

Identificación de fuentes de resistencia a *Xanthomonas campestris* en *Brachiaria* spp.

Carolina Zuleta¹
S.Kelemu¹
Oscar Cardozo²

RESUMEN. En 1997 se observó un marchitamiento bacteriano en algunas accesiones de *Brachiaria* del Programa de Mejoramiento del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en Palmira, Colombia, tanto en invernadero en Palmira (Valle) como en campo en Puerto López (Meta). Se recolectaron muestras de *Brachiaria* CIAT 1015 con sintomatología típica de la enfermedad, de las cuales se aisló una bacteria patógena identificada como *Xanthomonas campestris*. Para encontrar fuentes de resistencia a la enfermedad, se evaluaron en el invernadero 35 materiales de *Brachiaria*, entre poblaciones sexuales e híbridos. De éstos, 18 materiales mostraron resistencia. Se realizó un estudio entre materiales susceptibles y resistentes, para confirmar la relación de susceptibilidad de *Brachiaria* con el nivel poblacional de la bacteria en la planta, para lo cual se seleccionaron dos materiales, BR97-405 (resistente) y CIAT 1015 (susceptible). Se logró desarrollar una herramienta para evaluar fuentes de resistencia a enfermedades bacterianas en *Brachiaria* spp. relacionando el nivel poblacional con la susceptibilidad, lo cual permitirá evitar pérdidas causadas por este patógeno en el campo.

Palabras clave: *Brachiaria* spp., *Xanthomonas campestris*, Enfermedades, Resistencia.

ABSTRACT. Identification of sources of resistance to *Xanthomonas campestris* in *Brachiaria* spp. In 1997 bacterial wilting was observed in some the *Brachiaria* accessions of the Improvement Program of the International Center of Tropical Agriculture (CIAT), in Palmira, Colombia, both in the greenhouse in Palmira (Valle) and in the field in Puerto López (Meta). Samples of *Brachiaria* CIAT 1051 were collected with typical symptoms of the disease, from which a pathogenic bacterium identified as *Xanthomonas campestris* was isolated. In order to find sources of resistance to the disease, 35 *Brachiaria* materials, sexual and hybrid populations were evaluated in the greenhouse. Of these, 18 showed resistance. A study of resistant and susceptible material was performed, to confirm the relation between *Brachiaria* susceptibility and the population level of the bacteria on the plant, for which two materials were selected, BR97-405 (resistant) and CIAT 1015 (susceptible). A tool was successfully developed to evaluate sources of resistance to bacterial diseases in *Brachiaria* spp. relating the population level with susceptibility, which will make it possible to avoid losses caused by this pathogen in the field.

Key words: *Brachiaria* spp., *Xanthomonas campestris*, Diseases, Resistance.

Introducción

El género *Brachiaria*, de la tribu Paniceae, contiene aproximadamente 100 especies que crecen en regiones tropicales y subtropicales de los hemisferios Oriental y Occidental, y se encuentran principalmente en África (Renvoize 1987). Siete especies perennes de origen africano se han utilizado como forraje en América tropical, Asia, Pacífico Sur y Australia. En la

actualidad, *Brachiaria* es el género que contribuye con más materiales forrajeros en el trópico, especialmente en América Central y América del Sur (Miles *et al.* 1998).

La primera introducción de *Brachiaria* en Colombia se remonta a mediados del siglo XIX, cuando *B. mutica* llegó en buques de carga. Desde 1955 se han introducido en Colombia materiales selecciona-

¹ Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. s.kelemu@cgiar.org

² Universidad del Tolima, Santa Helena, Ibagué, Colombia.

dos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* y *B. dictyoneura*. En 1992, las pasturas constituidas por especies de *Brachiaria*, asociadas o no con leguminosas, contenían principalmente *B. decumbens* y *B. humidicola* y ocupaban cerca del 92% del área total dedicada a pasturas mejoradas en la región de Puerto López y Puerto Gaitán, en los Llanos Orientales de Colombia. En 1995 se habían sembrado en Colombia aproximadamente 3 millones de hectáreas con especies de *Brachiaria*, en especial *B. decumbens* (Miles *et al.* 1998).

La marchitez bacteriana es una enfermedad que ha sido investigada y descrita en especies forrajeras en Europa, especialmente en el Reino Unido, Noruega y Bélgica (Egli y Smidth 1982). El principal síntoma de la enfermedad es la marchitez de las hojas de la planta, que se inicia con un rayado blanco en los espacios internervales y continúa con clorosis y necrosis de las hojas. Los pastos infectados son menos persistentes en el campo; las plantas jóvenes, después de una infección artificial en invernadero, pueden morir en poco tiempo. El patógeno originalmente llamado *Xanthomonas graminis*, fue reclasificado como un patovar de *Xanthomonas campestris*, o sea, como *Xanthomonas campestris* pv. *graminis* (Egli y Smidth 1982).

El primer reporte de marchitez bacteriana en pasturas del género *Brachiaria* mencionaba a *B. mutica* como hospedante alterno de *X. campestris* pv. *vascuolorum*, un patógeno causante de gomosis en cultivos de caña de azúcar en el sur de Australia (Hughes 1938).

El género de bacterias *Xanthomonas* (Dowson 1939) se ha descrito como gram-negativa, obligadamente aeróbica, constituida por bacilos no fermentativos que pueden ser móviles por un flagelo polar y pueden producir un pigmento amarillo llamado xantomonadina. Todos los aislamientos reportados de este género han sido asociados con plantas y la mayoría ha sido relacionada con un hospedante en particular (Schaad 1988).

En Colombia se observó un marchitamiento, posiblemente bacteriano, en diferentes accesiones de *Brachiaria* del programa de mejoramiento del CIAT en 1997, cuando se sembró material proveniente de semilla de la estación CIAT-Popayán (Cauca) en los invernaderos de CIAT-Palmira (Valle) (J.W. Miles, *Comunicación personal*). En 1998 se presentaron síntomas de marchitez, iniciándose con un rayado albino y clorótico a lo largo de los espacios internervales en las hojas y en estado avanzado se presentó un enrollamiento de las hojas, similar al causado por condiciones

de sequía, provocando finalmente la muerte de las plantas en el invernadero y luego en el campo en Puerto López (Meta). A partir de ese año, la enfermedad se propagó debido al manejo del cultivo en los invernaderos. A comienzos de 1999, la enfermedad se encontraba presente en una gran cantidad de materiales desarrollados por el programa de mejoramiento de forrajes tropicales del CIAT. Esto hizo necesario el desarrollo de una metodología de selección de material resistente a la enfermedad para evitar su propagación en el campo; allí la enfermedad es prácticamente inmanejable, dada la extensión de las pasturas y los altos costos que representa su control.

Los objetivos de este trabajo fueron identificar el agente causal de la marchitez bacteriana de *Brachiaria* spp. y estudiar su comportamiento, con el fin de encontrar fuentes de resistencia entre los materiales desarrollados en el programa de mejoramiento de forrajes del CIAT, en Palmira, antes de ser llevados a parcelas comerciales. Esto permitió establecer una metodología de evaluación y preselección estable para los diferentes materiales desarrollados.

Materiales y métodos

Aislamiento

Se recolectaron muestras de *Brachiaria* CIAT 1015 (un cruce de *B. ruziziensis* 44-03 con *B. decumbens* CIAT 606) del invernadero del programa de mejoramiento de forrajes del CIAT, cuyas plantas presentaban la sintomatología típica de la enfermedad en su estado inicial, o sea, marchitez en las hojas y líneas albinas en los espacios internervales.

De las muestras de hojas se cortaron trozos de 1 cm, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min y con etanol al 70% durante 1 min, y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar el etanol. Una vez desinfectadas las muestras, se maceraron en un mortero con 1 ml de agua destilada estéril; del producto de la maceración se tomaron volúmenes de 50 ml y se sembraron en un medio de cultivo de agar nutriente (extracto de carne 3 g, bacto-peptona 5 g, bacto-agar 15 g, agua destilada 1 L Lab Difco, Detroit, MI, EEUU). Las muestras se dispersaron con un rastrillo de vidrio y un plato giratorio con el fin de obtener colonias independientes. Estas colonias se sembraron separadamente según sus características, con el fin de incrementarlas, en cajas con agar nutriente. A las 24 horas se trasladaron de nuevo a caldo nutritivo y se incubaron en un agitador New Brunswick Edison, NJ, USA, durante 17 horas a

200 r.p.m. y 28 °C. De este caldo se tomaron alícuotas de 750 µl, a las cuales se les adicionó 750 ml de glicerol estéril al 30% a cada una, y se procedió a guardarlas a -80 °C (Sambrook *et al.* 1989).

Inoculación

Se incrementaron las colonias bacterianas a partir de las células almacenadas en glicerol a -80 °C sobre medio de agar nutriente. Posteriormente, se prepararon 200 ml de caldo nutritivo en un Erlenmeyer de 500 ml que fue inoculado con las células que se incrementaron sobre el agar nutriente por un periodo de 24 h. Este caldo fue incubado en un agitador (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) a 200 r.p.m. y 28 °C durante 14 h. Después se centrifugó el medio de caldo nutritivo durante 15 min a 4000 r.p.m. y 4 °C y se siguió el siguiente protocolo: Se preparó una dilución $O.D_{600} = 0,1$ de las bacterias en agua destilada estéril usando un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb, USA) y se inocularon con él plantas de *Brachiaria* 1015, aplicando los siguientes métodos: 1. Inoculación de las hojas con aguja: se introdujeron dos agujas hipodérmicas juntas en la suspensión bacteriana para recoger una muestra y se punzó la hoja con ellas. 2. Introducción de la raíz en suspensión bacteriana durante 12 h y trasplante de la misma a suelo estéril. 3. Introducción de tijeras en la suspensión bacteriana para cortar las hojas con ellas. 4. Aspersión de la solución bacteriana sobre la planta añadiendo Tween 20 al 5%. 5. Inyección de suspensión bacteriana en el tallo de la planta mediante jeringa y aguja hipodérmica. 6. Inoculación mediante una prensa que lleva en una de sus caras una espuma que ha sido remojada previamente en la suspensión bacteriana y en la otra agujas hipodérmicas que también han sido sumergidas previamente en la suspensión bacteriana y entre las dos se prensa la hoja por algunos segundos.

Las plantas inoculadas se llevaron a un cuarto con humedad relativa entre 60% y 70% y a 27°C por 48 h, y luego se trasladaron a un cuarto de crecimiento con las siguientes condiciones: 28 a 30 °C, 70% HR y, fotoperíodo de 12 h; donde permanecieron hasta que aparecieron los síntomas de marchitez.

Finalmente, se esperó la expresión de los síntomas en las plantas para evaluarlas según el efecto del patógeno.

Los testigos se inocularon con agua destilada estéril aplicando las metodologías antes descritas y se inocularon plantas de *Brachiaria* 1015 completamente sanas.

Identificación taxonómica

Con la bacteria patogénica seleccionada se procedió a realizar diferentes pruebas bioquímicas, siguiendo la metodología de clasificación de bacterias patogénicas (Schaad 1988). Estas pruebas permitieron estudiar el comportamiento biológico y químico del patógeno y así facilitar su identificación.

Evaluación de resistencia de *Brachiaria*

Para identificar las fuentes de resistencia en *Brachiaria*, se inocularon 35 materiales, los cuales se evaluaron para detectar la expresión de los síntomas en condiciones de invernadero. La evaluación consideró dos tipos de plantas según su respuesta: a. Susceptible: si se desarrollaron los síntomas de enrollamiento de la hoja, rayado clorótico y albino a lo largo de la hoja inoculada hasta causar su necrosis 15 días después. b. Resistente: si las plantas conservaron una apariencia sana a los 15 días después de la inoculación.

Mutante del patógeno resistente a rifampicina

El propósito de crear este mutante fue marcar la bacteria para realizar el estudio de la dinámica poblacional del patógeno en plantas de *Brachiaria* spp. El propósito fue evitar errores en el recuento de las unidades formadoras de colonias al momento del reaislamiento del patógeno inoculado en las plantas, ya que éstas pueden contener diferentes tipos de bacterias.

Para obtener la bacteria resistente a Rifampicina, se realizó el procedimiento de evaluación empleando el método del gradiente de concentraciones de este antibiótico, incrementando la concentración hasta llegar a 25 µg/ml.

La bacteria resistente o mutante debe conservar las mismas características de la bacteria original, como ritmo de crecimiento, color y patogenicidad, que es la capacidad que tiene el organismo para causar daño a la planta. Se compararon la bacteria original y la mutante, dejándolas crecer en medio líquido a partir de una concentración conocida $O.D_{600}=0,01$ utilizando para ello un espectrofotómetro y haciendo observaciones cada hora para la elaboración de la curva de crecimiento por medición de la densidad óptica.

Dinámica poblacional de la bacteria en la planta

Preparación del inóculo. De las bacterias resistentes al antibiótico (Rifampicina 25 µg/ml) y guardadas a -80 °C en glicerol al 20% se tomó una muestra con un palillo estéril y se sembró sobre un medio de cultivo de agar nutriente que contenía la concentración del

antibiótico a la cual es resistente la bacteria. Esta fue incubada a 28 °C para incrementarla nuevamente. Una vez incrementada, se tomaron una o dos colonias con un palillo estéril y se inocularon con ella 200 ml de caldo nutritivo más antibiótico, que se incubaron en un agitador a 200 r.p.m. y a 28 °C. Después de 17 horas, este caldo fue centrifugado a 4000 r.p.m. durante 15 min y a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron las células en agua destilada estéril y se llevaron a $O.D_{600} = 0,3$ en un espectrofotómetro.

Metodología de inoculación. La inoculación se realizó en plantas de crecimiento homogéneo de aproximadamente 40 días, usando la técnica de corte del ápice de las hojas con tijeras que fueron previamente sumergidas en el inóculo. En cada planta se inoculó la segunda hoja más joven de la planta.

Cuantificación de la población de la bacteria en las plantas. Se evaluó el desarrollo del patógeno calculando el número de unidades formadoras de colonias (CFU) en plantas susceptibles y resistentes durante 13 días. Estos datos se graficaron (CFU vs tiempo, en días).

Para evaluar el crecimiento y la multiplicación de la bacteria dentro de la planta, se procedió de la siguiente manera, del día 1 al 13:

- Se tomó la hoja inoculada (lámina foliar completa) de la planta, se dividió en partes de 1 cm de largo y se desinfectó la superficie; luego se maceró en un mortero con 1 ml de agua destilada estéril, tomándose 100 μ l para realizar diluciones seriadas hasta llegar a 10^{-10} .
- Se tomaron muestras de 10 μ l de cada valor de la dilución y se sembraron en cajas de Petri sobre medio de cultivo PDA (Potato-Dextrosa-agar) que contenía el antibiótico Rifampicina 25 μ g/ml; se usaron cuatro muestras de cada dilución. Después de 48 h, a 28 °C, se contaron las colonias individuales que se formaron y se llevaron luego a un volumen total de 1 ml, para obtener así el dato total de cada hoja evaluada.

Relación patógeno-planta. Para establecer los estados de desarrollo de la sintomatología de la enfermedad se estableció una escala visual de severidad de síntomas en la planta. La escala utilizada fue la siguiente: 0= Planta sana el día de la inoculación. 1= Inicio del desarrollo de necrosis en el sitio del corte. 2= Presencia de líneas cloróticas internervales alrededor del sitio de corte. 3= Líneas cloróticas presentes en las hojas, las cuales a veces tratan de cerrarse. 4= Necrosis presente en el sitio de inoculación y desarrollo de síntomas en el resto de la hoja. y 5= Muerte de la hoja inoculada.

Análisis estadístico

El ensayo se ajustó a un diseño completamente al azar con dos tratamientos: accesión susceptible y accesión resistente. Se evaluaron tres plantas por día de cada tipo de accesión. Las evaluaciones se realizaron durante 13 días, iniciando media hora después de haber sido realizada la inoculación. Se utilizaron 78 unidades experimentales. El análisis estadístico se hizo por comparación de medias empleando el programa SAS.

Resultados y discusión

Metodologías de inoculación

Mediante las pruebas de patogenicidad se determinó que de las metodologías de inoculación evaluadas la más eficiente fue el corte del ápice de la hoja con tijeras previamente sumergidas en una suspensión de inóculo de concentración conocida, porque al utilizarla se obtuvieron los síntomas observados originalmente en las plantas que se encontraron afectadas en campo e invernadero. Con este resultado, se procedió a identificar el agente causal de la enfermedad mediante pruebas bioquímicas, determinándose *Xanthomonas campestris* (Bergey *et al.* 1984) (Fig. 1 y 2).



Figura 1. Síntomas de marchitez bacteriana en el campo.



Figura 2. Síntomas de marchitez bacteriana en plantas inoculadas en el invernadero.

Fuentes de resistencia en *Brachiaria* spp.

De los 35 materiales de *Brachiaria* evaluados se determinó resistencia en 18 materiales evaluados (Cuadro 1).

El desarrollo de resistencia es la medida más importante para el control de la marchitez bacterial. Las metodologías de inoculación para evaluar poblaciones de especies de plantas hospedantes han sido desarrolladas utilizando ciclos de selección recurrente para forrajes como el centeno y forrajeras de diferentes géneros, inoculadas artificialmente en invernadero con un aislamiento altamente agresivo de *X.campestris* pv. *graminis* (Michel 2001).

La metodología de corte con tijera para la selección de materiales resistentes a marchitez bacterial permitió la evaluación de los materiales de *Brachiaria* spp. que mostraban resistencia para llevarlos al campo. El corto tiempo en el que se muestran los síntomas y las facilidades de manejo de material hacen de esta metodología una alternativa de evaluación eficiente.

Mutante del patógeno resistente a Rifampicina

Después de evaluar la resistencia de la bacteria a diferentes concentraciones del antibiótico se seleccionó la concentración de 25 µg/ml. Al exponer la bacteria a esta concentración no sufrió cambios ni en sus características morfológicas ni en las patogénicas. Tampoco presentó diferencias significativas en cuanto al ritmo de crecimiento (Fig. 3).

En trabajos anteriores de dinámica de crecimiento de *X.campestris* en hojas de diferentes cultivares de arroz, se apreció la aplicabilidad de obtener aislamientos de bacterias resistentes a antibióticos, ya que de este modo se realiza una evaluación sin la interferencia en el conteo con bacterias que se encuentran en la planta en el momento de la inoculación o que se desarrollan en ella, como saprófitos dado el efecto de la muerte de los tejidos por la invasión de la bacteria causante de marchitez bacterial (Barton-Willis *et al.* 1989).

Dinámica poblacional de la bacteria en la planta

En los tres primeros días de la evaluación, se observó un comportamiento homogéneo tanto en el material resistente como en el material susceptible, al no presentarse diferencias significativas en el desarrollo de la población bacterial (Fig. 4) A partir del cuarto día se observaron diferencias significativas; encontrándose una población mayor de la bacteria en el material susceptible CIAT 1015. Este incremento de población continuó presentando diferencias signifi-

Cuadro 1. Materiales de *Brachiaria* que fueron evaluados para encontrar fuentes de resistencia a *X.campestris*.

Genotipo	Origen del material	Reacción a la bacteria
BR 97 NO/ 0047	Selección, población sexual, 1997	R
BR 97 NO/ 0082	Selección, población sexual, 1997	S
BR 97 NO/ 0155	Selección, población sexual, 1997	S
BR 97 NO/ 0383	Selección, población sexual, 1997	S
BR 97 NO/ 0402	Selección, población sexual, 1997	R
BR 97 NO/ 0405	Selección, población sexual, 1997	R
BR 97 NO/ 0457	Selección, población sexual, 1997	R
BR 97 NO/ 1143	Selección, población sexual, 1997	S
BR 97 NO/ 1173	Selección, población sexual, 1997	S
BR 97 NO/ 2965	Selección, población sexual, 1997	R
BR 98 NO/ 0709	Híbrido, sexual	S
BR 98 NO/ 0773	Híbrido, sexual	S
BR 98 NO/ 1251	Híbrido apomíctico	R
BR 99 NO/ 4015	Híbrido apomíctico	R
BR 99 NO/ 4016	Híbrido, sexual	S
BR 99 NO/ 4099	Híbrido, sexual	R
BR 99 NO/ 4132	Híbrido apomíctico	S
BR 99 NO/ 4138	Híbrido, sexual	R
BR 99 NO/ 4278	Híbrido, sexual	S
BRUZ4X/ 4402	<i>B. ruzizensis</i> , tetraploide sexual	S
FM 9503/ 46/024	Híbrido apomíctico	S
CIAT 606	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	R
CIAT 679	<i>B. humidicola</i> cv. Tully	R
CIAT/ 1015	<i>B. ruzizensis</i> tetraploide x <i>B. decumbens</i> CIAT606	S
CIAT 6133	<i>B. humidicola</i> cv. Llanero	R
CIAT 6294	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	R
CIAT 6780	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	S
CIAT 16322	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	R
CIAT 16488	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	S
CIAT 26110	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	R
CIAT 26124	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	R
CIAT 26318	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	R
CIAT 26556-G	<i>B. brizantha</i> , accesión CIAT	R
CIAT 36061	Híbrido apomíctico "precomercial"	S
CIAT 36062	Híbrido apomíctico	S

R = resistente, S = susceptible

cativas entre los dos materiales hasta el día 13, cuando culminó la evaluación. El mayor grado de diferencia significativa entre los materiales CIAT 1015 y BR 97-405 se observó a partir del día octavo, incrementándose la población de *X. campestris*. Sin embargo, sólo se observaron los síntomas en CIAT 1015, material en el que la bacteria causó la muerte de las plantas.

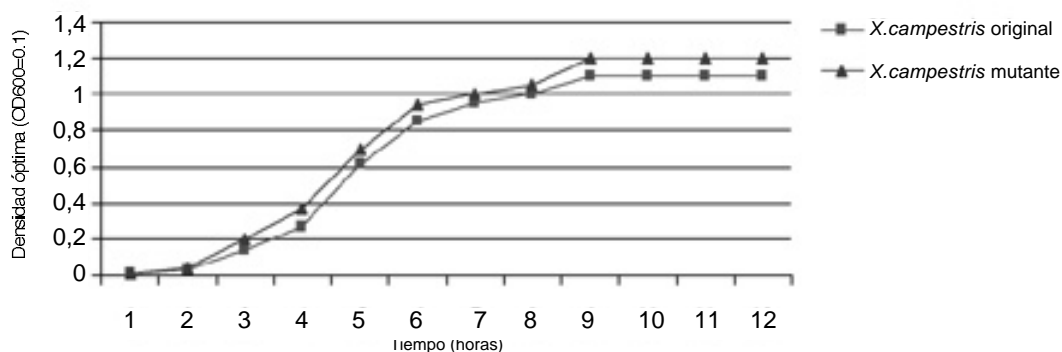


Figura 3. Curva de crecimiento comparativa entre *X. campestris* original y *X. campestris* mutante.

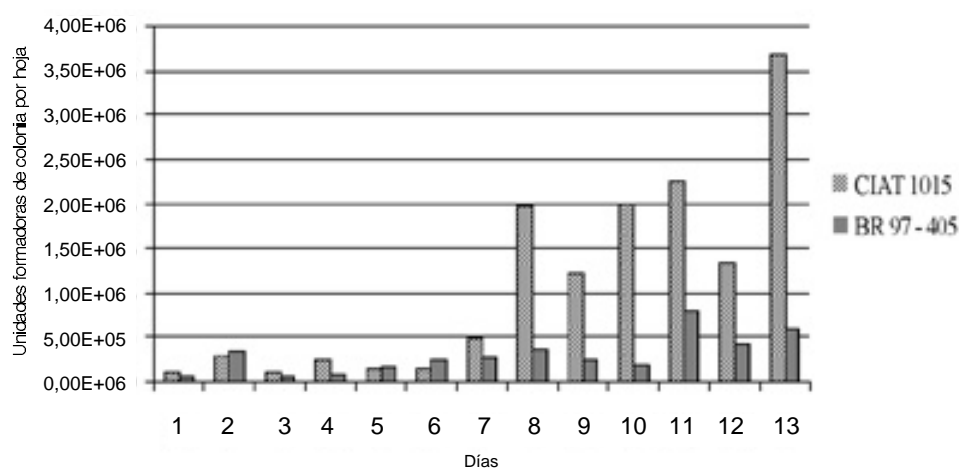


Figura 4. Dinámica poblacional de *X. campestris* en *Brachiaria* spp. en escala aritmética.

BR 97-405, por su parte, permitió el desarrollo de la bacteria a niveles no patogénicos, lo que indica que este material de *Brachiaria* puede ser clasificado como resistente.

Este resultado evidenció la relación entre resistencia y nivel poblacional de la bacteria en la planta, lo cual se confirmó al cuantificar la población bacteriana día a día en plantas de *Brachiaria* spp. susceptibles y resistentes a la marchitez bacterial.

Relación patógeno-planta

La escala visual definida (Fig. 5) permitió establecer una metodología para la evaluación de materiales

promisorios de *Brachiaria* spp. inoculados con la bacteria y determinar los materiales susceptibles y resistentes a la enfermedad, de acuerdo a los niveles de resistencia mostrados por las plantas en el invernadero. Esto es muy importante para que los materiales utilizados en el campo sean aquellos que se han identificado como resistentes. En Colombia, la enfermedad no ha causado problemas a nivel de campo, pero dado la extensión de tierras sembradas de *Brachiaria* y la importancia de la actividad ganadera, y la poca factibilidad de control de este patógeno en el campo, la prevención mediante la selección de materiales resistentes a la enfermedad es una medida prioritaria.

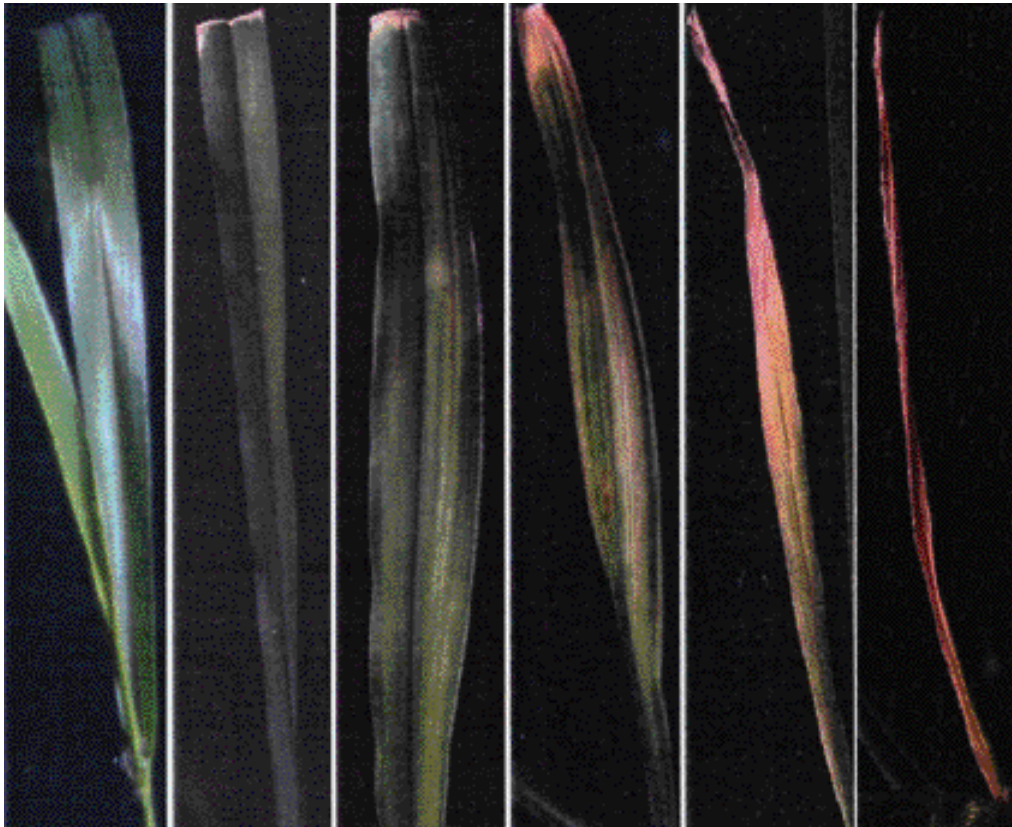


Figura 5. Escala para evaluar el desarrollo de los síntomas de marchitez en las plantas susceptibles de *Brachiaria* spp.

Agradecimiento

A Camilo Plazas por facilitar la fotografía de los síntomas de marchitez en el campo, a Ximena Bonilla por su asistencia técnica y al Dr. J.W. Miles por facilitar los materiales de *Brachiaria* para los ensayos.

Literatura citada

- Barton-Willis, PA; Roberts, DP; Guo, AY; Leach, JE. 1989. Grow dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in leaves of rice differential cultivars. *Phytopathology* 79:573-578.
- Bergey, DD; Sneath, PHA. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins. p. 200-207.
- Egli, T; Schmidt, D. 1982. Pathogenic variation among the causal agents of bacterial wilt of forage grasses. *Journal of Phytopathology* 104:138-150.
- Hughes. 1938. *Proceedings of VIth International Society of Sugar Cane Technologist*. p.430-437.
- Michel, VV. 2001. Interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *graminis* strains and meadow fescue and Italian Rye grass cultivars. *Plant Dis.* 85:538-542.
- Miles, JW; Maass, BL; Do Valle, CB Ed. 1998. *Brachiaria: Biology, agronomy and improvement*. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 302 p.
- Renvoize, SA. 1987. A survey of leaf blade anatomy in grasses; XI: Paniceae. *Kew Bull.* 42(3):739-768.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaad, NW Ed. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2 ed. St Paul, Minnesota, APS.