

REVISTA
FACULTAD NACIONAL
DE AGRONOMIA

DIRECTOR: CARLOS GARCES O.

Vol. XII	Medellín, Junio-Septiembre de 1950	Nos. 38 y 39
----------	------------------------------------	--------------

Apartado Aéreo 568—Dirección postal: Facultad Nal. de Agronomía
BIBLIOTECA — Medellín - Colombia, S. A.

*(Registrado como artículo de 2ª clase en el Ministerio de Correos y Telégrafos,
el 8 de septiembre de 1939.—Licencia N° 648)*

El agente causante de la Gomosis Bacterial del Pasto Imperial en Colombia

MORTIMER P. STARR (1) B. A. M. S., PH. D.,
División de Bacteriología, Colegio de Agricultura
Universidad de California, Davis, California, y CAR-
LOS GARCES O., A. M. S., Facultad Nacional de
Agronomía — Medellín - Colombia.

La yerba Imperial (*Axonopus scoparius*), es ampliamente cultivada en Colombia como pasto de corte para el ganado lechero. En los últimos años este pasto y su pariente cercano, el Micay (*Axonopus micay*) han venido siendo atacados por una seria enfermedad vascular, dando por resultado el que la producción de estos dos cultivos tan importantes se ve seriamente limitada. Un informe preliminar sobre esta enfermedad fue dado por Garcés (1947) junto con algunas pruebas de que una bacteria no identificada es la causa de la enfermedad.

En 1948 el autor senior fue consultado sobre la identidad de esta bacteria causal; posteriormente se le presentó la oportunidad de visitar a Colombia con el fin de ayudar a la identificación del

(1) Especialista visitante de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín, Colombia quien se permite reconocer ampliamente la generosa cooperación del Sr. Decano y del personal de la Institución.

patógeno. Este viaje se debió a la generosa cooperación de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín. La Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, los Departamentos de Estado y Agricultura de los Estados Unidos y la Universidad de California. El estudio fue comenzado en Agosto de 1949 en la Facultad de Agronomía de Medellín y se continuó durante tres meses aproximadamente.

LA ENFERMEDAD

Fueron visitados campos de Imperial y Micay típicamente enfermos, en la región de Rionegro y La Ceja, en Antioquia, así como en Chinchiná y Naranjal en Caldas. En todos los casos, los síntomas y el progreso de la enfermedad concordaron bajo todos los aspectos, con la descripción dada por Garcés (1947) y de aquí que creamos innecesario prestar atención ahora a este aspecto del problema. Se recolectó material en campos típicamente enfermos y de allí se efectuaron los aislamientos del agente causal.

AISLAMIENTO DEL PATOGENO

Al principio se confrontaron grandes dificultades para aislar de las plantas, el agente causal. Aunque en la goma amarilla que llena los vasos infectados podía verse lo que parecía ser un cultivo puro de pequeñas bacterias móviles, en los platillos de cultivo no aparecían bacterias de tipo semejante. Se determinó que este fracaso era la resultante de varios factores, entre los cuales los más importantes eran: 1) la ocurrencia de grandes números de bacterias no patógenicas, de rápido crecimiento, principalmente especies de **Pseudomonas**, en la baba que se encuentra entre las yaguas, tanto en las plantas sanas como en las enfermas; y 2) el muy lento desarrollo de las colonias del patógeno, aun sobre medios de cultivo favorables, y la completa inhabilidad del mismo para crecer, pasado del material infectado, sobre agar de papa-dextrosa, el medio de cultivo más usado por los fitopatólogos.

Estas dificultades fueron finalmente eliminadas por medio de la siguiente técnica: Pedacitos de vasos infectados de la parte superior del tallo, fueron disectados usando precauciones asépticas.

Estos pedacitos fueron sumergidos por pocas horas en pequeños volúmenes de agua estéril y las suspensiones bacteriales resultantes fueron vaciadas en platillos de Petri sobre un medio de agar favorable, como la peptona-sucrosa de Wilbrink (2) (Ashby, 1929). Por medio de esta técnica fue posible aislar, de cada una de

(2) La composición del agar de Wilbrink es la siguiente:

Sucrosa (o azúcar común de mesa)	2 gms.
Peptona (Fairchild o Bacto)	0.5 "
K ₂ HPO ₄	0.05 "
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.025 "
Agar (Bacto)	2.5 "
Agua para hacer	100 cc.
pH aproximadamente	6.6

las plantas enfermas estudiadas, cultivos prácticamente puros de pequeñas bacterias móviles que forman, solamente después de periodos de incubación de 7 a 10 días, pequeños colonias brillantes, húmedas, de color amarillo claro que se oscurece gradualmente pasando a un color amarillo anaranjado. La extremada lentitud con que se desarrollan estas colonias, del material vegetal infectado, debe ser destacada de nuevo, así como también debe serlo, la completa inhabilidad de estas bacterias para crecer sobre el agar de papa ácido de uso común.

Con el fin de asegurar la pureza de los cultivos se plantaron colonias representativas, en serie, dos o tres veces, y las colonias puras resultantes se usaron para la inoculación de las pruebas determinativas que se detallan enseguida.

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

El hecho de que este organismo bacterial móvil y de color amarillo es indudablemente la causa de la gomosis de la yerba Imperial fue demostrado infectando plantas con estos cultivos.

Para este fin se obtuvieron plantas de Imperial sanas en los campos de la Facultad, en Medellín. Se propagaron tanto por cepa como por tallos. Antes de sembrarlos se examinaron microscópicamente los tallos, para estar seguros de que los vasos estaban realmente libres de bacterias. Para las siembras se empleó suelo esterilizado.

Dos métodos de inoculación tuvieron buen éxito. El uno consistió en sumergir durante varias horas, en una suspensión acuosa de bacterias, los pedazos de cepa previamente recortados de raíces para facilitar la entrada del patógeno. El otro método consistió en punzar las hojas jóvenes con una aguja cargada de bacterias. En ambos casos ocurrieron infecciones típicas cuando se inculó la bacteria amarilla, en tanto que las plantas no inoculadas, tratadas del mismo modo, permanecieron sanas.

No puede haber duda de que la bacteria amarilla es la causa de la gomosis, puesto que está invariablemente presente en las plantas enfermas y después de aislada en cultivo **puro**, demostró ser capaz de reproducir la enfermedad, una vez inoculada en yerba Imperial sana.

DESCRIPCION DEL PATONEGO

Las pruebas determinativas del patógeno se efectuaron usando métodos como los detallados en el **Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria**. (Comm. S. A. B., 1923-1949), y en otras publicaciones de uno de los autores (Starr, 1947; Starr y Pirone, 1942). Para estas pruebas se usó una colección de 10 a 20 aislamientos típicos.

Morfología

El patógeno de la yerba Imperial es una bacteria con forma de varilla. En la goma del tallo infectado y en cultivos viejos, es relativamente pequeña, cerca de una micra de largo y alrededor de 0.4 micras de ancho; en cultivos jóvenes y especialmente en medio de acetato de plomo Bacto (Difco, 1948) que contiene tiosulfato de sodio o en medio de tioglicolato Bacto, las células en división tienen cerca de 3 micras de largo por 0.6 de ancho. Según el Dr. W. J. Dowson de la Botany School, Cambridge, Inglaterra, quien amablemente examinó los cultivos, "la apariencia general, fueran vivas montadas en agua o coloreadas con carbol tionina azul, era de células delgadas relativamente largas", la observación se efectuó de cultivos de 3 días de edad, en agar sucrosa-sulfito de Wilbrink.

La movilidad es regularmente observada en cultivos jóvenes y en preparaciones hechas directamente de goma amarilla fresca de los vasos de las plantas infectadas. Sin embargo, los cultivos más viejos generalmente no son móviles, pero casi a la hora de pasados a caldo fresco de levadura-dextrosa, readquieren el movimiento activo. Mediante el método de Liefson (Comm. S. A. B., 1923-1949) puede demostrarse la presencia de un solo flagelo polar alargado o por la tinción de Morton, del azul-noche (Dawson, 1949).

En la mayoría de los cultivos se ven cápsulas, siendo especialmente prominentes en los cultivos más viejos en medios de azúcar. No se forman endosporos.

El patógeno es gram-negativo cuando se tiñe con el gram, modificado por Hucker, y se compara en la misma placa con bacterias de reconocida reacción gram.

El examen efectuado por el Dr. Dowson mostró que "trozos de cualquier edad entre 3 y 10 días teñidos con carbol-fuchina fuerte mostraban una estructura arrosariada que al inspeccionarse de cerca recordaba a las estructuras cromáticas en división descritas por C. F. Robinow (1945).

Características culturales

Colonias en agar de extracto de levadura.—(1% extracto de levadura Bacto; 2.5% Bacto-agar; pH 6.9). El crecimiento es muy lento; pequeñas colonias superficiales aparecen solamente después de 6 u 8 días. Estas colonias son lenticulares, de color amarillo claro, y con menos de 1 milímetro de longitud, aún después de una larga incubación. Las colonias que crecen debajo del agar cerca al vidrio, son prácticamente incoloras, planas y redondas, y no mayores de 1 milímetro de diámetro. Las colonias superficiales son

redondas, translúcidas, amarillas muy pálidas, brillantes y usualmente inferiores a 1 milímetro de diámetro.

Colonias en agar peptona-sucrosa de Wilbrink.—El crecimiento en este medio también es lento, apareciendo las colonias solamente después de una semana; sin embargo, el crecimiento es eventualmente denso. Las colonias sub-superficiales son semejantes a las del agar de extracto de levadura aunque quizás de amarillo más pálido. Las colonias superficiales son redondas, convexas, opacas, amarillo claro vivo, tornándose amarillo naranja, húmedas y gomosas, pero usualmente no viscidas, y tienen entre uno y cuatro milímetros o más de diámetro.

Colonias en agar de papa-dextrosa.—(pH 5.2). No hay crecimiento del patógeno del Imperial en este medio. Se encontró que esta incapacidad era debida al bajo pH a que este medio se usa ordinariamente; véase la sección siguiente sobre los pH límites de crecimiento.

Crecimiento en tubos con agar de extracto de levadura.—Moderado, húmedo, brillante, filiforme, amarillo claro vivo después de una semana.

Crecimiento en tubos con agar peptona-sucrosa.—Abundante, húmedo, gomoso, extendido, amarillo claro vivo, volviéndose amarillo naranja. El crecimiento es lento al principio pero eventualmente se vuelve muy denso.

Crecimiento en rebanadas de papas esterilizadas.—Crecimiento moderado pero lento de la mayoría de los "strains"; ocasionalmente algunos de estos no crecen en ciertas tandas de papa, probablemente por causa de un pH limitante. Amarillo naranja, brillante, no extendiéndose, hay digestión de almidón bajo la colonia.

Crecimiento en caldo de extracto de levadura-dextrosa.—(1% de extracto de levadura Bacto, 1% de dextrosa, pH 6.8). A los dos días o cerca de ese tiempo aparece una ligera turbidez y permanece en forma moderada. Después de casi dos semanas se desarrolla una película gomosa amarilla y un anillo.

Límites de temperatura para el crecimiento.—Usando caldo de extracto de levadura hay un crecimiento lento y escaso a los 5°C y 10°C; crecimiento moderado a bueno a 15, 20 y 25°C; excelente crecimiento rápido a 30°C y ninguno a 37°C. (con excepción de dos strains que crecieron muy lentamente), ni a 43°C.

Relaciones con el oxígeno.—El organismo es un aerobio como lo demuestra su crecimiento únicamente en los 1 a 2 milímetros superiores de cultivos de agar peptona-sucrosa, sacudidos,

Características bioquímicas

Reducción de nitratos.—No hay reducción a nitrato ni a nitrógeno gaseoso cuando cultivos en caldo de nitrato se prueban después de 3, 7 y 15 días con los reactivos del ácido sulfanílico y **alfa-naftol**, seguidos de polvo de zinc.

Producción de indol.—En caldo de triptona Bacto al 1% y pH 7.0 no hay formación de indol después de 3, 7 o 15 días según determinación con el reactivo de Kovacs.

Acción en gelatina.—Crecimiento filiforme amarillo, pero no licuefacción de la gelatina Bacto, a 20 o 30°C, después de dos meses.

Acción en almidón.—Fuerte poder amilolítico demostrado en platillos con agar-almidón (1% extracto de levadura, 1% almidón soluble, 2% agar), después de 7 días, al inundar los platillos con yodo.

Acción en pectato.—Hay crecimiento y formación de una reacción alcalina, pero no hay licuefacción del gel de pectato, después de 2 meses de cultivo en el medio de levadura-pectato (Starr, 1947).

Acción en leche-litmus.—Sin cambios por varias semanas después de la inoculación; después de dos meses se presenta un crecimiento superficial amarillo bastante denso, y la mayoría de los cultivos muestran una reacción alcalina; sin embargo, en unos pocos cultivos solamente es visible la más pequeña traza de digestión, no mostrando las restantes, signos de peptonización. No se forma cuajada.

Habilidad lipolítica.—En agar de spirit blue-cotonsseed oil (Starr y Burkholder, 1942), hay un crecimiento moderado, pero no se observa acción sobre la grasa.

Efectos del pH sobre el crecimiento.—Como ya se anotó no hay crecimiento en agar ordinario de papa-dextrosa, de pH 5.2. Cuando el pH del agar se cambió a 5.8 la mayoría de estos cultivos creció. A pH 6.6 y 7.6 todos los cultivos se desarrollaron muy bien formando un crecimiento denso amarillo, mucoso, similar al mostrado por cultivos de **Xanthomonas** fitopatogénicas en el agar ácido común de papa-dextrosa.

Tolerancia al cloruro de sodio.—Usando el método y el medio dados por Burkholder y Starr (1948), la bacteria de la yerba Imperial es relativamente intolerante a la concentración salina. Crece bien con 0.5% de NaCl, moderadamente con 1% de NaCl, y es incapaz de crecer en presencia de 1.5% de NaCl (con excepción de dos strains que producen un escaso crecimiento a esta concentración de sal).

Producción de ácido sulfhídrico.— En la superficie de cultivos de tubo (slants) con agar de acetato de plomo Bacto, hay una ligera o dudosa producción de H_2S demostrada por el pardeamiento del medio. Como no hay crecimiento bajo la superficie en cultivos clavados (stabs) en este medio, la formación de H_2S en cultivos clavados no puede demostrarse.

Requerimientos nutritivos mínimos.—El patógeno no crece en el medio basal de amonio, glucosa y sales (Starr, 1946), ni cuando se añade un suplemento vitamínico. Crece, lentamente al principio, pero eventualmente muy bien cuando el medio basal es suplementado con 0.5% de hidrolizato caseínico libre de vitamina. El hidrolizato de caseína no puede reemplazarse por el glutamato de sodio, metionina, o una mezcla de estos dos aminoácidos. No se intentaron más esfuerzos para identificar los componentes aminoácidos activos de la caseína hidrolizada. No hay respuesta a vitaminas en el medio de hidrolizato caseínico.

Rección tyrosinasa.—Hay crecimiento lento pero no reacción tyrosinasa en el medio de hidrolizato caseínico al cual se ha agregado tyrosina.

Utilización de azúcares.—Las determinaciones de habilidad para utilizar ("fermentar") varios carbohidratos y sustancias relacionadas, se condujeron en tubos de fermentación Durham, empleando el medio de hidrolizato caseínico con un 0.1 por ciento de extracto de levadura, un indicador de pH (mezcla de cresol rojo y bromo-cresol púrpura) y 0.1 por ciento del azúcar esterilizado al filtro. Generalmente estas pruebas fueron insatisfactorias por causa del lento crecimiento, y también porque las reacciones de pH ácido esperadas de los azúcares, fueron algunas veces oculadas por sustancias alcalinas producidas por las bacterias, del hidrolizato caseínico. Varias repeticiones de estas pruebas, bajo condiciones culturales diferentes no han suministrado sin embargo una solución a este problema. Nuestros resultados se presentan por tanto ahora, sujetos a esta incertidumbre. A juzgar por la reacción ácida y el aumentado crecimiento en un mes, solamente fueron definitivamente utilizadas la sucrosa, la trehalosa y probablemente la dextrosa. No se pudo demostrar la producción de ácido de las siguientes fuentes de carbono: dextrina, dulcitol, esculina, glicerol, inulina, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, salicina y sorbitol. No queremos implicar que el patógeno del Imperial sea incapaz de utilizar ninguna de estas sustancias, o todas ellas, sino únicamente que no pareció que las utilizara bajo las condiciones empleadas en nuestros ensayos. Trabajos posteriores pueden hacer modificar esta lista.

TAXONOMIA Y NOMENCLATURA

El problema de dar nombre a cualquier bacteria fitopatogénica "nueva" es perplejo. Cuando se consideran todas sus características, el patógeno del pasto Imperial parece pertenecer al género **Xanthomonas**. Sin embargo, hay desviaciones de la descripción de este género según lo dan en el **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (Breed, Murray, and Hitchens, 1948). Posiblemente la principal desviación concierne a la característica de que "usualmente las proteínas son rápidamente digeridas" por las **Xanthomonas**, mientras que el patógeno del Imperial no licua la gelatina ni peptoniza las proteínas de la leche. Sin embargo, el examen de la descripción original del género **Xanthomonas** (Dowson, 1939), revela que la actividad proteolítica no fue incluida como una característica genérica, e indudablemente, organismos incapaces de digerir la gelatina, han sido colocados en este género por Dowson (1949).

Una vez colocado el patógeno en el género **Xanthomonas**, confrontamos el otorgamiento de la denominación específica. Idealmente, la solución de este problema se ayudaría inoculando muchos huéspedes posibles para determinar la especificidad patogénica, pero esto no fue practicable. Afortunadamente para los fines taxonómicos, algunas de las características culturales y bioquímicas del patógeno de la yerba Imperial son muy diferentes de los de la mayoría de las especies de las **Xanthomonas**; por ejemplo:

- 1.—La ya mencionada inhabilidad para digerir las proteínas de la leche y la gelatina.
- 2.—La falta de acción lipolítica en el agar "spirit blue".
- 3.—Los requerimientos nutritivos mínimos algún tanto exactos.
- 4.—La incapacidad para crecer en agar de papa-dextrosa ácido, de pH 5.2.

El patógeno del pasto Imperial se parece bastante estrechamente a la bacteria del escaldado de la hoja de la caña de azúcar, **Xanthomonas albilineans**. Sin embargo, la literatura (Martin, Carpenter, y Weller, 1932), sugiere puntos de diferencia entre estos dos microbios, algunos de los cuales hemos comprobado mediante un verdadero estudio de laboratorio de tres cultivos auténticos (3) de la bacteria de la caña de azúcar. Entre estas diferencias deseamos realizar las siguientes:

- 1.—**X. albilineans** no ataca el almidón; todos los **strains** del patógeno de la yerba Imperial son capaces de descomponer activamente el almidón.

(3) Dos cultivos (de A. 154; de A. 166) del Dr. Spencer Correa de Arruda, Sao Paulo, Brasil; y un cultivo (Dowson 235) del Dr. W. J., Dowson, Cambridge, England.

- 2.—Mientras que el ácido glutámico más metionina satisfacen los requerimientos nutritivos mínimos de *X. albilineans* (Véase Starr, 1946), el patógeno del Imperial necesita algunos otros aminoácidos, todavía no identificados.

Es por supuesto posible, que, tales diferencias culturales no sean significativas desde el punto de vista de la diferenciación de esta especie, y que la bacteria de la yerba Imperial sea en realidad idéntica a la *X. albilineans*. En apoyo de esta idea, encontramos que Orian 1942, ha infectado con éxito varias gramíneas con los organismos del escaldado de la hoja de la caña de azúcar, y queda dentro de los límites de la posibilidad el que *X. albilineans* pueda infectar la yerba Imperial. Experimentos de inoculación cruzada serían muy instructivos sobre este punto.

En todo caso, esta considerable similitud debe tenerse en mente en conexión en el control de ambas enfermedades. Aunque la enfermedad del escaldado de la hoja de la caña de azúcar ocurre en el Brasil (Arruda, 1944), no ha sido que nosotros sepamos, registrada en Colombia. Una búsqueda específica de esta enfermedad deberá hacerse a la luz del descubrimiento de Orian de que el patógeno puede infectar varias gramíneas cultivadas, algunas de las cuales son importantes en la agricultura colombiana. La situación inversa es también peligrosa; esto es, la posibilidad de que el patógeno del Imperial pueda extenderse a la caña de azúcar y a otras gramíneas colombianas. Todos estos puntos deben comprobarse mediante pruebas de inoculación apropiadas y pueden traer un futuro cambio de nomenclatura.

Si por el momento desechamos las especulaciones precedentes y dependemos de los hechos reales que ahora conocemos, es nuestra opinión que la bacteria de la yerba Imperial debe ser considerada al presente como una especie distinta. Por tanto, sugerimos que sea llamada *Xanthomonas axonoperis* sp. nov.

RESUMEN:

De casos típicos de la enfermedad de la gomosis del pasto Imperial en Colombia, se aisló en cultivo puro una bacteria, la cual se probó que era la causa de esta seria enfermedad. Se da una completa descripción de este patógeno. Sobre la base de pruebas determinativas parece razonable que esta bacteria sea considerada al presente como una especie distinta y se sugiere para ella el nombre de *Xanthomonas axonoperis* sp. nov.

X. axonoperis, es más semejante en sus características culturales y bioquímicas a *X. albilineans*, la causa de la enfermedad del escaldado de la hoja "de Java", de la caña de azúcar. A causa de esta semejanza, el problema de la posible infectividad cruzada debe examinarse cuidadosamente.

ENGLISH SUMMARY

From typical cases of the "gummosis" disease of pasture grasses in Colombia, there was isolated in pure culture a bacterium which was proven to be the cause of this serious disease. A thorough description of this pathogen is presented. On the basis of determinative tests, it seems reasonable that this bacterium should be considered for the present as a distinct species, and the name *Xanthomonas axonoperis* sp. nov. is suggested.

X. axonoperis is rather similar in cultural and biochemical characteristics to *X. albilineans*, the cause of the "Java" leaf scald disease of sugar cane. Because of this similarity, the problem of possible cross-infectivity must be carefully examined.

LITERATURA CITADA

- Arruda, S. C. A "escaldadura das folhas", doenca da cana de acucar, nova no Brasil. Arquivos do Instituto Biologico 15: 141-196. 1944.
- Ashby, S. F. The bacterium which causes gumming disease of sugar-canes with notes on two other bacterial disease of the same host. Tropical Agric. (Trinidad). 6: 135-138. 1929.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Hitchens, A. P. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. 1948.
- Burkholder, W. H., & Starr, M. P. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopath. 38: 494-502. 1948.
- Committee on Bacteriological Technic, Society of American Bacteriologists. Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria. Biotech Publications, Geneva, N. Y. 1923-1949.
- Difco Laboratories. Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents. Difco, Detroit. 1948.
- Dowson, W. J. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens, Zentral Bakt. Parasitenk., Abt. II, 100: 177-193. 1939.
- Dowson, W. J. Manual of Bacterial Plant Diseases. A. and C. Black, London. 1949.
- Garcés O., Carlos. Informe preliminar sobre la gomosis de los pastos Micay e Imperial o Gramalote en Colombia. Revista Fac. Nal. Agronomía de Medellín, Colombia 7: 1-24. 1947.
- Martin, J. P., Carpenter, C. W., and Weller, D. M. Leaf scald disease of sugar cane in Hawaii. The Hawaiian Planters Record. 36: 145-196. 1929.

- Orian, G. Artificial hosts of the sugar cane leaf scald organism. *Revue Agricole de l'île Maurice* 21: 285-304. 1942.
- Robinow, C. F. Nuclear Apparatus and Cell Structure of Rod-Shaped Bacteria. Addendum to Dubos, R. J., *The Bacterial Cell*. Harvard University Press, Cambridge. 1945.
- Starr, M. P. The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of the *Xanthomonas*. *Journ Bact.* 51: 131-143. 1946.
- Starr, M. P. The causal agent of bacterial root and stem disease of guayule. *Phytopath.* 37: 291-300. 1947.
- Starr, M. P., & Burkholder, W. H. Lipolytic activity of phytopathogenic bacteria determined by means of spirit blue agar and its taxonomic significance. *Phytopath.* 32: 598-604. 1942.
- Starr, M. P., & Pirone, P. P. *Phytomonas poinsettiae* n. sp., the cause of a bacterial disease of poinsettia. *Phytopath.* 32: 1076-1081. 1942.