Reseña

CARACTERIZACIÓN DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* A TRAVÉS DEL ESTUDIO DE SU DIVERSIDAD GENÉTICA

Yelaine Tejeda Gómez

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.ª B y 5.ª F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, ytejeda@inisav.cu

RESUMEN

La bacteria fitopatógena Ralstonia solanacearum *es causante de la marchitez bacteriana en diversos cultivos de importancia económica en regiones de clima tropical y subtropical, así como en diversos países de clima templado. La especie constituye una unidad taxonómicamente compleja en la que las cepas muestran una amplia diversidad a nivel fisiológico, serológico, genético y de rango de hospedantes. El análisis por RFLP proporciona un nuevo esquema de clasificación al dividir la especie en los grupos Asiaticum y Americanum, en relación con el origen geográfico de las cepas. A partir de estos análisis preliminares se ha incrementado el empleo y desarrollo de las técnicas moleculares para el estudio de la diversidad genética dentro de esta especie bacteriana. En el presente trabajo se destacan los principales aportes que, con el empleo de técnicas moleculares, han realizado varios grupos de investigación a la comprensión de las relaciones filogenéticas y evolutivas entre las cepas.*

Palabras claves: *Ralstonia solanacearum, bacteria, diversidad genética*

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum *causes bacterial wilt in many important crops in tropical and subtropical regions, and some mild climate countries. The species is taxonomically complex and the strains show a high diversity at different levels as physiological, serological, genetic, and host range. RFLP analysis has provided a new classification system in which the species is divided in Americanum and Asiaticum groups, related to the geographic origin of the strains. Since these preliminary investigations were performed, the development of molecular techniques in the study of* Ralstonia solanacearum *genetic diversity has increased. In this paper, the most outstanding contributions of various researches groups in this field are outlined. These investigations have improved the comprehension of phylogenetic and evolutionary relationships among* Ralstonia solanacearum *strains.*

Key words: *Ralstonia solanacearum, bacteria, genetic diversity*

INTRODUCCIÓN

La bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* es causante de la marchitez bacteriana en diversos cultivos en regiones de clima tropical y subtropical [Kelman, 1953], así como en algunos países de clima templado [Hayward, 1991; Janse, 1996]. La enfermedad afecta a varios cientos de especies vegetales distribuidas en más de cincuenta familias [Hayward, 1994]. Dentro de ellas se encuentran cultivos de importancia económica como papa (*Solanum tuberosum*, Sw.), tabaco (*Nicotiana tabacum*, Lin.), tomate (*Licopersicum esculentum*, Mill.), pimiento (*Capsicum annuum*, L.*)*, plátano y banano (*Musa* sp.), berenjena (*Solanum melongena*, L.), además de numerosas plantas ornamentales, medicinales, malezas y algunas especies silvestres [Kelman, 1953].

Ralstonia solanacearum es una especie heterogénea que se encuentra poco relacionada filogenéticamente con otros grupos del género *Pseudomonas*. Las únicas especies que muestran relación con ella son *P. picketii* –patógeno ocasional en humanos– y *P. syzygii*, causante del marchitamiento del clavo de olor en Sumatra [Seal *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996]. Las evidencias sugieren que *R. solanacearum* es una especie que surgió temprano en la historia geológica, posiblemente como un patógeno de los ancestros de las plantas modernas [Sequeira, 1994]. Buddenhagen y Kelman (1964) concluyeron que las cepas de *R. solanacearum* son el producto de un largo proceso evolutivo que se ha producido de manera independiente en varias áreas geográficas y en diferentes hospederos. Esta hipótesis se ha confir-

mado por estudios del material genético [Cook *et al.*, 1989].

La especie *R.solanacearum* constituye una unidad taxonómicamente compleja en la que las cepas muestran una amplia diversidad a diferentes niveles: fisiológico, serológico, genético y de rango de hospedantes. El gran número de cepas de *R. solanacearum* existente en todo el mundo dificulta el establecimiento de criterios para la diferenciación de cepas, aspecto esencial para el trabajo de los taxónomos y del personal de cuarentena. Con el objetivo de describir esta variabilidad intraespecífica se han propuesto diversos sistemas de clasificación.

Se conocen cinco razas de *R. solanacearum* cuya separación está basada en el rango de los hospedantes y la habilidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales [Buddenhagen *et al.*, 1962; He *et al.*, 1983; Buddenhagen, 1985; Pegg y Moffett, 1971]. La utilización de tres disacáridos y/u oxidación de tres hexosa alcoholes ha permitido la separación de los aislamientos en seis biovares [Hayward, 1964; He *et al.*, 1983; Hayward *et al.*, 1990]. El sistema de clasificación en razas y biovares es confuso, pues cada biovar contiene cepas con diferentes rangos de hospedantes, y varias razas contienen una amplia diversidad de cepas pertenecientes a diferentes biovares. Solo existe correspondencia entre la raza 3 y el biovar 2. El análisis de ácidos grasos [Janse, 1991] y del perfil de proteínas [Dianese *et al.*, 1994] no ha logrado esclarecer las relaciones entre las cepas ni el establecimiento de un criterio de clasificación uniforme. Esto hace que los métodos tradicionales de clasificación no sean lo suficientemente efectivos [Poussier *et al.*, 1999; Sequeira, 1994].

Estas dificultades condujeron a la búsqueda de un nuevo sistema de clasificación basado en el análisis del material genético. Muchas de las técnicas moleculares empleadas en la actualidad tienen como fundamento común la separación de fragmentos de ADN de diferentes pesos moleculares. El resultado electroforético se representa por un patrón de bandas en un gel. Estos patrones suelen ser muy complejos y de difícil interpretación.

Entre las técnicas utilizadas para el estudio de *R. solanacearum* se encuentran el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)) en sus dos variantes: Southern blotting-RFLP y PCR-RFLP, el ADN polimórfico aleatoriamente amplificado (Random Amplified Polymorphic DNA or Arbitrary Primed PCR, RAPD), el Rep-PCR, el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)) y la secuenciación de regiones específicas del genoma. El empleo de cada una de ellas ha contribuido a una caracterización y diferenciación más acertadas de las cepas. El análisis a nivel genético de las cepas ofrece la posibilidad de estudiar las relaciones filogenéticas y evolutivas entre ellas.

Contribución de los estudios de diversidad genética a la diferenciación intraespecífica de las cepas de *Ralstonia solanacearum*

Los primeros trabajos que constituyeron un hito en el estudio de la diversidad genética del patógeno fueron reportados por Cook *et al.* (1989) y Cook y Sequeira (1994). Estos investigadores utilizaron el Southern blotting-RFLP con nueve sondas, lo que les permitió detectar y localizar secuencias específicas en el ADN, las cuales contenían información esencial para la virulencia y la respuesta de hipersensibilidad. Estas secuencias se sometieron a digestión con enzimas de restricción específicas. La ubicación de los sitios de corte para una enzima de restricción determinada dentro de un *locus* de interés puede variar de una cepa a otra, y traer como resultado fragmentos que difieren en tamaño en cepas diferentes [Olive y Bean, 1999]. El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos por este procedimiento posibilitó establecer la existencia de dos grupos o divisiones con un coeficiente de similitud de 13,5%: la división I, que incluyó los biovares 3, 4 y 5, y la división II, formada por las cepas de biovares 1, 2 y N2. Dentro de cada división los coeficientes de similitud resultaron ser muy elevados, y fueron mayores dentro de la división I. Más del 90% de las cepas de la división I procedían de Asia y Australia (división Asiaticum), mientras que 98% de las cepas de la división II eran originarias de las Américas (división Americanum).

Estas divisiones se han confirmado por análisis de la secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal 16 S [Li *et al.*, 1993; Seal *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996]. El análisis de esta secuencia permitió estudiar las relaciones filogenéticas y evolutivas entre los microorganismos, dado su elevado contenido informacional, su naturaleza conservativa, su distribución universal y la accesibilidad de las secuencias en bancos de genes [Woese, 1987]. Las secuencias de los genes que codifican para el ARNr 16S son por lo general específicas para cada especie y están presentes en múltiples

copias en el genoma, lo que las hace excelentes para la identificación de bacterias a nivel de especie. Taghavi *et al.* (1996) demostraron la existencia de dos subdivisiones dentro de la división Americanum: la 2b, que contiene aislamientos pertenecientes a los biovares 1, 2 y N2 procedentes de Indonesia, y la 2a que incluye el resto de las cepas de biovares 1, 2 y N2. En este trabajo se reportó una cepa biovar 2 atípica, similar a las cepas de biovares 3 y 4 estudiadas, por lo que se agrupó dentro de la subdivisión Asiaticum.

Fegan *et al.* (1998) realizaron el análisis de la secuencia de la región intergénica 16S-23S RNA. Dada la elevada similitud de secuencia de los genes que codifican para ARNr 16S en las cepas de *R. solanacearum*, resulta más factible el análisis de la región espaciadora entre 16S y 23S, que produce información filogenética más valiosa al ser mayor su grado de variabilidad entre diferentes cepas [Barry *et al.*, 1991; Leblond-Bourget *et al.*, 1996]. En este trabajo se analizaron además las secuencias de los genes que codifican para las enzimas poligalacturonasa y endoglucanasa. En todos los casos se confirmó el sistema de clasificación obtenido por Taghavi *et al.* (1996).

El análisis PCR-RFLP de diferentes regiones del genoma bacteriano demostró también la existencia de las divisiones Asiaticum y Americanum [Gilling *et al.*, 1993]. Poussier *et al.* (1999), por medio del PCR-RFLP, analizaron regiones del gen hrp relacionado con la respuesta de hipersensibilidad, y tuvieron resultados mayormente consistentes con lo reportado por Cook *et al.* (1989); sin embargo, encontraron que las cepas biovar 1 del sur de África quedaban agrupadas en una subdivisión diferente, la cual poseía mayor homología con las cepas de la división Asiaticum que con las de la división Americanum. Para esclarecer las relaciones entre las cepas biovar 1 del sur de África y otras cepas de *R. solanacearum* ampliaron el estudio con la inclusión de 59 cepas, dentro de las que se encontraban las de biovares N2 y 5, así como nuevas cepas africanas.

Como resultado de estas nuevas investigaciones, Poussier *et al.* (2000) reportaron por primera vez el empleo de la técnica AFLP para el análisis de una colección de cepas internacionales dentro de un estudio de diversidad genética. Este método pertenece a la categoría de las técnicas de amplificación selectiva de fragmentos de restricción, basadas en la ligazón de adaptadores a fragmentos de restricción genómicos seguido de una amplificación por PCR con cebadores específicos para los adaptadores [Olive y Bean, 1999]. El AFLP permitió una fina discriminación entre los aislamientos y logró diferenciar cepas que resultaron indistinguibles por PCR-RFLP. De las 96 cepas analizadas por AFLP se obtuvieron 60 patrones diferentes, y se observó el 95% de polimorfismo en las bandas, mientras que en el análisis por PCR-RFLP, de 178 cepas se obtuvieron 20 patrones diferentes. Incluso al compararse con lo obtenido por Cook *et al.* (1989, 1991) y Cook y Sequeira (1994), donde se produjeron 46 perfiles diferentes a partir de 164 cepas analizadas, se demuestra que el AFLP tiene un nivel de resolución superior para la diferenciación intraespecífica de *R. solanacearum*. El AFLP posibilitó una separación más definida entre cepas de biovar 2 y N2, y también entre cepas de biovares 3, 4 y 5. El AFLP y el PCR-RFLP confirmaron que el biovar 2 es el menos diverso genéticamente entre todos los biovares [Cook *et al.*, 1989; Cook y Sequeira, 1994; Smith *et al.*, 1995; Van Der Wolf *et al.*, 1998; Thammakijjawat, 2001].

Pese a que los estudios llevados a cabo por Poussier *et al.* (2000) confirmaron la clasificación ofrecida por Cook *et al.* (1989), se encontraron excepciones en este esquema. Los resultados confirmaron la presencia de una subdivisión formada por cepas biovar 1 del sur de África. Aunque el análisis por PCR-RFLP mostró una mayor homología entre estas cepas y las cepas biovar 1 de la división Asiaticum, el análisis por AFLP y la secuenciación de genes para ARNr 16S arrojaron un resultado opuesto. Las cepas biovar 1 del sur de África fueron por lo tanto incluidas en una nueva subdivisión –2c– con respecto a lo reportado por Taghavi *et al.* (1996). La explicación más probable a la diferencia existente entre las cepas biovar 1 africanas y americanas es un desarrollo evolutivo diferenciado debido a la separación geográfica. Otros aislamientos africanos que pertenecen a la división Americanum pueden haber sido introducidas al continente africano por medio de intercambios comerciales.

No obstante la gran cantidad de investigaciones que apoyaron y enriquecieron los estudios preliminares de Cook y colaboradores, el análisis de nuevos aislamientos aportó resultados que demuestran el elevado grado de complejidad taxonómica de esta especie bacteriana.

En 1998 Tsuchiya y Horita reportaron el análisis de 64 cepas japonesas por medio de diferentes técnicas moleculares: el Southern blotting-RFLP con cuatro sondas específicas para DNAr 23S y 16S (también co-

nocido como *ribotyping*), el PCR-RFLP y el Rep-PCR. Las cepas analizadas correspondían a raza 1 (biovares 1, 2, 3 y 4) y raza 3 (biovar 2). Según el esquema de clasificación de Cook *et al*. (1989), las cepas raza 1 debían pertenecer a la división Asiaticum y las cepas raza 3 a la división Americanum. Como resultado del empleo de las técnicas mencionadas anteriormente se logró obtener una clara diferenciación entre las cepas de raza 1 y raza 3. Con Southern blotting-RFLP el coeficiente de similitud entre raza 1 y 3 fue de 15,4%, y dentro de la raza 1 de 75,5%. Los patrones electroforéticos obtenidos a partir de cepas raza 1 (biovares 1, 2, 3 y 4) fueron similares a los patrones de los biovares 3, 4 y 5 de la división Asiaticum. Los patrones de las cepas raza 3/biovar 2 fueron similares a los de las cepas biovar 1 de la división Americanum, lo que apoya la hipótesis planteada por Buddenhagen (1985), quien sugirió que la raza 3 se originó en la región andina de Sudamérica, de donde es originaria la papa, su principal hospedante, y que la aparición de raza 3 fuera de esta región es resultado del comercio internacional. La distribución de las cepas japonesas raza 1 (biovares 1 y 2) no se corresponde con lo reportado por Cook *et al*. (1989). Las nueve cepas japonesas raza 1/biovar 2 resultaron ser homogéneas a la cepa atípica perteneciente a la división Asiaticum reportada por Taghavi *et al*. (1996). Con respecto a las cepas raza 1/biovar 1, fueron semejantes a las cepas japonesas raza 1/biovar 4, y no a los biovares 1 americanos. Estas cepas pueden ser mutantes de raza 1/biovar 4 que perdieron la capacidad de degradar las tres hexosas alcoholes.

Thammakijjawat *et al*. (2001) realizaron el análisis PCR-RFLP de cepas tailandesas y otras internacionales tuvieron con Cook *et al*. (1989) resultados consistentes. Las excepciones fueron dos cepas biovar 1 atípicas y tres cepas biovar N2 de Japón, que se agruparon dentro de la división Asiaticum. Excepciones de este tipo fueron reportadas por Horita y Tsuchiya (2001).

Aunque actualmente existe una mejor comprensión de la diversidad intraespecífica de la bacteria *R.solanacearum*, las investigaciones en este campo continúan con la búsqueda de nuevas metodologías de mayor sensibilidad. Lee *et al*. (2001) reportaron el aislamiento de una secuencia de inserción –IS1405– a partir de una cepa de raza 1. Este tipo de secuencia constituye un componente importante de la mayoría de los genomas bacterianos. Las mutaciones y reordenamientos provocados por las secuencias de inserción es uno de los mecanismos más importantes en la generación de diversidad genética [Galas *et al*., 1989]. En algunos casos la localización de secuencias de inserción específicas en sitios definidos del cromosoma es lo suficientemente estable como para permitir su análisis por RFLP [Mahillon y Chandler, 1998]. La caracterización molecular de cepas con el uso de secuencias de inserción puede reflejar mejor la organización del genoma bacteriano que la búsqueda de diferencias en las secuencias [Lee *et al*., 2001]. En este trabajo la IS1405 se empleó como sonda en un análisis por RFLP, lo que permitió clasificar cepas de raza 1 de Taiwán.

El estudio de la diversidad genética entre las cepas de *R. solanacearum* no solo permitió conocer más claramente las relaciones filogenéticas y evolutivas entre ellas, sino que proporcionaron nuevas herramientas para el esclarecimiento de numerosas interrogantes como la posible correlación entre diversidad genética y la virulencia de las cepas [Darrase *et al*., 1998].

CONCLUSIONES

- Los métodos de estudio de la diversidad genética de *R. solanacearum* se han desarrollado vertiginosamente desde finales del pasado siglo a partir de los estudios preliminares realizados en este campo, los que lograron suministrar un sistema de clasificación con el empleo del RFLP que fue de gran utilidad para estudios posteriores.
- El sistema de clasificación se ha corroborado por los resultados de otros investigadores, y se ha enriquecido en el transcurso de los años con la definición de nuevas subdivisiones.
- Los métodos moleculares para la caracterización genética han probado ser imprescindibles, reflejado en su amplia adopción por diversos grupos de investigación y los resultados promisorios de su empleo.

REFERENCIAS

Abdel-Kader, D.; L. Seigner; M. Zellner: «Epidemiological Field Studies on Bacterial Ring Rot (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*) and Brown Rot (*Ralstonia solanacearum*) of Potato», *Gesunde Pflanzen* 52:240-247, 2000.

Barry, T.; G. Colleran; M. Glennon; L. K Dunican; F. Gannon: «The 16S/23S Ribosomal Spacer Region As a Target for DNA Probes to Identify Eubacteria», *PCR Methods and Applications* 1:51-56, 1991.

Buddenhagen, I. W.: «Bacterial Wilt Revisited», *Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific.* ACIAR no. 13, Canberra, Australia, 1985, pp.126-143.

Buddenhagen, I. W.; A. Kelman: «Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*», *Annu. Rev. Phytopathol*. 2:203-230, 1964.

Buddenhagen, I. W.; L. Sequeira; A. Kelman: «Designation of Races in *Pseudomonas solanacearum*», *Phytopathology* 52:162, 1962.

Cook, D.; E. Barlow; L. Sequeira: «Genetic Diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of Restriction Fragment Length Polymorphisms with DNA Probes that Specify Virulence and the Hypersensitive Response», *Mol. Plant-Microbe Interact*. 2:113-121, 1989.

——: «DNA Probes As Tools for the Study of Host Pathogen Evolution: the Example of *Ps. Solanacearum*», *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* 1:103-108, Dordrecht, Kluwer, 1991.

Cook, D.; L. Sequeira: «Strain Differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by Molecular Genetic Methods, *Bacterial Wilt, the Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*, CAB International, Wallingford, Inglaterra, 1994, pp. 77-93.

Darrase, A.; A. Trigalet; P. Prior: «Phylogeny, Diversity and Molecular Diagnostics of *R. solanaceaum*», *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, INRA Editions, París, 1998, pp. 19-33.

Dianese, J. C.; M. C. G. Dristig: «Strain Characterization of *Pseudomonas solanacearum* Based on Membrane Protein Patterns», *Bacterial Wilt, the Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*, CAB International, Wallingford, Inglaterra, 1994, pp. 113-121.

Fegan, M.; M. Taghavi; L. I. Sly; A. C. Hayward: «Phylogeny, Diversity and Molecular Diagnostics of *R. solanaceaum*», *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, INRA Editions, París, 1998, pp. 19-33.

Galas, D. J.; M. Chandler: «Bacterial Insertion Sequences», *Mobile DNA*, American Society for Microbiology, Washington, 1989, pp. 109-162.

Gilling, M.; P. Fahy; C. Davies: «Restriction Analysis of Amplified Polygalacturonase Gene Fragment Differentiates Strains of the Phytopathogenic Bacterium *Pseudomonas solanacearum*. Lett.», *Appl. Microbiol.* 17:44-48, 1993.

Hayward, A. C.: «Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*», *J. Appl. Bacteriol*. 27:265-277, 1964.

Hayward, A. C.; H. M. El-Nashaar; U. Nydegger; L. de Lindo: «Variation in Nitrate Metabolism in Biovars of *Pseudomonas solanacearum*», *J. Appl. Bacteriol*. 69:269-280, 1990.

Hayward, A. C.: «Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*», *Ann. Rev. Phytopathol*. 29:65-87, 1991.

——: «The Hosts of *Pseudomonas solanacearum*», Bacterial Wilt, the Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*, CAB International, Wallingford, Inglaterra, 1994, pp. 9-25.

He, L. Y.; L. Sequeira; A. Kelman: «Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China», *Plant Dis*. 67:1357-1361, 1983.

Horita, M.; K. Tsuchiya: «Genetic Diversity of Japanese Strains of *Ralstonia solanacearum*», *Phytopathology* 91:399-407,2001.

Janse, J. D.: «Infra and Intraspecific Classification of *Pseudomonas solanacearum* Strains Using Whole Cell Fatty Acid Analysis», *Syst. Appl. Microbiol*. 14:335-345, 1991.

——: «Potato Brown Rot in Western Europe-History, Present Occurrence and Some Remarks on Possible Origin, Epidemiology and Control Strategies», *Bulletin OEPP/EPPO*, Bulletin 26:679-695, 1996.

Kelman, A.: «The Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*», *Technical Bulletin*. North Carolina no. 99, North Carolina Agricultural Experiment Station, Estados Unidos, 1953.

Leblond-Bourget, N.; H. Philippe; I. Mangin; B. Decaris: «16 rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence Analysis Reveal inter-and Intraspecific Bifidobacterium Phylogeny», *Int. J. Syst. Bacteriol*. 46:102-111, 1996.

Lee, Y.; S. Fan; L. Chiu; K. Hsia: «Isolation of an Insertion Sequence from *Ralstonia solanacearum* Race 1 and Its Potential Use for Strain Characterization and Detection», *Applied and Environmental Microbiology* 67 (9) 3943-3950, 2001.

Li, X.; M. Dorsch; T. del Dot; L. Sly; E. Stackebrandt; A. C. Hayward: «Phylogenetic Studies of the rRNA Group II Pseudomonads Based on 16S rRNA Gene Sequences», *J. Appl. Bacteriol*. 74:324-329, 1993.

Mahillon J.; M. Chandler: «Insertion Sequences», *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3):725-774, 1998.

Olive, D. M.; P. Bean: «Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms», *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6):1661-1669, 1999.

Pegg, K.; M. Moffett: «Host Range of the Ginger Strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland», *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb*. 11:696-698, 1971.

Poussier, S.; D. Trigalet-Demery; P. Vandewalle; G. Bruno; L. Jacques; A. Trigalet: «Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* As Assessed by PCR-RFLP of the *hrp* Gene Region, AFLP and 16S rRNA Sequence Analysis, and Identification of an African Subdivision», *Microbiology* 146:1679-1692, 2000.

Poussier, S.; P. Vandewalle; J. Luisetti: «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 (5):2184-2194, 1999.

Seal, S. E.; L. A. Jackson; J. P. W. Young; M. J. Daniels: «Diffentiation of *Ps. Solanacearum, Ps. Syzygii, Ps. Pickettii* and the Blood Didease Bacterium by Partial 16S rRNA Sequencing: Construction of Oligonucleotide Primers for Sensitive Detection by PCR», *Journal of General Microbiology* 139, 1587-1594, 1993.

Sequeira, L.: «The Life and Times of *Pseudomonas solanacearum*», *Plant Pathogenic Bacteria* no. 66, INRA Editions, París, 1994, pp. 37-44.

Smith, J. J.; L. C. Offord; M. Holderness; G. S. Saddler: «Genetic Diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonym *Pseudomonas solanacearum*) Race 3 in Kenya», *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4263-4268, 1995.

Taghavi, M.; C. Hayward; L. I. Sly; M. Fegan: «Analysis of the Phylogenetic Relationships of Strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and the Blood Disease Bacterium of Banana Based on 16S rRNA Gene Sequences», *Int. J. System. Bacteriol*. 46:10-15, 1996.

Thammakijjawat, P.; N. Thaveechai; W. Kositratana; J. Chunwongse; R. D. Frederick; N. W. Schaad: «Genetic Analysis of *Ralstonia solanacearum* Strains from Different Hosts in Thailand Using PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism», *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 35:397-408, 2001.

Tsuchiya, K.; M. Horita: «Genetic Diversity of *R. solanacearum* in Japan», *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, INRA Editions, París, 1998, pp. 61-73.

Van Der Wolf, J. M.; P. J. M. Bonants; J. J. Smith; M. Hagenaar; E. Nijhuis; J. R. C. M. Van Beckhoven; G. S. Saddler; A. Trigalet; R. Feuillade: «Genetic Diversity of *R. solanacearum* Race 3 in Western Europe Determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR», *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, INRA Editions, París, 1998, pp. 44-49.

Woese, C. R.: «Bacterial Evolution», *Microbiological Reviews* 51:221-271, 1987.