การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ สายพันธุ์ ดินอ้อยno 6 เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา

Development of powder formulation of Bacillus subtilis 4415 strain and sugarcane soil no.6 strain for controlling Curcuma bacterial wilt disease

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ดารุณี ปุญญพิทักษ์[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/]
รุ่งนภา ทองเครื่ง[1/] วิภาดา ทองทักษิณ[2/] สุธามาศ ณ น่าน[3/]
[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน
[3/] ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน

รายงานความก้าวหน้า

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 เพื่อเพิ่มปริมาณ ดำเนินการเลี้ยงในอาหารเหลว NGB และอาหารแข็งNGA นำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณได้ไปทำเป็นผงเชื้อโดยใช้ผงทาคัมเป็นวัสดุรองรับ ผลิตผงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 จำนวน 2 กิโลกรัม ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 ในผงเชื้อทุกเดือนเพื่อเช็คความอยู่รอดและปริมาณ พบว่า ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ เป็นเวลา 6 เดือน นำมาตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 ในผงเชื้อพบว่ามีปริมาณ $1X10^{10}$ cfu/g และนำผงเชื้อไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง อยู่ในระหว่างการตรวจผลการทดสอบ

รหัสโครงการ.. 01-32-54-01-01-01-01-54

คำนำ

ปทุมมาเป็นไม้พื้นเมืองของประเทศไทยที่นิยมนำไปเป็นไม้ประดับและไม้ตัดดอก มีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปขายยังต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ปัญหาสำคัญที่พบในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมามีโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) ระบาดทำความเสียหายให้กับเกษตรกรและผู้ส่งออก แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิด โดยเฉพาะในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่พืชเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา เป็นต้น *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียทางดินสามารถอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ได้ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคนี้จึงสามารถแพร่ได้อย่างรวดเร็วและทั่วประเทศเมื่อมีการขนย้ายส่วนขยายพันธุ์ของพืชที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไปปลูกในที่ต่าง ๆ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลายสภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรีย *R. solanacearum* ยังเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืช ถ้าพบแบคทีเรียนี้ติดไปกับหัวพันธุ์ที่ส่งออก หัวพันธุ์เหล่านั้นจะถูกเผาทำลายทันที ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้

การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถที่จะคงอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคนี้ วิธีการป้องกันกำจัดยังคงจำกัด ได้มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธี ในการป้องกันกำจัดโรคนี้ ซึ่งการใช้วิธีควบคุมโรคเหี่ยวโดยชีววิธีนี้ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับและส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาใช้โดยตระหนักถึงอันตรายจากการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมและช่วยแก้ปัญหาการดื้อสารเคมีของศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด ตลอดจนเพิ่มทางเลือกในการพิจารณาใช้วิธีใดวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการควบคุมศัตรูพืชแก่เกษตรกร

การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ปทุมมา มันฝรั่ง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้วิธีการจัดการดิน วิธีเขตกรรม ร่วมกับการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง

ณัฏฐิมา *et al.* (2551) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar และ บนอาหารเหลว Tryptic Soy Broth ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, methylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และผง talcum 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียในผงเชื้อคือ1.1×10^{10} และ 0.7×10^{10} CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ได้

เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °C มีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน และ15 เดือน ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงพบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 % ในเรือนทดลองและ 30-37 % ในแปลงทดลองปีที่ 1 และ 67.5-72.5% ในปีที่สอง

ณัฎฐิมา *et al* (2551) ได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4415 และ รากอ้อย no.6 ที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในแปลงทดลองได้ 43 และ 40 % ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์ และ/หรือราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลง และวิธีการปฏิบัติเช่นนี้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มักไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลแบคทีเรียตายลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนารูปแบบการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว ให้อยู่ในรูปที่ง่ายต่อการบรรจุหีบห่อ ขนส่ง และเกษตรกรนำไปใช้ได้สะดวก และสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆได้

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ปฏิปักษ์ 4415 และ รากอ้อย no.6 ให้อยู่ในรูปที่ง่ายต่อการบรรจุหีบห่อ ขนส่ง และเกษตรกรนำไปใช้ได้สะดวก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1. **การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และสายพันธุ์ ดินอ้อยno 6**

   1.1 การเพิ่มปริมาณ *B.subtilis* บนอาหารแข็ง

เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* บนอาหาร nutrient agar (NA) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง เติมสารละลาย magnesium sulfate (0.1 M) 10 มล.ต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียบนผิวอาหารให้ผสมในสารละลายจากนั้นนำไปผสมกับ methylcellulose 2.5% ในน้ำ ในปริมาตรที่เท่ากัน พักไว้ 20 นาที จึงผสมกับสารพาผง talc ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดี

ก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดให้เป็นผงละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 35 mesh เก็บไว้ถุงพลาสติกก่อนนำไปศึกษาต่อไป (Xu and Gross, 1986)

1.2 การเพิ่มปริมาณ B.subtilis บนอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ 150 rpm. นาน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ผสม carboxymethylcellulose 10 กรัมกับผง talc 1 กิโลกรัม นำส่วนผสมไปนึ่งฆ่าเชื้อนาน 30 นาที 2 วัน ติดต่อกันวันละครั้ง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปริมาณ 400 มล. เทลงในส่วนผสมของผง talc และ carboxymethylcellulose 1 กิโลกรัม ผสมให้เข้ากันดีในสภาพปลอดเชื้อ บรรจุในถุงพลาสติก (Vidhyasekaran and Muthamilan, 1995)

2. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่ผลิตได้

นำส่วนผสมผงเชื้อ 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณเชื้อ *B.subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับเชื้อ *B.subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

3. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ของหัวเชื้อที่ผลิตได้ โดยทดสอบ 2 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษา 15 เดือน วางแผนการทดลอง factorial in CRD 2 ปัจจัย 15 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

4. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนทดลอง

4.1 การเตรียมดินผสมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

เลี้ยงเชื้อ *R.solanacearum* บนอาหารแข็ง Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำนึ่ง 10 มล.ต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียผสมในน้ำเพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ปรับให้มีความเข้มข้น 1x106 cfu/ml. นำไปผสมคลุกเคล้ากับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตรา 1:10 (ปริมาตร:น้ำหนัก) นำดินที่ผสมเชื้อสาเหตุโรคไปตรวจหาปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ก่อนนำดินไปบรรจุในกระถางเพื่อเตรียมไว้ปลูกพืชทดสอบต่อไป

4.2 การคลุกหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยผงเชื้อ *B. subtilis*

นำหัวพันธุ์ปทุมมา ล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งมาคลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 จากนั้นนำผงเชื้อ *B.subtilis* ผสมน้ำนึ่งเพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ที่มีความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml. นำไปรดพืชทดสอบที่ปลูกไว้ในกระถางทุก 1 สัปดาห์ สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ปทุมมาที่ไม่ได้คลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* และใช้น้ำนึ่งรดพืชทดสอบแทนการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

4.3 การบันทึกข้อมูล

4.3.1 บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* ในดินที่เตรียมไว้ก่อนนำไปใช้ปลูกพืชทดสอบ

4.3.2 บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* และ *B.subtilis* ในดินที่ใช้ปลูกพืชทดสอบแล้วทุกสัปดาห์

4.3.3 บันทึกจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคเหี่ยวทุกสัปดาห์

5. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลอง

5.1 การเตรียมดินผสมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

เตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสาเหตุโรค *R.solanacearum* ปลูกเชื้อกับต้นกล้ามะเขือเทศเพื่อให้เป็นโรคเหี่ยว แล้วนำต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคสับให้ละเอียดผสมคลุกเคล้ากับดินในแปลงทดสอบที่มีการควบคุมอย่างดี สุ่มตัวอย่างดินไปตรวจนับปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* ด้วยวิธี soil dilution plates

5.2 การคลุกหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยผงเชื้อ *B.subtilis*

นำหัวพันธุ์ปทุมมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง คลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำมาปลูกในแปลงทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จากนั้นนำผงเชื้อ *B.subtilis* ผสมน้ำนึ่งเพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียนำไปรดพืชทดสอบที่ปลูกไว้ในแปลงทุกสัปดาห์ สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ปทุมมาที่ไม่ได้คลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* และใช้น้ำนึ่งรดพืชทดสอบแทนการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

5.3 การบันทึกข้อมูล

5.3.1 บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงทดสอบก่อนนำพืชไปปลูก

5.3.2 บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* และ *B.subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงทดสอบที่ใช้ปลูกพืชทดสอบทุกสัปดาห์

5.3.3 บันทึกจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคเหี่ยวทุกสัปดาห์

5.3.4 บันทึกน้ำหนักของผลผลิต

เวลาและสถานที่

ต.ค.48 - ก.ย.53 ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร และ แปลงเกษตรกร จังหวัดเชียงราย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 เพื่อเพิ่มปริมาณ ดำเนินการเลี้ยงในอาหารเหลว NGB และอาหารแข็งNGA นำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณได้ไปทำเป็นผงเชื้อโดยใช้ผงทาคัมเป็นวัสดุรองรับ ผลิตผงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 จำนวน 2 กิโลกรัม ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สาย

พันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 ในผงเชื้อทุกเดือนเพื่อเช็คความอยู่รอดและปริมาณ พบว่า ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ เป็นเวลา 6 เดือน นำมาตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 ในผงเชื้อพบว่ามีปริมาณ $1X10^{10}$ cfu/g และนำผงเชื้อไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง อยู่ในระหว่างการตรวจผลการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน. 2541. ศึกษาเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมา. รายงานผลงานวิจัย ปี 2541. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 24-35.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และบุษราคัม อุดมศักดิ์ 2551. พัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรีย Bacillus subtilis ควบคุมโรคเหี่ยวในขิง. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล วิภาดา ทองทักษิณ และสุธามาศ ณ น่าน 2551. การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมาโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. 2537. ปทุมมา. กสิกร. 67(5):415-419.

สุเนตรา ภาวิจิตร , ณัฏฐิมา บุญวัฒน์ และนิยมรัฐ ไตรศรี. 2538. โรคหัวเน่าของกระเจียวและปทุมมา ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 5(4) : 92

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537 ปทุมมาและกระเจียว. น.58-72. ใน : ไม้ตัดดอกเขตร้อน. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.159 น.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว (Curcuma) ไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด,กรุงเทพฯ.128 น.

Aspiras, R.B. and A.R. de la Cruz. 1985. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 And *Pseudomonas fluorescens*, pp. 89-92. *In* G.J. Persley. Bacterial wilt Disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Bannos, Philippines

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 p.

Celino, M.S. and D. Gotllieb. 1952. Control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus polymyxa*. Phytopathology. 42:4(Abstract).

Guo,J., H. Qi and S. Li . 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to Pepper bacterail wilt. Bacterial wilt newsletter. 17 :3 .

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of Pseudomonas solanacearum. J. App. Bacteriol. 27:265-277.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltomore.

Karuna , K., A.N.A. Khan and M. R. Ravikumar. 1997. Potential of biocontrol agent in the management of bacterial wilt of Tomato caused by *Ralstonia solanacearum.* Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

Xu, G.W. and D.C. Gross.1986. Field evaluation of the interaction among fluorescent Pseudomonas, Erwinia calotovora and potato yield. Phytophathology 76 : 423-430.

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* and other Bactria. Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.