

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE RAZAS Y BIOVARES DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* (E.F.SMITH) YABUUCHI *ET AL.*, EN NICARAGUA

MSc. Jorge Ulises Díaz B.

Docente-Investigador del Departamento de Protección Agrícola y Forestal de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria. Email: ulises.diaz.blandon@una.edu.ni

RESUMEN

Ralstonia solanacearum (E.F. Smith) Yabuuchi *et al.*, causa la marchitez bacteriana de un amplio rango de cultivos en muchas regiones tropicales y subtropicales y en algunas zonas calientes de países con clima templado. Esta bacteria es una especie altamente variable, por consiguiente, el estudio de su diversidad poblacional es un importante factor a considerar para su control. El objetivo principal de este estudio fue el de caracterizar la estructura poblacional de *R. solanacearum* al determinar sus razas y biovares en diferentes sitios de Nicaragua. El muestreo se llevó a cabo en cuatro departamentos de Nicaragua (Estelí, Matagalpa, Jinotega y Rivas). Se recolectaron y purificaron 33 aislamientos. De estos, 27 aislamientos fueron confirmados que eran *R. solanacearum*. A través de pruebas bioquímicas se identificaron veinte aislamientos pertenecientes a la Raza 1, Biovar 3 y 7 pertenecientes a la Raza 2, Biovar 3. El biovar 3 es el más prevalente en los sitios muestreados.

Palabras claves: Marchitez bacteriana, cultivos de solanáceas, diversidad poblacional, pruebas bioquímicas.

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum (E.F. Smith) Yabuuchi *et al.*, causes bacterial wilt of a wide range of crops in many tropical, subtropical and warm temperate regions worldwide. This bacterium is a highly variable species; therefore, the study of its population diversity is an important factor to be considered for its control. The main objective of this study was to characterize the population diversity of *R. solanacearum* by determining its races and biovars in different sites of Nicaragua. The sampling was carried out in four departments of Nicaragua (Estelí, Matagalpa, Jinotega and Rivas). Thirty three isolates were collected and purified. Out of these, 27 isolates were confirmed to be *R. solanacearum*. Twenty isolates belonging to race 1 biovar 3, and 7 belonging to race 2 biovar 3 were identified through biochemical tests. In the sampling sites the biovar 3 is the most prevalent.

Key words: Bacterial wilt, solanaceous crops, population diversity, biochemical tests.



R*alstonia solanacearum* (E.F.Smith) Yabuuchi *et al.*, causa la marchitez bacteriana de un amplio rango de cultivos en muchas regiones tropicales y subtropicales y en algunas zonas calientes de países con clima templado (Roncal *et al.*, 1999).

Las investigaciones han demostrado que *R. solanacearum* es una especie altamente variable que abarca cinco biovares y cuatro razas (Hayward, 1991), en las cuales las cepas muestran una importante diversidad a nivel fisiológico, serológico, características genéticas y rango de hospedantes (Poussier *et al.*, 1999). El sistema de razas agrupa a las cepas en cuatro razas de acuerdo al rango de hospedantes (Buddenhagen *et al.*, 1962; He *et al.*, 1983). El sistema de biovares agrupa a las cepas en cinco biovares basándose en la utilización de tres disacáridos y la oxidación de tres hexosas alcohólicas (Hayward, 1964; Hayward *et al.*, 1991).

Dentro del biovar 2 se han determinado 2 fenotipos: el fenotipo A (biovar 2T), el cual incluye cepas metabólicamente más activas, adaptadas a condiciones tropicales calientes y con un rango de hospedantes más amplio; el fenotipo B (biovar 2A), el cual corresponde a las cepas de la Raza 3 e incluye cepas metabólicamente menos activas y adaptadas a temperaturas frescas (Hayward *et al.*, 1989).

Recientemente, el uso de técnicas moleculares ha suministrado un nuevo esquema de clasificación, el cual ha separado las especies de *R. solanacearum* en dos grupos principales, la división Asiática y la Americana (Cook *et al.*, 1989; Seal *et al.*, 1992; Seal *et al.*, 1993; Poussier *et al.*, 1999).

La variabilidad presentada por un patógeno en particular es un importante factor a considerar para su control. Por esta razón, la caracterización de *R. solanacearum* es un prerrequisito para estudiar su epidemiología y desarrollar estrategias de control (Smith *et al.*, 1995). Por lo tanto, en un programa de manejo de la marchitez bacteriana se debe considerar la variabilidad poblacional de *R. solanacearum*, principalmente, cuando la estrategia básica es la utilización de variedades resistentes (Silveira *et al.*, 1998).

Basándose en lo anterior, el objetivo fundamental de este estudio fue caracterizar la diversidad poblacional de *R. solanacearum* a través de la determinación de las diferentes razas y biovares que conforman esas poblaciones en los sitios seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo. La recolección de las muestras se efectuó en los meses de Enero y Febrero del año 2002 en los departamentos de Esteli (Mirafior, La Pita y La Laguna en Tisey), Jinotega (Santa Lastenia y El Mojón), Matagalpa (La Fundadora) y Rivas (San Esteban y San Jorge). Se recolectaron plantas de papa y pseudotallos de plátano que presentaban síntomas de la enfermedad, así como también tubérculos de papa sospechosos de albergar a la bacteria.

Aislamiento del patógeno. La bacteria fue inicialmente aislada en el medio agar sacarosa-peptona (ASP). La virulencia de los aislamientos fue comprobada en el medio cloruro de tetrazolium (TZC) de Kelman (1954). Se aislaron y purificaron 33 cepas de las ocho localidades en los cuatro departamentos. Las diferentes cepas fueron preservadas en agua destilada estéril (ADE) para evitar que mutaran a formas avirulentas (French *et al.*, 1995).

Caracterización de las razas. Se utilizaron 33 plantas de tabaco cv. Habano criollo, cultivadas en invernadero. Se utilizó el método propuesto por Lozano y Sequeira (1970), el cual consiste en la infiltración del mesófilo de las hojas de tabaco plenamente desarrolladas. Para la infiltración de la suspensión bacteriana se utilizaron agujas hipodérmicas (No. 25). Los criterios que se utilizaron para la caracterización de las razas fueron los siguientes: la Raza 1, causa clorosis a los dos días después de la inoculación y marchitamiento típico después de 7-8 días; la Raza 2, provoca reacción hipersensitiva 12-24 horas después de la inoculación; y la Raza 3, causa solamente clorosis 2-8 días después de la inoculación.

Caracterización de los biovares. Se determinaron sobre la base de la utilización de tres disacáridos (lactosa, maltosa y celobiosa) y la oxidación de tres hexosas alcohólicas (dulcitol, manitol y sorbitol). Se utilizó un medio base ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, peptona 1 g, azul de bromotimol 0.03 g, agar 3 g, agua destilada 1000 ml) al cual se le agregó las soluciones de los carbohidratos al 10% según el procedimiento descrito por Lelliott y Stead (1987). Se inocularon 198 tubos de ensayo con una suspensión

Tabla 1. Clasificación de *Ralstonia solanacearum* en biovares basada en la habilidad de utilizar disacáridos y oxidar hexosas alcohólicas. + = reacción positiva (producción de ácido), - = reacción negativa.

Pruebas fisiológicas	Biovares				
	1	2	3	4	5
Utilización de disacáridos					
Celobiosa	-	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	-	+
Oxidación de alcoholes					
Dulcitol	-	-	+	+	-
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-

Fuente: French *et al.* (1995).

de la bacteria *R. solanacearum* (controles positivos) y otros 198 tubos no fueron inoculados (controles negativos).

Cada tubo de ensayo contenía 4.5 ml del medio base y 0.5 ml de uno de los carbohidratos al 10%. A cada cepa le correspondió 6 tubos de ensayo, ya que eran seis tipos de carbohidratos y como eran 33 cepas eso da el total de 198 tubos de ensayos. El experimento se repitió dos veces con el fin de confirmar los resultados. Como referencia se utilizó la información del Tabla 1 que establece los criterios de ubicación de cada uno de los biovares:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sitios de muestreo. En la Tabla 2 se presentan los lugares y los hospedantes de donde se recolectaron las diferentes cepas de *R. solanacearum* que fueron incluidas en las pruebas de infiltración de hojas de tabaco para determinar las razas y en las pruebas fisiológicas para la

determinación de los biovares. Como se puede observar en el Tabla 1, solamente de dos hospedantes (papa y plátano) se obtuvieron los aislamientos, lo cual se debe a que en ese momento de la recolección de las muestras (enero-febrero) eran los únicos cultivos disponibles en el campo.

Aislamiento del patógeno. Las colonias bacterianas que crecieron en el medio agar sacarosa-peptona fueron rayadas en el medio TZC para determinar su virulencia en este medio de cultivo. De las 33 cepas aisladas, 27 de ellas presentaron características claras de virulencia en el medio TZC.

Estas colonias eran blanquecinas a cremosas, fluidas y con un centro ligeramente rojo a rosado (Figuras 1 y 2). Por el contrario, las seis cepas restantes presentaron una coloración roja uniforme y de aspecto butiroso. Estas lecturas fueron realizadas a las 48 horas después que estas bacterias fueron sembradas en el medio TZC. La

Tabla 2. Cepas de *R. solanacearum* recolectadas de diferentes sitios de Nicaragua y usadas en las pruebas bioquímicas y reacción de hipersensibilidad.

Cepas		Hospedante	Departamento	Localidad
No.	Código			
1	MJ-1	Papa	Jinotega	El Mojón
2	MJ-2	"	"	"
3	MJ-3	"	"	"
4	MJ-4	"	"	"
5	MJ-5	"	"	"
6	MJ-6	"	"	"
7	MJ-7	"	"	"
8	MJ-8	"	"	"
9	MJ-9	"	"	"
10	MJ-10	"	"	"
11	MJ-11	"	"	"
12	MJ-12	"	"	"
13	MJ-13	"	"	"
14	LL-TE1	"	Estelí	La Laguna (Tisey)
15	LL-TE2	"	"	"
16	LL-TE3	"	"	"
17	LL-TE4	"	"	"
18	LL-TE5	"	"	"
19	LL-TE6	"	"	"
20	LF-1	"	Matagalpa	La Fundadora
21	LF-2	"	"	"
22	StL-3	"	Jinotega	Santa Lastenia
23	Nah-1	Plátano	Rivas	Nahualapa (S. Jorge)
24	Nah-2	"	"	"
25	Nah-3	"	"	"
26	SE-1	"	"	San Esteban
27	SE-2	"	"	"
28	SE-3	"	"	"
29	SE-4	"	"	"
30	MF-1T	Papa	Estelí	Miraflor
31	MF-2T	"	"	"
32	MF-5T	"	"	"
33	LP-3B	"	"	La Pita

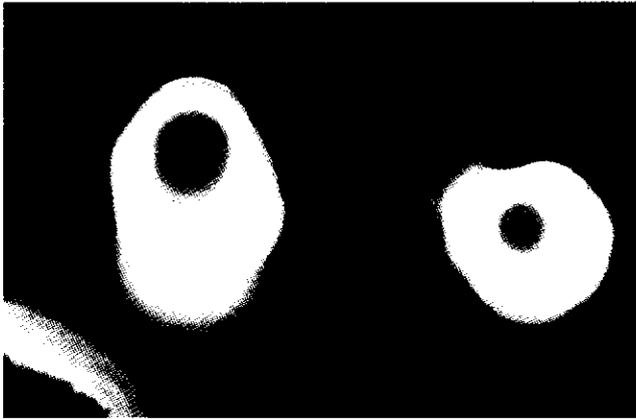


Figura 1. Colonias virulentas de la Raza 1 de *R. solanacearum* obtenidas de papa.

temperatura y la humedad relativa promedio en que permanecieron los cultivos fueron 28°C y 65% respectivamente.

Caracterización de las razas. En el invernadero, la temperatura y la humedad relativa promedio durante el desarrollo del experimento fueron de 32°C y 57% respectivamente y un fotoperíodo de 12 horas aproximadamente. Las primeras respuestas a las inoculaciones de las cepas en las hojas de tabaco fueron obtenidas 36 horas después, cuando se observó una reacción de hipersensibilidad en las hojas de tabaco que fueron inoculadas con las cepas obtenidas de plátano (Cuadro 3 y Figura 3). Sobre la base de esta reacción estas cepas fueron ubicadas en la Raza 2. A las 72 horas después de las inoculaciones hubo una respuesta generalizada en las plantas de tabaco. A las 72 horas, en veinte plantas de tabaco se observó clorosis a la cual le siguió marchitamiento de las plantas, por lo cual se determinó que estas cepas pertenecen a la Raza 1 del patógeno (Cuadro 3 y Figura 4).

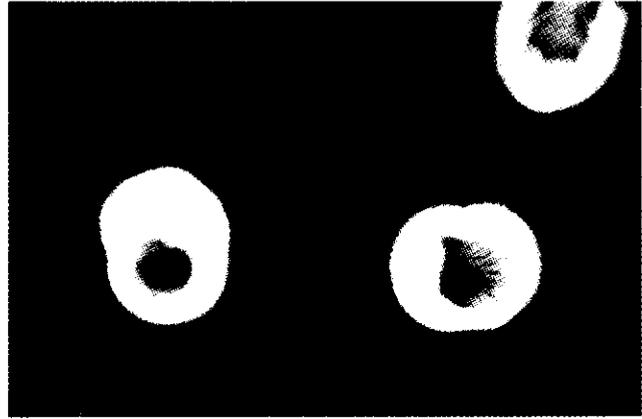


Figura 2. Colonias virulentas de la Raza 2 de *R. solanacearum* obtenidas de plátano.

A las 36 horas inicialmente, en las próximas 96 horas posteriores a la inoculación, en seis plantas de tabaco se observó un amarillamiento atípico, el cual aumentó de intensidad a medida que avanzaba el tiempo (Tabla 3 y Figura 5).

Esta sintomatología no varió del todo, incluso cuando se hicieron lecturas a las 144 horas después de la inoculación. A excepción de este síntoma, las plantas no presentaron ningún otro tipo de afectación, por lo que se presume que estas cepas sean de una identidad distinta a la *R. solanacearum*.

De las 33 cepas inoculadas en las plantas de tabaco, 20 presentaron características sintomatológicas de ser de la Raza 1, 7 cepas dieron una reacción de hipersensibilidad en las hojas de tabaco 36 horas después de ser inoculadas, por lo que se determinó que pertenecen a la Raza 2 de *R. solanacearum*. Seis cepas no presentaron características distintivas, por lo que no fueron ubicadas en ninguna de las razas conocidas de *R. solanacearum* y su identidad perma-

Tabla 3. Reacción de hojas de tabaco a la infiltración con cepas de *Ralstonia solanacearum*, recolectadas de ocho localidades (cuatro departamentos) de Nicaragua.

Cepa No.	Horas después de la infiltración								Raza
	12	24	36	48	60	72	84	96	
1	-	-	-	-	-	C	C	C	1
2	-	-	-	-	-	C	C	C	1
3	-	-	-	-	-	C	C	C	1
4	-	-	A	A	A	A	A	A	-
5	-	-	-	-	-	A	A	A	-
6	-	-	-	-	-	C	C	C	1
7	-	-	-	-	-			C	1
8	-	-	-	-	-	C	C	C	1
9	-	-	-	-	-	C	C	C	1
10	-	-	-	-	-	C	C	C	1
11	-	-	-	-	-	C	C	C	1
12	-	-	-	-	-	C	C	C	1
13	-	-	-	-	-	C	C	C	1
14	-	-	-	C	C	C	C	C	1
15	-	-	-	-	-	-	C	C	1
16	-	-	-	-	-	C	C	C	1
17	-	-	-	-	-	C	C	C	1
18	-	-	-	-	-	-	-	C	1
19	-	-	-	-	-	C	C	C	1
20	-	-	-	-	-	-	-	C	1
21	-	-	-	-	-	A	A	A	-
22	-	-	-	-	-	A	A	A	-
23	-	-	RH	RH	RH	RH	RH	RH	2
24	-	-	RH	RH	RH	RH	RH	RH	2
25	-	-	RH	RH	RH	RH	RH	RH	2
26	-	-	RH	RH	RH	RH	RH	RH	2
27	-	-	RH	RH	RH	RH	RH	RH	2
28	-	-	RH	RH	RH	RH	RH	RH	2
29	-	-	RH	RH	RH	RH	RH	RH	2
30	-	-		C	C	C	C	C	1
31	-	-		C	C	C	C	C	1
32	-	-		A	A	A	A	A	-
33	-	-		A	A	A	A	A	-

C=clorosis; A=amarillamiento intenso; RH=reacción hipersensitiva.



Figura 3. Reacción de hipersensibilidad causada por cepas de la Raza 2 de *R. solanacearum* aisladas de plátano en la zona de Rivas (Nahualapa-San Jorge y San Esteban).



Figura 4. Clorosis seguida de marchitamiento causada por cepas de la Raza 1 de *R. solanacearum* obtenidas de papa de los departamentos de Jinotega, Matagalpa y Estelí.



Figura 5. Amarillamiento del área de infiltración causada por cepas desconocidas y que presumiblemente pertenezcan a *Erwinia carotovora*.

nece aún sin determinar, aunque sus características fenotípicas sugieren que son *Erwinia carotovora* p.v. *atroseptica*.

Caracterización de los biovares. Según la respuesta obtenida en las pruebas bioquímicas con los carbohidratos, todos los 27 aislamientos plenamente identificados como *R. solanacearum* pertenecen al Biovar 3. Las seis cepas desconocidas fallaron en oxidar el dulcitol, por lo que no fueron ubicadas en ninguno de los biovares hasta ahora plenamente reconocidos (Tabla 4). Esto no puede llevar a la conclusión de que las poblaciones de *R. solanacearum* están conformadas

única y exclusivamente por el Biovar 3, ya que en este estudio se incluyeron únicamente dos hospedantes y un número no conclusivo de cepas de la bacteria.

Futuras investigaciones en esta dirección deben incluir un número mayor de plantas hospedantes y por lo tanto un número mayor de cepas para tener una idea más amplia de la estructura poblacional de este importante patógeno, el cual no ha recibido la atención debida, aún cuando se sabe que su rango de hospedantes es bastante amplio y tiende a ampliarse aún más no solamente en plantas hospedantes nuevas, sino también territorialmente como consecuencia del irrestricto comercio internacional de productos vegetales (material de siembra) y localmente como resultado de la constante expansión de la frontera agrícola.

Tabla 4. Utilización de disacáridos y oxidación de hexosas alcohólicas por cepas de *Ralstonia solanacearum* recolectadas de ocho localidades (cuatro departamentos) de Nicaragua y su caracterización en biovares y razas

Cepa No.	Disacáridos			Hexosas alcohólicas			Biovar	Raza
	Lactosa	Maltosa	Celobiosa	Dulcitol	Manitol	Sorbitol		
1	+	+	+	+	+	+	3	1
2	+	+	+	+	+	+	3	1
3	+	+	+	+	+	+	3	1
4	+	+	+	-	+	+	-	-
5	+	+	+	-	+	+	-	-
6	+	+	+	+	+	+	3	1
7	+	+	+	+	+	+	3	1
8	+	+	+	+	+	+	3	1
9	+	+	+	+	+	+	3	1
10	+	+	+	+	+	+	3	1
11	+	+	+	+	+	+	3	1
12	+	+	+	+	+	+	3	1
13	+	+	+	+	+	+	3	1
14	+	+	+	+	+	+	3	1
15	+	+	+	+	+	+	3	1
16	+	+	+	+	+	+	3	1
17	+	+	+	+	+	+	3	1
18	+	+	+	+	+	+	3	1
19	+	+	+	+	+	+	3	1
20	+	+	+	+	+	+	3	1
21	+	+	+	-	+	+	-	-
22	+	+	+	-	+	+	-	-
23	+	+	+	+	+	+	3	2
24	+	+	+	+	+	+	3	2
25	+	+	+	+	+	+	3	2
26	+	+	+	+	+	+	3	2
27	+	+	+	+	+	+	3	2
28	+	+	+	+	+	+	3	2
29	+	+	+	+	+	+	3	2
30	+	+	+	+	+	+	3	1
31	+	+	+	+	+	+	3	1
32	+	+	+	-	+	+	-	-
33	+	+	+	-	+	+	-	-

Como ha señalado Hayward (1964) y He *et al.* (1983), no hay correlación directa entre las características fisiológicas y de patogenicidad en la mayoría de los casos. Por lo tanto, la determinación de biovares en el laboratorio no es particularmente útil para determinar el potencial de rango de hospedantes de una cepa en particular. El rango de hospedantes debe ser determinado mediante la inoculación de hospedantes diferenciales en el invernadero, lo cual a su vez está sujeto a la variabilidad inherente de los procedimientos de inoculación. Además, ciertas plantas hospedantes se marchitarán cuando sean inoculadas en el invernadero, pero no lo harán en condiciones naturales. Por lo tanto, este estudio puede ser considerado solamente como preliminar y debe ser confirmado mediante investigaciones adicionales donde se incluya un número mayor de cepas de otras localidades de Nicaragua.

Las pruebas fisiológicas utilizadas en este estudio constituyen una buena herramienta para la identificación de las cepas de *R. solanacearum* cuando no se disponen de otros medios para hacerlo. Sin embargo, estas pruebas requieren de mucho tiempo (más de 14 días) para conocer los resultados, por lo que se hace necesario la búsqueda de técnicas más precisas y rápidas.

En este sentido, los platos de microtitulación, las pruebas serológicas y las técnicas moleculares han venido a darle respuesta a esta demanda, ya están siendo ampliamente utilizadas para estos y otros fines. Estas nuevas herramientas no solamente nos ayudarán a caracterizar las poblaciones del patógeno de manera precisa y rápida, sino que también nos darán pautas para la toma de decisiones para el manejo de la bacteria.

CONCLUSIONES

En los sitios muestreados las cepas de *R. solanacearum* pertenecen a la Raza 1 (Jinotega, Matagalpa y Estelí) y a la Raza 2 (Rivas).

El Biovar 3 es el que predomina dentro de las razas y cepas identificadas.

Se hace necesario el uso de técnicas distintas a las pruebas fisiológicas para un análisis más rápido y preciso de la estructura poblacional de *R. solanacearum* en Nicaragua.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero brindado por el Programa de Apoyo al Consejo de Investigación (PACI) de la Universidad Nacional Agraria (UNA) para la ejecución y culminación de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BUDDENHAGEN, I., SEQUEIRA, L., AND KELMAN, A.** 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**: 726.
- COOK, D., ELIZABETH, B., AND SEQUEIRA, L.** 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2**: 113-121.
- FRENCH, E.B., GUTARRA, L., ALEY, P., AND ELPHINSTONE, J.** 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. *Fitopatología* **30**: 126-130.
- HAYWARD, A.C.** 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* **27**: 265-277.
- HAYWARD, A.C.** 1991. Biology and Epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**: 65-87.
- HAYWARD, A.C., EL-NASHAAR, H.M., DE LINDO, L., AND NYDEGGER, U.** 1989. The use of microtiter plates in the phenotypic characterization of phytopathogenic pseudomonads. In *Proceedings 7th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*. Budapest, Hungary. Vol. II. p. 593-598.
- HE, L., SEQUEIRA, L., AND KELMAN, A.** 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease* **67**: 1357-1361.
- KELMAN, A.** 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* **44**: 693-695.
- LELLIOTT, R.A., AND STEAD, D.E.** 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Great Britain, London. Blackwell Scientific Publications. *Methods in Plant Pathology Volume 2*. p. 114-117, 188-189.
- LOZANO, J.C., AND SEQUEIRA, L.** 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* **60**: 833-838.
- POUSSIER, S., VANDEWALLE, P., AND LUISETTI, J.** 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2184-2194.
- RONCAL, J., GUTARRA, L., AND PRIOU, S.** 1999. Rapid differentiation of strains of *Ralstonia solanacearum* by restriction analysis of PCR-Amplified Fragments. *Bacterial Wilt Newsletter* **16**: 6-9.
- SEAL, S.E., JACKSON, L.A., AND DANIELS, M.J.** 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3759-3761.
- SEAL, S.E., JACKSON, L.A., YOUNG, J.P.W., AND DANIELS, M. J.** 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* **139**: 1587-1594.
- SILVEIRA, E.B., GOMES, A.M.A., MICHHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R.** 1998. Variability of *Ralstonia solanacearum* populations causing wilt on tomato in Agreste of Pernambuco, Brazil. Australian Centre for international Agricultural Research (ACIAR). *Bacterial Wilt Newsletter* N° **15**: 8-10.
- SMITH, J.J., OFFORD, L.C., HOLDERNESS, M., AND SADDLER, G.S.** 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 4263-4268.