

# Predominância da biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em olerícolas cultivadas no Estado do Rio Grande do Sul<sup>1</sup>

José Ricardo Pfeifer Silveira<sup>2</sup>, Vivian Caroline Ruprecht<sup>3</sup>, Mônica de Medeiros Silva<sup>4</sup>,  
Bruno Brito Lisboa<sup>5</sup>, Luciano Kayser Vargas<sup>6</sup> e Andréia Mara Rotta de Oliveira<sup>7</sup>

**Resumo:** Com a finalidade de verificar a ocorrência e a distribuição de biovares de *Ralstonia solanacearum* em olerícolas cultivadas no Estado do Rio Grande do Sul, plantas de tomate, berinjela e fumo com sintomas de murcha bacteriana foram coletadas, na primavera de 2004, em 12 lavouras de quatro municípios: Maquiné, Caxias do Sul, Sobradinho e Santa Cruz do Sul. A determinação da espécie foi feita com teste sorológico através de ELISA e a da biovar, com base no metabolismo oxidativo de açúcares e álcoois e por PCR. Todos os 54 isolados foram identificados como biovar 1. Porém, a amplificação por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores T3A e T5A resultaram em tipo diferente de perfil daqueles previstos para estirpes deste patógeno, com a amplificação de um produto de adicional de 650 pb. Devido às condições climáticas do Estado do Rio Grande do Sul e a levantamentos anteriormente realizados para determinar a ocorrência de biovares de *R. solanacearum* em lavouras de batata, ficou estabelecida a predominância, quase que absoluta, de estirpes da biovar 2 do patógeno. Este trabalho demonstrou que as condições de clima e solo do RS possibilitam a ocorrência das duas biovares, e que a predominância de uma delas é determinada pela espécie hospedeira.

**Palavras-chave:** epidemiologia, murcha bacteriana, biovar, tomate, berinjela, fumo

## Predominance of *Ralstonia solanacearum* biovar 1 in vegetable crops under crop in Rio Grande do Sul State

**Abstract:** In order to verify the occurrence and distribution of biovars of *Ralstonia solanacearum* in vegetable crops under crop in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, samples of tomato, eggplant and tobacco showing symptoms of bacterial wilt were collected in the spring of 2004, in 12 farms from four cities: Maquiné, Caxias do Sul, Sobradinho and Santa Cruz do Sul. The identification of the bacterial species was carried out by the immunological test of ELISA and the classification in biovar was based on the oxidative metabolism of alcohols and sugars and in the PCR fingerprinting. All the 54 isolates were identified as biovar 1. However, the amplification of DNA with the primers T3A and T5A resulted in a profile different from that expected for *R. solanacearum* strains, showing the amplification of an additional product with 650 bp. Due to its climatic conditions and according to previous surveys in potato fields, it was established the predominance of the biovar 2 of *R. solanacearum*. This study demonstrated that conditions of climate and soil in Rio Grande do Sul State permit the occurrence of both biovars 1 and 2 and that the predominance of one or other is determined by the host species.

**Key words:** epidemiology, bacterial wilt, biovar, tomato, eggplant, tobacco

<sup>1</sup> Trabalho realizado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS

<sup>2</sup> Eng. Agr. Dr., FEPAGRO/Fitopatologia. Rua Gonçalves Dias, 570, Bairro Menino Deus, CEP 90130-060. Porto Alegre, RS: jose-silveira@fepagro.rs.gov.br - Autor para correspondência.

<sup>3</sup> Acadêmica de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UERGS - Bolsista de Iniciação Científica, FAPERGS.

<sup>4</sup> Acadêmica de Biologia, UFRGS.

<sup>5</sup> Eng. Agr. B.Sc., FEPAGRO/Fitopatologia.

<sup>6</sup> Eng. Agr. Dr., FEPAGRO/Fitopatologia.

<sup>7</sup> Biol. Dr. UERGS/Prof.

Recebido para publicação em 15-08-2005

## Introdução

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. 1995 sin. *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith 1914, esta amplamente distribuída em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo (HAYWARD, 1991). O patógeno é considerado endêmico em muitas áreas e está associado a mais de 200 espécies de plantas cultivadas e silvestres de, pelo menos, 50 famílias diferentes (HAYWARD, 1995; KELMAN, 1998; SAILE et al., 1997). As espécies hospedeiras de importância econômica mais afetadas são, principalmente, solanáceas como a batata, o tomate, o pimentão, a berinjela e o fumo, entre outras (TAKATSU e LOPES, 1997).

Estirpes de *R. solanacearum* diferem quanto às espécies hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade, relacionamento epidemiológico e propriedades fisiológicas (BUDDENHAGEN e KELMAN, 1964). Devido a sua grande complexidade, a bactéria é classificada por raças em relação à espécie hospedeira e por biovars conforme a habilidade de utilizar ou oxidar determinados açúcares e álcoois (HAYWARD, 1991). As estirpes das biovars 1 e 2 estão amplamente distribuídas, sendo que a biovar 1, que corresponde à raça 1, predomina em regiões de clima quente, caracteriza-se por afetar um maior número de espécies hospedeiras e possui maior capacidade de persistir no solo. A biovar 2, que corresponde à raça 3, predomina em regiões de clima temperado, restringe-se basicamente a batata como hospedeira e apresenta maior capacidade de produzir infecções latentes. A biovar 3 está mais adaptada às regiões quentes dos trópicos (HAYWARD, 1991; LOPES, 1994).

Nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil, predomina a biovar 2 em batata, embora a biovar 1 também possa ser encontrada (LOPES et al., 1993; LOPES 1994; LOPES 1993; MACIEL 1999). No Estado do Rio Grande do Sul (RS), onde o clima é subtropical úmido e o patógeno é considerado endêmico, Silveira et al. (2002) realizaram um levantamento com um número representativo de isolados (490) de *R. solanacearum*, em áreas de lavouras de batata de quatro regiões produtoras do Estado. Os resultados demonstraram um predomínio de 94% de isolados da biovar 2, sendo que os demais isolados (6%) foram determinados como biovar 1. Essa característica pode favorecer os produtores do RS, pois estirpes da biovar 2 estão restritas a regiões de clima mais ameno, possuem baixa capacidade de sobrevivência no solo e infectam basicamente a batata. De acordo com Lopes (1994), o comportamento das estirpes destes dois grupos é bastante diferente e leva à adoção de medidas diferenciadas para o manejo integrado da doença, sendo o controle mais satisfatório para as estirpes da biovar 2.

Levantamentos de biovars ou raças de *R. solanacearum* na Região Sul do Brasil foram realizados, porém, em plantas de batata. Embora os resultados confirmem a predominância da biovar 2 do patógeno e as condições climáticas do RS sejam favoráveis às estirpes deste grupo, a batata é uma espécie hospedeira quase que restrita da biovar 2 de *R. solanacearum*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os isolados de *R. solanacearum* obtidos de plantas solanáceas além da batata.

## Material e métodos

### Obtenção dos isolados de *Ralstonia solanacearum*

No período de novembro de 2004 a março de 2005, plantas de tomate, berinjela e fumo, com sintomas de murcha bacteriana, foram coletadas em 12 lavouras localizadas em quatro municípios de três regiões produtoras do RS: Litoral, Sub-região 2A (Maquiné); Serra do Nordeste, Sub-região 4A (Caxias do Sul) e Encosta Inferior da Serra do Nordeste, Sub-região 6B (Sobradinho e Santa Cruz do Sul) (Figura 1) (RIO GRANDE DO SUL, 1994).

Hastes de plantas com sintomas foram desinfestadas pela imersão consecutiva em álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, por 30 s, e lavadas com água destilada esterilizada (ADE). Segmentos de 1 a 2 cm foram então colocados em tubos de centrifuga (1,5 ml) contendo 500µl de ADE para observação do fluxo bacteriano. Cada suspensão de células foi diluída em série ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), e com uma pipeta de microtitulação, 100µl da suspensão bacteriana, obtida na última diluição, foram transferidos para a superfície do meio de cultura semi-seletivo modificado SMSA (peptona 10; caseína hidrolisada 1; agar 15 g/l; glicerol 5ml/l; bacitracina 25; polimixina B sulfato 100; cloranfenicol 5; Penicilina G 0,5; cristal violeta 5 e cloreto de trifetil tetrazólio 50 mg/l) (ELPHINSTONE et al. 1996) em placas de Petri. Após 48h a 28 °C, colônias fluidas, brancas e com centro vermelho, foram transferidas para meio SPA (sacarose, 20; peptona 10; e agar 15 g/l) em placas de Petri, e após 24 h a 28 °C, submetidas ao teste de Gram, oxidase e DAS-ELISA com anti-soro policlonal reativo a *R. solanacearum* fornecido pela EMBRAPA de Clima Temperado (CASTRO et al., 1993). Os isolados foram armazenados em ADE, a 5 °C, e em glicerol-água (15:85), a -20 °C.

### Testes bioquímicos para determinação da biovar

A capacidade dos isolados em oxidar diferentes fontes de carbono, para a determinação da biovar (SCHAAD, 1988), foi testada em placas de microtitulação (96 amostras/placa), contendo 150 µl de meio Ayers pH 7,2 ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1; KCl 0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2; agar 6 g/l; pH 7,2), acrescido de 1 ml/l de azul de bromotimol 1,6%, e uma das seguintes fontes de carbono à 1%: celobiose, lactose, maltose, trealose, dulcitol, manitol e sorbitol. Culturas com 24 h de crescimento, cultivadas em meio SPA a 28 °C,

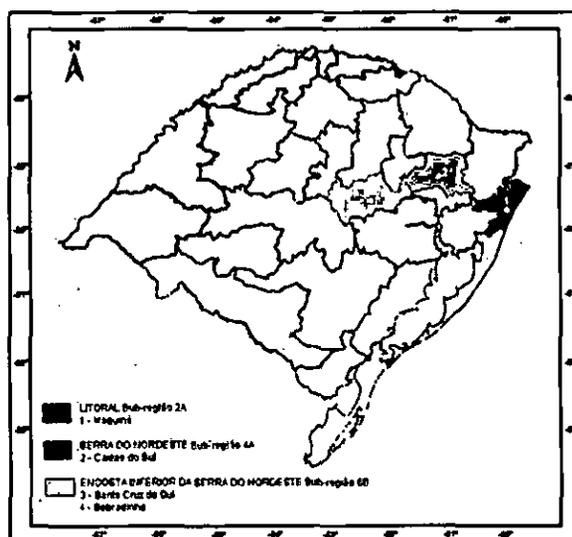


Figura 1 - Regiões agroecológicas do Estado do Rio Grande do Sul onde foram coletadas plantas de tomate, berinjela e fumo com sintomas de murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em lavouras de produção, Porto Alegre, 2005.

foram transferidas, com um palito de dente esterilizado, para o meio com a fonte de carbono específica contido nos orifícios da placa. Utilizaram-se três repetições (placa) para cada substrato, e o meio sem fonte de carbono foi utilizado como controle negativo. Como controle positivo, utilizaram-se seis isolados de *R. solanacearum* oriundos de plantas de batata, fornecidos pela EMBRAPA Clima Temperado de Pelotas-RS. As placas foram então incubadas a 28 °C, e a capacidade do isolado oxidar a fonte de carbono fornecida foi avaliada através da mudança de cor do meio de verde para amarela, após 72 h.

#### Determinação da biovar por PCR

A extração do DNA dos isolados de *R. solanacearum* foi realizada de acordo com Boucher et al. (1987), as quantificações realizadas em espectrofotômetro (Spectronic Unicam/Genesys 10UV) e as amostras mantidas a -20 °C. Para a determinação da biovar, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores T3A (5'-GGG GGT TCG AAT TCC CCG CCG GCCCA-3') e T5A (5'-AGT CCG GTG CTCTAA CCAACT GAG3') (Cybersyn), (WELSH e MCCLELLAND, 1991; SEAL et al., 1992). As amplificações foram conduzidas em termociclador Uvigene em 10 µl, contendo solução tampão de PCR (10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 50 mM KCl); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de deoxinucleotídeos (cada); 1,25 U polimerase AmpliTaq (Gibco-BRL); 1 µM dos oligonucleotídeos iniciadores e 50 ng de DNA. As condições foram 2 min a 96 °C; 35 ciclos (90 s a 94 °C, 15 s a 50 °C; 60 s a 72 °C) e 10 min a 72 °C.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 1,5%, juntamente com um padrão de DNA 1 kb plus ladder, e submetidos à eletroforese 4 V/cm por 2 h, corados com brometo de etídio (0,05%), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science

ID-EDAS 120). Para a determinação da biovar, foram considerados biovar 2 os isolados que resultaram após a amplificação um produto de 100 pb, amplificações com produtos resultantes de 100 e 200 pb foram considerados biovar 1 (SEAL et al., 1992).

#### Resultados e discussão

Foram obtidos 54 isolados de *R. solanacearum* de plantas com sintomas de murcha bacteriana em 12 lavouras de tomate, fumo e berinjela de três regiões produtoras de olerícolas do Estado do Rio Grande do Sul. Os isolados obtidos foram reativos ao anti-soro policlonal de *R. solanacearum* e resultaram positivos pelo teste de oxidase e Gram negativos. Pelos testes bioquímicos propostos por Hayward (1991), todos os 54 isolados oxidaram apenas a trealose, modificando a cor do meio de verde para amarela e foram considerados como biovar 1 (Tabela 1).

Pela amplificação por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores T3A e T5A, os 54 isolados geraram produtos de 100, 200 pb conforme o esperado para estirpes da biovar 1. Porém, a maioria dos isolados gerou um fragmento adicional de 650 pb (Figura 2). De acordo com Seal et al. (1992; 1993), todos os isolados de *R. solanacearum* amplificam pelo menos um fragmento de baixo peso molecular próximo de 100 pb, e os perfis gerados por estirpes dos diferentes grupos de *R. solanacearum* podem ser classificados em três tipos. O perfil do Tipo 1, com um único fragmento de 100 pb e que representa o grupo de estirpes da raça 3, correspondentes à biovar 2; o Tipo 2 com um fragmento adicional de 200 pb e que representa o grupo de estirpes da raça 1, correspondentes à biovar 1; e o perfil do Tipo 3 que contém os dois fragmentos (100 e 200 pb) adicionados de um terceiro fragmento de 450 pb e que representa as estirpes das biovars 3, 4 e 5. Segundo os autores, o

Tabela 1 - Isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de olerícolas cultivadas em lavouras das diferentes regiões produtoras do RS e submetidos à determinação da biovar.

Município	Lavoura	Cultivar	Isolados*
Maquiné	Tomate	Saladinha	T01, T02, T03, T04 e T05
	Tomate	Cascade	T06, T07, T08, T09 e T10
	Tomate	Saladinha	T11, T12, T13, T14 e T15
Caxias do Sul	Tomate	Carmem	T16, T17, T18, T19 e T20
	Tomate	Paulista	T21, T22, T23, T24 e T25
	Tomate	Leila	T26, T27, T28, T29 e T30
	Tomate	Funny	T31 e T32
Maquiné	Berinjela	Flórida	B33
Sobradinho	Tomate	Ângela	T34, T35, T36, T37; T38 e T39
	Tomate	Santa Clara	T40, T41, T42, T43 e T44
-Santa Cruz do Sul	Fumo	Virgínia	F45, F46, F47, F48 e F49
	Fumo	Virgínia	F50, F51, F52, F53 e F54

\* Um isolado por planta.



Figura 2 - Produto da amplificação do DNA de isolados *Ralstonia solanacearum* por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores T3A e T5A. (M) Marcador de peso molecular 1kb plus, T01, T06, T11, T21, T26, T31, T34, T37, T40 isolados obtidos de plantas de tomate, B33 de berinjela, e F45, F50 e F54 de fumo. Porto Alegre, 2005.

perfil dos dois primeiros tipos corresponde à divisão II, descrita por Cook et al. (1989) e o perfil do Tipo 3 corresponde à divisão I.

Desse modo, o perfil gerado pela amplificação do DNA de isolados da biovar 1 de *R. solanacearum*, obtidos de plantas de tomate, berinjela e fumo no RS, não encontra um perfil correspondente aos descritos por Seal et al. (1992) para este patógeno.

Isolados da biovar 2 de *R. solanacearum* obtidos de plantas de batata, foram avaliados com os oligonucleotídeos T3A e T5A por Silveira (2002), que não relatou a presença de um perfil diferente dos descritos por Seal et al. (1992). Estes resultados demonstram uma maior variabilidade para as estirpes da biovar 1 de *R. solanacearum*, corroborando com a afirmativa de que as estirpes deste grupo possuem maior variabilidade genética do que as estirpes da biovar 2.

No Estado do Paraná, no município de Contenda, Lopes et al. (1993) identificaram estirpes pertencentes à biovar 1 de *R. solanacearum*, porém, a predominância, nos 15 campos de produção de batata avaliados de sete municípios, foi de estirpes da biovar 2. No Rio Grande do

Sul, os levantamentos realizados por Maciel (1999), Maciel et al. (2001) e Silveira et al. (2002), em lavouras de batata, relatam a ocorrência das biovars 1 e 2 de *R. solanacearum* e confirmam a melhor adaptação das estirpes da biovar 2 ao clima sub-tropical característico do Estado, com uma incidência de aproximadamente 94% dos isolados. Sabe-se que o comportamento destes dois grupos é diferente quanto ao clima, sendo as estirpes da biovar 1 mais adaptadas a temperaturas mais quentes, como nas regiões tropicais, e as estirpes da biovar 2 ocorrem em regiões de clima mais ameno. Embora estes relatos confirmem a ocorrência somente destes dois grupos de estirpes no RS, ainda não haviam sido realizados trabalhos com um número significativo de isolados de outras espécies olerícolas além da batata, de importância econômica para o Estado do RS, capazes de hospedar *R. solanacearum*.

Com os resultados obtidos neste trabalho, em que ocorrência da biovar 1 representou a totalidade dos isolados obtidos das espécies olerícolas avaliadas, o tomate, a berinjela e o fumo, de três regiões diferentes do RS, pode-se inferir que as condições de clima e de solo do Estado do Rio Grande do Sul são favoráveis à manuten-

ção dos dois grupos de estirpes e que a predominância de um determinado grupo pode estar relacionado à espécie hospedeira. Deste modo, a caracterização por raças, que leva em consideração a espécie hospedeira, assume um papel preponderante para a definição de estratégias de controle.

Deve-se considerar, também, o histórico das áreas produtivas das diferentes regiões. Os municípios de Sobradinho e Santa Cruz do Sul, na região da Encosta Inferior da Serra do Nordeste e de Maquiné, na região Litoral Norte, são regiões onde o fumo já foi, ou ainda está sendo cultivado em áreas representativas do município, e o fumo é um hospedeiro de estirpes da biovar 1 de *R. solanacearum*. Porém, o município de Caxias do Sul, na Serra do Nordeste, não possui áreas com histórico de lavouras com o plantio de fumo, mas é considerada uma região que possui uma extensa área cultivada com diversas olerícolas, tais como o tomate, a berinjela e o pimentão entre outras, que também podem hospedar estirpes da biovar 1 de *R. solanacearum*.

Estirpes de *R. solanacearum* diferem na gama de hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade, relacionamento epidemiológico e propriedades fisiológi-

cas, de modo que as biovars 1 e 2 são bastante distintas das demais biovars (HAYWARD, 1995). Entre as biovars 1 e 2 também existem características distintas. A biovar 1 possui maior capacidade de se manter no solo, ocorre em climas mais quentes (26 a 36 °C) e possui maior relação de hospedeiras cultivadas e silvestres, enquanto que a biovar 2 ocorre em regiões mais frias (15 a 20 °C) e possui a batata e o tomate como hospedeiras naturais (HAYWARD, 1991; LOPES, 1994).

De acordo com Lopes (1994), o comportamento das estirpes dos dois grupos é bastante diferente e leva à adoção de medidas diferenciadas para o manejo integrado da doença, sendo que as estirpes da biovar 2 são mais factíveis de serem erradicadas do que a biovar 1. Portanto, a predominância de estirpes da biovar 1 em áreas de cultivo de regiões produtoras de olerícolas é um fator preocupante para os produtores do RS, devido a maior dificuldade de se erradicar estirpes deste grupo do patógeno. Estes resultados sugerem ainda que a ocorrência da biovar 1 em batata esteja associada ao plantio desta espécie em solos infestados, enquanto a ocorrência da biovar 2 à presença do inoculo na batata semente.

## Referências

- BOUCHER C.A.; VAN GIJSEGEN, F.; BARBERIS, P.A.; ARLAT, M.; ZISCHEK, C. *Pseudomonas solanacearum* Genes Controlling Both Pathogenicity on Tomato and Hiper-sensitivity on Tobacco are Clustered. *Journal of Bacteriology*, Oxford, v. 169, n.12, p. 5626-5632, 1987.
- BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 12, p. 203-230, 1964.
- CASTRO, L.A.S.; DANIELS, J.; COUTO, M.E.O. Utilização do Teste de ELISA na Diagnóse de *Pseudomonas solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, n. 3, p. 296, 1993. Resumo.
- COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic Diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of Restriction Fragment Length Polymorphisms with DNA Probes that Specify Virulence and the Hypersensitive Response. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, St Paul, v. 2, n.3, p. 113-121, 1989.
- ELPHINSTONE, J.G.; HENNESSY, J.; WILSON, J.K.; STEAD, D.E. Sensitivity of Different Methods for the Detection of *Ralstonia solanacearum* In Potato Tuber Extracts. *OEPP/EPP Bulletin*, Paris, v. 26, p. 663-678, 1996.
- HAYWARD, A.C. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 29, p.65-87, 1991.
- HAYWARD, A.C. *Pseudomonas solanacearum*. In: SINGH, U.; SINGH, R.; KOHMOTO, K. (Eds.). *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases*. Oxford: Pergamon, 1995. v.1, p. 139-151.
- KELMAN, A. One Hundred and One Years of Research on Bacterial Wilt. In: *INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadalupe. Reports...* Paris: INRA, 1998. p.1-5.
- LOPES, C.A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: *TALLER SOBRE ENFERMEZAS BACTERIANAS DE LA PAPA*, 1993, Brasília, Memórias... Brasília: EMBRAPA/CNP, 1994. p. 17-22.
- LOPES, C.A.; NAZARENO, N.R.X.; FURIATTI, R.S. Prevalência mas não Exclusividade da Raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* em Batata no Estado de Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, p. 312, 1993. Suplemento.
- MACIEL, J.L.N.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J.R.P.; VAN DER SAND, S.T. Frequência de Biovars de *Ralstonia solanacearum* em Diferentes Cultivares e Épocas de Cultivo de Batata no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 4, p. 741-744, 2001.
- MACIEL, J.L.N. *Biovars e Densidade Populacional de Ralstonia solanacearum em Cultivares de Batata nas Condições do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, 1999. 143 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- RIO GRANDE DO SUL. *Macrozoneamento Agroecológico e Econômico do Estado do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: SAA; EMBRAPA/CNPT, 1994. 307 p.
- SAILE, E.; Mc GARVEY, J.A.; SCHELL, M.A.; DENNY, T.P. Role of Extracellular Polysaccharide and Endoglucanase in Root Invasion and Colonization of Tomato Plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1264-1271, 1997.

SCHAAD, N.W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. St. Paul: APS Press, 1988. v.2, 146p.

SEAL, E.S.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Use of tRNA Consensus Primers to Indicate Subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by Polymerase Chain Reaction Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 11, p. 3759-3761, 1992.

SEAL, E.S.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* 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**, Londres, v. 139, n. 7, p. 1587-1594, 1993.

SILVEIRA, J.R.P. **Aspectos Epidemiológicos e de Resistência à *Ralstonia solanacearum* na Cultura da Batata no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2002.104 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SILVEIRA, J.R.P.; DUARTE, V.; MORAES, M.G. Ocorrência das Biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em Lavouras de Batata no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 450-453, 2002.

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Murcha Bacteriana em Hortaliças: Avanços Científicos e Perspectivas de Controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 170-177, 1997. Suplemento.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of Two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Duodoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.