

Le flétrissement bactérien – une maladie mystérieuse des graminées fourragères

Roland Kölliker¹, Fabienne Wichmann^{1,2}, Frank-Jörg Vorhölter³, Constanze Conradin¹, Sonja Reinhard¹, Beat Boller¹ et Franco Widmer¹

¹Station de recherche Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, 8046 Zurich, Suisse

²Yale University, Molecular, Cellular and Developmental Biology, 06511 New Haven, CT, USA

³Université de Bielefeld, CeBiTec, 33615 Bielefeld, Allemagne

Renseignements: Roland Kölliker, e-mail: roland.koelliker@art.admin.ch, tél. +41 44 377 7345



Figure 1 | Des coupes fréquentes peuvent favoriser le flétrissement bactérien.

(Photo: Cornel Stutz, ART)

Introduction

Le flétrissement bactérien est une des principales maladies de nos graminées fourragères et peut entraîner des pertes de rendements allant jusqu'à 20 % (Egli et Schmidt 1982). La maladie est causée par la bactérie *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (Xtg). Cet agent pathogène est le pathovar qui infecte le plus fréquemment les graminées fourragères. Il contamine différentes espèces comme *Lolium multiflorum*, *L. perenne*, *Festuca pratensis*, *Phleum pratense* et *Poa pratensis*. La maladie se transmet principalement par des lésions tissulaires. C'est pourquoi des espèces comme *L. multiflorum*, qui sont coupées souvent, sont particulièrement exposées (fig. 1).

Comme la protection phytosanitaire n'est généralement pas souhaitée dans les herbages et qu'aucun moyen efficace n'est connu, la sélection de variétés résistantes ou tolérantes reste la seule possibilité de contrôler la maladie. Bien que la résistance des nouvelles variétés se soit considérablement accrue grâce à une sélection systématique (Hirschi et al. 2010), l'amélioration continue de la résistance au flétrissement bactérien reste un enjeu de taille (Boller et al. 2005). Pour avoir à l'avenir également des variétés de première qualité, très résistantes dans les futures conditions environnementales, il est indispensable d'améliorer sans cesse les processus de sélection. Pour ce faire, il faut connaître en détail les interactions entre le pathogène et la plante. Le but de nos recherches

est de comprendre le contrôle génétique de la résistance dans le cas de *L. multiflorum* (*Lm*) et de la virulence de *Xtg*, c'est-à-dire l'interaction *Lm* x *Xtg*, afin de développer des outils de génétique moléculaire pour permettre une sélection efficace des résistances.

Gènes de résistance de *L. multiflorum* (*Lm*)

Dans une population dite de cartographie de *Lm*, basée sur le croisement d'une plante sensible de la variété Adret et d'une plante résistante du programme de sélection de la station de recherche Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, la résistance a été contrôlée par un ou quelques loci du génome (Studer *et al.* 2006). Sur le terrain comme en serre, un locus de ce type présentait entre 43 et 84 % de la résistance totale. Ceci indique en général une résistance qualitative, spécifique, dans laquelle un gène de résistance de la plante interagit avec des facteurs de virulence hautement spécifiques d'isolats bactériens déterminés (Jones et Dangl 2006). Il est cependant intéressant de constater qu'une comparaison de plantes *Lm* infectées et non infectées n'a permis d'identifier aucune différence dans l'expression des gènes de résistances spécifiques connus (Wichmann *et al.* 2011a). Par contre, différents gènes importants dans les réactions de résistance non spécifiques se sont davantage exprimés dans les plantes infectées. Le premier objectif de l'étude était donc de savoir si l'interaction *Lm* x *Xtg* était une résistance spécifique ou non.

Facteurs de virulence de *X. t. pv. graminis* (*Xtg*)

Pour coloniser une plante, éviter la réaction de son système immunitaire et prélever ses éléments nutritifs, les pathogènes produisent ce qu'on appelle des protéines effectrices, qui sont issues de systèmes de sécrétion spécifiques. Les composants de ce système sont appelés facteurs de virulence. Chez les xanthomonades, le système de sécrétion de type 3 (T3SS) est responsable de la sécrétion des différentes protéines effectrices (Büttner et Bonas 2010), qui font souvent partie d'une identification spécifique de la race par les pathogènes spécifiques, avec réaction de résistance ultérieure. Bien qu'il existe des similitudes entre les facteurs de virulence parmi les xanthomonades, les mécanismes de sécrétion et les protéines effectrices varient considérablement d'une espèce et d'un pathovar à l'autre (White *et al.* 2009). Comme *Xtg* n'est apparenté que de loin aux espèces caractéristiques de *Xanthomonas*, on peut s'attendre à ce que les facteurs de virulence se différencient considérablement eux aussi. Le deuxième objectif de l'étude consistait à savoir si le T3SS est indispensable à la virulence de *Xtg*. Nous souhaitons également caractériser les différents composants du système T3SS.

Résumé

Le flétrissement bactérien des graminées fourragères est causé par la bactérie *Xanthomonas translucens* *pv. graminis* (*Xtg*) et occasionne de lourds dommages dans les prairies et les pâturages. Pour permettre de sélectionner des variétés résistantes, nous étudions les principes génétiques de l'interaction entre les bactéries et les plantes. Il s'est avéré que cette interaction présentait certaines particularités par rapport à d'autres maladies causées par des espèces de *Xanthomonas* touchant le riz, la tomate ou le citron. Aucun signe d'interaction spécifique n'a pu être trouvé entre les isolats de bactéries et les phytogénotypes, interaction typique des gènes de résistance classiques. Le séquençage du génome *Xtg* a montré que ce pathogène possédait un nombre extraordinairement important de séquences d'insertion. De plus, l'organisation d'un facteur de virulence capital se distingue fondamentalement des autres espèces de *Xanthomonas*. Bien que la suppression spécifique de ce facteur de virulence ait conduit à une large perte de la virulence, les bactéries ont tout de même pu se multiplier dans la plante. Ces découvertes apportent des éléments précieux pour le développement de méthodes de sélection efficaces.





Figure 2 | Infection artificielle à l'aide de ciseaux plongés dans la suspension bactérienne. (Photo: ART)

Matériel et méthodes

Caractérisation de la résistance de *Lm*

Un essai en serre a été organisé afin d'étudier s'il existe une interaction spécifique entre différents génotypes de *Lm* et des isolats de *X. t. pv. graminis*. Pour l'infection artificielle, six isolats bactériens (*Xtg3*, *Xtg5*, *Xtg8*, *Xtg9*, *Xtg19*, *Xtg29*) basés sur une virulence, une origine et une diversité génétique différentes ont été sélectionnés (Kölliker *et al.* 2006). Le matériel végétal se composait de soixante-deux génotypes de *Lm* différents sélectionnés dans des variétés, des écotypes et des populations expérimentales présentant une résistance variable au flétrissement bactérien (Wichmann *et al.* 2011b). Dix-huit clones de chaque génotype ont été isolés et plantés dans la serre à raison de 372 plantes en quatre répétitions. Au bout de huit semaines, les plantes ont été infectées avec chacun des six isolats bactériens. Les symptômes de la maladie ont été évalués 15, 21 et 28 jours après l'infection. L'infection a été pratiquée selon la méthode décrite par Rechsteiner *et al.* (2006), en coupant la plante à l'aide de ciseaux plongés dans une suspension bactérienne (fig. 2). A partir d'une échelle d'estimation allant de 1 (plante saine) à 9 (plante morte), la zone située sous la courbe de progression de la maladie (en anglais: *area under disease progress curve*, valeur AUDPC) a été calculée et utilisée pour l'évaluation statistique.

Caractérisation de la virulence de *X.t. pv. graminis*

L'importance de T3SS comme facteur de virulence de *Xtg* a été étudiée en deux temps. Premièrement, un isolat de *Xtg* a été modifié de façon à ce qu'un gène important pour la régulation de T3SS lui fasse défaut. Ces mutants ont été testés afin de déterminer leur capacité à causer les symptômes de la maladie et leur aptitude à survivre dans la plante. Deuxièmement, l'ensemble du génome de *Xtg* a été séquencé et étudié afin d'identifier la présence de composants de T3SS. Pour ces essais, on a utilisé l'isolat standard d'ART, à savoir *Xtg29* (Kölliker *et al.* 2006).

Le gène *hrpG* est un élément régulateur important du T3SS chez les xanthomonades (Büttner et Bonas 2010). A partir de la séquence *hrpG* de *Xtg29*, on a créé une construction génétique $\Delta hrpG$, composée uniquement de séquences flanquantes, mais pas de véritables séquences génétiques de *hrpG*. Cette construction a été clonée dans le vecteur pCC101 (fig. 3; Wichmann *et al.* 2012). *Xtg29* a été transformé par électroporation et double recombinaison homologue. On a ensuite vérifié que les mutants obtenus étaient des mutants $\Delta hrpG$ (sans la séquence *hrpG*) à l'aide d'une réaction en chaîne par polymérase. La virulence des mutants et du type sauvage *Xtg29* a été testée en quatre répétitions sur un génotype *Lm* très sensible de la variété Adret, selon la méthode décrite plus haut. De surcroît, l'aptitude à la survie dans la plante a été étudiée dans le cadre de deux expériences. Pour ce faire, 0, 4, 7 et 14 jours après l'infection (expérience 1), ainsi que 14, 17, 21 et 28 jours après l'infection (expérience 2), des feuilles de plantes infectées ont été recueillies, stérilisées superficiellement et placées sur des plaques d'Agar. Le nombre de colonies développées par gramme de matériel végétal a été déterminé après sept jours d'incubation à 28 °C.

Une ébauche du génome *Xtg29* a été réalisée à l'aide du séquençage 454 (Roche). L'ADN et les séquences protéiques des éléments du T3SS ont été comparés avec des séquences d'autres xanthomonades à l'aide de BLASTn, BLASTx et BLASTp (Altschul *et al.* 1990).

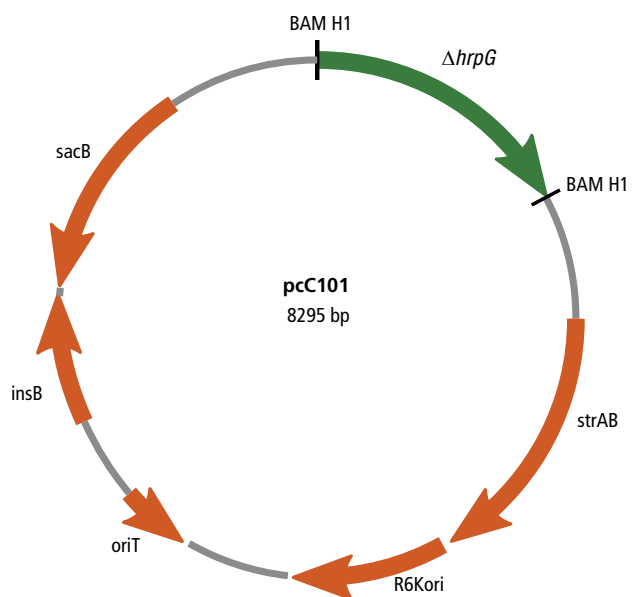


Figure 3 | Vecteur avec le fragment $\Delta hrpG$ utilisé pour la mutation de *Xtg29*.

Résultats

Grande variabilité de la résistance

Les notes moyennes de l'estimation variaient de $2,67 \pm 0,97$ (15 jours après l'infection) à $3,66 \pm 1,16$ (28 jours après l'infection). Aucune résistance complète n'a été observée sur aucune plante. Une comparaison des valeurs AUDPC des six isolats a montré que la résistance des génotypes de *Lm* tout comme la virulence des isolats de *Xtg* variait considérablement. En ce qui concerne la capacité à causer les symptômes de la maladie, l'isolat *Xtg9* était celui qui affichait la plus grande virulence et l'isolat *Xtg3* celui qui affichait la virulence la plus faible, tandis que *Xtg29* présentait une virulence moyenne à élevée (fig. 4). Les génotypes G-04 (écotype), L-03 (variété Axis) et B-01 (variété candidate) étaient ceux qui avaient la résistance moyenne la plus élevée contre les six isolats bactériens avec des valeurs AUDPC comprises entre 30,1 et 31,4. Les trois génotypes K-01 à K-03 (variété Adret) présentaient la résistance moyenne la plus basse avec des valeurs AUDPC de 77,3 à 83,7. Une répartition des génotypes en trois catégories, sensible (AUDPC ≥ 60), moyennement sensible ($60 < \text{AUDPC} < 39$) et résistant (AUDPC ≤ 39) a montré que seuls deux génotypes étaient résistants à un ou plusieurs isolats tout en étant sensibles à d'autres isolats. Les 60 autres génotypes *Lm* présentaient soit la même réaction à tous les isolats,

Tableau 1 | Analyse de variance de AUDPC (zone située sous la courbe de progression de la maladie) valeurs de 62 génotypes *L. multiflorum* (*Lm*) ayant été infectés par six isolats *X. t. pv. graminis* (*Xtg*) (tiré de Wichmann et al. 2011b)

Source de variation	DL	MC	Valeur F
Répétition	3	4725	62,94***
Génotype <i>Lm</i>	61	2941	39,18***
Isolat <i>Xtg</i> Isolat	5	999	13,31***
Génotype <i>Lm</i> x isolat <i>Xtg</i>	305	63	0,95 ^{ns}
Erreur	1113	75	

*** $P < 0,001$, ^{ns} $P \geq 0,05$

soit se distinguaient tout au plus pour une catégorie de résistance. L'influence des génotypes *Lm* tout comme celle des isolats *Xtg* étant toutefois hautement significative statistiquement parlant, il n'a pas été possible d'identifier une interaction significative entre les génotypes de *Lm* et les isolats *Xtg* (tabl. 1).

Signification et composants de T3SS du type *Xtg*

Une double recombinaison homologue avec le vecteur pCC101 (fig. 2) a permis de créer un mutant $\Delta hrpG$, qui ne peut plus produire la protéine régulatrice HrpG. La méthode RCP a permis de montrer que ce mutant ne possédait pas la séquence du gène *hrpG*. Dans leur croisance en milieu Agar, les mutants ne se distinguaient pas

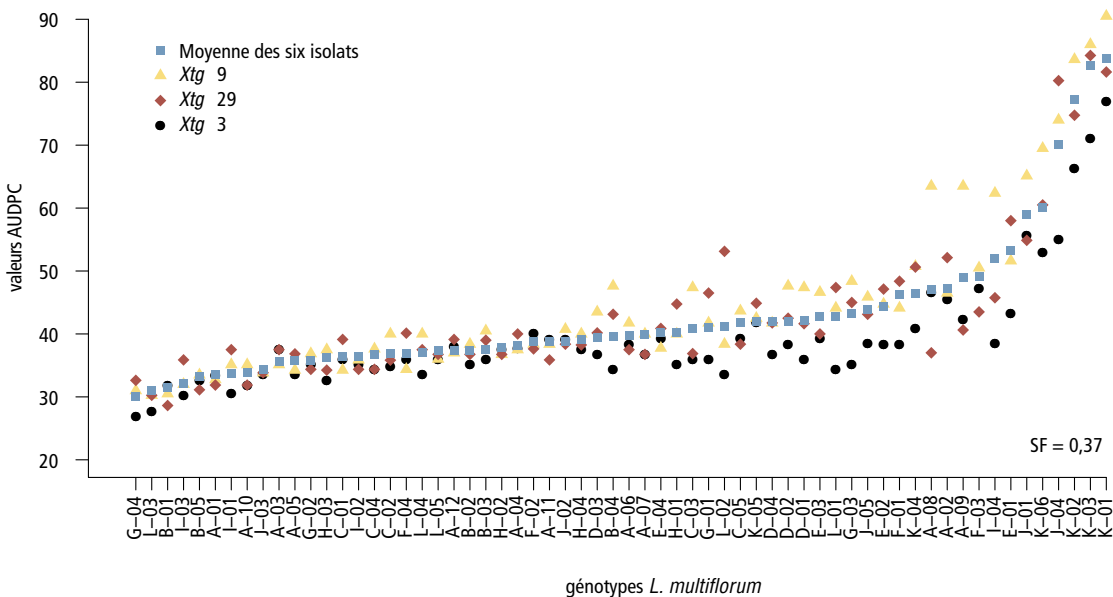


Figure 4 | Résistance moyenne de 62 génotypes *Lm* à six isolats *Xtg* et aux isolats *Xtg3*, *Xtg9* et *Xtg29* (selon Wichmann et al. 2011b).

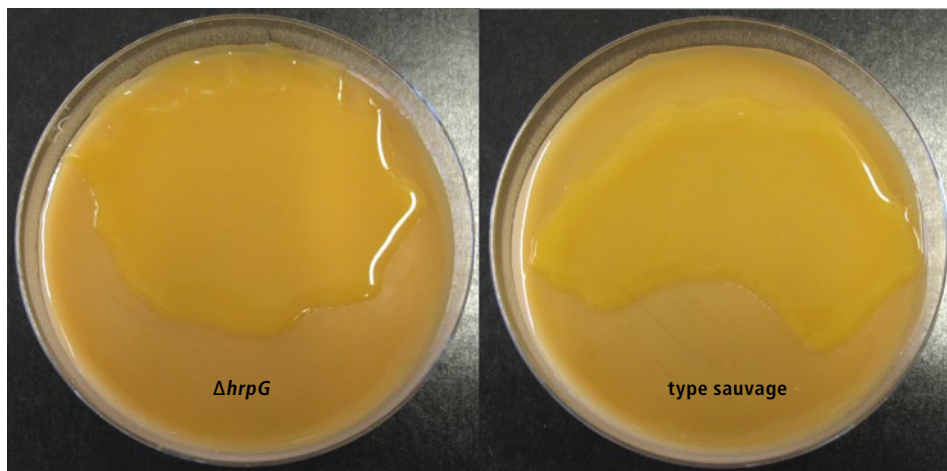


Figure 5 | Forme de croissance des mutants $\Delta hrpG$ et du type sauvage *Xtg29* sur agar.

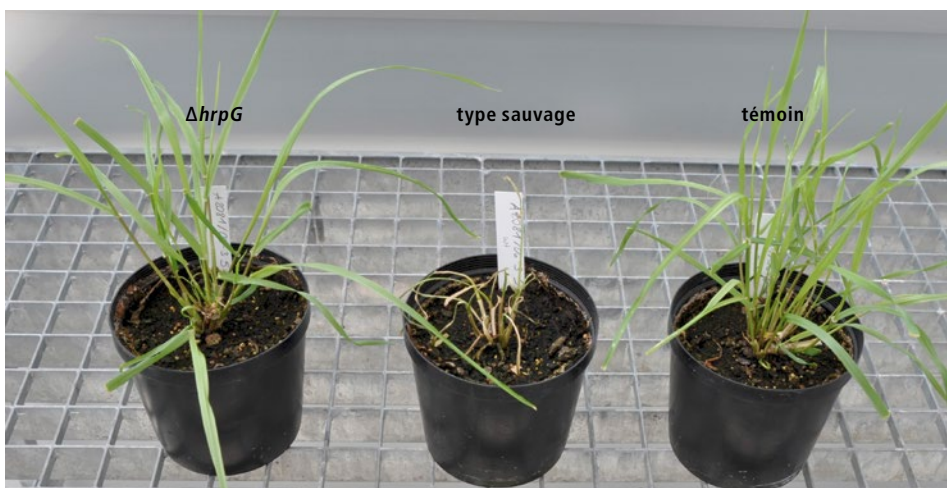


Figure 6 | Symptômes de maladie causés par le type sauvage *Xtg29*; aucun symptôme clair sur le mutant $\Delta hrpG$ et le témoin H_2O .

du type sauvage *Xtg29* (fig. 5). Par contre, le mutant $\Delta hrpG$ ne causait pas ou très peu de symptômes de la maladie sur les géotypes *Lm* sensibles (fig. 6). Tandis que les symptômes causés par le type sauvage avaient une note de résistance de $3,25 \pm 1,71$ (7 jours après l'infection) à $5,5 \pm 1,73$ (28 jours), les valeurs du mutant $\Delta hrpG$ étaient comprises entre $1,00 \pm 0,58$ et $2,50 \pm 0,58$ (fig. 7). Afin de constater si les mutants étaient en mesure de survivre dans la plante, on a procédé à des rétro-isolations. Six heures après l'infection (jour 0), la densité de population dans les plantes infectées par $\Delta hrpG$ étaient 10 % plus basse que dans les plantes infectées par le type sauvage (fig. 8). Jusqu'au jour 7, la densité a augmenté considérablement pour les deux isolats, mais pour $\Delta hrpG$, qui affichait une valeur $8,51 \pm 0,50$ \log_{10} , elle était d'environ 55 % plus basse que pour le type sauvage ($9,31 \pm 0,20$). Dans la phase de développe-

ment ultérieur, la densité de population a eu tendance à baisser pour les deux isolats, sachant qu'une légère réaugmentation a été observée sur le type sauvage au bout de 21 jours (fig. 8).

Une analyse provisoire de la séquence du génome de *Xtg29* a permis d'estimer la taille du génome à 5,01 mégabases. Différents loci génétiques présentaient d'importantes similitudes par rapport à d'autres espèces de *Xanthomonas*. Les principaux composants connus de T3SS ont également été trouvés dans le génome *Xtg29* (fig. 9). Contrairement aux autres xanthomonades, les gènes régulateurs *hrpG* et *hrpX* se situent directement dans le cluster de gènes de *hrp* et non dans un cluster séparé (fig. 9). Une disposition semblable a été trouvée sur *Ralstonia solanacearum*, le responsable du flétrissement bactérien des morelles, où le *hrpB* correspond au *hrpX* des xanthomonades.

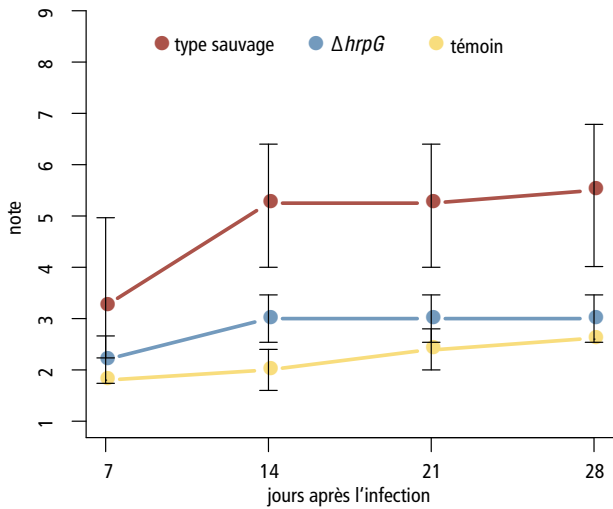


Figure 7 | Résistance d'un génotype *Lm* sensible infecté par le type sauvage *Xtg29*, le mutant $\Delta hrpG$ et le témoin H_2O . Les valeurs d'évaluation vont de 1 (résistant) à 9 (sensible).

Discussion et conclusions

Aucune indication claire de spécificité

Pour maîtriser durablement le flétrissement bactérien dans les systèmes herbagers, il est important de bien comprendre l'existence des mécanismes de résistance spécifiques. Comme la résistance spécifique n'est normalement efficace que contre certaines populations de

pathogènes, des modifications génétiques des pathogènes ou la migration de pathogènes d'autres régions peuvent rendre la résistance inefficace. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune influence significative de l'interaction entre les génotypes de *Lm* et les isolats *Xtg*. De plus, la résistance variait plus ou moins dans les mêmes plages pour tous les 62 génotypes étudiés, indépendamment des isolats de bactéries employés. C'est le signe très net que ce ne sont pas des gènes de résistance spécifiques, mais des mécanismes de résistance non spécifiques, qui sont les premiers responsables de la résistance de *Lm* au flétrissement bactérien. Les interactions spécifiques dans d'autres espèces de *Xanthomonas* sont souvent accompagnées d'une très grande diversité dans les populations pathogènes (Hu *et al.* 2007). Les populations de *Xtg* en revanche semblent se caractériser par une variabilité génétique extrêmement faible (Kölliker *et al.* 2006). La grande variabilité génétique de *Lm* associée au fait que les graminées sont souvent mises en place dans des mélanges comprenant des légumineuses et des herbacées, pourrait expliquer que la pression de sélection pour la formation d'interactions spécifiques soit trop faible. Même avec l'agent pathogène fongique *Puccinia coronata* (rouille couronnée), avec lequel des résistances spécifiques sont connues, des essais de plusieurs années sur plus de trente sites en Europe n'ont pas permis de montrer une variation régionale ou temporelle des races de champignons (Schubiger *et al.* 2010). ➤

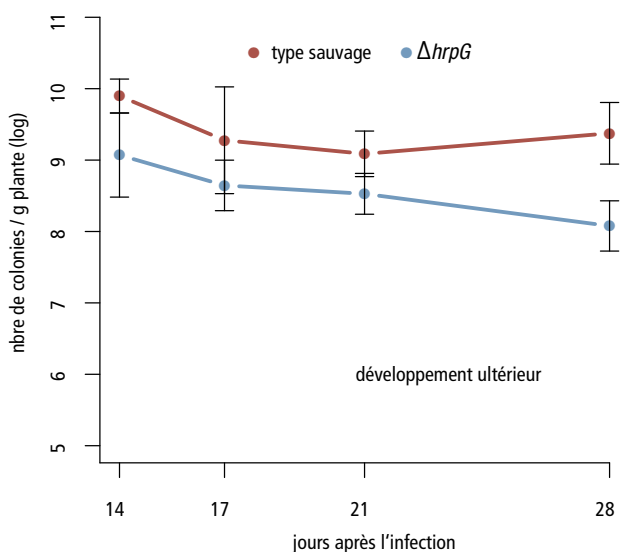
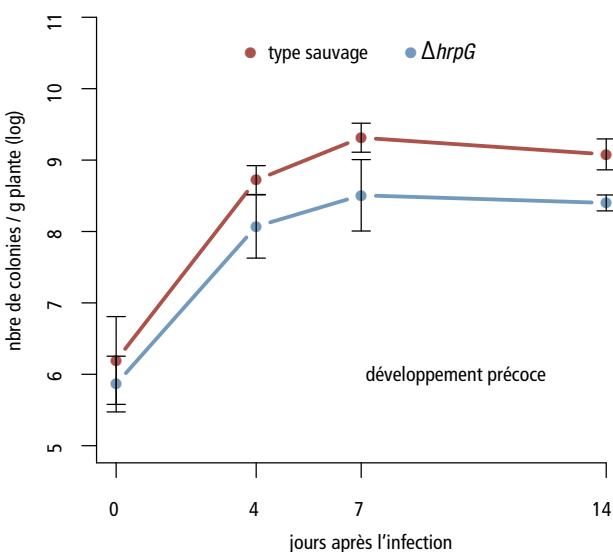


Figure 8 | Colonisation de *Lm* par le type sauvage *Xtg29* et le mutant $\Delta hrpG$ 0 – 14 jours (développement précoce) et 14 – 28 jours (développement ultérieur) après l'infection.

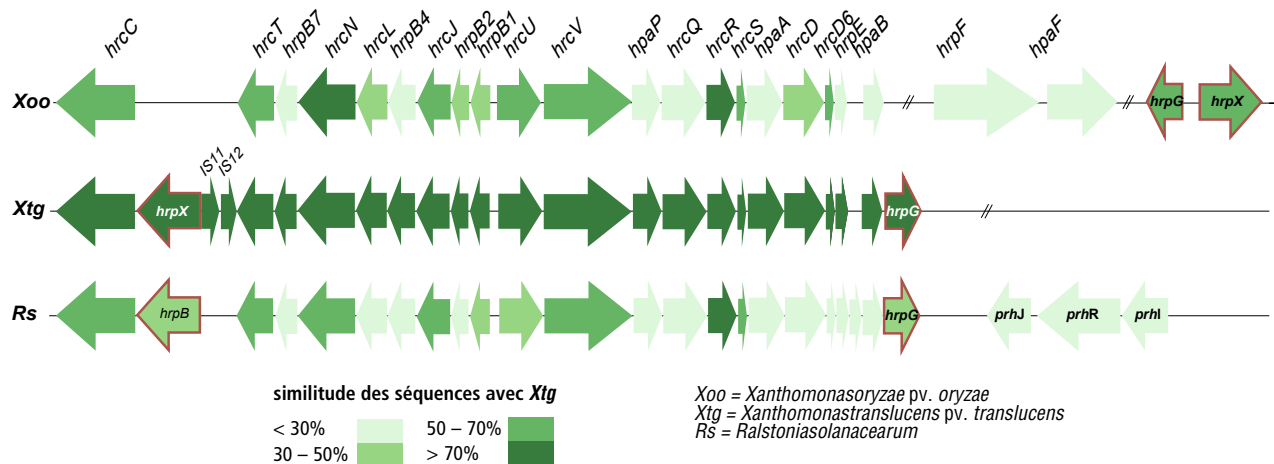


Figure 9 | Disposition et similitude des gènes *hrp*, *hrc* et *hpa* de *X. oryzae* pv. *oryzae* (pourriture bactérienne du riz), *Xtg29* (flétrissement bactérien des graminées fourragères) et *Ralstonia solanacearum* (flétrissement bactérien des morelles).

Virulence très amoindrie sans T3SS

L'absence de gène *hrpG* dans *Xtg* a considérablement freiné le développement de symptômes sur *Lm*. C'est le signe qu'un T3SS complet est nécessaire pour que le pouvoir pathogène et la virulence de *Xtg* s'expriment. Un développement très faible de symptômes sur les mutations de T3SS a également été décrit sur d'autres espèces de *Xanthomonas* (Büttner et Bonas 2010). Dans la présente étude, le mutant $\Delta hrpG$ de *Xtg* a déclenché des symptômes certes faibles, mais clairement différenciables du témoin. On ne peut donc pas exclure qu'à côté de T3SS d'autres facteurs, comme les polysaccharides extracellulaires ou des protéines issues du système de sécrétion de type 2, jouent un rôle dans la virulence. Les mutants $\Delta hrpG$ se sont développés presque aussi vite dans la plante que le type sauvage *Xtg29*, ce qui est étonnant. C'est la preuve que le T3SS n'est pas nécessaire à la survie de *Xtg*.

Xtg – une xanthomonade unique

La plupart des composants de T3SS ont été trouvés dans *Xtg*. La disposition des éléments régulateurs *hrpG* et *hrpX* est toutefois unique. Sur toutes les autres espèces de *Xanthomonas* séquencées, ces gènes se situent nettement en dehors du cluster de gènes *hrp*. Cette disposition spéciale permet de supposer une possible similitude des mécanismes de virulence avec *Ralstonia solanacearum*. Bien que les séquences des gènes *hrc*, *hrp* et *hpa* de *Xtg* soient plus semblables à celles des xanthomonades qu'à celles de *R. solanacearum*, ils se distinguent néanmoins considérablement des premières.

Notre étude a montré que les mécanismes de virulence et de résistance dans l'interaction *Lm* x *Xtg* se distinguent à plus d'un titre de ceux des autres maladies causées par les xanthomonades. Bien qu'aucun gène de résistance spécifique n'ait pu être identifié, l'importance de T3SS pour la virulence indique un rôle important des effecteurs sécrétés. ■

Riassunto

Batteriosi vascolare: una malattia enigmatica delle graminacee foraggere

Nelle graminacee foraggere, la batteriosi vascolare è scatenata dal batterio *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (*Xtg*) e genera ingenti danni a pascoli e prati. Al fine di selezionare varietà resistenti, si è condotta un'analisi sulle basi genetiche dell'interazione tra batteri e piante, dalla quale è emerso che tale interazione presenta alcune particolarità rispetto ad altre malattie di riso, pomodori o limoni causate da specie *Xanthomonas*. Non si sono potute individuare, pertanto, indicazioni su un'interazione caratteristica della razza tra i singoli isolati di batteri e i genotipi delle piante, come tipicamente accade per i geni classici della resistenza. Dal sequenziamento del genoma *Xtg* è emerso che, stranamente, tale patogeno ha molte sequenze di inserzione. Inoltre, l'organizzazione di un importante fattore di virulenza si differenzia nettamente da altre specie di *Xanthomonas*. Una soppressione specifica di tale fattore di virulenza ha sì generato un'ingente perdita di virulenza, ma i batteri erano ancora in grado di riprodursi nella pianta. Tali risultati forniscono basi preziose per lo sviluppo di efficaci metodi di selezione.

Bibliographie

- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D. J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal Of Molecular Biology* **215** (3), 403–410.
- Boller B., Schubiger F. X., Tanner P., Streckeisen P., Herrmann D. *et al.*, 2005. La diversité génétique dans les prairies naturelles suisses et son utilisation en sélection. *Fourrages* **182**, 263–274.
- Büttner D. & Bonas U., 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *Fems Microbiology Reviews* **34** (2), 107–133.
- Egli T. & Schmidt D., 1982. Pathogenic variation among the causal agents of bacterial wilt of forage grasses. *Phytopathologische Zeitschrift* **104** (2), 138–150.
- Hirschi H.-U., Frick R. & Bertossa M., 2010. Liste 2011–2012 des variétés recommandées de plantes fourragères. *Recherche Agronomique Suisse* **1** (10), encart.
- Hu J., Zhang Y., Qian W. & He C. Z., 2007. Avirulence gene and insertion element-based RFLP as well as RAPD markers reveal high levels of genomic polymorphism in the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Systematic and Applied Microbiology* **30** (8), 587–600.
- Jones J. D. G. & Dangl J. L., 2006. The plant immune system. *Nature* **444** (7117), 323–329.
- Kölliker R., Kraehenbuehl R., Boller B. & Widmer F., 2006. Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *Systematic and Applied Microbiology* **29** (2), 109–119.
- Rechsteiner M.P., Widmer F. & Kölliker R., 2006. Expression profiling of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) during infection with the bacterial wilt inducing pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *Plant Breeding* **125** (1), 43–51.

Summary

Bacterial wilt – a puzzling disease of forage grasses

Bacterial wilt of forage grasses is caused by the bacterium *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (*Xtg*) and leads to major damage in meadows and pastures. To support the breeding of resistant cultivars, we are studying the genetic bases of the interaction between bacteria and plants. In doing so, we have learnt that this interaction exhibits a number of unique features when compared with other diseases of rice, tomatoes or lemons caused by *Xanthomonas* species. For one thing, no indications were found of a strain-specific interaction between individual bacterial isolates and plant genotypes, as is characteristic for typical resistance genes. The sequencing of the *Xtg* genome has shown that this pathogen possesses an unusually high number of insertion sequences. In addition, the organisation of an important virulence factor differs noticeably from other *Xanthomonas* species. Although knock-out mutation of this virulence factor led to a significant reduction of virulence, the bacteria were still able to reproduce in the plant. These findings provide valuable bases for the further development of efficient breeding methods.

Key words: bacterial wilt, resistance genes, virulence factors.

- Schubiger F. X., Baert J., Bayle B., Bourdon P., Cagas B. *et al.*, 2010. Susceptibility of European cultivars of Italian and perennial ryegrass to crown and stem rust. *Euphytica* **176** (2), 167–181.
- Studer B., Boller B., Herrmann D., Bauer E., Posselt U.K. *et al.*, 2006. Genetic mapping reveals a single major QTL for bacterial wilt resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theoretical and Applied Genetics* **113** (4), 661–671.
- White F., Potnis N., Jones J. & Koebnik R., 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* **10** (6), 749–766.
- Wichmann F., Asp T., Widmer F. & Kölliker R., 2011a. Transcriptional responses of Italian ryegrass during interaction with *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* reveal novel candidate genes for bacterial wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **122** (3), 567–579.
- Wichmann F., Widmer F., Vorhölter F.-J., Boller B. & Kölliker R., 2012. Breeding for resistance to bacterial wilt in ryegrass: insights into the genetic control of plant resistance and pathogen virulence. In: Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement (Eds. S. Barth and D. Milbourne). Springer Science+Business Media, Dordrecht, 37–46.
- Wichmann F., Mueller-Hug B., Widmer F., Boller B., Studer B. *et al.*, 2011b. Phenotypic and molecular characterization indicate no major race-specific interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* and *Lolium multiflorum*. *Plant Pathology* **60** (2), 314–324.