รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

กิจกรรมย่อย : -

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจำแนกชนิดและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Identification and DNA Fingerprint of Race of *Ralstonia solanacearum* in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	: ทิพวรรณ กันหาญาติ	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	บูรณี พั่ววงษ์แพทย์	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	รุ่งนภา ทองเครั่ง	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย ที่แยกได้จาก มะเขือเทศ มันฝรั่ง มะเขือยาว มะเขือเปราะ พริก ยาสูบ ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง และ ยูคาลิปตัส จำนวน 130 สายพันธุ์ โดยทดสอบการเกิดโรคกับพืชอาศัยจำนวน 4 ชนิดได้แก่ พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มันฝรั่ง ผลการทดสอบแบคทีเรียทั้ง 130 สายพันธุ์ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัย ทั้ง 4 ชนิด โดยทำให้พืชอาศัยทุกชนิดแสดงอาการของโรคเหี่ยวภายใน 15 วัน สามารถจัดจำแนกแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้ง 130 สายพันธุ์ อยู่ใน Race เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกชนิด Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สามารถจัดจำแนกอยู่ใน Biovar 2 3 และ 4 จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep PCR ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *R. solanacearum* Race 1 ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 130 สายพันธุ์มีความหลากหลายสูง และแบคทีเรีย *R. solanacearum* .Biovar 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อ Biovar 3 และ 4 และ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ Biovar 3 และ 4ได้

Based on pathogenicity test on tomato, eggplant, chili, and potato, 130 strains of *Ralstonia solanacearum* that were isolated from tomato, potato, eggplant, pepper, Chili, tobacco, Ginger, Curcuma, Groundnut, and Eucalyptus were identified as Race 1. The biovar test using the oxidization of maltose, lactose, cellobiose, mannitol, sorbitol และ dulcitol of these

strains of *R. solanacearum* were grouped into biovar2, 3 and 4. The evaluation of genetic diversity among 130 strains of *R. solanacearum* was conducted by using rep-PCR. The result showed the fingerprint of *R. solanacearum* Biovar 2 could be separate from Biovar 3 and 4. The rep-PCR could not separate Biovar 3 and 4.

6. คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (bacterial wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ Solanaceae (Kelman, 1953) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลายสภาพแวดล้อมและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อโรคชนิดนี้ โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของประเทศได้แก่ มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ขิง และปทุมมา เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน สามารถเข้าทำลายพืชทางรากโดยเข้าตามรอยแผลที่เกิดจากการทำลายของแมลง ไส้เดือนฝอย รอยฉีกขาดของรากหรือแผลที่เกิดในธรรมชาติ สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ดีโดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกชุกจะมีการระบาดของโรครุนแรงและรวดเร็ว เชื้อนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์โดยสามารถแอบแฝงอยู่ในหัวพันธุ์(Latent infection) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมและปริมาณของเชื้อโรคมากพอก็จะแสดงอาการของโรคออกมา โดยจะแสดงอาการเมื่อนำหัวพันธุ์ไปปลูกในสภาพแปลง ทำให้เกิดการระบาดของโรคในแปลงปลูก นอกจากนี้เชื้อนี้ยังสามารถอาศัยอยู่ในพืชอาศัยอื่นได้เนื่องจากมีพืชอาศัยที่กว้าง ทำให้เชื้อโรคสามารถอยู่ข้ามฤดูได้

เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบกระจายในเขตร้อนและใกล้เขตร้อนอบอุ่นเย็นของพื้นที่ทั่วโลก มีความหลากหลายทางสายพันธุ์มาก โดยมีความแตกต่างในพืชอาศัย(host range) การกระจายตัวตามภูมิศาสตร์ (geographical distribution) ความสามารถในการเกิดโรค (pathogenicity) ความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อโรค (epidemiological relationships) และ คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อ (physiological properties) ทำให้มีการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกหรือบรรยาย (describe) ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียตามการกระจายตามตามภูมิประเทศ และการเกิดโรคบนพืชอาศัยไว้ (Buddenhagen *et al*., 1962; He *et al*., 1983) ดังนี้

Race 1: มีผลกระทบกับยาสูบ, มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, มะเขือยาว, กล้วย diploid และพืชในกลุ่มมะเขืออื่นๆ และ วัชพืช มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 2: มีผลกระทบกับกล้วย triploid (ก่อให้เกิดโรค Moko) และ เฮลิโคเนีย มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 3: มีผลกระทบส่วนใหญ่กับมันฝรั่งและมะเขือเทศ ไม่มีผลกระทบกับพืชกลุ่มมะเขืออื่นๆ มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิลดสูงสุด (27 ° C).

Race 4: มีผลกระทบกับพืชตระกูลขิง (Zingiber officinale) มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 5: มีผลกระทบกับพืชตระกูลหม่อน (Morus spp.) ที่พบที่ประเทศจีน มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

บางสายพันธุ์สามารถเกิดโรคกับพืชอาศัยได้กว้างแต่บางสายพันธุ์เกิดโรคกับพืชในวงศ์จำกัด เช่น สายพันธุ์ที่พบในแถบเขตหนาวเช่นในแถบประเทศยุโรป เรียกว่าเป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า low temperature จัดอยู่ใน race 3 ซึ่งทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่ง และมะเขือเทศในเขตพื้นที่สูงที่มีอากาศหนาวเย็นเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ที่เข้าทำลายพืชตระกูลกล้วยเท่านั้น จัดอยู่ใน race 2 (ก่อให้เกิดโรค Moko disease) นอกจากการจำแนกแบคทีเรีย *R. solanacearum* ตามการเกิดโรคบนพืชอาศัยแล้ว ยังสามารถจำแนกตามคุณสมบัติการใช้น้ำตาล 6 ชนิด(Biovar) ได้แก่ maltose lactose cellobiose mannitol sorbitol และ dulcitol แบ่งออกเป็น 5 Biovar (Hayward,1964)

ในประเทศไทยได้มีการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *R. solanacearum* ไว้บ้างแต่ยังไม่มีการศึกษาและรายงานชนิดของrace ที่พบในประเทศไทย ทำให้ขาดข้อมูลการเกิดโรค ความรุนแรง ตลอดจนพืชอาศัยที่พบในประเทศไทย ซึ่งถ้าทราบถึงชนิดของrace ของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะทำให้หาวิธีการป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้องต่อไป และเป็นการรายงานชนิดของrace ของเชื้อ *R. solanacearum* ในประเทศไทย

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

1. ปลูกพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้แก่ มะเขือเทศ (พันธุ์สีดาทิพย์) พริก (พันธุ์พริกหนุ่ม) มันฝรั่ง (พันธุ์สปุนตา) มะเขือยาว และ มะเขือเปราะ(พันธุ์เจ้าพระยา) และขิง (พันธุ์หยวก) โดยทำการปลูกพืชอาศัยลงกระถาง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ปลูกพืชอาศัยในเรือนปลูกทดลองให้มีอายุ 30 วัน โดยใช้พืชอาศัยชนิดละ 10 ต้นต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์

2. การเตรียมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ทำการฟื้นฟูการมีชีวิตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือ ขิง และ มันฝรั่ง ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection จำนวน 130 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) มาเลี้ยงในอาหาร TTC ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่รุนแรงบนอาหาร TZC เพื่อใช้ในการทดสอบ มาเลี้ยงในอาหารเหลว 523 บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ 100 µl ของสารละลายเชื้อมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 523 บ่มที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการละลายเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.3 มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

3. การปลูกเชื้อ *R. solanacearum* บนพืชอาศัย โดยก่อนปลูกเชื้องดการให้น้ำพืชอาศัยเป็นเวลา 1 วัน ทำการปลูกพืชทดสอบโดยใช้มีดหรือคัตเตอร์ที่สะอาดตัดส่วนรากห่างจากต้น 1-2 เซนติเมตร ราดด้วยสารละลายเชื้อที่เตรียมข้างต้นทันที โดยใช้อัตราส่วนสารละลายต่อดินในกระถาง 1: 10(V/V) (~ 25 มิลลิลิตร/ต้น)

4. บันทึกผล ตรวจผลการทดลอง 15 วัน หลังการปลูกเชื้อ โดยให้ค่าระดับความรุนแรงของโรคตามอาการของพืช (Jeong *et.al* 2007) ดังนี้

- = พืชปกติ (healthy plant)หรือไม่มีแสดงอาการเหี่ยว
+ = 25% ของต้นแสดงอาการเหี่ยวโดยใบ 1-2 ใบ แสดงอาการเหี่ยว
++ = 50% ของต้นแสดงอาการเหี่ยว โดยใบ 3-4 ใบ แสดงอาการเหี่ยว
+++ = >75% ของต้นแสดงอาการเหี่ยวโดยใบ 5 ใบหรือแสดงอาการเหี่ยว

ยืนยันการเกิดโรคเหี่ยวโดยการตรวจด้วย ELISA และ แยกเชื้อบนอาหาร TTC

ทดสอบชนิด Biovar แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ทดสอบพืชอาศัยเรียบร้อยแล้วมาทดสอบการใช้น้ำตาล 6 ชนิด ได้แก่ maltose lactose cellobiose mannitol sorbitol และ dulcitol เพื่อจัดจำแนก biovar ของแต่ละไอโซเลทเพื่อหาความสัมพันธ์ของ biovar กับการเกิดโรคบนพืชอาศัยของสายพันธุ์ประเทศไทยเปรียบเทียบกับรายงานในต่างประเทศ

การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralstoonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

1. การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum* เพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย *R.solanacearum* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Wakimoto's medium ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารแข็ง LB (Luria &Bertani medium) (Sambrook et al., 1989) อายุ 48 ชั่วโมง เตรียมไว้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2. การแยกสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ให้บริสุทธิ์

ใช้การแยกสกัดจีโนมิค ดีเอ็นเอ โดยตามวิธีของ Pitcher *et al.* (1989) ใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *R.solanacearum* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB อายุ 48 ชั่วโมง ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน 1 ml ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA, pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 µl ของ TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA, pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น Vortex เติมด้วย 500 µl ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 µl ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 µl ของสารผสม chloroform : isoamyl alcohol อัตรา 24/1 ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC จำนวน 378 µl ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 µl ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer, pH. 8.0 ปริมาณ 100 µl วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260 และ A280 ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/µl เพื่อนำไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3. **การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ด้วยเทคนิค rep-PCR**

การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ด้วยเทคนิค rep PCR ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ในการทดลองได้แก่ enterobacteria repetitive intergenic concensus (ERIC) และ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) (Louws *et al*., 1994) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 µl ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv..*citri* 50 ng ผสมกับ 10X PCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH8.8, 83 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2.0 mM $MgCl_2$, 30 mM 2-mercaptoethanol, 10% dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin] dNTPs ชนิดละ 125 µM, เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.0 ยูนิต (Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 50 pM และ ไพรเมอร์ BOX จำนวน 100 pM แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 µl ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Louws *et al.* (1994)

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	7
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	53 (BOX)	1
	53 (ERIC)	1

4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) 65 8
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) 65 15

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 µl มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 µl จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทย โดยนำแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้งหมด 130 สายพันธุ์ที่แยกได้จากพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย (table 1) ทดสอบการเกิดโรคกับพืชอาศัยทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่มะเขือเทศ (พันธุ์สีดาทิพย์) พริก (พันธุ์พริกหนุ่ม) มันฝรั่ง (พันธุ์สปุนตา) และ มะเขือเปราะ(พันธุ์เจ้าพระยา) พบว่าแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้ง 130 สายพันธุ์ ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัย ทั้ง 4 ชนิด โดยทำให้พืชอาศัยทุกชนิดแสดงอาการของโรคเหี่ยวภายใน 15 วัน (table 1) นำต้นพืชที่แสดงอาการเหี่ยวมาแยกเชื้อสาเหตุเพื่อยืนยันการเกิดโรค โดยแยกได้เชื้อ *R. solanacearum* ได้จากต้นพืชที่แสดงอาการเหี่ยวทุกต้น จากผลการทดลอง สามารถจัดจำแนก Race ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 130 สายพันธุ์ คือ Race 1 ซึ่งตรงกับรายงานของ วงศ์และคณะ (2546) และ Uematsu *et.al* (1983) ที่รายงานไว้ว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่ จัดอยู่ใน Race 1 ซึ่ง Race 1 เป็น Race ที่เข้าทำลายพืชอาศัยในกลุ่มพืชตระกูลมะเขือและพืชอื่นๆที่มีพืชอาศัยกว้าง และแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่พบเข้าทำลายพืชในประเทศไทยส่วนใหญ่เข้าทำลายพืชในกลุ่มตระกูลมะเขือ ได้แก่ มะเขือเทศ มันฝรั่ง พริก มะเขือเปราะ มะเขือยาว ยาสูบ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบเข้าทำลายในกลุ่มตระกูลขิง ได้แก่ ขิง ปทุมมา เป็นต้น แต่ยังไม่พบแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เข้าทำลายกล้วย ซึ่งตรงกับที่ Uematsu *et.al* (1983) ที่รายงานไว้เช่นกันว่าจากการสำรวจโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในประเทศไทยไม่พบเข้าทำลายกล้วย

ทดสอบชนิด Biovar ของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

นำแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ทดสอบ Race แล้ว ทั้งหมด 130 สายพันธุ์ นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยทดสอบการใช้น้ำตาล 6 ชนิด ได้แก่ maltose lactose cellobiose mannitol sorbitol และ dulcitol เพื่อจัดจำแนก biovar (figure 1) ผลการจัดจำแนกพบว่าแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่

แยกได้จากพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย อยู่ใน Biovar 2 3 และ 4 (table 1) โดยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชตระกูลมะเขือ ได้แก่ มะเขือเทศ พริก มะเขือเปราะ มะเขือม่วง ยาสูบ มันฝรั่ง จัดจำแนกเป็น Biovar 2 3 และ 4 (table 1) ส่วนแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลขิง ได้แก่ ขิง และปทุมมา จัดจำแนก เป็น Biovar 3 และ4 (table 1) แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จาก ถั่วลิสง จัดจำแนก เป็น Biovar 3 และ4 (table 1) แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จาก ยูคาลิปตัส และ ดาวเรือง จัดจำแนกเป็น Biovar 3 (table 1) :ซึ่งผลการจำแนกสอดคล้องกับ วนิดา (2542) ได้รายงานไว้ว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่แยกได้จากพืชผักต่างๆส่วนใหญ่อยู่ใน Biovar 3 ส่วนแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่แยกได้จากขิง และปทุมมา ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน Biovar 4 แบคทีเรียแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่แยกได้จากมันฝรั่งมีบางส่วนจัดจำแนกได้เป็น Biovar2 ตรงกับ วงศ์และคณะ (2546) ที่ได้รายงานไว้ ว่าพบแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่แยกได้จากมันฝรั่งในเขตภาคเหนืออยู่ใน Biovar 2 เช่นกันแต่ผลการจำแนก Race ไม่ตรงกัน โดยวงศ์และคณะ (2546) รายงานแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่แยกได้จากมันฝรั่ง เกิดโรคเฉพาะกับมันฝรั่งจึงจัดให้อยู่ใน Race 3 Biovar 2 ในขณะที่แบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่แยกได้จากมันฝรั่งจากการทดลองนี้ จัดอยู่ใน Race 1 Biovar 2

จากผลการจัดจำแนก Race และ Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ใน Race 1 Biovar 2 3 และ 4 สอดคล้องกับรายงานของ Elphinstone (2005) ว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่พบในแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และ ไทย จัดอยู่ใน Race 1 Biovar 2 3 และ 4

การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralstoonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

จากการจำแนกข้างต้น แบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้ง 130 สายพันธุ์อยู่ใน Race 1 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค rep PCR ผลการทำปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX และ ERIC ให้ผลผลิตดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากประเทศไทยทั้ง 130 สายพันธุ์ จำนวน 21 และ 16 แถบ ตามลำดับ (figure 2 และ 3) ประกอยด้วยลักษณะพันธุกรรมหรือลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 28 และ 13 แบบ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ dendrogram คือ 16 และ 9 แถบ คิดเป็นร้อยละ 57.14 และ 69.23 ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจากแต่ละไพรเมอร์ มีขนาดตั้งแต่ 100 คู่เบสถึง 6500 คู่เบส (figure 2 และ 3) เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYspc version 2.1 เพื่อสร้าง dendrogram แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อกับ race Biovar และพืชอาศัย โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดกลุ่มจะพิจารณาจากค่า similarity ที่สามารถจัดกลุ่มได้ดีที่สุด ผลการวิเคราะห์ dendrogram ที่ได้จากไพรเมอร์ BOX (figure 4) และERIC (figure 5) แบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้งหมดจัดอยู่ใน race 1 แต่อยู่ใน Biovar ที่แตกต่างกัน พบว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกจากพืชอาศัยในตระกูลมะเขือ ได้แก่ มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ยาสูบ มะเขือเปราะ มะเขือยาว ส่วนใหญ่จะอยู่ใน Biovar 3 และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชตระกูลขิง ส่วนใหญ่จะอยู่ใน Biovar4 ทั้ง 2 Biovar ให้ลักษณะทางพันธุกรรมมีทั้งที่ใกล้เคียงกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและแตกต่างกันไม่สามรถแยกกลุ่มกันได้

แต่แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากมันฝรั่ง และจำแนกอยู่ใน Biovar 2 ให้ลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างสามารถแยกกลุ่มออกจาก แบคทีเรีย *R. solanacearum* Biovar3 และ4 โดยเมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์ของdendrogram กับการจัดจำแนกชนิดของ Biovar ที่ได้จากไพรเมอร์ BOX (figure 4) ที่ค่า similarity 0.65 จัดแบ่ง แบคทีเรีย *R. solanacearum* เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่อยู่ใน Biovar 3และ 4 ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่อยู่ใน Biovar 2 เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ของdendrogram กับการจัดจำแนกชนิดของ Biovar ที่ได้จากไพรเมอร์ ERIC (figure 5) ที่ค่า similarity 0.45 จัดแบ่ง แบคทีเรีย *R. solanacearum* เป็น 2 กลุ่ม โดยแยก Biovar 2 ออกจาก Biovar 3และ 4 จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม แบคทีเรีย *R. solanacearum* Biovar 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจาก Biovar 3และ4 โดยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทย เกือบทั้งหมด จัดอยู่ใน Biovar 3 และ 4 ซึ่งเป็น Biovar ที่พบแพร่ระบาดในแถบทวีปเอเชีย สอดคล้องกับรายงานของ Cook *et al*.(1989) ที่รายงานการศึกษาวิวัฒนาการของแบคทีเรีย*R. solanacearum* และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย (RFLP marker) จากผลการวิเคราะห์สามารถจัดแบ่งแบคทีเรีย *R. solanacearum* ตามความแตกต่างทางพันธุกรรม ออกเป็น 2 Division โดย Division 1 ประกอบไปด้วย Biovar 3 4 และ 5 ที่เป็นเชื้อที่พบในทวีปเอเชีย ส่วน Division 2 ประกอบไปด้วย Biovar 1 2 และ N2 ที่เชื้อที่พบในทวีปอเมริกาและยุโรป มีเพียง แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกจากมันฝรั่งบางสายพันธุ์เท่านั้นที่จัดอยู่ใน Biovar2 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากแปลงที่มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมาจากต่างประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีการผลิตมันฝรั่งไม่เพียงพอที่เข้าสู่โรงงานอุสาหกรรม จึงมีความจำเป็นต้องนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากต่างประเทศ โดยเฉพาะในกลุ่มสหภาพยุโรปอาจทำให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ติดเข้ามากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง เมื่อนำมาปลูกในแปลงปลูกของประเทศไทย ส่วนใหญ่จะอยู่ในพื้นที่ที่มีอากาศเย็น เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ Biovar 2 ทำให้เกิดการระบาดในแปลงปลูกมันฝรั่งในประเทศไทย

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย ทั้งหมดจำนวน 130 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่แยกได้จาก มะเขือเทศ มันฝรั่ง มะเขือยาว มะเขือเปราะ พริก ยาสูบ ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง และ ยูคาลิปตัส สามารถจัดจำแนกทั้งหมดอยู่ใน Race 1 เมื่อนำมาจัดจำแนกชนิด Biovar จำแนกได้อยู่ใน Biovar 2 3 และ 4 ผลการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค rep PCR แบคทีเรีย *R. solanacearum* Biovar 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อ Biovar 3 และ 4 และ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ Biovar 3 และ 4ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ชนิดของ race และ biovar พร้อมทั้งเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลรายละเอียดของศัตรูพืชในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชสำหรับการค้าระหว่างประเทศ และใช้ในการยืนยันว่าเป็นเชื้อที่พบในประเทศไทย

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. 50 หน้า.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2547. โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด.หน้า 47-74. ใน เอกสารวิชาการ กล้วยไม้. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ 2551. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

สุเนตรา ภาวิจิตร สุทธิพงษ์ ญาณวารี และ ศิริลักษณ์ โล่สวัสดิ์. 2532. การศึกษาสาเหตุโรคเน่าของกล้วยไม้สกุลหวายทางเคมีและฟิสิกส์. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 30-40.

อนุพันธ์ อิฐรัตน์ .2542. ภัยเงียบจากคลอรีน. เอกสารประกอบการบรรยาย ณ ห้องประชุมกำธรสุวรรณกิจ กรมอนามัย.

Chandrkrachang, S.2002. The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand, in: K. Suchiva, S. Chandrkrachang, P. Methacanon, M.G. Peter (Eds.), Advances in Chitin Science, vol. 5:458-462.

Chuenchitt, S. 1982. A new bacterial disease on orchids Dendrobium sp. caused by Pseudomonas gladioli. Kasetsart J. (Sci) 17 : 27-32.

13. ภาคผนวก

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
94	S.Pepper	Nakhon Si Thammarat	3	+++	+++	+++	+++	1
392	Pepper	Lum Phun	3	+++	+++	+++	+++	1
394	Pepper	Lum Phun	3	+++	+++	+++	+++	1
666	S.Pepper	Pathumtani	3	+++	+++	+++	+++	1
906	Hot Chili	Phichit	3	+++	+++	+++	+++	1
975	Pepper	Ratchaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
976	Pepper	Kanchanaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
1075	Chili	Chiang Mai	3	+++	+++	+++	+++	1
1105	Chili	prachuapkhirikhan	3	+++	+++	+++	+++	1
1108	Chili	prachuapkhirikhan	3	+++	+++	+++	+++	1
1178	Chili	Kanchanaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
1271	Pepper	Nonthaburi	3	+++	+++	+++	+++	1

1299	Pepper	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
1358	Pepper	Nakhon Sawan	3	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1382	S.Pepper	Bangkok	3	+++	+++	+++	+++	1
1383	Pepper	Bangkok	3	+++	+++	+++	+++	1
1390	Pepper	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1
1392	Pepper	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1
1431	Pepper	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
1473	S.Pepper	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
1474	S.Pepper	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
1496	Pepper	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
1555	Pepper	Chiang Mai	3	+++	+++	+++	+++	1
1558	Pepper	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1
1559	S.Pepper	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1

1560	Pepper	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1
1563	Chili	Si Sa Ket	3	+++	+++	+++	+++	1
1564	Chili	Si Sa Ket	3	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1566	Chili	Si Sa Ket	3	+++	+++	+++	+++	1
1570	Chili	Si Sa Ket	3	+++	+++	+++	+++	1
1573	Pepper	Kanchanaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
1574	Pepper	Kanchanaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
1602	Chili	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1
1603	S.Pepper	Nokohn Ratchasima	3	+++	+++	+++	+++	1
1604	Pepper	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1
1605	Pepper	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1
1606	Pepper	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1
1609	Pepper	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1

2323	Chili	Sa Kaeo	3	+++	+++	+++	+++	1
2577	Chili	Phrae	3	+++	+++	+++	+++	1
RSS	Chili	Chiang Mai	3	+++	+++	+++	+++	1
402	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
461	Potato	Chiang Mai	2	++	+++	+++	++	1
555	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
556	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1155	Potato	Chiang Mai	2	++	+	+++	+++	1
1162	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1250	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1251	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1253	Potato	Lamphun	4	+++	+++	+++	+++	1
1254	Potato	Lamphun	4	+++	+++	+++	+++	1
1255	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1

1257	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
1260	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1261	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1262	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1263	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1264	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1268	Potato	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1277	Potato	Loei	2	+++	+	+++	++	1
2338	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
2339	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
2581	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
2583	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
2584	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
2585	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
2586	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1
2587	Potato	Tak	4	+++	+++	+++	+++	1

21	Tomato	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1
264	Tomato	Nakhon Pathom	3	+++	+++	+++	+++	1
334	Tomato	Nong Khai	3	+++	+++	+++	+++	1
358	Tomato	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
991	Tomato	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1
998	Tomato	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1289	Tomato	Lampang	3	+++	+++	+++	+++	1
1342	Tomato	Chiang Mai	3	+++	+++	+++	+++	1
1391	Tomato	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1
1398	Tomato	Sakon Nakhon	3	+++	+++	+++	+++	1
1404	Tomato	Nakhon Pathom	3	+++	+++	+++	+++	1
1406	Tomato	Nakhon Pathom	3	+++	+++	+++	+++	1
1494	Tomato	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
1607	Tomato	Nong Khai	3	+++	+++	+++	+++	1

131	*Eggplant Solanum melongena L*	Pathum Thani	3	+++	+++	+++	+++	1
1011	*Solanum melongena L* (Eggplant)	Trang	3	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1099	*Solanum melongena L* (Eggplant)	Songkhla	3	+++	+++	+++	+++	1
1506	*Solanum melongena L* (Eggplant)	Surat Thani	3	+++	+++	+++	+++	1

393	*Solanum xanthocarpum* (Eggplant)	Lamphun	3	+++	+++	+++	+++	1
1124	*Solanum xanthocarpum* (Eggplant)	Nakhon Phanom	3	+++	+++	+++	+++	1
1341	*Solanum xanthocarpum* (Eggplant)	Nan	3	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1355	*Solanum xanthocarpum* (Eggplant)	Pathum Thani	3	+++	+++	+++	+++	1

2327	*Solanum xanthocarpum* (Eggplant)	Chanthaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
1106	*Solanum Torvum* (Eggplant)	Prachuap Khiri Khan	3	+++	+++	+++	+++	1
UE426	Tobaco	Songkhla	3	+++	+++	+++	+++	1
525	Tobaco	Songkhla	3	+++	+++	+++	+++	1
1401	Tobaco	Nakhon Phanom	3	+++	+++	+++	+++	1
1405	Tobaco	Nakhon Phanom	3	+++	+++	+++	+++	1
2204	Tobaco	Phetchabun	3	+++	+++	+++	+++	1
810	Groundnut	Phatthalung	3	+++	+++	+++	+++	1
1367	Groundnut	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

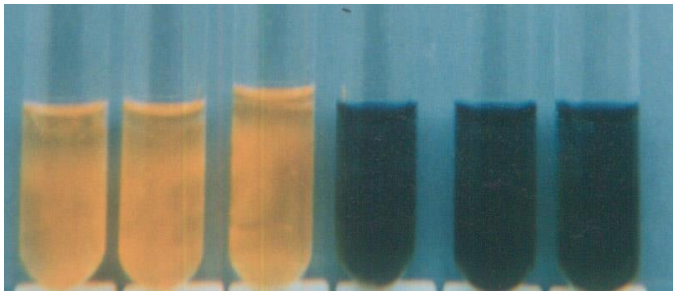
Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1205	Groundnut	Nakhon Sawan	3	+++	+++	+++	+++	1
1461	Groundnut	Nakhon Sawan	3	+++	+++	+++	+++	1

1562	Groundnut	Khon Kaen	3	+++	+++	+++	+++	1
1227	Eucalyptus	Chachoengsao	3	+++	+++	+++	+++	1
1372	Eucalyptus	Chachoengsao	3	+++	+++	+++	+++	1
1374	Eucalyptus	Chachoengsao	3	+++	+++	+++	+++	1
98	Marigold	Nonthaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
1387	Marigold	Bangkok	3	+++	+++	+++	+++	1
1451	Marigold	Bangkok	3	+++	+++	+++	+++	1
1455	Marigold	Bangkok	3	+++	+++	+++	+++	1
1528	Marigold	Ratchaburi	3	+++	+++	+++	+++	1
32	Ginger	Chiang Rai	3	+++	+++	+++	+++	1
128	Ginger	Chiang Rai	4	+++	+++	+++	+++	1
176	Ginger	Chiang Rai	4	+++	+++	+++	+++	1
238	Ginger	Chumphon	3	+++	+++	+++	+++	1
983	Ginger	Prachuap Khiri Khan	3	+++	+++	+++	+++	1

Table 1 Details of *Ralstonia solanacearum* strains were used to identification of Race and Biovar and DNA fingerprint (Cont.)

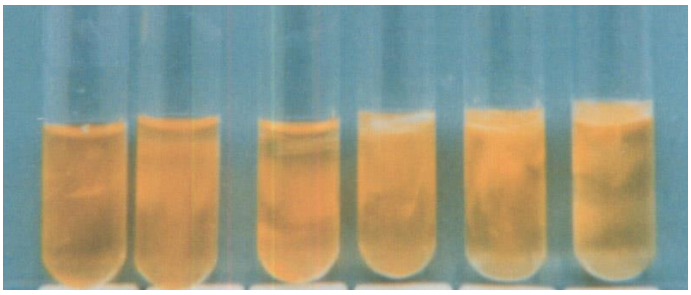
Strain Number of *Ralstonia solanacearum*	Host	Place	Biovar	Tomato	Chilli	Potato	Eggplant	Race
1052	Ginger	Phetchabun	3	+++	+++	+++	+++	1
1107	Ginger	Prachuap Khiri Khan	3	+++	+++	+++	+++	1

1350	Ginger	Chiang Rai	4	+++	+++	+++	+++	1
1380	Ginger	Loei	4	+++	+++	+++	+++	1
2156	Ginger	Phetchabun	4	+++	+++	+++	+++	1
1217	Curcuma	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1352	Curcuma	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1438	Curcuma	Chiang Rai	4	+++	+++	+++	+++	1
1439	Curcuma	Lamphun	4	+++	+++	+++	+++	1
1446	Curcuma	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1447	Curcuma	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1476	Curcuma	Chiang Rai	4	+++	+++	+++	+++	1
1481	Curcuma	Chiang Mai	4	+++	+++	+++	+++	1
1512	Curcuma	Chiang Rai	4	+++	+++	+++	+++	1
2423	Curcuma	Kanchanaburi	4	+++	+++	+++	+++	1



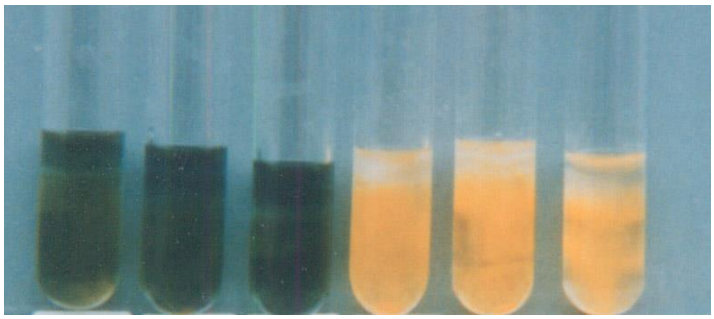
Biovar 2

Cellobiose Lactose Maltose Ducitol Mannitol Sorbitol



Biovar 3

Cellobiose Lactose Maltose Ducitol Mannitol Sorbitol



Biovar 4

Cellobiose Lactose Maltose Ducitol Mannitol Sorbitol

Figure 1 The result of identification of Biovar type of *Ralstonia solanacearum*

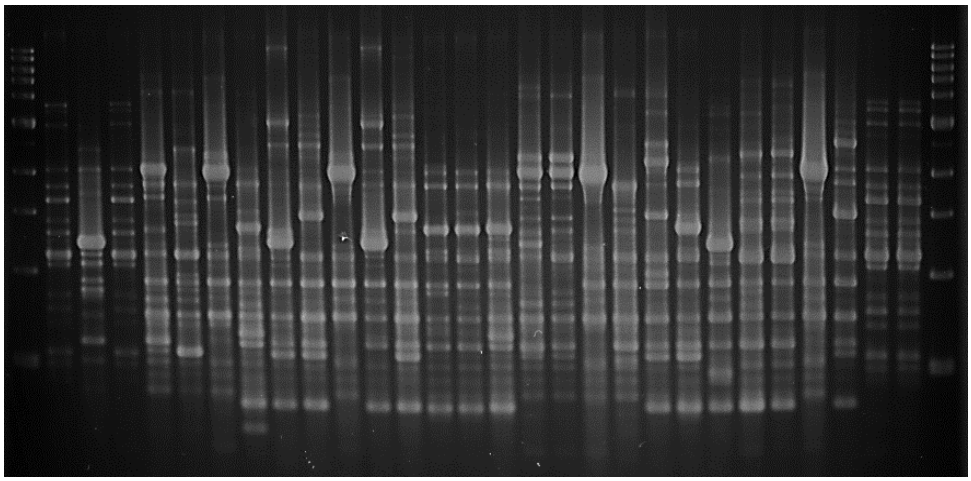


Figure 2 DNA fingerprint from rep-PCR using BOX primer for *Ralstonia solanacearum* from Thailand

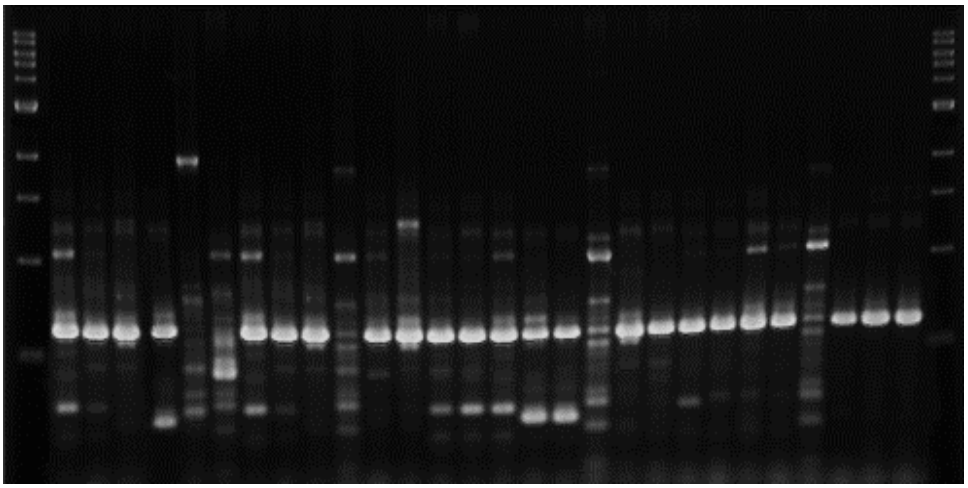


Figure 3 DNA fingerprint from rep-PCR using ERIC primer for *Ralstonia solanacearum* from Thailand

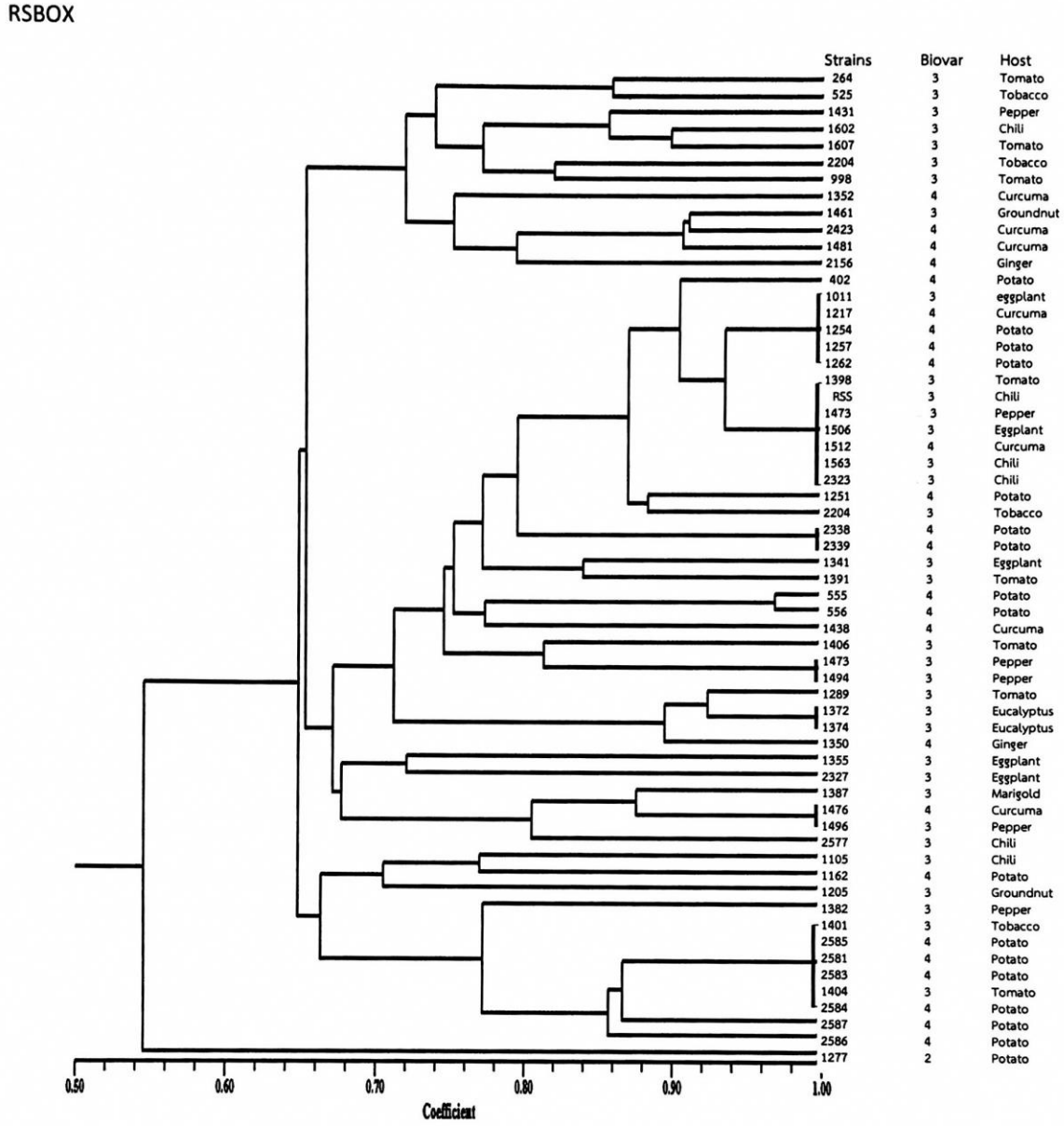


Figure 4 Dendrogram among *Ralstonia solanacearum* strains from Thailand using BOX primer applying the Dice coefficient of similarity and the UPGMA method using the NTSYS-Pc software

RSERIC

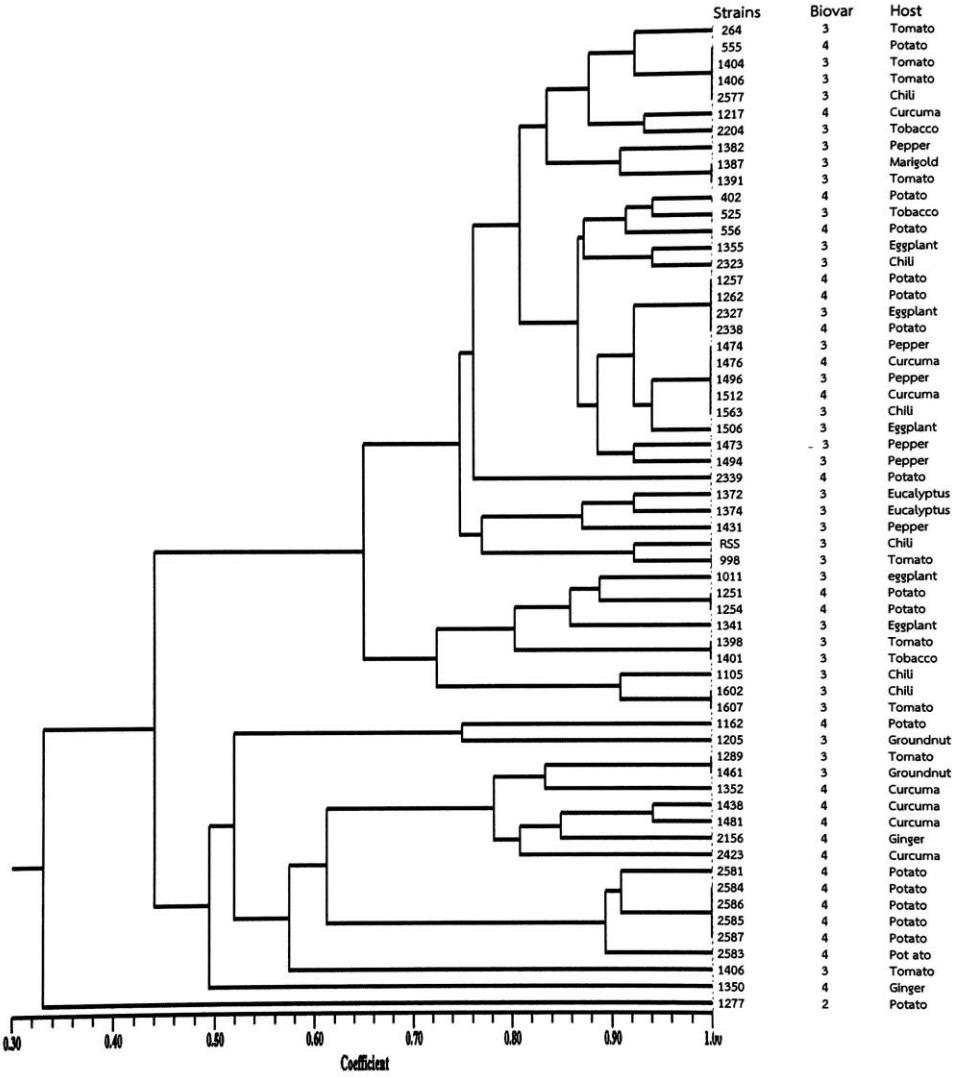


Figure 5 Dendrogram among *Ralstonia solanacearum* strains from Thailand using ERIC primer that applying the Dice coefficient of similarity and the UPGMA method using the NTSYS-Pc software