีด (ลูกศรสีเหลือง) หรืออาการด่าง (ลูกศรสีแดง) แล้วเกิดอาการด่างและเสียรูปทรงทั้งยอด และใบล่างที่ถัดลงมาจากยอดที่แสดงอาการใบด่าง

ภาพที่ 6 โรคใบด่างที่ถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหวี่ขาวยาสูบ บริเวณใบยอดและใบล่างที่ถัดลงมาจากยอดของต้นมันสำปะหลังที่ลงหัวแล้วหรืออายุมาก

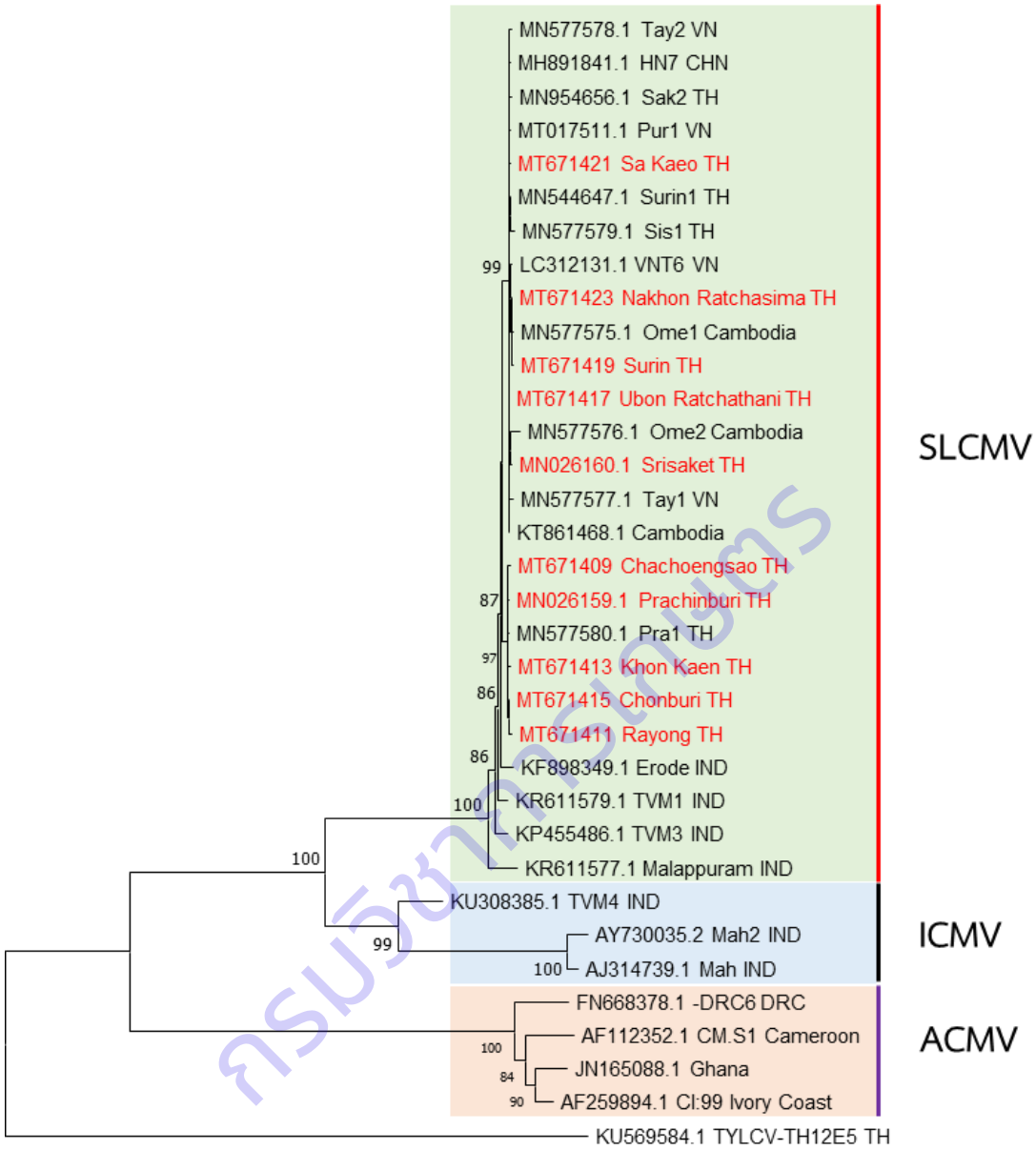


ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส SLCMV ไอโซเลต Srisaket ทั้ง segment A และ segment B สาเหตุโรคโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบในจังหวัดศรีสะเกษ



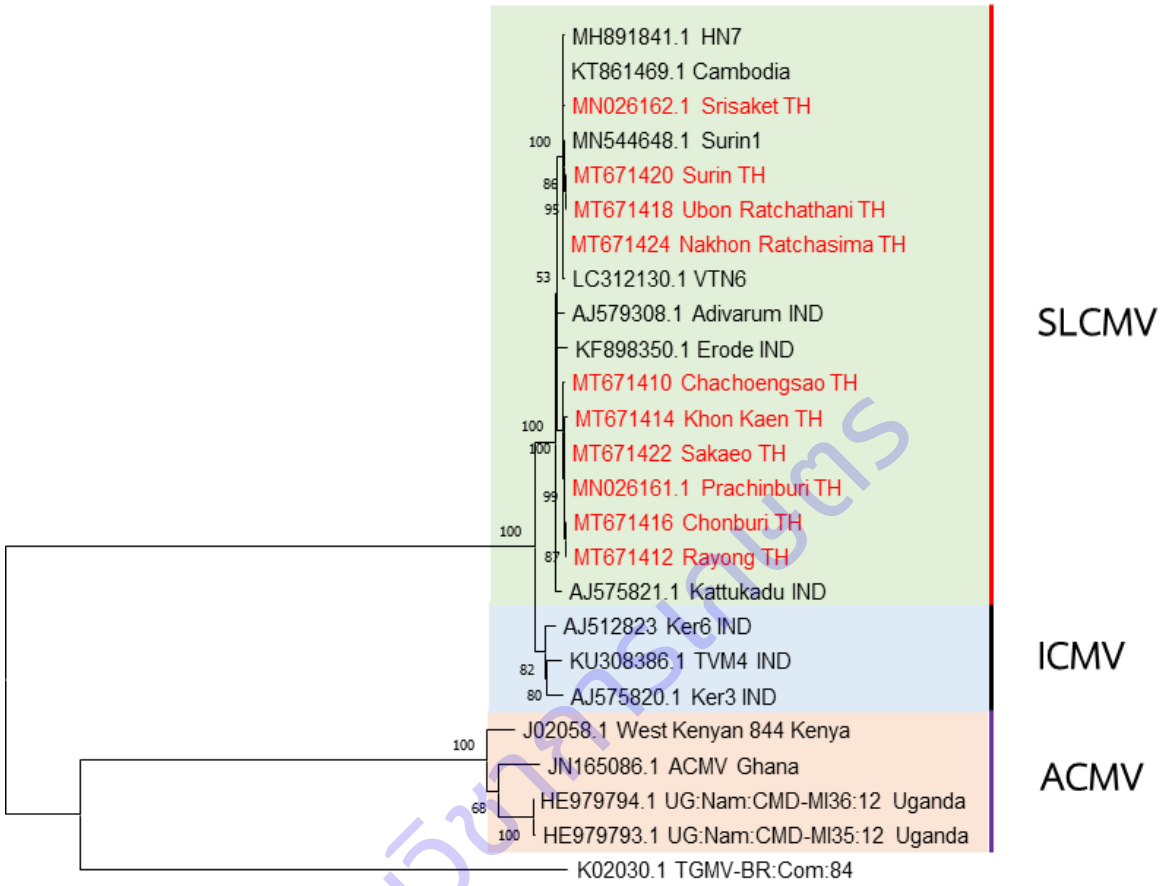
ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส SLCMV ไอโซเลต Prachinburi ทั้ง segment A และ segment B สาเหตุโรคโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบในจังหวัดปราจีนบุรี

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 9 Neighbor-joining phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยลำดับนิวคลิโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง segment A ของเชื้อ SLCMV ทั้ง 10 ไอโซเลต ของไทยกับ ไอโซเลตอื่น ๆ ของเชื้อ SLCMV, *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) และ *African cassava mosaic virus* (ACMV) ที่มีรายงานในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA Xโดยใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 80% และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCV-TH12E5) เป็น outgroup

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 10 Neighbor-joining phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยลำดับนิวคลิโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง segment B ของเชื้อ SLCMV ทั้ง 10 ไอโซเลตของไทยกับไอโซเลตอื่น ๆ ของเชื้อ SLCMV, *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) และ *African cassava mosaic virus* (ACMV) ที่มีรายงานในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 80% และใช้ข้อมูลของเชื้อ Tomato golden mosaic virus-Yellow vein (TGMV-BR) เป็น outgroup

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการศึกษาสถานภาพการปรากฏของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ในประเทศไทยตั้งแต่ ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 พบการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังใน 32 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ จันทบุรี กาญนบุรี กาฬสินธุ์ กำแพงเพชร ขอนแก่น ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ชัยนาท ชัยภูมิ เชียงราย นครราชสีมา นครสวรรค์ ปราจีนบุรี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แพร่ มหาสารคาม มุกดาหาร ยโสธร ร้อยเอ็ด ระยอง ลพบุรี ลำปาง สระบุรี สุพรรณบุรี อำนาจเจริญ และอุทัยธานี

การตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคใบด่างมันสำปะหลังและอาการต้องสงสัยจากแปลงปลูกมันสำปะหลังใน 32 จังหวัด รวมจำนวนทั้งสิ้น 4,143 ตัวอย่าง ตรวจพบเป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 2,860 ตัวอย่าง และไม่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 1,283 ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ทั้ง 10 ไอโซเลต ด้วยลำดับนิวคลิโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง segment A และ segment B ของเชื้อ SLCMV ทั้ง 10 ไอโซเลตของประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม และจีน

แม้ว่าในประเทศไทยพบการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังแล้ว แต่ก็ยังมีความจำเป็นต้องเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่ระบาดไปยังแหล่งปลูกอื่น ๆ ในประเทศอย่างต่อเนื่องต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. เพื่อเป็นเอกสารอ้างถึงสถานภาพการปรากฏของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ในประเทศไทย
2. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเฝ้าระวัง การตรวจติดตามการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลัง
3. ใช้เป็นเอกสารอ้างอิงในการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างมันสำปะหลังในห้องปฏิบัติการ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

Berrie, L.C., Rybicki, E.P., Rey, M.E. 2001. Complete nucleotide sequence and host range of *South African cassava mosaic virus*: further evidence for recombination amongst begomoviruses. *J. Gen. Virol*. 82 (Pt 1): 53-58.

Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C., Fiallo-Olive, E., Briddon, R.W., Hernandez-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., Varsani, A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160(6): 1593-1619.

Bull, S.E., Briddon, R.W., Sserubombwe, W.S., Ngugi, K., Markham, P.G., Stanley, J. 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *J. Gen. Virol*. 87(Pt 10): 3053-3065.

กรมวิชาการเกษตร

Byrne, D.N., Bellows T.B., M.P., P. 1990. Whiteflies in agricultural systems. pp. 227-261 In: Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management, D. Gerling (ed.). Intercept, Hants, United Kingdom.

Dubern, J. 1994. Transmission of *African cassava mosaic geminivirus* by the whitefly (Bemisia tabaci). *Trop. Science* 34: 82-91.

Duraisamy, R., Natesan, S., Muthurajan, R., Gandhi, K., Lakshmanan, P., Karuppusamy, N., Chokkappan, M. 2013. Molecular Studies on the Transmission of *Indian Cassava Mosaic Virus* (ICMV) and *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) in Cassava by Bemisia tabaci and Cloning of ICMV and SLCMV Replicase Gene from Cassava. *Mol. Biotechnol*. 53: 150-158.

Fondong, V.N., Thresh, J.M., Zok, S. 2002. Spatial and Temporal Spread of *Cassava Mosaic Virus* Disease in Cassava Grown Alone and when Intercropped with Maize and/or Cowpea. *J. Phytopathol.* 150(7): 365-374.

Harimalala, M., Lefeuvre, P., De Bruyn, A., Tiendrebeogo, F., Hoareau, M., Villemot, J., Ranomenjanahary, S., Andrianjaka, A., Reynaud, B., Lett, J.M. 2012. A novel cassava-infecting begomovirus from Madagascar: *cassava mosaic Madagascar virus*. Arch. Virol. 157(10): 2027-2030.

Kumar, S., Stecher, G., Li. M, Knyaz, C, and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol*. 35(6): 1547-11549.

Makeshkumar, T., Sankar, A., Nair, R.R., Edison, S. 2005. Detection of *cassava mosaic virus* in India using polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization technique. *J. Root Crops* 31(1), 1-6.

Malathi, V.G., Nair, N.G. and Shantha, P. 1985. Cassava Mosaic Disease. Technical Bulletin Series No.5, Central Tuber Crops Research Institute, Sreekariyam, Thiruvananthapuram, Kerala, India, 18p.

Morris, B., Coates, L., Lowe, S., Richardson, K., Eddy, P. 1990. Nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of *African cassava mosaic virus* (Nigerian strain). *Nucleic Acids Res*. 18(1), 197-198.

Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S., Fauquet, C.M. 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J. Gen. Virol*. 82 (Pt 3): 655-665.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Uke, A., Hoat, T.X, Quan, M.V., Liem, N.V., Ugaki, M. and Natsuaki, K.T. 2018. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infecting Cassava in Vietnam. *Plant Dis*. 102(12): 2669.

Wang, H.-L., Cui, X.-Y., Wang, X.-W., Liu, S.-S., Zhang, Z.-H., Zhou, X. 2016. First Report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* Infecting Cassava in Cambodia. *Plant Dis*. 100(5): 1029.

Wang, D., Yao, X.M., Huang, G.X., Shi, T., Wang, G.F. and Ye, J. 2019. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infected Cassava in China. *Plant Dis*. 103(6): 1437.

Zhou, X., Robinson, D.J., Harrison, B.D. 1998. Types of variation in DNA-A among isolates of *East African cassava mosaic virus* from Kenya, Malawi and Tanzania. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 11): 2835-2840.

กรมวิชาการเกษตร

13. ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 รายชื่อเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง ลักษณะอาการ แมลงพาหะ และการแพร่กระจาย

เชื้อไวรัส	จีนัส/แฟมิลี่	ลักษณะอาการ	พาหะ	การแพร่กระจาย	อ้างอิง
African cassava mosaic virus (ACMV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	Africa	Morris *et al.*, 1990
African cassava mosaic Burkina Faso virus (ACMBFV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	Burkina Faso	Tiendre´be´ogo *et al.*, 2012
Cassava mosaic Madagascar virus (CMMGV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	Madagascar	Harimalala *et al.*, 2012
East African cassava mosaic Cameroon virus (EACMCV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	West Africa, Tanzania	Fondong *et al*. 2000
East African cassava mosaic Kenya virus (EACMKV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	East Africa	Bull *et al.* 2006
East African cassava mosaic Malawi virus (EACMMV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	Malawi	Zhou *et al*., 1998
East African cassava mosaic virus (EACMV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	East Africa	Bull *et al*., 2006
East African cassava mosaic virus-Uganda (EACMV-UG)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	Sub-Saharan Africa	Pita *et al.*, 2001

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

East African cassava mosaic Zanzibar virus (EACMZV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสีย รูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	Zanzibar, Madagascar	Bull *et al.*, 2006
Indian cassava mosaic virus (ICMV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสีย รูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	Togo, India and Sri Lanka	Malathi *et al.*, 1985,
South African cassava mosaic virus (SACMV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสีย รูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	South Africa, Malawi, Madagascar and Zimbabwe	Berrie *et al.*, 2001
Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV)	*Begomovirus/ Geminiviridae*	ใบด่าง เสีย รูปทรง และลำต้นแคระแกร็น	แมลงหวี่ขาวยาสูบ	India, Sri Lanka Cambodia Veitnam and China	Saunders *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2016, Uke *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2019

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2 ไอโซเลต Accession number และ ขนาดจีโนมของ Segment A และ Segment B ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus*

Isolate	Accession number		Genome size (nt)	
	Segment A	Segment B	Segment A	Segment B
Prachinburi	MN026159	MN026161	2760	2537
Srisaket	MN026160	MN026162	2758	2537
Chachoengsao	MT671409	MT671410	2759	2537
Rayong	MT671411	MT671412	2759	2537
Khon Kaen	MT671413	MT671414	2758	2537
Chonburi	MT671415	MT671416	2758	2537
Ubon Ratchathani	MT671417	MT671418	2758	2537
Surin	MT671419	MT671420	2758	2537
Sakaeo	MT671421	MT671422	2759	2537
Nakhon Ratchasima	MT671423	MT671424	2758	2537

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลิโอไทด์ Segment A และ Segment B ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* ทั้ง 10 ไอโซเลต

	Isolate	Segment A									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Prachinburi		99.2	99.8	99.7	99.8	99.8	99.3	99.2	99.3	99.2
2	Srisaket	98.4		99.2	99.1	99.1	99.1	99.9	99.8	99.7	99.8
3	Chachoengsao	99.7	98.4		99.7	99.7	99.7	99.3	99.2	99.3	99.2
4	Rayong	99.9	98.3	99.6		99.7	99.8	99.2	99.1	99.2	99.1
5	Khon Kaen	99.7	98.1	99.5	99.6		99.8	99.2	99.1	99.2	99.1
6	Chonburi	99.9	98.3	99.6	99.9	99.6		99.2	99.1	99.2	99.2
7	Ubon Ratchathani	98.4	99.6	98.4	98.3	98.1	98.3		99.9	99.9	99.9
8	Surin	98.4	99.6	98.4	98.3	98.1	98.3	100		99.7	100
9	Sakaeo	99.9	98.4	99.7	99.8	99.7	99.8	98.4	98.4		99.8
10	Nakhon Ratchasima	98.5	99.7	98.6	98.4	98.2	98.4	99.7	99.7	98.5	
		Segment B									

กรมวิชาการเกษตร