

COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* EM SEMENTES DE FEIJOEIRO¹

ANTONIO CARLOS MARINGONI², HIROSHI KIMATI³ e CHUKICHI KUROZAWA⁴

RESUMO - O presente trabalho visou avaliar a eficiência da extração de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijoeiro infectadas naturalmente. Os métodos empregados incluíram a maceração de sementes inteiras em solução salina tampão fosfato e sua trituração após a maceração. As suspensões obtidas das sementes foram diluídas e plaqueadas em meio de cultura semi-seletivo para *X. campestris* pv. *phaseoli*. Verificou-se que o método de extração através de trituração foi o mais eficiente para o isolamento da referida bactéria das sementes de feijoeiro. Os isolados bacterianos obtidos foram patogênicos ao feijoeiro, apresentaram reação sorológica positiva para um antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli*, e possuíram as características morfológicas e fisiológicas/bioquímicas típicas de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Termos para indexação: crestamento bacteriano comum, *Phaseolus vulgaris*, patologia de sementes.

COMPARISON BETWEEN TWO EXTRACTION METHODS OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* FROM BEAN SEEDS

ABSTRACT - The objective of this research was to evaluate the effectiveness of the extraction of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from naturally infected dry bean seeds. Extraction methods tested included soaking whole seeds in sterilized saline phosphate buffer and crushing seeds after soaking in sterilized saline phosphate buffer. The bacterium was isolated on a semiselective agar medium. The seed crushing method was found to be more effective. The bacterium strains isolated were pathogenic to bean leaves, reacted with *X. campestris* pv. *phaseoli* antiserum, and had morphological and physiological/biochemical characteristics typical of the *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Index terms: common bacterial blight, *Phaseolus vulgaris*, seed pathology.

¹ Aceito para publicação em 19 de novembro de 1997.

² Eng. Agr., Prof. Assistente, Dr., Dep. de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Caixa Postal 237, CEP 18603-970 Botucatu, SP. Bolsista do CNPq.

³ Eng. Agr., Prof. Titular, Dep. de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Caixa Postal 09, CEP 13418-900 Piracicaba, SP.

⁴ Eng. Agr., Prof. Titular, Dep. de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano comum é uma doença cosmopolita que ocorre na cultura do feijoeiro, principalmente nas regiões úmidas e quentes do globo (Saettler, 1991). A bactéria incitadora dessa doença é *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye; apresenta várias formas de sobrevivência, e em sementes, sobrevive no estado hipobiótico por longos períodos, sob condições adversas (Schuster & Coyne, 1977). Pode estar localizada interna ou externamente (Saettler & Perry, 1972; Schuster & Coyne, 1974; Weller & Saettler, 1980a), sem perder a virulência (Schuster & Coyne, 1971, 1975; Schuster et al., 1973).

As sementes merecem uma atenção especial quanto à disseminação dessa bactéria, pois elas transportam o patógeno a longas distâncias e são sérias fontes primárias de inóculo no campo (Schuster et al., 1973; Neergard, 1979). Wallen & Sutton (1965) verificaram, em Ontário, Canadá, que 0,5% de sementes contaminadas foi suficiente para iniciar a disseminação da doença. Posteriormente, Weller & Saettler (1980b) demonstraram experimentalmente que uma população mínima de $10^3 - 10^4$ ufc de *X. campestris* pv. *phaseoli* por semente contaminada externamente foi necessária para originar plantas doentes em condições de campo. Maringoni et al. (1995) evidenciaram que o desenvolvimento da epidemia de *X. campestris* pv. *phaseoli* em algumas cultivares de feijoeiro dependeu mais do nível de resistência horizontal ao crestamento bacteriano presente nas cultivares e das condições climáticas, do que da população do patógeno presente nas sementes.

Inúmeras técnicas foram desenvolvidas ou adaptadas com a finalidade de detectar o transporte de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. A observação visual dos sintomas apresentados pelas sementes, tais como: descoloração no hilo, manchas amarelas no tegumento, e enrugamento são indicativos da infecção das sementes pela bactéria. Porém, esse método não é preciso, pois pode sub ou superestimar a infecção das sementes, uma vez que sementes assintomáticas podem estar colonizadas internamente (Cafati & Saettler, 1980; Maringoni et al., 1993).

O emprego de bacteriófagos (Katznelson & Sutton, 1951; Katznelson et al., 1954) e a inoculação em plantas de feijoeiro com suspensões oriundas da maceração de sementes foram empregados em algumas técnicas com o intuito de detectar bactérias fitopatogênicas associadas às sementes de feijoeiro (Saettler, 1971; Valarini & Menten, 1992).

Outra forma de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro é o plaqueamento direto das sementes ou da suspensão de maceração das sementes, trituradas ou não em meio de cultura agarizado (Ednie & Needhan, 1973; Cafati & Saettler, 1980; Rat, 1987; Maringoni et al., 1993; Romeiro et al., 1993).

O emprego de meios de cultura não-seletivos tem dificultado o isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijoeiro, uma vez que inúmeras bactérias saprófitas podem ser veiculadas às sementes, principalmente nas provenientes de vagens que entram em contato com o solo e essas bactérias saprófitas interferem na recuperação da bactéria alvo (Ednie & Needhan, 1973; Sheppard, 1983; Sheppard et al., 1989). Alguns meios de cultura semi-seletivos foram desenvolvidos e mostraram-se eficientes na inibição do crescimento de bactérias saprófitas, sem interferir no crescimento de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Trujillo & Saettler, 1980; Claflin et al., 1987; Magabala & Saettler, 1992; Romeiro et al., 1993; Maringoni et al., 1994a).

Além destes métodos de detecção, existem vários métodos sorológicos que foram empregados, como: dupla difusão (Trujillo & Saettler, 1980), imunofluorescência direta ou indireta (Malin et al., 1983; Van Vuurde et al., 1983; Wong, 1991), “RIA”, “ELISA” indireta, e “dot blot assay” (Malin et al., 1985).

O presente trabalho objetivou comparar dois métodos de extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijoeiro naturalmente infectadas, e verificar a eficácia do meio de cultura semi-seletivo desenvolvido por Maringoni et al. (1994a) no isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Quinze amostras de 200 g de sementes de feijoeiro, cultivar Rio Negro, foram empregadas no experimento. A técnica empregada para a análise das sementes foi adaptada de Van Vuurde et al. (1983) e Rat (1987).

Cada amostra de sementes foi previamente lavada em água de torneira, de duas a três vezes consecutivas, para remoção dos detritos mais grosseiros. Em seguida, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% (Ednie & Needhan, 1973; Trujillo & Saettler, 1979), na razão de 500 mL da solução de hipoclorito para 200 g de sementes, durante cinco minutos. Após a desinfestação, as sementes foram enxaguadas por duas vezes consecutivas, em 500 mL de água de torneira esterilizada, e depois, transferidas para frascos contendo 430 mL de solução salina tampão fosfato esterilizada (SSTFE) 0,01 M, pH 7,2 a 7,4, e submetidas à maceração durante 24 horas, a 5°C. Após o período de maceração das sementes, foi adicionado 0,1 mL de uma solução de Tween-20 a 1 % em cada frasco, e estes foram agitados durante 15 min, em agitador de bancada, sob condições de laboratório.

Uma alíquota de 1 mL foi retirada da suspensão de maceração das sementes, e diluições em série foram feitas em SSTFE. Colocou-se 0,1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-4} em cada placa-de-Petri, que continha o meio de cultura semi-seletivo constituído de: extrato de carne, 3,0 g; peptona, 5,0 g; sacarose, 10 g; amido solúvel, 2,0 g; ágar, 15 g; água destilada, 1000 mL e acrescido, após a autoclavagem, a 45 a 50°C, de benomyl, 20 mg; chlorothalonil, 20 mg; cefalexina monohidratada, 30 mg; nitofurantoína, 2 mg, e ácido nalidíxico, 1 mg, conforme Maringoni et al. (1994a). As suspensões foram espalhadas na superfície do meio de cultura, com o auxílio de uma alça de Drigalski.

As mesmas amostras de sementes foram trituradas em aparelho eletrodoméstico “Mix”, previamente desinfestado. O triturado obtido foi peneirado em peneira de arame, utilizada para coar chá, previamente flambada. A suspensão peneirada resultante foi refrigerada a 4 a 5°C, por uma a duas horas, com a finalidade de decantar as partículas grosseiras suspensas. Em seguida, foram feitas diluições seriadas em SSTFE, e 0,1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-4} foi submetido a plaqueamento, conforme descrito anteriormente, em meio de cultura semi-seletivo.

Cada diluição foi plaqueada em quatro placas-de-Petri contendo o meio de cultura semi-seletivo, incubadas a 28°C durante 72 a 96 horas. As colônias típicas de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram contadas, e algumas delas repicadas para tubos de ensaio contendo o meio peptona- -sacarose-ágar (PSA) (Fahy & Persley, 1983), para posterior caracterização. A observação da hidrólise de amido pela bactéria foi realizada através da adição de lugol na superfície do meio de cultura. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística não-paramétrica, pelo teste t, a 1 % de probabilidade, para

verificar a possível diferença existente entre os dois métodos de extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* das sementes de feijoeiro.

Quinze isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* obtidos das sementes de feijoeiro foram submetidos a testes de caracterização morfológica, bioquímica/fisiológica, sorológica e de patogenicidade.

Os testes de caracterização morfológica e bioquímica/fisiológica foram realizados conforme Dye (1980), no tocante ao gênero *Xanthomonas*, e Dye & Lelliott (1974) e Dye (1980), para a diferenciação das espécies dentro deste gênero. Já o método adotado para a realização dos testes foi o descrito por Kiraly et al. (1974) e Fahy & Persley (1983).

Os testes sorológicos foram realizados, em dupla difusão, em gel-de-ágar. Os antissoros utilizados foram obtidos por Maringoni et al. (1994b), e os antígenos bacterianos foram preparados segundo o método descrito no referido trabalho. As placas-de-Petri contendo o gel-de-ágar permaneceram sob condições de laboratório, durante 48 a 72 horas, quando foram avaliadas as bandas de precipitação formadas.

No teste de patogenicidade, o inóculo foi obtido mediante o cultivo dos isolados bacterianos em meio PSA, durante 72 a 96 horas, e a seguir foram feitas suspensões em água destilada, a fim de obter concentração de 10^7 a 10^8 ufc/mL. As inoculações foram realizadas por meio de riscas, na face dorsal das folhas primárias de duas a três plantas da cultivar Rio Negro, com um palito dental previamente umedecido no inóculo. Após as inoculações, as plantas foram mantidas sob condições de casa de vegetação durante 15 dias, até a avaliação dos sintomas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo método adaptado de Van Vuurde et al. (1983) e Rat (1987), foi possível recuperar substancialmente *X. campestris* pv. *phaseoli* das amostras de sementes analisadas (Tabela 1), embora tenha sido realizada a sua desinfestação com hipoclorito de sódio. Este tratamento teve a finalidade de erradicar ou reduzir a população de microrganismos saprófitas existentes nas sementes, que interferem no isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* ou de outras fitobactérias associadas às sementes de feijoeiro, em meio de cultura (Wharton, 1967; Taylor, 1970; Ednie & Needhan, 1973).

TABELA 1. Recuperação de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijoeiro naturalmente infectadas, por dois métodos de extração.

Amostra	Número de ufc/mL	
	Maceração	Trituração
1	$8,75 \times 10^3$	$4,93 \times 10^5$
2	$1,06 \times 10^4$	$1,28 \times 10^6$
3	$7,25 \times 10^3$	$1,10 \times 10^5$
4	$8,78 \times 10^3$	$6,18 \times 10^5$
5	$1,69 \times 10^4$	$1,64 \times 10^6$
6	$8,73 \times 10^3$	$8,60 \times 10^5$
7	$1,21 \times 10^5$	$1,21 \times 10^6$
8	$4,68 \times 10^4$	$1,00 \times 10^6$
9	$3,25 \times 10^3$	$1,56 \times 10^6$
10	$1,81 \times 10^4$	$1,58 \times 10^6$
11	$2,45 \times 10^3$	$9,82 \times 10^5$
12	$3,08 \times 10^4$	$5,62 \times 10^5$
13	$1,46 \times 10^4$	$8,60 \times 10^5$
14	$3,54 \times 10^4$	$7,40 \times 10^6$
15	$3,95 \times 10^4$	$1,55 \times 10^6$
Média ¹	$2,49 \times 10^4$ b	$1,00 \times 10^6$ a

¹ Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste t, a 1% de probabilidade.

Mesmo com a desinfestação das sementes, verificou-se a presença de algumas colônias de bactérias saprófitas desenvolvidas na superfície do meio de cultura semi-seletivo utilizado. Este resultado já era previsível, uma vez que a mistura dos antibióticos cefalexina, ácido nalidíxico e nitrofurantonina não inibiu todos os isolados de bactérias saprófitas provenientes de sementes de feijoeiro (Maringoni et al., 1994a).

Embora alguns métodos de detecção de fitobactérias em sementes de feijoeiro não empreguem a trituração das sementes (Van Vuurde et al., 1983; Rat, 1987; Valarini & Menten, 1992; Romeiro et al., 1993), os resultados aqui obtidos indicaram que este procedimento permitiu extrair 40 vezes mais ufc/mL de

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* do que nas amostras não trituradas (Tabela 1). Desta maneira, vê-se que a trituração facilitou a liberação de *X. campestris* pv. *phaseoli* que estava no interior das sementes de feijoeiro, uma vez que esta bactéria coloniza-as internamente (Burkholder, 1921).

Valarini & Menten (1992), empregando a técnica de inoculação em folhas primárias de feijoeiro cv. EMGOPA 201-Ouro, verificaram que a técnica de extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijoeiro pela imersão de sementes inteiras em água proporcionou elevada severidade de sintomas do crestamento bacteriano comum nas folhas infectadas, quando comparado com as extrações da bactéria de sementes moídas e inteiras previamente submetidas a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio. Entretanto, esses autores não quantificaram a população de *X. campestris* pv. *phaseoli* presente nas amostras de sementes, e basearam-se apenas na severidade dos sintomas apresentados pelas plantas infectadas.

A fidelidade da recuperação de *X. campestris* pv. *phaseoli* das sementes de feijoeiro foi confirmada pelos testes empregados para a caracterização dos isolados bacterianos. As colônias de *X. campestris* pv. *phaseoli* apresentaram-se circulares, mucóides, brilhantes, amarelas, convexas, e com a adição de lugol no meio de cultura; constatou-se a hidrólise do amido ao redor das colônias. Não foi observado o escurecimento do meio de cultura utilizado para o isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* das sementes. Cultivos posteriores destes isolados no meio de cultura extrato de levedura-carbonato de cálcio-ágar (Basu & Wallen, 1966) causaram escurecimento do meio de cultura, que é típico de isolados produtores de melanina *in vitro*.

Embora não tenham sido realizados todos os testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos recomendados por Dye (1980), foi possível enquadrar os isolados bacterianos obtidos no gênero *Xanthomonas* e na espécie *X. campestris* (Tabela 2). Estes isolados bacterianos foram patogênicos ao feijoeiro cultivar Rio Negro e apresentaram reação sorológica de identidade para o anti-soro AS-Feij-20, obtido para um isolado de *X. campestris* pv. *phaseoli* produtor de melanina *in vitro*.

O não-isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* não-produtor de melanina *in vitro* indicou a presença apenas de isolados produtores deste pigmento nas amostras de sementes aqui analisadas. Isto não descarta a possibilidade do isolamento desta bactéria, que não produz melanina *in vitro* de outras amostras de sementes.

TABELA 2. Caracterização morfológica, fisiológica/bioquímica, sorológica e patogênica de quinze isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* provenientes de sementes de feijoeiro.

Teste	Reação dos isolados ¹
Bastonetes Gram positivos	+
Crescimento mucóide e colônias amarelas em meio PSA	+
Aerobiose	+
Hidrólise de amido	+
Hidrólise de Tween 20	+
Proteólise do leite	+
Produção de ácidos de:	
Arabinose	+
Glicose	+
Sacarose	+
Reação com os antissoros:	
AS-Feij-1	-
AS-Feij-20 ²	+
Patogenicidade em feijoeiro cultivar Rio Negro	+

¹ + = reação positiva; - = reação negativa.

² Antissoro obtido com um isolado de *X. campestris* pv. *phaseoli* produtor de melanina *in vitro*.

CONCLUSÕES

1. A trituração de sementes de feijoeiro, após sua maceração em solução salina tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 7,4, libera mais *X. campestris* pv. *phaseoli*.

2. O meio de cultura semi-seletivo utilizado é eficaz no isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijoeiro.

AGRADECIMENTOS

À Fundação ao Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo recurso financeiro concedido para a execução do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- BASU, P.K.; WALLEN, V.R. Influence of temperature on the viability, virulence and physiologic characteristics of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in vivo and in vitro. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.44, p.1239-1245, 1966.
- BURKHOLDER, W.H. The bacterial blight of the bean: a systemic disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.11, p.60-69, 1921.
- CAFATI, C.R.; SAETTLER, A.W. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus* genotypes. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.638-640, 1980.
- CLAFLIN, L.E.; VIDAVER, A.K.; SASSER, M. MXP, a semiselective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.730-734, 1987.
- DYE, D.W. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.E. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS Press. 1980. p.45-49.
- DYE, D.W.; LELLIOTT, R.A. Genus II. *Xanthomonas*. In: BUCHAN, R.E.; GIBBOWS, N.E. (Eds.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8.ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1974. p.243-249.
- EDNIE, A.B.; NEEDHAN, S.M. Laboratory test for internally-borne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Oklahoma City, v.63, p.76-82, 1973.
- FAHY, P.C.; PERSLEY, G.L. **Plant bacterial diseases**. Sidney: Academic Press. 1983. 393p.
- KATZNELSON, H.; SUTTON, M.D. A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infection of seed. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v.61, p.689-701, 1951.
- KATZNELSON, H.; SUTTON, M.D.; BAYLEY, S.T. The use of bacteriophage of *Xanthomonas phaseoli* in detecting infection in beans, with observation on its growth and morphology. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.2, p.22-29, 1954.
- KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOZY, F.; VOROS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest: Elsevier Scientific Pub., 1974. 910p.
- MAGABALA, R.B.; SAETTLER, A.W. An improved semiselective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, p.443-446, 1992.
- MALIN, E.; BELDEN, E.L.; ROTH, D. Evaluation of the radioimmunoassay, indirect enzyme linked immunosorbent assay, and dot blot assay for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.7, p.217-222, 1985.
- MALIN, E.M.; ROTH, D.A.; BELDEN, E.L. Indirect immunofluorescence stain for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. **Plant Disease**, St. Paul, v.67, p.645-664, 1983.
- MARINGONI, A.C.; FREGONESE, L.H.; TOFOLI, J.G.; KUROZAWA, C. Reação foliar e da vagem de feijoeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.412-415, 1993.
- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Cientifica**, São Paulo, v.22, p.277-288, 1994a.
- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Presença da *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.449-457, 1995.
- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.20, p.164-167, 1994b.
- NEERGARD, P. **Seed pathology**. London: McMillan, 1979. v.1, 839p.

- RAT, B. How to use bacteria detection methods in seed pathology routine laboratory. In: NASSER, L.C.; WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. (Eds.). **Seed pathology international advanced course**. Brasília: ABRATES. 1987. p.103-107.
- ROMEIRO, R.S.; PEREZ, F.S.; OLIVEIRA, J.R.; PELOSO, M.J. del. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, p.1-5, 1993.
- SAETTLER, A.W. Common bacterial blight. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean disease**. St. Paul: APS Press, 1991. p.28-29.
- SAETTLER, A.W. Seedling injection as an aid in identifying bean blight bacteria. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.55, p.703-706, 1971.
- SAETTLER, M.L.; PERRY, S.K. Seed transmitted bacterial diseases in Michigan navy (pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.56, p.378-381, 1972.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. Detection of bacteria in bean seed. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, New York, v.18, p.71, 1975.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. New virulent strain of *Xanthomonas phaseoli*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.55, p.505-506, 1971.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.199-221, 1974.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. Survival of parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.2, p.117-130, 1977.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P.; HOFF, B. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia and Nebraska. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.57, p.74-75, 1973.
- SHEPPARD, J.W. Detection of seed-borne bacterial blights of bean. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, p.561-567, 1983.
- SHEPPARD, J.W.; ROTH, D.A.; SAETTLER, A.W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. (Eds.). St. Paul: APS Press, 1989. p.11-29.
- TAYLOR, J.D. The quantitative estimation of infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burker) Dowson. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.66, p.29-36, 1970.
- TRUJILLO, G.E.; SAETTLER, A.W. A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v.4, p.35-41, 1979.
- TRUJILLO, G.E.; SAETTLER, A.W. A liquid semi-selective medium for *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. East Lansing: Michigan State University - Agricultural Experimental Station, 1980. 7p. (Research Report, 411)
- VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão: detecção por inoculação em plantas indicadoras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, p.171-180, 1992.
- VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DEN BOVENKAMP, G.W.; BIRBAUM, Y. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine test for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, p.547-559, 1983.
- WALLEN, V.R.; SUTTON, M.D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.43, p.437-446, 1965.
- WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grow navy beans. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.500-506, 1980a.
- WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Evaluation of seed-borne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.148-152, 1980b.
- WHARTON, A.L. Detection of infection by *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson in white seeded dwarf seed stocks. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.60, p.305-312, 1967.
- WONG, W.C. Methods for recovery and immunodetection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean seed. **Journal of Applied Bacteriology**, Osney Mead, v.71, p.124-129, 1991.