Micropipette Technique และ Scalpel Leaf-Clip Method ในการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย

(Micropipette Technique and Scalpel Leaf-Clip Method in Screening for Bacterial wilt Resistance of Tomato)

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และศักดิ์ สุนทรสิงห์[1]

Abstract

In screening for bacterial wilt resistance of tomato, eleven tomato varieties were inoculated with virulent *Pseudomonas solanacearum* of 1 x 10^6 cfu/ml and 1 x 10^8 cfu/ml. Two inoculation methods, Micropipette Technique and Scalpel Leaf-Clip Method were used. The first experiment was conducted in August to September. The second experiment (using the same tomato varieties and inoculation methods) was conducted in October to November. No significant differences between two inoculation methods and between two concentration levels were found. Therefore it is recommended that Micropipette Technique is suitable for intensive screening. But for the large scale or field screening Scalpel Leaf-Clip Method is recommended. The evaluation of bacterial wilt resistance among tomato varieties from both inoculation methods showed that CI 5915-223D_4- 2-1-0 was resistant, CI 5915-206D_4- 2-5-0 was only moderately resistant. 41-1-S-4B x 34-9B was varied from susceptible to moderately susceptible and others, TN#3, P 490, XP 5034, CI 4657-9-0-4 R-INR-0-5, P 502, Seedathip 2, Seedathip 3 and 34-9B-1-2 x chn 80-1-1B-1 were susceptible.

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University

บทคัดย่อ

ในการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรียได้ทำการปลูกเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* ที่อยู่ในสภาพรุนแรง 2 ระดับความเข้มข้น คือ 10^6 cfu/ml และ 10^8 cfu/ml ลงในมะเขือเทศ 11 พันธุ์ โดยใช้วิธีการปลูกเชื้อ 2 วิธีคือ Micropipette Technique และ Scalpel Leaf-Clip method การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกทำในช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน ส่วนชุดที่ 2 เป็นการทำซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองครั้งแรก จึงใช้พันธุ์มะเขือเทศและวิธีการเดียวกัน ทำในช่วงเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างวิธีปลูกเชื้อ และ 2 ระดับความเข้มข้นเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ แต่มีความแตกต่างในทางปฏิบัติ Micropipette technique เหมาะสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานที่ต้องการความละเอียด โดยสามารถใส่เชื้อในปริมาณและความเข้มข้นที่ต้องการลงในพืชทดสอบได้ และพืชทุกต้นจะได้รับเชื้อเท่า ๆ กัน แต่จำนวนพืชทดสอบต้องมีไม่มากนัก เนื่องจากการปลูกเชื้อต้องใช้เวลามาก และผู้ปฏิบัติต้องมีความชำนาญพอ แต่ถ้ามีพืชทดสอบจำนวนมาก หรือเป็นการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในแปลงใหญ่ วิธี Scalpel Leaf-Clip Method จะเหมาะสมกว่า เพราะสามารถทำได้รวดเร็วและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสม่ำเสมอดี ในกรณีที่เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้มีความรุนแรงสูง และสภาพแวดล้อมเหมาะต่อการเกิดโรค ผลการปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธีจะไม่มีความแตกต่างกันนัก ผลการประเมินระดับความต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากการปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธี พันธุ์ที่แสดงลักษณะต้านทาน ได้แก่ พันธุ์ CI 5915-223D_4- 2-1-0 พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน ได้แก่ พันธุ์ CI 5915-206D_4- 2-5-0 สำหรับพันธุ์ 41-1-S-4B x 34-9B แสดงลักษณะค่อนข้างอ่อนแอ-อ่อนแอ ส่วนพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ พันธุ์ TN#3, P 490, XP 5034, CI 4657-9-0-4R-INR-0-5, P 502, Seedathip 2, Seedathip 3 และ 34-9B-1-2 x chn 80-1-1B-1 แสดงลักษณะอ่อนแอ

คำนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) เป็นพืชผักในตระกูล Solanaceae ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่ง สามารถผลิตจำหน่ายในรูปผลสดและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำมะเขือเทศ ซอสมะเขือเทศ ฯลฯ เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดหนองคาย เชียงใหม่ ลำปาง นครราชสีมา ขอนแก่น นครปฐม (สุธัญญา, 2527) ปัญหาสำคัญในการปลูกมะเขือเทศอย่างหนึ่ง คือ โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (bacterial wilt) เป็นโรคที่พบระบาดรุนแรงในเขตร้อนชื้น เมื่อพืชเป็นโรคแล้วมักตายหรือแคระแกรนทำให้ต้องสูญเสียผลผลิตไปปีละมาก ๆ ลักษณะอาการที่เด่นชัดของมะเขือเทศที่เป็นโรค คือ ใบจะเหี่ยวลู่ลงมาทั้งต้นในขณะที่ใบยังคงเขียวอยู่ เมื่อตัดขวางบริเวณโคนต้น นำมาแช่ใน

น้ำสะอาดสักครู่ จะพบของเหลวสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม (bacterial exudate) ไหลออกมาจากรอยตัดเป็นสายซึ่งเต็มไปด้วยเซลแบคทีเรียจำนวนมาก เชื้อกระจายตัวและแพร่ระบาดได้ดีโดยน้ำ เชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคนี้ คือ *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith การปลูกพืชหมุนเวียนและการใช้สารเคมีควบคุมโรคนี้ กระทำได้ยากและไม่ให้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคมีพืชอาศัยกว้างขวางตั้งแต่พืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืช (Atabug และ San Juan, 1981) สามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้นาน (Smith, 1944 ; Kelman, 1953) และค่อนข้างต้านทานต่อสารเคมีและปฏิชีวนะสารหลายชนิด (Garner, และคณะ, 1917 ; Well และ Roldan, 1922 ; Miller และ Harvey, 1932) นอกจากนี้เชื้อยังมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอยู่เสมอ ทำให้เกิด strain หรือ race ต่าง ๆ มากมาย (AVRDC, 1974) แนวทางในการควบคุมโรคในปัจจุบัน คือ พยายามปรับปรุงคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค ซึ่งในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานจำเป็นต้องมีวิธีการทดสอบและประเมินระดับความต้านทานโรคที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลที่เชื่อถือได้ สะดวกในการปฏิบัติและเหมาะกับสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่มีอยู่ งานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการปลูกเชื้อระหว่าง Micropipette Technique และ Scalpel Leaf-Clip Method ในแง่ความสม่ำเสมอของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และการปฏิบัติงาน เพื่อจะสามารถนำมาเป็นข้อแนะนำในการทดสอบและประเมินระดับความต้านทานโรคในมะเขือเทศพันธุ์ต่าง ๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

มะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ ได้แก่

1. พันธุ์ CI 5915-206D_4- 2-5-0
2. พันธุ์ TN#3
3. พันธุ์ P 490
4. พันธุ์ XP 5034
5. พันธุ์ CI 4657-9-0-4R-INR-0-5
6. พันธุ์ P 502
7. พันธุ์ 41-1-S-4B x 34-9B
8. พันธุ์ Seedathip 2
9. พันธุ์ Seedathip 3
10. พันธุ์ CI 5915-223D_4- 2-1-0
11. พันธุ์ 34-9B-1-2 x chn 80-1-1B-1

โดยใช้กล้ามะเขือเทศอายุ 5 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่มีขนาดต้นเหมาะสมในการทำ Artificial inoculation และง่ายต่อการติดเชื้อ

การเตรียม inoculum

ในการปลูกเชื้อแบบ Artificial inoculation ใช้เชื้อ *Pseudomonas solanacearum* ที่อยู่ในสภาพรุนแรง (virulent) ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 10^6 และ 10^8 cfu/ml เตรียมโดย นำต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคเหี่ยวในระยะแรกมาล้างบริเวณโคนต้นและรากให้สะอาด ทำความสะอาดผิวด้วย ethyl alcohol 70 % ตัดโคนต้นตามขวางเป็นท่อนสั้น ๆ ใส่ในหลอดน้ำกลั่นนึ่ง 5 ml ตั้งทิ้งไว้สักครู่ จะเห็น bacterial exudate เป็นของเหลวสีขาวขุ่นไหลออกมาจากชิ้นส่วนพืชเป็นสาย เขย่าให้เชื้อกระจายตัวดีด้วย Vortex mixer ใช้ลูบแตะ suspension เชื้อ streak บน TZC medium (Kelman, 1954) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C 48 ชั่วโมง เลือก virulent colony ที่มีลักษณะเล็ก ไม่กลม สีขาวขุ่นมีจุดสีชมพูอ่อนอยู่กลางโคโลนีกระจายตัวในน้ำได้ดี นำไปเพิ่มปริมาณบน TZC-X (TZC medium ที่ไม่เติม 2, 3, 5 triphenyl-tetrazolium chloride) บ่มเชื้อที่ 30 ^{o}C 36 ชั่วโมง นำเชื้อมาทำ suspension ในน้ำกลั่นนึ่ง ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^8 cfu/ml ($O.D._{600}$ = 0.2 = 0.19 x 10^8 cfu/ml) แล้วแบ่งส่วนหนึ่งทำการเจือจางเป็น 10^6 cfu/ml

วิธีการปลูกเชื้อ

ใช้วิธีการปลูกเชื้อ 2 วิธี คือ

1) Micropipette Technique : ใช้ Micropipette ขนาด 10 μ ดูด suspension เชื้อแต่ละระดับความเข้มข้น แล้วปักลงในต้นมะเขือเทศที่ตำแหน่งเหนือซอกตาของใบที่ 3 เล็กน้อย ปลด Micropipette tip ที่มี suspension เชื้อเสียบคาไว้ ปล่อยให้พืชดูดซึมเชื้อเข้าไปเองจนหมด ซึ่งจะใช้เวลาไม่เกิน 4 ชม. จากนั้นจึงปลด plastic tip ออก (AVRDC, 1974)

2) Scalpel Leaf-Clip Method : ใช้มีดโกน (scalpel blade No. 10) คม ๆ จุ่ม suspension เชื้อ แล้วตัดก้านใบให้ชิดลำต้น ที่ตำแหน่งก้านใบที่ 3 นับจากยอดทันที

ปลูกเชื้อแต่ละระดับความเข้มข้น วิธีละ 10 ต้น เก็บพืชไว้ในเรือนระแนง รดน้ำสม่ำเสมอ สังเกตอาการเหี่ยว ทุกวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์

การบันทึกผลและประเมินระดับความต้านทาน

บันทึกค่า LT_{10} และเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคเหี่ยว แล้วประเมินระดับความต้านทานของมะเขือเทศพันธุ์ต่าง ๆ ตาม disease reaction ดังนี้

0-20 % wilt = Resistant (R)

21-40 % wilt = Moderately resistant (MR)

41-60 % wilt = Moderately susceptible (MS)

61-100 % wilt = Susceptible (S)

ผลและวิจารณ์

จากการปลูกเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* ที่อยู่ในสภาพรุนแรงที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml และ 10^8 cfu/ml ลงในมะเขือเทศ 11 พันธุ์ โดยใช้วิธีการปลูกเชื้อ 2 วิธี คือ Micropipette Technique และ Scalpel Leaf-Clip Method ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่าง 2 วิธี การปลูกเชื้อ และ 2 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูง และสภาพแวดล้อมหลังจากการปลูกเชื้อเหมาะแก่การเกิดโรคมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทดลองแรกปลูกเชื้อในเดือนกันยายน ซึ่งเป็นช่วงที่อุณหภูมิและความชื้นสูง ค่า LT_{10} ที่บันทึกได้โดยเฉลี่ยค่อนข้างต่ำ (5 วันสำหรับพันธุ์อ่อนแอ และ 9 วันสำหรับพันธุ์ค่อนข้างต้านทาน) แสดงว่า เชื้อมี incubation period สั้น พืชแสดงอาการเหี่ยวได้เร็ว ส่วนการทดลองที่ 2 ปลูกเชื้อปลายเดือนตุลาคม ซึ่งอุณหภูมิและความชื้นต่ำกว่า ได้ค่า LT_{10} มากกว่า (6-7 วันสำหรับพันธุ์อ่อนแอ และ 9-10 วันสำหรับพันธุ์ค่อนข้างต้านทาน) แสดงว่าเชื้อมี incubation period ยาวกว่าเล็กน้อย วิธี Micropipette Technique เหมาะสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานที่ต้องการความละเอียด สามารถใส่เชื้อลงในพืชแต่ละต้นในปริมาณที่แน่นอน และเท่า ๆ กัน แต่จำนวนพืชทดสอบต้องมีไม่มากนัก เนื่องจากในการปลูกเชื้อต้องเสียเวลามาก และผู้ปฏิบัติต้องมีความชำนาญพอ ถ้าพืชทดสอบมีจำนวนมาก หรือเป็นการคัดเลือกในแปลงใหญ่ ใช้วิธี Scalpel Leaf-Clip Method จะเหมาะสมกว่า เพราะสามารถทำได้รวดเร็วและผลที่ออกมาสม่ำเสมอเชื่อถือได้ ผลการประเมินระดับความต้านทานโรคเหี่ยวจากการปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธี พันธุ์ต้านทาน (Resistance) ได้แก่ CI 5915-223D_4- 2-1-0 พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน (Moderately resistance) ได้แก่ CI 5915-206D_4- 2-5-0 สำหรับพันธุ์ 41-1-S-4B x 34-9B แสดงลักษณะค่อนข้างอ่อนแอ (Moderately susceptible) ถึงอ่อนแอ (Susceptible) ได้แก่ พันธุ์ TN#3, P 490, XP 5034, CI 4657-9-0-4R-INR-0-5, P 502, Seedathip 2, Seedathip 3 และ 34-9B-1-2 x chn 80-1-1B-1

ผลการทดลองที่ 1 แสดงในตารางที่ 1-4

ผลการทดลองที่ 2 แสดงในตารางที่ 5-8

Table 1 Wilt percentage, disease reaction and LT_{10} of the first experiment

No. Tomato variety	Micropipette Technique						Scapel Leaf-Clip Method					
	10^6			10^8			10^6			10^8		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1. Cl 5915-206D4-2-5-0	30	MR	9	30	MR	9	40	MR	10	60	MR	9
2. TN # 37	0	S	5	100	S	5	80	S	5	70	S	5
3. P 49010	0	S	5	100	S	5	80	S	5	100	S	5
4. XP 5034	100	S	5	100	S	5	90	S	5	90	S	5
5. Cl 4657-9-0-4R-INR-0-5	80	S	6	70	S	7	80	S	6	70	S	6
6. P 502	80	S	5	60	MS	5	80	S	5	90	S	5
7. 41-1-S-4B x 34-9B	70	S	6	70	S	6	80	S	7	80	S	6
8. Seedathip 2	100	S	7	90	S	7	80	S	7	90	S	6
9. Seedathip 3	100	S	5	100	S	5	90	S	5	100	S	5
10. Cl 5915-223D4-1-2-0	10	R	9	0	R	-	0	R	-	0	R	-
11. 34-9B-1-2xchn 80-1-1B-1	80	S	6	60	S	6	100	S	6	90	S	6

I % wilt

II disease reaction 0-20 % wilt = Resistant (R)

21-40 % wilt = Moderately resistant (MR)

41-60 % wilt = Moderately susceptible (MS)

61-100 % wilt = Susceptible (S)

III LT_{10} = no. day for ten percent infection

Table 2 Analysis of variance table for factorial treatments in randomizedcomplete block design of the first experiment.

Source	DF	SS	MS	F	
Replications	9.0000	21.8205	2.4245	33.1787	**
Treatments	43.0000	35.7886	0.8323	11.3898	**
Factor A	3.0000	0.2068	0.0689	0.9434	ns
Factor B	10.0000	32.2136	3.2214	44.0837	**
A x B	30.0000	3.3682	0.1123	1.5364	*
Error	387.0000	28.2795	0.0731		
TOTAL	439.0000	85.8886			

CV. = 36.82 %

* = Significant Difference at 95 %

** = Significant Difference at 99 %

ns = No Significant Difference at 95 %

Table 3 Analysis of varience table for randomize complete block design of the first experiment.

Source	DF	SS	MS	F	
Replications	10.0	322.1365	32.2136	28.6924	**
Treatments	3.0	2.0683	0.6894	0.6141	ns
Error	30.0	33.6817	1.1227		

CV. = 14.43 %

** = Significant Difference at 99 %

ns = No Significant Difference at 95 %

Table 4 Relative resistance of tomato lines to TBW of the first experiment.

No. Variety	Mean value	Significant symbol	Relative resistance
1. CI 5915-206D4-2-5-0	0.4000	d	Moderately resistance (MR)
2. TN # 3	0.775	c	Susceptible (S)
3. P 490	0.950	a	Susceptible (S)
4. XP 5034	0.950	a	Susceptible (S)
5. CI 4657-9-0-4R-INR-0-5	0.750	c	Susceptible (S)
6. P 502	0.775	c	Susceptible (S)
7. 41-1-S-4B x 34-9B	0.750	c	Susceptible (S)
8. Seedathip 2	0.900	ab	Susceptible (S)
9. Seedathip 3	0.975	a	Susceptible (S)
10. CI 5915-223 D4-1-2-0	0.025	e	Resistance ®
11. 34-9B-1-2 x chn 80-1-1B-1	0.825	bc	Susceptible (S)

Table 5 Wilt percentage, disease reaction and LT_{10} of the second experiment

No. Tomato variety	Micropipette Technique						Scapel Leaf-Clip Method					
	10^6			10^8			10^6			10^8		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1. Cl 5915-206D4-2-5-0	30	MR	10	40	MR	9	40	MR	9	40	MR	9
2. TN # 3	70	S	6	80	S	6	60	MS	6	60	MS	5
3. P 490	90	S	7	100	S	7	70	S	7	100	S	7
4. XP 5034	100	S	6	100	S	6	90	S	6	100	S	6
5. Cl 4657-9-0-4R-INR-0-5	80	S	9	80	S	8	70	S	9	70	S	8
6. P 502	60	MS	7	60	MS	7	90	S	7	90	S	6
7. 41-1-S-4B x 34-9B	30	MR	5	40	MR	5	80	S	7	80	S	6
8. Seedathip 2	80	S	6	0	S	6	80	S	6	90	SS	6
9. Cl 5915-223D4-1-2-0	0	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	-
10. 34-9B-1-2xchn 80-1-1B-1	60	MS	8	80	S	7	90	S	7	80	S	6

I % wilt

II disease reaction 0-20 % wilt = Resistant (R)

21-40 % wilt = Moderately resistant (MR)

41-60 % wilt = Moderately susceptible (MS)

61-100 % wilt = Susceptible (S)

III LT_{10} = no. day for ten percent infection

Table 6 Analysis of variance table for factorial treatments in randomizedcomplete block design of the second experiment.

Source	DF	SS	MS	F	
Replications	9.0000	26.7182	2.9687	37.4450	**
Treatments	43.0000	37.3182	0.8679	10.9467	**
Factor A	3.0000	0.6636	0.2212	2.7902	*
Factor B	10.0000	32.5682	3.2568	41.0793	**
A x B	30.0000	4.0864	0.1362	1.7181	*
Error	387.0000	30.6818	0.0793		
TOTAL	439.0000	94.7182			

CV. = 41.02 %

* = Significant Difference at 95 %

** = Significant Difference at 99 %

Table 7 Analysis of varience table for randomize complete block design of the second experiment.

Source	DF	SS	MS	F	
Replications	10.0	325.6819	32.5682	23.9099	**
Treatments	3.0	6.6364	2.2121	1.6240	ns
Error	30.0	40.8386	1.3621		

CV. = 17.00 %

** = Significant Difference at 99 %

ns = No Significant Difference at 95 %

Table 8 Relative resistance of tomato lines to TBW of the second experiment.

No. Variety	Mean value	Significant symbol	Relative resistance
1. CI 5915-206D4-2-5-0	0.375	f	Moderately resistance (MR)
2. TN # 3	0.675	de	Susceptible (S)
3. P 490	0.900	ab	Susceptible (S)
4. XP 5034	0.975	a	Susceptible (S)
5. CI 4657-9-0-4R-INR-0-5	0.750	cd	Susceptible (S)
6. P 502	0.750	cd	Susceptible (S)
7. 41-1-S-4B x 34-9B	0.575	e	Moderately susceptible (MS)
8. Seedathip 2	0.825	bc	Susceptible (S)
9. Seedathip 3	0.950	a	Susceptible (S)
10. CI 5915-223 D4-1-2-0	0.000	g	Resistance (R)
11. 34-9B-1-2 x chn 80-1-1B-1	0.775	cd	Susceptible (S)

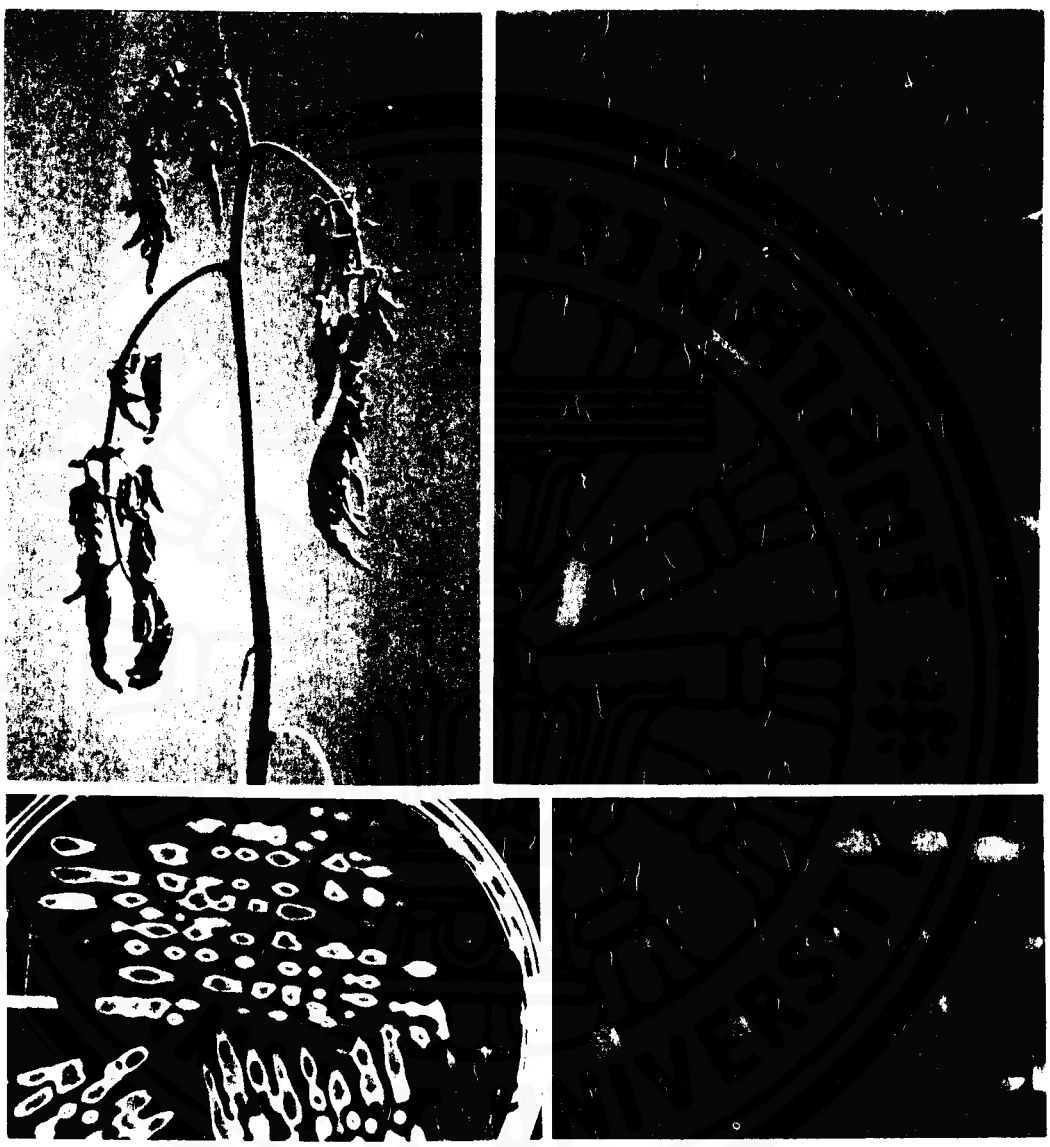

Figure 1 a. Diseased tomato show leaf epinasty and wilting symptom leave still green

b. Tomato seedling which was inoculated with Micropipette technique

c. Virulent colony (wild type) of P. *solanacearum* on TZC medium fromed an irregularly-round, fluidal, white colony with a pink center

d. Virulent colony of P. *solanacearum* on TZC formed irregularly round, fluidal and cream

เอกสารอ้างอิง

สุธัญญา ฉายาชวลิต. 2527. การศึกษาโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อบักเตรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

Asian Vegetable Research and Development Center. 1974. The Tomato, pp. 63-67 In Annual Report for 1974. Shanhua, Taiwan.

Asian Vegetable Research and Development Center. 1983. Tomato pathology, pp.5-6. In Progress Report Summaries, Shanhua, Taiwan.

Atabug, R.G. and San Juan. 1981. Screening of tomato accessions for Bacterial wilt resistance. Phil. Pathology 17 : 63-66.

Garner, W.W., F.A. Wolf ; and E.G. Moss. 1917. The control of tobacco wilt in the flue-cured district. U.S. Dept. Agr. Bur. Plant. Ind. Bul. 526 : 1-20.

Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. N. Carolina Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. 99 : 5-194.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. Phytopathology. 44 : 693-695.

Miller, J.H., and H.W. Harvey. 1932. Peanut wilt in Georgia. Phytopathology. 22 : 371-383.

Smith, E.F. 1944. Control of bacterial wilt of tobacco as influenced by crop rotation and chemical treatment of the soil. U.S. Dept. Agr. Cir. 692 : 1-16. cited in Kelman, A. 1953. the bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. N. carolina Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. 99 : 5-194.

Well, C.G., and E.F. Roldan. 1922. Solanaceous wilt in the Philippine Island. Philippine Agr. 10 : 393-398.