ชื่อเรื่อง การสำรวจและเฝ้าระวังโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อไวรัส

Survey and Surveillance of Cassava Mosaic Disease Caused by Plant Virus

ชื่อผู้ดำเนินงาน

ภูวนารถ มณีโชติ[1/] สุนัดดา เชาวลิต[1/]

กาญจนา วาระวิชะนี[1/] วาสนา รุ่งสว่าง[1/]

ภานุวัฒน์ มูลจันทะ[2/] ศิริลักษณ์ ล้านแก้ว[2/]

ประภาพร แพงดา[3/]

.....

บทคัดย่อ

โรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Cassava mosaic virus* (CMV) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกมันสำปะหลังเป็นอย่างมากในประเทศแถบแอฟริกา อินเดียและศรีลังกา ในปี 2558 มีรายงานการพบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ในจังหวัดรัตนะคีรี ประเทศกัมพูชาซึ่งเป็นประเทศที่มีพื้นที่ติดกับชายแดนของประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีรายงานการพบของโรคใบด่างมันสำปะหลังงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสถานภาพการปรากฏหรือไม่ปรากฏและสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ SLCMV ในประเทศไทย ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) เพื่อให้ทราบสถานภาพของเชื้อ CMV ในประเทศไทย โดยสำรวจแปลงปลูกมันสำปะหลังใน 18 จังหวัด รวมทั้งสิ้น 215 จุด คิดเป็นพื้นที่สำรวจ 430,000 ไร่ เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างคล้ายโรคใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 602 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบหาเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ผลปรากฏว่าไม่พบเชื้อ SLCMV ในทุกตัวอย่างที่ตรวจการสำรวจนี้ยังพบโรคแอนแทรคโนส โรครากและหัวเน่า โรคใบจุดสีน้ำตาล และอาการพุ่มแจ้พบในบางพื้นที่ส่วนอาการผิดปกติที่เกิดจากการขาดธาตุอาหารและสารเคมีแมลงหวี่ขาวยาสูบแมลงหวี่ขาวใยเกลียว ไรและเพลี้ยแป้งพบในทุกแปลงปลูกมันสำปะหลัง ผลจากการสำรวจครั้งนี้สามารถยืนยันสถานภาพการไม่ปรากฏของเชื้อ SLCMV ในประเทศไทยได้

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง โรคใบด่างมันสำปะหลัง แมลงหวี่ขาวยาสูบ

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

[3/] ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

Abstract

Cassava mosaic virus (CMV) is the causal agent of Cassava mosaic disease (CMD). CMV caused the serious damage to cassava production in Africa, India and Sri Lanka. In May 2015, Wang *et al.* (2016) reported the incidence of *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) infecting cassava in Ratanakiri Province, Cambodia. CMD has not yet been found in Thailand. The surveys were required to confirm the status of CMD in Thailand as Thailand shares boundary with Cambodia. This research was conducted to determine the status of SLCMV in Thailand. The specific surveys had been done during July 2016 - June 2017. The total 602 cassava samples showing CMD-like symptoms were collected from 215 cassava plantations (areas approximately 68,880 hectares) located in 18 provinces. CMD-like specimens were diagnosed for SLCMV infection using specific primers to SLCMV. The results from this research showed that SLCMV was not detected. It can be concluded that Thailand is free from SLCMV. During the surveys, others cassava diseases had also been observed. The symptoms of Anthracnose, Root and tuber rot, Brown leaf spot and Witches' broom were found in some plantations. It was not only the diseases were found, but also damages caused by chemical injuries, nutritional deficiencies, whiteflies, mites and mealybugs were found in all planting areas.

Key words : Cassava, Cassava mosaic disease, *Cassava mosaic virus*, Whiteflies

คำนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชไร่เศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่นิยมปลูกกันมากประเทศไทยและมีแนวโน้มการผลิตเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานว่าในปี 2559 จะมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง 9.32 ล้านไร่ มีผลผลิตมันสำปะหลังประมาณ 31.16 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ในการปลูกมันสำปะหลังพบว่าปัญหาหลักที่ทำให้ผลผลิตเสียหายลดลงคือการระบาดของโรค โดยพบว่ามีการระบาดของโรคมันสำปะหลังที่สำคัญ ได้แก่ โรครากและหัวเน่า โรครากปม อาการพุ่มแจ้ของมันสำปะหลัง และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic Disease : CMD) โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic Disease : CMD) มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Cassava mosaic virus* ซึ่งเป็นไวรัสในจีนัส *Begomovirus* มีรายงานทั้งหมด 12 ชนิด โดย 10 ชนิด ก่อความเสียหาย 20-100% ในหลายประเทศทางแอฟริกา เช่น ยูกันดา ทานซาเนีย และ มาดากัสคา เป็นต้น ส่วนในเอเชียพบการระบาดเพียง 2 ชนิด คือ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) และ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) พบมีการระบาดในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม และจีน โดยก่อความเสียหายต่อผลผลิตของปลูกมันสำปะหลังมากถึง 88% (Brown *et al*., 2015; Jose *et al*., 2008; Uke *et al*., 2018; Wang *et al*., 2016; Wang *et al*., 2016)

เชื้อไวรัสสามารถติดมากับท่อนพันธุ์มันสำปะหลังและมีแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci* Gennadius) เป็นแมลงพาหะซึ่งทำให้มีการแพร่กระจายและระบาดได้อย่างรวดเร็ว การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยอาศัยแมลงพาหนะ (vector) จัดว่าเป็นการถ่ายทอดเชื้อที่มีความสำคัญมากเพราะสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและควบคุมได้ยาก โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูด ซึ่งเชื้อไวรัสและแมลงพาหะจะมีความสัมพันธ์กันในเชิงชีวโมเลกุล และนำไปสู่ความเฉพาะเจาะจงระหว่างแมลงกับโรคพืชที่เกิดขึ้น

ในเดือนพฤษภาคม 2558 มีการพบมันสำปะหลังแสดงอาการใบด่างคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในจังหวัดรัตนคีรี ประเทศกัมพูชา และได้เก็บไปตรวจในห้องปฏิบัติการพบว่าอาการใบด่างมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อ SLCMV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มเดียวกับ *African cassava mosaic virus* (ACMV) และได้เผยแพร่ลงในวารสาร Plant Disease (Wang *et al.*2016) ทั้งนี้โรคใบด่างมันสำปะหลังยังไม่มีรายงานการพบโรคนี้ในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทย

ในเดือนกุมภาพันธ์ Sok *et al.* (2016) ได้ออกสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลังในแปลงปลูกมันสำปะหลังในประเทศกัมพูชา โดยเก็บตัวอย่างใบทั้งที่แสดงอาการใบด่างและไม่แสดงอาการ นำมาตรวจสอบให้ปฏิบัติการด้วยเทคนิค ELISA และ PCR ปรากฏว่ามีการตรวจพบเชื้อไวรัส SLCMV จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เก็บจากแปลงปลูกมันสำปะหลังในจังหวัดตโบงฆมุม โพธิสัต และ พระตะบอง ซึ่งพบว่ามีการระบาดอย่างรวดเร็วจากแหล่งที่พบเชื้อโรคในครั้งแรกที่จังหวัดรัตนะคีรี

จากรายงานการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังใน 4 จังหวัดของประเทศกัมพูชานั้นพบว่าใกล้กับชายแดนติดต่อระหว่างประเทศไทยและกัมพูชาซึ่งเป็นบริเวณเสี่ยงที่อาจจะมีการแพร่ระบาด

ของโรคเข้ามายังประเทศไทยได้ กรมวิชาการเกษตรในฐานะเป็นองค์กรการอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization) ตามอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention) ทำหน้าที่ป้องกันมิให้ศัตรูพืชจากต่างประเทศ โดยเฉพาะโรคใบด่างมันสำปะหลังเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศโดยการสำรวจและเฝ้าระวังไม่ให้เข้ามาก่อความเสียหายต่อมันสำปะหลังอธิบดีกรมวิชาการเกษตรจึงได้มีบัญชาให้สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชและสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกที่อยู่ติดกับชายแดนของไทยและกัมพูชาทั้ง 6 จังหวัด ดังนี้

1. จังหวัดจันทบุรี ได้แก่ อ.โป่งน้ำร้อน และ อ.สอยดาว
2. จังหวัดสระแก้ว ได้แก่ อ.คลองหาด อ.อรัญประเทศ อ.โคกสูง และ อ.ตาพระยา
3. จังหวัดสุรินทร์ ได้แก่ อ.พนมดงรัก อ.กาบเชิง อ.สังขะ และ อ.บัวเชด
4. จังหวัดศรีสะเกษ ได้แก่ อ.ภูสิงห์ อ.ขุนหาญ และ อ.กันทรลักษ์
5. จังหวัดบุรีรัมย์ ได้แก่ อ.ละหานทราย และ อ.บ้านกรวด
6. จังหวัดอุบลราชธานี ได้แก่ อ.น้ำขุ่น และ อ.น้ำยืน

โดยได้ดำเนินการตั้งแต่วันที่ 7-18 มีนาคม 2559 จากผลการสำรวจพบว่ามีมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างใบเสียรูปทรงและใบเรียวเล็กในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูก 6 จังหวัด จำนวน 542 ตัวอย่าง เมื่อตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัส SLCMV โดยเทคนิค PCR แล้วไม่พบเชื้อไวรัส SLCMV จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เก็บมาตรวจทุกตัวอย่าง

นอกจากนี้มอบให้สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานและสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1-6 ดำเนินการสำรวจในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทั่วประเทศ ทั้งสิ้น 50 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน พะเยา แพร่ น่าน ตาก กำแพงเพชร สุโขทัย อุตรดิตถ์ พิษณุโลก พิจิตร เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี ชัยนาท อุทัยธานี นครสวรรค์กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว จันทร์บุรี ระยอง ชลบุรี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด มหาสารคาม บุรีรัมย์ อำนาจเจริญ สุรินทร์ ยโสธร ศรีสะเกษ อุบลราชธานี มุกดาหาร หนองบัวลำภู นครพนม เลย สกลนคร บึงกาฬ ชัยภูมิ หนองคาย อุดรธานี ขอนแก่น และกาฬสินธุ์ โดยดำเนินการตั้งแต่วันที่ 21 มีนาคม - 28 พฤษภาคม 2559 พบว่ามีตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างคล้ายโรคไวรัสจากจังหวัดกำแพงเพชร ปราจีนบุรี ชลบุรี นครราชสีมา และกาฬสินธุ์ จากผลตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพืชดังกล่าวยังไม่พบเชื้อไวรัส SLCMV ในประเทศไทย

เชื้อ SLCMV เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มเดียวกับ *African cassava mosaic virus* (ACMV) และ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) ซึ่งประเทศไทยกำหนดให้เชื้อ ACMV และ ICMV เป็นศัตรูพืชกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 และห้ามนำเข้าท่อนพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์

ของมันสำปะหลัง ยกเว้นหัวมันสดและมันเส้น ถึงแม้ในประเทศไทยจะยังไม่มีการรายงานการพบของโรคใบด่างมันสำปะหลัง แต่ก็มีความเสี่ยงสูงที่เชื้อไวรัสจะมีโอกาสแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศไทย เนื่องจากมีพื้นที่ที่ติดชายแดนกับประเทศกัมพูชา และมีการปลูกมันสำปะหลังจำนวนมาก โดยอาจติดมากับแมลงหวี่ขาวยาสูบซึ่งเป็นพาหะและพืชอาศัยอื่น ๆ ได้ จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่ต้องสำรวจ ทำการเฝ้าระวังเชื้อไวรัสและเตรียมความพร้อมรวมทั้งกำหนดแนวทางป้องกันการเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง
2. สารเคมี
    - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ
    - ไนโตรเจนเหลว
    - ชุดสกัด Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
    - Green PCR Master Mix, 2x (Biotechrabbit, Germany)
    - 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotechrabbit, Germany)
    - Agarose gel (SeaKem, USA)
    - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
    - 10X TAE Buffer
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)
    - เครื่องกำหนดตำแหน่ง GPS eTrex-10 (Garmin, USA)
    - เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
    - เครื่องดูดแมลงหวี่ขาวยาสูบ (Aspirator)
    - หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
    - หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

วิธีการ

1. กำหนดพื้นที่สำรวจ (ตามมาตรฐาน ISPM No. 6 (Guideline for surveillance))

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง โดยเทียบกับลักษณะอาการโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบในประเทศกัมพูชา (Figure 1) เก็บแมลงหวี่ขาว และเก็บข้อมูลโรคอื่น ๆ ที่พบในพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 18 จังหวัด ดังนี้

1. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่ติดกับชายแดนประเทศกัมพูชา ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ และจันทบุรี

2. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ อุดรธานี เลย ขอนแก่น นครราชสีมา ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงราย ตาก กาญจนบุรี และกำแพงเพชร

3. สุ่มพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังเพื่อตรวจโรคในแต่ละจังหวัด โดยแต่ละจังหวัดสุ่มพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังไม่น้อยกว่า 10 จุด ทุก ๆ 2,000 ไร่ สุ่ม 0.25 เปอร์เซ็นต์ (พื้นที่ 5 ไร่) คิดเป็น 1 จุด โดยเก็บข้อมูล 1 แถวทุกต้น เว้น 5 แถว ลักษณะข้อมูลที่เก็บได้แก่ ลักษณะอาการที่สงสัย แมลงหวี่ขาว ยาสูบทุกระยะ ปริมาณที่พบ พิกัดภูมิศาสตร์ วันที่เก็บข้อมูล สถานที่พบ และบันทึกภาพอาการ

2. การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค PCR

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง

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

1. บดใบมันสำปะหลังแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมบัพเฟอร์ FAPG1 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และเติม RNase A ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 °Cนาน 10 นาที

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

3. เติมบัพเฟอร์ FAPG3 ปริมาตร 1.5 เท่าของทิ้งส่วนของเหลวใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน แล้วย้ายมาใส่ใน FAPG Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส

4. เติมบัพเฟอร์ W1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาทีทิ้งส่วนของเหลวใสแล้วล้างด้วยบัพเฟอร์ 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

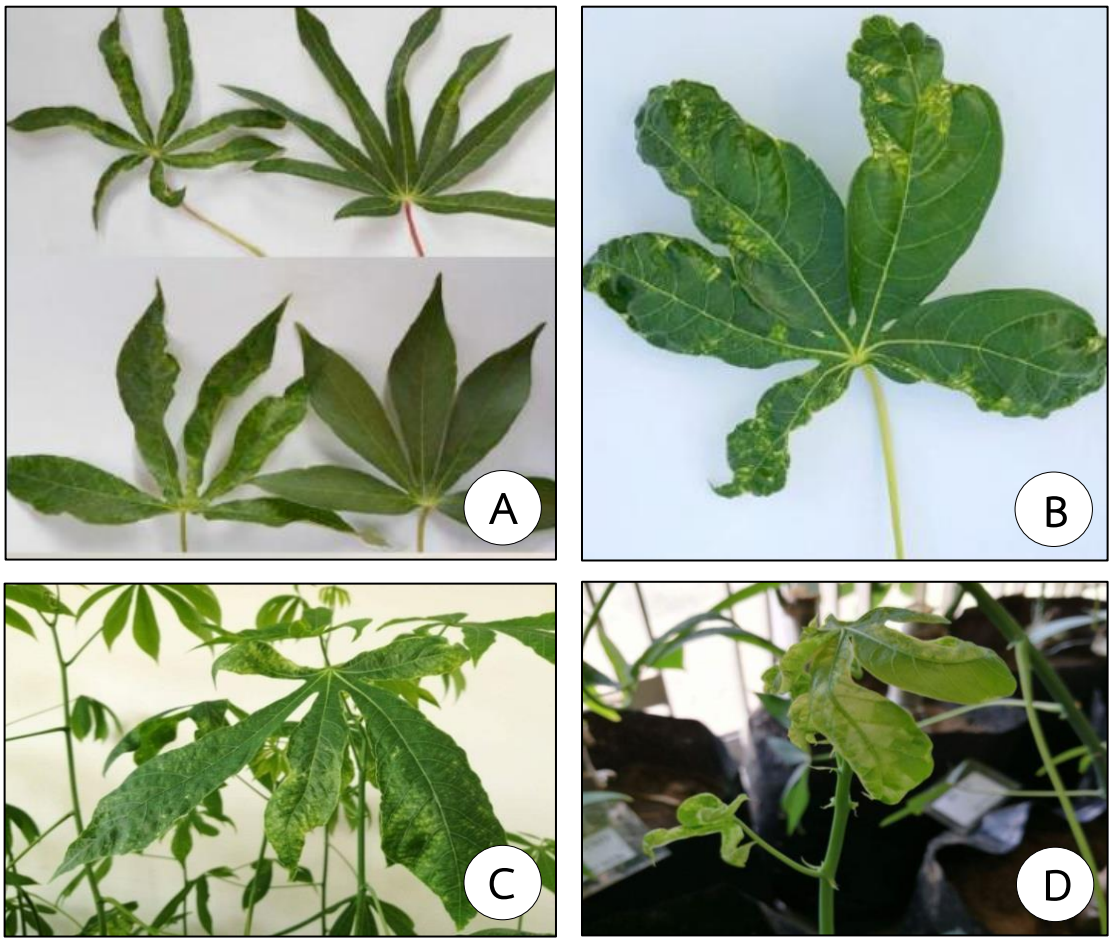

Figure 1. Typical CMD symptoms induced by *Sri Lankan mosaic virus* on cassava leaves in Cambodia. Cassava leaves showed mosaic, crinkle and distortion (A-C) and young leaves expressed mosaic and distortion (D)

Source : A – C: Photographed by Sok *et al*., 2016

D: Photographed by Phanuwat (2016), Rayong Field Crops Research Center, DOA

2.2 ตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction(PCR)

การเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อไวรัสในตัวอย่างมันสำปะหลังโดยใช้ Degenerate primers ที่สามารถตรวจเชื้อไวรัสในจีนัส *Begomovirus* และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ SLCMV และ ICMV ดังนี้

Degenerate primers ต่อเชื้อไวรัสในจีนัส *Begomovirus* จำนวน 2 คู่

คู่ที่ 1 ขนาดชิ้น DNA 600 คู่เบส (Alhudiab *et al*., 2014)

AVcore 5'-GCCHATRTAYAGRAAGCCNAGRAT-3'

ACcore 5'-GGRTTDGARGCATGHGTACANGCC-3'

คู่ที่ 2 ขนาดชิ้น DNA 1,200 คู่เบส (Rojas *et al*., 1993)

PALv1978 5'-GCATCTGCAGGCCCACATYGTCTTYCCNGT-3'

PARc496 5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRATACATRGG-3'

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส SLCMV ขนาดชิ้น DNA 600 คู่เบส (Jose *et al*., 2008)

SLCMV-F 5'-TGTAATTCTCAAAAGTTACAGTCN-3'

SLCMV-R 5'-ATATGGACCACATCGTGTCN-3'

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ICMV ขนาดชิ้น DNA 780 คู่เบส (Dutt *et al*., 2005)

ICMV-F 5'-ATGTCGAAGCGACCAGCAGATATCAT-3'

ICMV-R 5'-TTAATTGCTGACCGAATCGTAGAAG-3'

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

2x master mix buffer	10 ไมโครลิตร
Forward primer (10 pmole)	1 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 pmole)	1 ไมโครลิตร
Nuclease-free water	5 ไมโครลิตร
DNA template	3 ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermo cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ 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	5 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 ด้วยเครื่องChemiDoc Gel Imaging System (Biorad, USA)

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ให้ผลเป็นบวกกับชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ SLCMV และ ICMV จากปฏิกิริยา PCR จะนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ SLCMV หรือ ICMV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากข้อมูลยีนหรือโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal W จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสในจีนัส *Begomovirus* ชนิดต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7 (Kumar *et al*., 2016)

ระยะเวลาดำเนินการ กรกฎาคม2559 – มิถุนายน2560

สถานที่ดำเนินการ 1. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. แปลงปลูกมันสำปะหลังของเกษตรกรที่มีอาณาเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา 6 จังหวัดได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ และจันทบุรี

3.แปลงปลูกมันสำปะหลังของเกษตรกรที่สำคัญของประเทศไทย 12 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ อุดรธานี เลย ขอนแก่น นครราชสีมา ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงราย ตาก กาญจนบุรี และกำแพงเพชร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. พื้นที่สำรวจ

ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2559 ถึงเดือนมิถุนายน 2560 ได้ดำเนินการสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกทั้ง 18 จังหวัด มีพื้นที่ปลูกรวมประมาณ 6,333,814 ไร่ ได้ทำการสำรวจรวมทั้งสิ้น 215 จุด คิดเป็นพื้นที่รวมทั้งสิ้น 430,000 ไร่ จำนวนต้นมันสำปะหลังที่สำรวจทั้งหมด 334,000 ต้น จำนวนตัวอย่างที่สงสัยรวมทั้งสิ้น 602 ตัวอย่าง (Table 1 และ Figure 2) โดยแบ่งพื้นที่การสำรวจ ดังนี้

1. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่มีอาณาเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ และจันทบุรี สำรวจทั้งสิ้น 94 จุด คิดเป็นพื้นที่รวม

ทั้งสิ้น 188,000 ไร่ จำนวนต้นมันสำปะหลังที่สำรวจทั้งหมด 150,400 ต้น จำนวนตัวอย่างที่สงสัยรวมทั้งสิ้น 210 ตัวอย่าง

2. พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย 12 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ อุดรธานี เลย ขอนแก่น นครราชสีมา ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงราย ตาก กาญจนบุรี และกำแพงเพชร สำรวจทั้งสิ้น 121 จุด คิดเป็นพื้นที่รวมทั้งสิ้น 242,000 ไร่ จำนวนต้นมันสำปะหลังที่สำรวจทั้งหมด 193,600 ต้น จำนวนตัวอย่างที่สงสัยรวมทั้งสิ้น 392 ตัวอย่าง

2.การตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในตัวอย่างใบมันสำปะหลัง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังรวมทั้งสิ้นจำนวน 602 ตัวอย่าง ในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทั้ง 18 จังหวัด ที่แสดงอาการใบด่างประ ใบด่างชัดเจน ใบลดรูป เสียรูปทรงคล้ายโรคใบด่างมันสำปะหลัง (Figure 3) ตรวจสอบด้วยด้วยเทคนิค PCR ผลปรากฏว่าตรวจไม่พบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลังในทุกตัวอย่าง ซึ่งสามารถยืนยันสถานภาพการไม่ปรากฏและการแพร่ระบาดของเชื้อ SLCMVและ ICMV ในประเทศไทย อย่างไรก็ตามลักษณะผิดปกติของมันสำปะหลังเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ เช่น เกิดจากโรคอื่น ๆ ความผิดปกติที่เกิดจากสารเคมีหรือเกิดจากการแมลงมาดูดกินน้ำเลี้ยง ที่ทำให้เกิดอาการผิดปกติคล้ายโรคใบด่างมันสำปะหลัง

3. แมลงหวี่ขาวยาสูบที่พบในแปลงปลูกมันสำปะหลัง

แมลงหวี่ขาวยาสูบ (*B. tabaci* Gennadius) จัดเป็นศัตรูที่สำคัญซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตมันสำปะหลัง โดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของยอด ตายอด ใบและกิ่ง ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างหัวของมันสำปะหลัง และยังเป็นแมลงพาหะของเชื้อไวรัสหลายชนิด

จากการสำรวจและเก็บข้อมูลครั้งนี้พบแมลงหวี่ขาวยาสูบ ทุกระยะตั้งแต่ระยะดักแด้จะเห็นเป็นจุดสีขาวขุ่นกระจายอยู่ทั่วบริเวณหลังใบมันสำปะหลัง (Figure 4A-B) และตัวเต็มวัย (Figure 4C-D) พบได้ทั่วไปในแปลงปลูกมันสำปะหลังทุกจุดที่ทำการสำรวจทั้ง 18 จังหวัด

แมลงหวี่ขาวยาสูบ มีรายงานการพบทั้งในพื้นที่เขตร้อน และเขตกึ่งร้อน และยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ พริก มะเขือเทศ มะเขือยาว ฝ้าย มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง เป็นต้น และยังเป็นแมลงพาหะที่สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อ *Begomovirus* หลายชนิด รวมทั้งเชื้อ ICMV และ SLCMV (Byrne *et al*., 1990; Duraisamy *et al*., 2012; Kumarasinghe *et al*., 2009; Palaniswami and Henneberry, 2011) ซึ่งเชื้อไวรัสสามารถอยู่ในตัวแมลงหวี่ขาวยาสูบได้นานถึง 9 วันหรือจนกว่าแมลงหวี่ขาวยาสูบจะตายไป (Dubern, 1994) ปัจจุบันได้มีการจำแนกไบโอไทป์ (Biotypes) ของแมลงหวี่ขาวยาสูบโดยแบ่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Mitochondrial cytochrome oxidase I* (*mtCOI*) และได้เรียกตามแหล่งที่อาศัยแมลงหวี่ขาวยาสูบ ได้แก่ : Mediterranean (MED); Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1); Middle East-Asia Minor 2 (MEAM2); Asia I; China1; China 2; Asia II 1; Asia II 2; Asia II 3; Asia II 4; Asia II 5; Asia II 6; AsiaII 7; Asia II 8; Sub-Saharan Africa 1; Sub-Saharan Africa 2; Sub-Saharan Africa 3; Sub-

Saharan Africa 4 (Dinsdale *et al*. 2010; Mugerwa *et al*., 2012) โดยแต่ละไบโอไทป์จะมีความแตกต่างกันทางด้านพืชอาศัย ถิ่นที่อยู่ ความต้านทานต่อสารเคมี รวมถึงความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส (Perring, 2001; Qiu *et al*., 2009)

จากการสำรวจในช่วงเดือนมีนาคม 2559 – มิถุนายน 2560 ได้เก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวยาสูบที่พบในแปลงมันสำปะหลังในจังหวัดจันทบุรี สระแก้ว บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี รวม 61 ตัวอย่าง นำมาจำแนกไบโอไทป์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mtCOI* พบว่าเป็นไบโอไทป์ Asia II 1 จำนวน 47 ตัวอย่าง ไบโอไทป์ Asia II 6 จำนวน 14 ตัวอย่าง Wang *et al.* (2016) พบว่าแมลงหวี่ขาวยาสูบที่ในแปลงปลูกที่มีการระบาดของเชื้อ SLCMV ในกัมพูชานั้นเป็นไบโอไทป์ Asia II 1 ซึ่งเป็นไบโอไทป์ที่พบมากในแปลงปลูกมันสำปะหลังที่สำรวจ ดังนั้นหากเชื้อ SLCMV มีการแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศไทยจึงมีโอกาสที่จะทำให้โรคใบด่างมันสำปะหลังแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็วโดยมีแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นพาหะนำโรค

4. โรคอื่น ๆ แมลง อาการผิดปกติ พืชข้างเคียงและวัชพืชที่พบในแปลงมันสำปะหลัง

นอกจากการสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลัง และแมลงหวี่ขาวยาสูบแล้ว การสำรวจครั้งนี้ยังได้ทำเก็บข้อมูลการพบโรคอื่น ๆ เช่น โรคแอนแทรกโนส โรครากและหัวเน่า โรคใบจุดสีน้ำตาลและอาการแตกพุ่มแจ้ แมลงที่ก่อความเสียหายอื่น ๆ เช่น แมลงหวี่ขาวใยเกลียว เพลี้ยแป้ง ไรแดง อาการผิดปติอื่น ๆ รวมถึงพืชข้างเคียงและวัชพืชในแปลงปลูกที่แสดงอาการโรคไวรัส โดยได้รายงานไว้ในส่วนของภาคผนวก

Table 1. Survey locations in cassava plantation in 18 provinces in Thailand, during 2016, July – 2017, June.

Province		Survey site (2,000 rai per site)	Growing area (Rai)	Number of surveying (plant)	Number of sampling (plant)	Infection rate (%)
Cassava plantations along the border with Cambodia						
1	Ubon Ratchathani	34	68,000	54,400	47	0
2	Surin	10	20,000	16,000	45	0
3	Sa Kaeo	20	40,000	32,000	63	0
4	Srisaket	10	20,000	16,000	18	0
5	Buriram	10	20,000	16,000	19	0
6	Chanthaburi	10	20,000	16,000	18	0
Total		**94**	**188,000**	**150,400**	**210**	**0**
Cassava plantations in other provinces						
1	Kalasin	10	20,000	16,000	21	0
2	Udon Thani	10	20,000	16,000	35	0
3	Loei	10	20,000	16,000	23	0
4	Khon Kaen	7	14,000	11,200	14	0
5	Nakhon Ratchasima	8	16,000	12,800	21	0
6	Rayong	10	20,000	16,000	67	0
7	Chonburi	10	20,000	16,000	52	0
8	Chachoengsao	10	20,000	16,000	33	0
9	Chiang Rai	11	22,000	17,600	27	0
10	Tak	12	24,000	19,200	32	0
11	Kanchanaburi	12	24,000	19,200	35	0
12	Kamphaengphet	11	22,000	17,600	32	0
Total		**121**	**242,000**	**193,600**	**392**	**0**

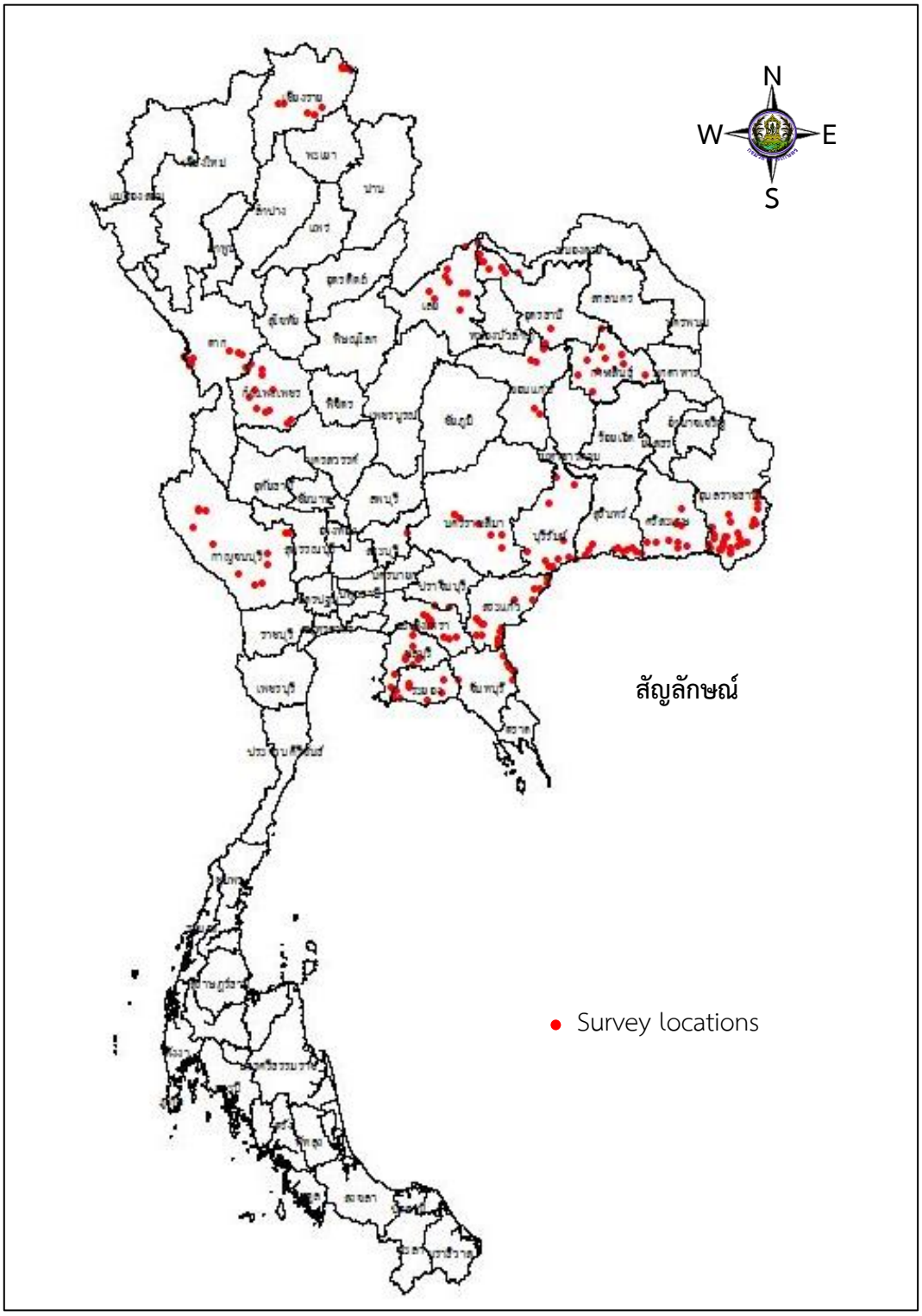

Figure 2. Survey locations in cassava plantation in 18 provinces in Thailand, during 2016, July – 2017, June

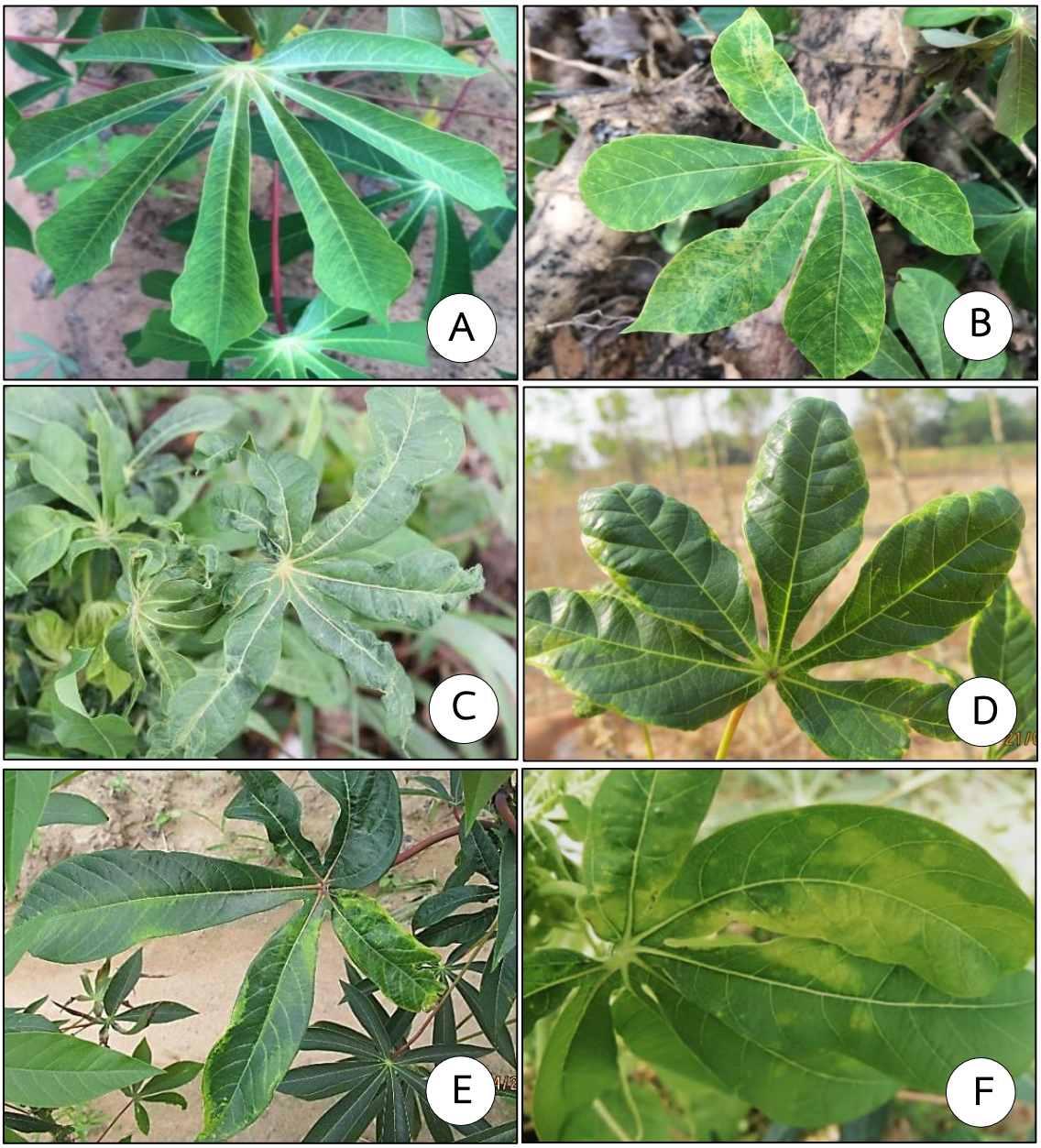

Figure 3. Cassava mosaic disease liked symptoms observed on leaves in cassava plantation. The cassava leaves displayed chlorotic symptoms (A), yellowing (B) and mosaic with leaf distortion (C-F)

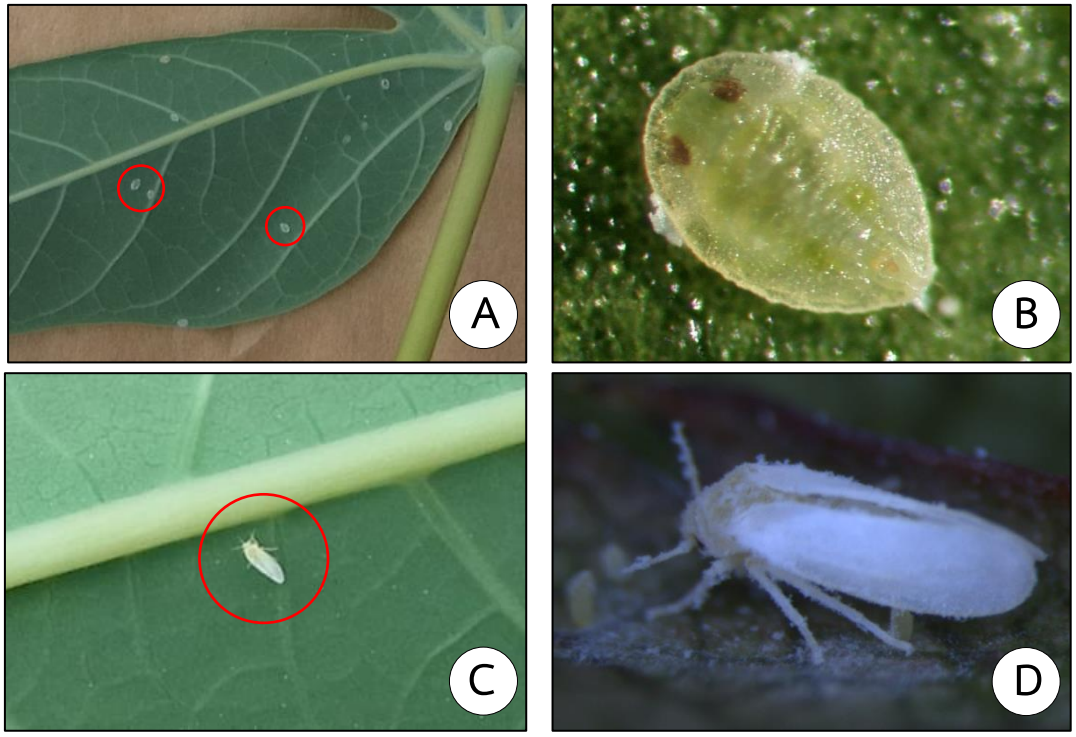

Figure 4. Tobacco whitefly (*B. tabaci* Gennadius) observed in cassava plantation. Whitefly nymph feeding on the lower leaf surface (A-B) and adult whitefly feeding on the lower leaf surface (C-D) as seen under the stereo microscope.

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. จากการสำรวจโรคใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทั้ง 18 จังหวัด ได้แก่

1) พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่มีอาณาเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สระแก้ว ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ และจันทบุรี สำรวจทั้งสิ้น 94 จุด คิดเป็นพื้นที่รวมทั้งสิ้น 188,000 ไร่ จำนวนต้นมันสำปะหลังที่สำรวจทั้งหมด 150,400 ต้น จำนวนตัวอย่างที่สงสัยรวมทั้งสิ้น 210 ตัวอย่าง

2) พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย 12 จังหวัด ได้แก่ ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ อุดรธานี เลย ขอนแก่น นครราชสีมา ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงราย ตาก กาญจนบุรี และกำแพงเพชร สำรวจทั้งสิ้น 121 จุด คิดเป็นพื้นที่รวมทั้งสิ้น 242,000 ไร่ จำนวนต้นมันสำปะหลังที่สำรวจทั้งหมด 193,600 ต้น จำนวนตัวอย่างที่สงสัยรวมทั้งสิ้น 392 ตัวอย่าง จำนวน 602 ตัวอย่าง

พ บ

มันสำปะหลังที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบด่างมันสำปะหลัง คือ อาการใบด่างประหรือด่างไม่ชัดเจน (Figure 1A) อาการจุดสีเหลืองซีดกระจายบนใบมันสำปะหลัง (Figure 1B) ใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบลดรูปมีขนาดเล็ก ใบหงิก (Figure 1C-F) **ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ SLCMV และ ICMV ปรากฏว่าตรวจไม่พบเชื้อ SLCMV และ ICMV จากทุกตัวอย่าง**

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำเอาวิธีการตรวจสอบที่ได้พัฒนาครั้งเป็นวิธีการมาตรฐานในการตรวจสอบเชื้อ SLCMV ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่สงสัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. ใช้เป็นข้อมูลยืนยันสถานภาพการปรากฏหรือไม่ปรากฏของเชื้อไวรัสใบด่างในประเทศไทย

3. ใช้เป็นข้อมูลการเฝ้าระวังและติดตามโรคใบด่างมันสำปะหลังมันสำปะหลังในประเทศไทย

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยภายใต้โครงการเงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปี ๒๕๕๙

ขอขอบพระคุณนางวิไลวรรณ พรหมคำ ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยโรคพืช นางสาวชลธิชา รักใคร่ รักษาการผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ตลอดจนเสร็จสิ้นโครงการวิจัยฯ

ขอขอบคุณเกษตรกรทุกท่านรวมถึงผู้มีส่วนช่วยเหลือต่างๆ ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2562

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559.มันสำปะหลังโรงงาน : เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อเนื้อที่เก็บเกี่ยว ปี 2557–2559. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://aginfo.oae.go.th/ewtnews/casava.html (12 กรกฎาคม 2560)

Alhudiab, K., Alaraby W. and Rezk A. 2014. Molecular Characterization of Tomato Yellow Leaf Curl Disease Associated Viruses in Saudi Arabia. *Int. J. Virol.* 10: 192-203.

.

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. and Varsani A. 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160: 1593-1619.

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

Dinsdale, A., Cook L., Riginos C., Buckley Y.M.and BarroP.D. 2010. Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Annu. Entomol. Soc. Am*. 103: 196-208.

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. and Chokkappan, M. 2012. 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.

Dutt, N., Briddon R.W. and Dasgupta I. 2005. Identification of a second begomovirus, *Sri Lankan cassava mosaic virus*, causing cassava mosaic disease in India. *Arch. Virol*. 150: 2101-2108.

Jose, A., Makeshkumar T. and Edison S. 2008. Host range of *Sri Lankan cassava mosaic virus*. *J. Root Crops* 34: 21-25.

Kumar, S., Stecher G. and TamuraK. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.

Kumarasinghe, N., Salim N. and WijayarathneW. 2009. Identification and Biology of two Whitefly Species on Cassava in Sri Lanka. *J. Plant Prot. Res.* 49: 373-377.

Mugerwa, H., Rey M.E.C., AlicaiT., Ateka E., Atuncha H., Ndunguru J. and Sseruwagi P. 2012. Genetic diversity and geographic distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) genotypes associated with cassava in East Africa. *Ecol. Evol*. 2: 2749-2762.

Palaniswami, M.S. and Henneberry T.J. 2011. *Bemisia tabaci* (Genn.): Biotypes and *Cassava Mosaic Virus in India*. pp. 121-163. In : The Whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plant. Springer: Houten, The Netherlands.

Rojas, M.R., Gilbertson R.L., RusselD.R. and Maxwell D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted *Geminivirus*. *Plant Dis*. 77: 340–347.

Sok, S., Yepes, M.C. and Cuellar J.W. 2016. Confirmation of the presence of Cassava Mosaic Disease (CMD) and *Sri Lankan Cassava mosaic virus* (SLCMV) in Cambodia: February, 2016. *CAIT Report*, 1-4.

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), pp. 2669.

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*.

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