

SELEKSI *IN VITRO* UNTUK MENDAPATKAN KLON KENTANG TAHAN TERHADAP PENYAKIT LAYU BAKTERI

SAMANHUDI

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta

ABSTRAK

Penelitian dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan metode seleksi *in vitro* yang efektif untuk menguji ketahanan klon kentang terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*). Bahan tanaman yang digunakan meliputi klon kentang (tetraploid) hasil fusi protoplas antara BF15 (dihaploid) dan *S. stenotomum* (diploid), yaitu BS-21, BS-23, BS-34, BS-38, BS-43, BS-49, BS-51, BS-53, BS-54, BS-55, BS-73, dan BS-75. Kultivar Nooksack digunakan sebagai pembanding tahan dan Atlantik sebagai pembanding rentan. Perbanyakan bahan tanaman dilakukan di Pusat Penelitian Bioteknologi IPB, sedangkan pengujian *in vitro* dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (Balitbio) Bogor dengan menggunakan rancangan acak lengkap faktorial. Pengamatan dilakukan setiap hari terhadap periode inkubasi dan kejadian penyakit, dan mulai satu hari setelah inokulasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik inokulasi dengan cara siram maupun pengguntingan pucuk dapat digunakan untuk pengujian ketahanan klon kentang terhadap penyakit layu bakteri secara *in vitro*. Namun demikian teknik inokulasi dengan cara pengguntingan pucuk menghasilkan periode inkubasi yang lebih cepat sehingga waktu pengujian yang diperlukan lebih singkat dibanding dengan teknik inokulasi siram. Berdasarkan pengujian tersebut, dari 12 klon kentang hasil fusi protoplas antara BF15 (2x) dan *S. stenotomum* (2x) terdapat empat klon yang termasuk tahan yaitu BS-23, BS-43, BS-75, dan BS-73, tiga klon agak tahan yaitu BS-53, BS-54, dan BS-38, dua klon agak rentan yaitu BS-49 dan BS-55, dan tiga klon rentan yaitu BS-34, BS-51, dan BS-21. Pengujian secara *in vitro* dapat digunakan untuk seleksi ketahanan klon kentang terhadap penyakit layu bakteri, karena waktu yang diperlukan lebih singkat dibanding pengujian di lapangan.

Kata kunci: Fusi protoplas, *in vitro*, tahan, rentan, layu bakteri, *Ralstonia solanacearum*

PENDAHULUAN

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan tanaman pangan utama dunia setelah padi, gandum, dan jagung yang mendapatkan prioritas dalam pengembangannya di Indonesia. Sebagai salah

satu bahan pangan yang mengandung karbohidrat, mineral, dan vitamin yang cukup tinggi, kentang dapat menggantikan bahan pangan karbohidrat yang berasal dari beras, gandum, atau jagung tersebut untuk memenuhi kebutuhan pangan masyarakat.

Produksi kentang Indonesia pada tahun 1997 mencapai 1.1 juta ton (FAO dalam Kompas, 1998), dengan rata-rata produksi kentang di Indonesia pada tahun 1998 adalah 15.30 ton/ha (BPS, 1998). Produktivitas ini masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan produksi kentang di negara beriklim sedang yang dapat mencapai 30 ton/ha (Kahar, 1996). Rendahnya produksi kentang di Indonesia terutama disebabkan oleh iklim yang kurang mendukung, penggunaan bibit yang mutunya rendah, serta gangguan hama dan penyakit (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998). Salah satu penyakit penting pada kentang adalah layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum* pada kentang sampai saat ini masih menjadi kendala dalam produksi kentang. Berbagai rekomendasi upaya pengendalian penyakit ini belum memberikan hasil yang optimal. Penggunaan tanaman tahan merupakan faktor yang sangat penting untuk mengendalikan penyakit tanaman. French (1994), menyatakan bahwa salah satu metode untuk mengendalikan penyakit adalah penggunaan kultivar tahan.

Karena sifat ketahanan seringkali terdapat pada spesies *Solanum* diploid, maka program pemuliaan untuk mendapatkan sifat-sifat ketahanan dapat dilakukan dengan merakit kultivar yang tahan terhadap bakteri tersebut melalui hibridisasi somatik antara kultivar dihaploid dengan spesies *Solanum* diploid (Purwito *et al.*, 2000).

Fusi protoplas merupakan salah satu metode pemuliaan yang dapat digunakan untuk mendapatkan kultivar baru, selain melalui cara penyilangan biasa, mutasi buatan, dan transformasi genetik (Purwito, 1999). Menurut Wattimena (2000), fusi protoplas memberi peluang yang tinggi untuk merakit kultivar-kultivar tanaman baru, karena dapat mengatasi ketidakmampuan yang terdapat pada teknik hibridisasi seksual atau transformasi tanaman. Fusi protoplas antar spesies dalam satu genus atau fusi interspesies bertujuan untuk mendapatkan kultivar baru dengan sifat-sifat tertentu, termasuk ketahanan terhadap hama dan penyakit (Purwito, 1999).

Pengujian ketahanan melalui inokulasi alami di lapangan telah banyak dilakukan, namun metode ini sering mengalami *disease escape*. Di samping itu lahan yang digunakan untuk pengujian

tersebut dapat menjadi sumber penyakit baru terutama patogen yang bersifat tular tanah seperti *R. solanacearum*. Metode lain yang diharapkan dapat memberikan hasil yang lebih efektif dan efisien adalah dengan seleksi *in vitro*. Teknik seleksi *in vitro* merupakan metode yang efektif dan efisien karena dapat memberikan beberapa keuntungan antara lain dapat mengurangi kemungkinan terjadinya *escape*, hasil seleksi dapat diulang di rumah kaca atau di lapangan, dan patogen yang digunakan tetap terbatas di laboratorium.

Metode ini mudah dikerjakan dan telah dipelajari pada beberapa tanaman dalam program pemuliaan untuk mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit. Wenzel dan Forouhhi-Wehr (1990) memperlihatkan bahwa ketahanan pada barley, gandum dan kentang dihasilkan melalui seleksi secara *in vitro*. Fock *et al.* (2000) juga telah melakukan seleksi secara *in vitro* terhadap klon-klon kentang hasil fusi protoplas antara BF15 (2x) dengan *S. phureja* (2x) untuk mendapatkan klon yang tahan penyakit layu bakteri. Metode inokulasi yang digunakan adalah dengan memasukkan inokulasi ke dalam akar tanaman secara *in vitro*. Namun teknik inokulasi yang digunakan tersebut masih belum efektif dan dari hasil

penelitian ini terlihat bahwa periode inkubasinya masih relatif lama.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik seleksi *in vitro* yang efektif untuk menguji ketahanan klon kentang terhadap penyakit layu bakteri (*R. solanacearum*) dan mengetahui tingkat ketahanan 12 klon kentang hasil fusi protoplas antara BF15 (2x) dengan *S. stenotomum*(2x) terhadap penyakit layu bakteri (*R. solanacearum*) secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Bahan. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12 klon kentang (tetraploid) hasil fusi protoplas antara BF15 (dihaploid) dengan *S. stenotomum* (diploid), yaitu: BS-21, BS-23, BS-34, BS-38, BS-43, BS-49, BS-51, BS-53, BS-54, BS-55, BS-73, dan BS-75 yang dikoleksi oleh Laboratorium Kultur Jaringan Kentang Jurusan Budidaya Pertanian Faperta IPB. Kultivar BF15 (2x) dan spesies diploid *S. stenotomum* (2x) merupakan tetua fusi. Kultivar Nooksack digunakan sebagai pembanding yang tahan terhadap bakteri layu dan kultivar Atlantik sebagai pembanding rentan. Bahan lain yang digunakan adalah media MS untuk penanaman, bahan-bahan

kimia untuk isolasi dan identifikasi bakteri, biakan murni *R. solanacearum*, dan bahan-bahan untuk sterilisasi.

Metode Percobaan. Percobaan disusun berdasarkan RAL Faktorial terdiri atas dua faktor, yaitu faktor klon kentang yang terdiri atas 16 klon dan teknik inokulasi yang terdiri atas dua cara (siram dan gunting). Dari kedua faktor tersebut terdapat 32 kombinasi perlakuan, dan tiap perlakuan diulang tiga kali. Masing-masing satuan percobaan terdiri atas satu botol kultur yang berisi 10 tanaman. Tahapan kegiatan meliputi isolasi dan perbanyakan *R. solanacearum*, pembuatan media perbanyakan tanaman, penanaman eksplan, serta inokulasi tanaman dengan *R. solanacearum*. Inokulasi dengan patogen dilakukan pada saat tanaman berumur empat minggu di dalam botol kultur dengan konsentrasi inokulum 10^9 sel/ml. Pada teknik penyiraman digunakan 1 ml inokulum per botol kultur, kemudian diratakan ke seluruh permukaan media. Sedangkan pada teknik penggungtingan pucuk dilakukan dengan cara mencelupkan gunting ke dalam suspensi bakteri setiap kali akan digunakan.

Peubah yang diamati meliputi: (a) periode inkubasi, (b) kejadian penyakit,

dan (c) ketahanan tanaman. Periode inkubasi merupakan periode waktu yang dibutuhkan oleh patogen sejak penetrasi hingga timbul infeksi yang diekspresikan melalui gejala yang dapat dilihat pada tanaman atau bagian tanaman. Pengamatan terhadap periode inkubasi dilakukan setiap hari dan dimulai satu hari setelah inokulasi hingga timbul gejala awal. Sedangkan kejadian penyakit dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$KP = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Dimana :

KP = Kejadian penyakit (% layu)

n = Jumlah tanaman layu

N = Jumlah tanaman yang diamati

Untuk mengetahui tingkat ketahanan masing-masing klon kentang yang diuji, nilai persentase kejadian penyakit dikonversikan ke derajat ketahanan menurut cara Thaveechi, Hartman dan Kositratana (1989) (Tabel 1).

Tabel 1
Tingkat ketahanan klon kentang terhadap serangan bakteri layu *R. solanacearum* (Thaveechai *et al.*, 1989)

Persentase kejadian penyakit (%)	Tingkat ketahanan
0 - 20	Tahan (T)
21 - 40	Agak tahan (AT)
41 - 60	Agak rentan (AR)
61 - 100	Rentan (R)

Data hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis ragam dan jika terhadap beda nyata maka dilakukan uji lanjutan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Periode Inkubasi

Hasil pengamatan terhadap periode inkubasi disajikan pada Tabel 2, yang menunjukkan bahwa rata-rata periode inkubasi pada seleksi klon kentang secara *in vitro* dengan metode inokulasi siram yaitu 11.91 hari. Pada metode siram ini

gejala awal yang terlihat berupa menguningnya daun-daun yang dimulai dari daun bagian bawah dan selanjutnya diikuti dengan kelayuan tanaman. Sequeira (1992) menyatakan bahwa ada tidaknya pelukaan pada perakaran tanaman mempengaruhi proses infeksi bakteri patogen. Karena pada metode siram ini tidak ada pelukaan terhadap akar tanaman, maka terjadinya infeksi lebih lambat dan periode inkubasinya juga lebih lama. Tabel 2 juga memperlihatkan rata-rata periode inkubasi pada metode inokulasi gunting yaitu 7.26 hari, yang berarti lebih cepat jika dibandingkan dengan metode siram.

Tabel 2

Periode inkubasi penyakit layu bakteri pada 12 klon kentang hasil fusi protoplas antara BF15 dengan *S. stenotomum* berdasarkan seleksi *in vitro* dengan dua teknik inokulasi yang berbeda

Klon kentang	Periode inkubasi (hsi)		Rata-rata
	Siram	Gunting	
<i>S. stenotomum</i> (tetua, diploid)	14.63	9.83	12.23 a
Nooksack (pembanding tahan)	14.60	9.40	12.00 a
BS-23	13.87	9.17	11.52 ab
BS-73	13.67	9.13	11.40 ab
BS-75	13.23	9.03	11.13 ab
BS-43	13.00	8.87	10.94 abc
BS-54	12.07	7.47	9.77 bcd
BS-53	11.83	6.83	9.33 cde
BS-38	10.77	6.73	8.75 def
BS-49	10.97	6.47	8.72 def
BS-51	10.43	6.33	8.38 def
BS-55	10.57	5.83	8.20 def
BS-34	10.53	5.50	8.02 def
BS-21	10.17	5.33	7.75 ef
BF15 (2x) (tetua, dihaploid)	10.17	5.27	7.72 ef
Atlantik (pembanding rentan)	10.00	4.97	7.49 f
Rata-rata	11.91 A	7.26 B	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNJ taraf 5%; hsi = hari setelah inokulasi.

Periode inkubasi dipengaruhi oleh umur tanaman, konsentrasi dan virulensi inokulum, serta faktor lingkungan. Karena pada percobaan ini semua faktor tersebut relatif sama, maka perbedaan periode inkubasi diduga disebabkan oleh perbedaan klon kentang yang diuji. Pada percobaan *in vitro* ini, klon BS-23, BS-73, BS-75, dan BS-43 mempunyai periode inkubasi yang tidak berbeda dengan pembanding tahan (Nooksack) maupun

tetua fusi yang diduga tahan (*S. stenotomum*). Sehingga dapat diduga bahwa keempat klon kentang hasil fusi protoplas tersebut termasuk klon yang tahan terhadap bakteri *R. solanacearum*.

Kejadian Penyakit

Data pengamatan kejadian penyakit pada seleksi klon kentang secara *in vitro* dengan teknik inokulasi siram dan gunting disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3

Kejadian penyakit layu bakteri dan tingkat ketahanan 12 klon kentang hasil fusi protoplas antara BF15 dengan *S. stenotomum* berdasarkan seleksi *in vitro* dengan dua teknik inokulasi yang berbeda

Klon kentang	Kejadian penyakit (%)*		Rata-rata	Tingkat ketahanan
	Siram	Gunting		
<i>S. stenotomum</i> (tetua, diploid)	0.00	0.00	0.00	Tahan
Nooksack (pembanding tahan)	0.00	0.00	0.00	Tahan
Tahan	6.67	0.00	3.33	Tahan
Tahan	10.00	0.00	5.00	Tahan
Tahan	10.00	0.00	5.00	Tahan
Tahan	10.00	0.00	5.00	Tahan
BS-53	23.33	36.67	30.00	Agak Tahan
BS-54	26.67	33.33	30.00	Agak Tahan
BS-38	33.33	43.33	38.33	Agak Tahan
BS-49	36.67	46.67	41.67	Agak Rentan
BS-55	36.67	73.33	55.00	Agak Rentan
BS-51	76.67	63.33	70.00	Rentan
BS-34	66.67	83.33	75.00	Rentan
BF15 (2x) (tetua, dihaploid)	76.67	93.33	85.00	Rentan
BS-21	80.00	100.00	90.00	Rentan
Atlantik (pembanding rentan)	100.00	100.00	100.00	Rentan
Rata-rata	37.08 A	42.08 A		

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNJ taraf 5%. Kejadian penyakit 0-20% = tahan, 21-40% = agak tahan, 41-60% = agak rentan, 61-100% = rentan.

*) Untuk uji beda data ditransformasi dengan $\text{Arc. sin } \sqrt{x}$: Untuk tingkat ketahanan digunakan data non transformasi; data dihitung per 10 tanaman.

Tabel 3 memperlihatkan bahwa kejadian penyakit pada seleksi *in vitro* berkisar 0 -100%. Kejadian penyakit pada pembandingan rentan (Atlantik) dapat mencapai 100%, sementara kejadian penyakit pada pembandingan tahan (Nooksack) masih 0%. Dari klon-klon yang diuji terdapat lima klon yang kejadian penyakitnya sudah di atas 60.00% yaitu BS-21, BS-51, BS-34, Atlantik, dan tetua fusi BF15 (2x). Sedangkan kejadian penyakit 0 - 20% terdapat pada klon-klon yang diduga tahan yaitu *S. stenotomum*, Nooksack, BS-23, BS-43, BS-73, dan BS-75.

Besarnya kejadian penyakit terkait dengan periode inkubasi. Pada klon-klon yang tahan dengan periode inkubasi yang lama menunjukkan kejadian penyakitnya rendah. Sebaliknya pada klon-klon yang rentan dengan periode inkubasi yang cepat menunjukkan kejadian penyakitnya tinggi. Namun demikian persentase kejadian penyakit pada kedua teknik inokulasi tersebut tidak berbeda nyata, walaupun periode inkubasinya berbeda nyata. Hal ini dapat terjadi karena tidak semua gejala awal penyakit layu bakteri yang muncul tersebut dapat menyebabkan kelayuan tanaman secara permanen. Kejadian seperti ini dapat dilihat pada saat

pengamatan dimana dari sejumlah tanaman yang menunjukkan gejala awal ternyata pada akhirnya terdapat beberapa tanaman yang sehat kembali sehingga dapat melanjutkan proses fisiologisnya.

Ketahanan Tanaman

Tingkat ketahanan klon kentang berdasarkan seleksi secara *in vitro* telah disajikan pada Tabel 3. Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa dari 12 klon kentang hasil fusi protoplas terdapat empat klon yang tahan yaitu BS-23, BS-43, BS-73, dan BS-75, tiga klon agak tahan yaitu BS-53, BS-54, dan BS-38, dua klon agak rentan yaitu BS-49 dan BS-55, serta tiga klon tergolong rentan yaitu BS-51, BS-34, dan BS-21. Kenyataan ini mengindikasikan bahwa gen yang mengontrol ketahanan terhadap *R. solanacearum* bersifat kompleks. Kempe dan Sequeira (1983) menyatakan bahwa gen tahan adalah kompleks dan tidak ada klon kentang yang mempunyai sifat ketahanan terhadap banyak strain patogen.

Pengujian ketahanan terhadap *R. solanacearum* dengan teknik *in vitro* memberikan keuntungan antara lain diperlukan waktu yang lebih cepat, biaya yang lebih murah, dan tenaga yang lebih ringan dibanding pengujian di lapangan,

dapat dilakukan terhadap jumlah klon yang banyak dalam waktu sekaligus, tidak memerlukan lahan yang luas, serta tidak menimbulkan masalah penyakit baru di lapangan. Sehingga untuk tujuan yang lebih efektif dan efisien, pengujian ketahanan klon kentang terhadap penyakit layu bakteri (*R. solanacearum*) dapat dilakukan dengan teknik *in vitro*.

Namun demikian, pengujian secara *in vitro* juga memiliki kekurangan, seperti adanya seleksi yang terlalu ketat dapat mengakibatkan banyak klon yang hilang, memerlukan peralatan laboratorium (inkubator), dan ketahanan di laboratorium (*in vitro*) mungkin saja tidak sejalan dengan pengujian di lapangan karena gen tahan ada yang *linkage* dengan sifat agronomis, sehingga gen yang mengendalikan sifat ketahanan tersebut mungkin baru ter-ekspresi setelah di lapangan. Selain itu perlu konfirmasi lebih lanjut terhadap sifat-sifat agronomis lain yang dimiliki oleh klon tahan terseleksi, misalnya produksinya yang tinggi atau kualitas umbinya yang baik.

KESIMPULAN

1. Periode inkubasi penyakit layu bakteri pada seleksi *in vitro* berkisar 7.49 -

12.23 hari, dimana periode inkubasi pada kon-klon yang tahan lebih lama daripada klon rentan.

2. Dari 12 klon kentang hasil fusi protoplas antara BF.15 (2x) dengan *S. stenotomum* (2x), terdapat empat klon (33.33%) yang tahan yaitu BS-23, BS-43, BS-75, dan BS-73 dengan keadaan penyakit layu bakteri berkisar 3.33 - 5.00%, dan tiga klon (25.00%) yang agak tahan yaitu BS-53, BS-54, dan BS-38 dengan kejadian penyakit berkisar 30.00 - 38.33%.

3. Pengujian secara *in vitro* dapat digunakan untuk seleksi ketahanan klon kentang terhadap penyakit layu bakteri, karena waktu yang diperlukan lebih singkat dibanding pengujian di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Biro Pusat Statistik. 1998. Survei Pertanian Produksi Tanaman Sayuran dan Buah-Buahan 1998. BPS, Jakarta. 43 hal.
- Fock, I., C. Collonnier, A. Purwito, J. Luisetti, V. Souvannavong, F. Vedel, A. Servaes, A. Ambroise, H. Kodja, G. Ducreux, and D. Sihachakr. 2000. Resistance to Bacterial Wilt in Somatic Hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. phureja*. Plant Science (Acceptance).

- French, E.R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. pp. 199-208. *In*: A.C. Hayward and G.L. Hartman (Eds.). 1994. Bacterial Wilt: The Disease and Its Cusative Agent, *P. solanacearum*. CAB, International, Wallingford.
- Kahar, A. 1996. Pengarahan Direktur Jenderal Tanaman Pangan dan Hortikultura pada Seminar Agribisnis Kentang, Jakarta 18-19 Januari 1996.
- Kempe, J. and L. Sequeira. 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Disease* 67:499-503.
- Kompas. 1998. Berharap kentang mampu berdentang. *Kompas* Senin 4 Mei 1998, Halaman D.
- Purwito, A. 1999. Fusi Protoplas Intra dan Interspecies pada Tanaman Kentang. Disertasi Program Pascasarjana IPB, Bogor. 223 hal.
- Purwito, A., G.A. Wattimena, D. Siha-chakr, dan S. Numba. 2000. Fusi protoplas antara *Solanum tuberosum* dan *S. stenotomum* untuk mendapatkan tanaman berdaya hasil tinggi. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. Vol. 5, No. 1, pp. 18-28.
- Rubatzky, V.E. dan M. Yamaguchi. 1998. Sayuran Dunia I Prinsip, Produksi, dan Gizi. Edisi kedua. ITB, Bandung.
- Sequeira, L. 1992. Bacterial wilt: past, present, and future. pp. 12-21. *In*: G.L. Hartman and A.C. Hayward (Eds.) Bacterial Wilt: Proceedings of an International Conference, held at Kaohsiung, Taiwan 28-31 Oktober 1992. ACIAR Proceeding No. 45, Canberra, Australia.
- Thaveechai, N., G.L. Hartman, and W. Kositratana. 1989. Bacterial Wilt Resistance Screening. Laboratory Course on Bacterial Wilt of Tomato. Kasetsart University, Thailand.
- Wattimena, G.A. 2000. Pengembangan propagul kentang bermutu dan kultivar kentang unggul dalam mendukung peningkatan produksi kentang di Indonesia. Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Ilmu Hortikultura. Fakultas Pertanian IPB, Bogor 2 September 2000.
- Wenzel, G. and B. Foroughi-Wehr. 1990. *In vitro* selection. pp. 353-370. *In*: M.D. Hayward, N.O. Bosermark and I. Romagosa (Eds.). *Plant Breeding: Principle and Prospects*. Chapman and Hall, London.
- Yabuuchi, E., Y. Kosaka, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an alcaligenes species to *Ralstonia* gen: proposal of *R. pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., *R. solanacearum* (Smith, 1896) comb. nov. and *R. eutropha* (Davis, 1969) comb. nov. *J. Microbiol. And Immunol.* 39(11):897-904.