

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* EM SEMENTES DE FEIJÃO
II. DETECÇÃO POR ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA¹

P.J. Valarini²
J.O.M. Menten³

INTRODUÇÃO

Entre as doenças que afetam a produção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), em diferentes partes do mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais, está o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* incluindo "strain" *fuscans* (DYE et alii, 1980). No Brasil, é uma doença que assume importância econômica, principalmente no cultivo "das águas"; é de ampla distribuição e de controle problemático, agravado pela dificuldade em se obter resistência ou tolerância nas cultivares de calor comercial, baixa eficiência do controle químico e pelo sistema de cultivo em mais de uma época no mesmo ano. Além disso, o seu agente causal tem a semente como principal meio de sobrevivência e disseminação (KIMATI, 1980; VIEIRA & SARTORATO, 1984; BULISANI et alii, 1987).

Uma das medidas que têm trazido resultados eficientes de controle do patógeno é a utilização de sementes com elevado padrão de sanidade, produzidas em regiões de clima seco, onde as condições são desfavoráveis ao desenvolvimento da bactéria (BULISANI et alii, 1987; SCHAAD, 1988). Considerando a possibilidade de ocorrência de epi

¹ Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

² CNPDA/EMBRAPA. Jaguariúna-SP.

³ Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP. Piracicaba - SP.

demias em campo a partir de sementes com baixos níveis de incidência do patógeno (WALLEN & SUTTON, 1965; KIMATI, 1980), torna-se importante, além das inspeções visuais de campo, contar com métodos eficientes, sensíveis e rápidos para a detecção do patógeno em lotes de sementes de feijão.

Existem diversas metodologias desenvolvidas em laboratório para a detecção de bactérias patogênicas em sementes de culturas de importância econômica, tais como, testes de crescimento, uso de bacteriófagos, inoculações em plantas hospedeiras, isolamento em meios de cultura, técnicas serológicas e plaqueamento direto (SCHAAD, 1982; RODRIGUES NETO, 1988). O método de isolamento em meio de cultura consiste na extração das bactérias presentes na semente e distribuição de suspensão obtida em meios básico, semi-seletivo ou seletivo. Após a incubação, as colônias individuais são identificadas com base em suas características culturais, (tamanho, cor, consistência, presença de pigmento, forma, etc.) e testes serológicos e de patogenicidade (SCHAAD, 1980; RANDHAWA & SCHAAD, 1984; MOHAN & SCHAAD, 1987). Meios seletivo e semi-seletivo têm sido desenvolvidos para diversas fitobactérias, tais como: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (SCHAAD & WHITE, 1974; CHUN & ALVAREZ, 1983; RANDHAWA & SCHAAD, 1985); *X. campestris* pv. *translucens* (SCHAAD & FORSTER, 1985); *Clavibacter michiganense* sub. *nebraskenses* (GROSS & VIDAVER, 1979); *Pseudomonas solanacearum* (NESMITH & JENKINS, 1979); *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* (MOHAN & SCHAAD, 1987). Para a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão foram utilizados os meios seletivos e semi-seletivos: SSM (TRUJILLO & SAETTLER, 1979, 1980) e MXP (CLAFLIN et alii, 1987). Entretanto, o meio preferível deve ser aquele que exija ingredientes disponíveis, seja de fácil preparo, baixo custo e permanença efetivo após prolongada armazenagem (CLAFLIN et alii, 1987). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de

feijão, envolvendo a comparação de quatro técnicas de extração e identificação por meio do isolamento em dois meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba-SP.

. Técnicas de extração

Para avaliar a metodologia de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*), foram utilizadas 6 amostras de sementes de feijão, procedentes de plantios com sintomas característicos da bacteriose: 5 coletadas em campos experimentais do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina-PR (cvs. Rosinha, Rio Vermelho, Carnaval, Catu e Rio Ivaí) e 1 coletada em lavoura de Goiânia/GO (cv. EMGO PA 201-Ouro). Foram comparadas as quatro técnicas de extração de *Xcph* a partir de sub-amostras de sementes de vários tamanhos e isolamento em dois meios de cultura para a identificação do patógeno.

As técnicas de extração da bactéria consistiram em: a) imersão em água destilada esterilizada de sementes moídas (TAYLOR, 1970; modificada); b) imersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras, desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo); c) imersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras (RAT, 1987, modificada)¹ e d) imersão de sementes inteiras em meio de cultura líquido (3 g de extrato de levedura/ℓ) esterilizado (VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984, modificada). As quantidades de água ou meio líquido variaram em função do número de sementes e das

¹ RAT, B. (INRA - Station the Pathologie Vegetable-Angers France). Comunicação Pessoal, 1987.

condições em que as mesmas foram submetidas (sementes moídas ou inteiras) conforme TABELAS I e II.

TABELA I. Volume de água para extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* de amostras de sementes moídas de diferentes tamanhos.

Nº de Sementes	Volume de água (ml)	Tamanho do frasco (l)
1000	2000	3
500	1000	2
100	250	0,5
10	50	0,125

TABELA II. Volume de água ou meio líquido para extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* de amostras de sementes inteiras de diferentes tamanhos.

Nº de Sementes	Volume de água ou meio líquido (ml)	Tamanho do frasco (l)
1000	350 - 450	1
500	180 - 240	0,5
100	35 - 50	0,25
10	5 - 10	0,125

Para as sementes moídas, os extratos obtidos foram incubados por 2 horas sob condições de laboratório; para sementes inteiras, os extratos foram incubados em geladeira por 18-24 horas. Posteriormente, a partir da suspensão obtida procedeu-se a identificação do patógeno.

. Isolamento em meios de cultura

Dois meios de culturas foram comparados no isolamento de *Xcph*: Nutriente-glucose-agar (NGA); Extrato de carne - 3g peptona-5,0g; glucose - 2,5 g; agar (15,0 g/l) (SCHAAD, 1980) e EPGA-Extrato de levedura - 3,0 g; peptona 7,0 g; glucose 15,0 g; amido; (fécula de batata) 15,0 g e agar - 15,0 g/l (RAT, 1987). Após a autoclavagem, a temperatura de 45-50°C, foram adicionados aos meios NGA e EPGA, o antibiótico cefalexina (Keplex) e o fungicida clorotalonil (Daconil) nas concentrações de 40 µg e 50 µg/ml ativos, respectivamente, ajustando-se o pH para 7,2.

Foi testada a seletividade à *Xcph* dos meios de cultura (NGA e EPGA), com ou sem a adição do fungicida e do antibiótico, incluindo outros microorganismos patogênicos e não patogênicos ao feijoeiro (TABELA III).

. Comparação de técnicas de extração através do isolamento em meios de cultura

Para avaliar as técnicas de extração do *Xcph* e *Xcphf* de sementes de feijão, utilizou-se o isolamento em meio NGA, com ou sem a adição do antibiótico cefalexina e do fungicida clorotalonil.

O isolamento constituiu-se em tomar 0,1 ml do líquido sobrenadante e das diluições (10^{-1} e 10^{-2}), somente para o caso das sementes moídas, e transferir para a superfície das placas com o meio NGA com ou sem antibiótico e fungicida. Em seguida, o líquido foi uniformemente espalhado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas em câmaras de crescimento à temperatura de 28°C. A partir de 24 até 96 horas, procedeu-se a avaliação periódica de 4 placas/tratamento/diluição, por meio de observações das características culturais das colônias individuais formadas, sob microscópio estereoscópico. Colônias pequenas, de crescimento lento e de coloração amarelada, viscosa, convexa, de bordos lisos e eventualmente produtora do pigmento pardo difusível no meio, foram consideradas como

TABELA III. Efiiciência da cefalexina e do clorotalonil, em dois meios de cultura, para inibição de crescimento de diversas espécies de bactérias e fungos¹.

Bactérias e Fungos	Número de isolados	Meios de Cultura			
		NGA		EPCA	
		Com Ant. (2) e fungicida	Sem Ant. e fung.	Com Ant. (2) e fungicida	Sem Ant. e fung.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> [XcpH]	4	+	+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseolicola</i> var. <i>fuscans</i> [XcpHf]	4	+	+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	2	+	+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	2	+	+	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2	-	+	-	+
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	1	-	+	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	1	-	+	-	+
<i>Erwinia herbicola</i>	2	-	+	-	+
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	1	-	+	-	+
<i>Fusarium</i> spp.	5	-	+	-	+
<i>Trichoderma</i> spp.	3	-	+	-	+
"Contaminantes" bacterianos de sementes de feijão	10	-	+	-	+

(1) + Crescimento - ausência de crescimento (média de quatro repetições).

(2) Concentrações: antibiótico: 40 µg i.a./ml e fungicida: 50 µg i.a./ml.

Xcph. Colônias duvidosas (não características) foram reisoladas e purificadas em meio NGA para posterior comprovação por testes serológicos e de patogenicidade. Como controle, foi utilizado cultura pura de *Xcph* com 48 horas de crescimento em NGA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de eficiência de cefalexina e do clorotalonil, acrescidos aos meios NGA e EPGA, em inibir o crescimento de diversas bactérias e fungos e não afetar o desenvolvimento de *Xcph* e *Xcph*_f, encontram-se na TABELA III. Dos isolados testados, os do gênero *Xanthomonas* cresceram normalmente em ambos os meios, com e sem antibiótico e fungicida, enquanto que os isolados de *Pseudomonas* spp., *Bacillus*, *Erwinia* spp., *Fusarium*, *Trichoderma* e "contaminantes" bacterianos freqüentemente associados a sementes de feijão, foram completamente inibidos pela cefalexina (40 µg.ia/ml) e fungicida (50 µg.ia/ml) contidos nos meios de cultura. MARINGONI & KUROZAWA (1984) estudaram o efeito de quatro fungicidas (captan, clorotalonil, ciclohemida e thiran) em diversas concentrações, nos meios de cultura, sobre cinco isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e concluíram que o clorotalonil, em concentrações entre 12,5 a 50 µg/ml, inibiu parcial ou totalmente o crescimento de *Botrytes cinerea*, *Penicillium* sp., *Neurospora* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*, não afetando o desenvolvimento de *X. campestris* pv. *visicotoria* isolado do tomateiro. Dessa forma, este fungicida pode ser um produto alternativo a cicloheximida com vantagem de ser encontrado no Brasil. CLAFLIN et alii (1987) desenvolveram um meio semi-seletivo (MXP para isolar *Xcph* de sementes de feijão em que incluíram cefalexina (20 µg.ia/ml) e clorotalonil (15 µg.ia/ml) para inibir contaminantes bacterianos e fúngicos, respectivamente. Segundo os autores, a cefalexina, nessa dosagem, foi requerida para inibir *Erwinia herbicola*, enquanto que "strains" de *Xcph* cresceram em até 30 µg.ia/ml.

Apesar de ambos os meios de cultura (NGA e EPGA) apresentarem comportamento semelhante em relação a *Xcph*, *Xcphf* e aos demais microrganismos testados, NGA foi selecionado para avaliar as técnicas de extração, considerando a maior facilidade para caracterizar as colônias de *Xcph* devido à sua transparência.

A TABELA IV apresenta os resultados de comparação de quatro técnicas de extração de *Xcph* e *Xcphf* por meio do isolamento em meio NGA, com e sem a adição de cefalexina e clorotalonil.

Os melhores resultados de extração da bactéria através do isolamento em meio de cultura, foram alcançados a partir das técnicas de extração em sementes moídas (TAYLOR, 1970) e inteiras (RAT, 1987), modificadas, imersas em água destilada esterilizada. Embora, ambas apresentassem-se semelhantes e a primeira jamais rápida, a segunda seria a mais indicada, devido à maior facilidade de utilização para detecção.

Com relação ao isolamento, o meio contendo os inibidores microbianos foi consistentemente mais eficiente em detectar *Xcph* e *Xcphf* nas sementes de feijão devido à inibição de contaminantes bacterianos e fúngicos (maior número de resultados positivos). SCHAAD (1982) prefere usar nutriente agar (NA), um meio menos rico que reduz o crescimento de bactérias saprofíticas; entretanto, a desvantagem do NA é que colônias de *Xanthomonas campestris* são difíceis de serem distinguidas de outras bactérias produtoras de pigmento amarelado (*Xanthomonadina*). Além disso, a detecção de pequeno número de bactérias fitopagênicas em sementes tem sido difícil, por causa do número relativamente grande de bactérias saprofíticas, taxonomicamente relacionadas aos patógenos, que o acompanham e interfere com seu crescimento sobre meios seletivos (SCHAAD & WHITE, 1974).

Um meio semi-seletivo MKP foi desenvolvido por CLAFLIN et alii (1987), para isolamento de *Xcph* e do

"strain" *fuscans* a partir de sementes de feijão e solo infestado. Todos os "strains" *fuscans* de *Xcph* e a maioria dos patovares de *X. campestris* testado cresceram sobre esse meio. Entretanto alguns "strains" *fuscans* (*Xcphf*) foram indistinguíveis de *Xcph* típico e o pigmento marrom característico não foi produzido sobre esse meio. Também, os autores admitiram que outros "strains" cresceram lentamente sobre o meio e concluíram que, embora os meios semi-seletivos sejam práticos, torna-se difícil desenvolver um meio que restrinja o crescimento de todos os contaminantes sem afetar o patógeno. Segundo SCHAAD (1982) e MOHAN & SCHAAD (1987), enquanto os meios semi-seletivos melhoram as chances de sucesso no isolamento do patógeno, há necessidade de confirmar a sua identidade através de testes de patogenicidade. Outros pontos que parecem ser limitantes são: o alto custo dos agentes inibidores de crescimento de saprófitas, a necessidade de pessoal para obtenção desses meios, e, principalmente, a falta de segurança nos resultados obtidos.

Deve ser mencionado que, para comprovação final da identidade de algumas colônias duvidosas, foram utilizadas as técnicas serológicas de dupla difusão de Ouchterlony e testes de patogenicidade. Também, o empardecimento do meio de cultura após 3 e 4 dias devido a presença de "strains" *fuscans* (*Xcphf*), foi uma característica cultural auxiliar na identificação do patógeno (*Xcph*). Sobre esse aspecto, SUTTON WALLEN (1970) verificaram que os "strains" *fuscans* foram identificados pela habilidade em produzir o pigmento marrom ou pardo em nutriente agar com 24 a 28 horas de incubação a 27°C. Esses resultados indicaram que algumas bactérias patogênicas de sementes podem ser identificadas apenas com base nas características de colônias em meio agar, como acontece com a maioria dos fungos (SCHAAD, 1982; IRWIN, 1987).

Quanto a sensibilidade do método, embora os dados não sejam consistentes, houve uma tendência em se observar colônias típicas do patógeno a partir de sub-amostras (1000 e 500 sementes).

TABELA IV. Comparação de técnicas de extração de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e o "strain" *fuscans* (Xcph_f), a partir de sub-amostras de sementes de cultivares de feijoeiro através do isolamento em meio de cultura NGA com e sem antibiótico e fungicida.

Técnicas de extração e tamanho de sub-amostras de sementes	ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA											
	Rio Vermelho		Rosinha		Carnaival		Catu		Rio Ivaí		Emgopa 201-Ouro	
	NGA	NGA+AF	NGA	NGA-AF	NGA	NGA+AF	NGA	NGA+AF	NGA	NGA + AF	NGA	NGA + AF
Sementes moídas e suspensão em água 2 h à temperatura ambiente	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sementes inteiras com decaim-fecção superf. suspensão água 18-24 h à 5-10°C	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sementes inteiras, suspensão em água 18-24 h à 5-10°C	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sementes inteiras, suspensão em meio líquido 18-24 h à 5-10°C	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controles: Xcph (10 ⁸ ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xcph _f (10 ⁸ ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
água dest./meio liq. ester.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) ausência e (+) presença de colônias características de Xcph e Xcph_f; AF = Antibiótico + Fungicida.

Dentre as 6 amostras de sementes de feijão testadas, todas foram portadoras de *Xcph* e/ou *Xcphf*. Considerando o método de extração selecionado (sementes inteiras, suspensas em água, 18-24 h, 5-10°C) e o meio de cultura NGA + antibiótico e fungicida, o patógeno foi detectado nas subamostras de 100 sementes em 4 das amostras avaliadas. Isto significa uma incidência do patógeno em pelo menos 1% das sementes nestas amostras.

RESUMO

Para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), compararam-se quatro técnicas de extração através do isolamento em meios de cultura. As técnicas de extração incluíram sementes moídas e inteiras, com ou sem assepsia superficial, imersas em água destilada ou meio líquido (3 g extrato de levedura/l) esterilizados e incubados por 2 horas, à temperatura ambiente (sementes moídas) ou 18-24 horas, à 5-10°C (sementes inteiras). Para a identificação do patógeno foram comparados dois meios de cultura NGA (extrato de carne 3 g, peptona 5 g, glucose 2,5 g e agar 15 g/l) e EPGA (extrato de levedura - 3 g, peptona 7 g, glucose 15 g, amido 15 g e agar 15 g/l), com e sem a adição de cefalexina (40 ug.i.a./ml) e clorotalonil (50 ug.i.a./ml). A melhor técnica de extração da bactéria baseou-se na imersão de sementes inteiras em água destilada esterilizada por 18-24 horas, a 5-10°C. O meio NGA, contendo cefalexina e clorotalonil foi consistentemente mais eficiente para detectar o patógeno extraído de sementes de feijão, devido a inibição dos contaminantes bacterianos e fúngicos e maior facilidade de identificação. A sensibilidade do método de isolamento em meio de cultura foi suficiente para detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em amostras de sementes de feijão cuja incidência foi de pelo menos 1%.

Palavras-chave: Feijão semente, crestamento bacteriano, detecção.

SUMMARY*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* IN COMMON BEAN SEEDS. II. DETECTION BY ISOLATION IN CULTURE MEDIA

Culture media and extraction techniques were compared for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds by identification of colonies in culture. The extraction techniques included ground or whole seeds, with or without superficial desinfestation, soaked in sterile distilled water or liquid medium (3 g yeast extract/l) during 2 hours at room temperature (grinded seeds) or 18-24 hours at 5-10°C (whole seeds). The culture media included NGA (glucose-nutrient-agar) and LPGA (yeast extract + peptone + glucose + soluble potato starch + agar) with or without the addition of cephalixin (40 µg a.i./ml) and chlorotalonil (50 µg a.i./ml). The best pathogen extraction technique was soaking whole seeds in sterile distilled water for 18-24 h, at 5-10°C. NGA, with cephalixin and chlorotalonil, was consistently more efficient for detecting the pathogen; due to the inhibition of contaminant bacteria and fungi and easier pathogen identification. The method sensibility was enough for the detection of *X. campestris* pv. *phaseoli* in common bean seed samples with at least 1% of the pathogen incidence.

Key words: Common bean seeds, bacterial blight, detection.

LITERATURA CITADA

- BULISANI, E.A.; L.D. ALMEIDA & A.J. ROSTON, 1987. A cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. IN: BULISANTI, E.A. (coord.). *Feijão: fatores de produção e qualidade*. Campinas, Fundação Cargill. Cap. 2, p. 29-88.

- CLAFLIN, L.E.; A.K. VIDAVER & M. SASSER, 1987. MxP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris phaseoli*. *Phytopathology*, St. Paul, **77**(5): 730-734.
- CHUN, W.C. & A.M. ALVAREZ, 1983. A starch-methionine medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from plant debris in soil. *Plant Dis.*, **67**: 632-635.
- DYE, D.W.; J.F. BRADBURY; M. GOTO; A.C. HAYWARD; R.A. LEL LIOTT & M.N. SCHROTH, 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, Wallingford, **59**(4): 153-168.
- GROSS, D.C. & A.K. VIDAVER, 1979. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. *Phytopathology*, St. Paul, **69**: 82-87.
- IRWIN, J.A., 1987. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. *Seed Science and Technology*, Zurich, **15**: 755-763.
- KIMATI, H., 1980. Doenças do feijoeiro. IN: GALLI, F. (ed.). *Manual de Fitopatologia*. 2.ed. São Paulo, Ceres. V.2, Cap. 19, p.297-318.
- MARINGONI, A.C. & C. KUROZAWA, 1984. Efeito de captan chlorotalonil cicloheximida e thiram no isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dowson) Dye. IN: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 7., Botucatu. *Summa Phytopatologica*, Piracicaba, **10**(1/2): 64-66.
- MOHAN, S.K. & N.W. SCHAAD, 1987. An improved agar planting assay for detecting *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae* and *P.s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology*, St. Paul, **77**: 1390-1395.
- NESMITH, W.C. & S.F. JENKINS, 1979. A selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum* from soil. *Phytopathology*, St. Paul, **69**: 182-185.
- RANDHAWA, P. & N.W. SCHAAD, 1984. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, St. Paulo, **74**: 268-272.

- RODRIGUES NETO, J., 1988. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes. IN: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., Lavras. Anais. Campinas, Fundação Cargill. p.123-139.
- SCHAAD, N.W., 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, Committee of American Phytopathological Society. 72p.
- SCHAAD, N.W., 1982. Detection of seedborne bacterial pathogens. *Plant Disease*, St. Paul, **66**: 885-890.
- SCHAAD, N.W., 1988. Bacteria. IN: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 76., Ontario. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, **78**(6). 872-875.
- SCHAAD, N.W. & W.C. WHITE, 1974. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, **64**: 876-880.
- SCHAAD, N.W. & R.L. FORSTER, 1985. A semi-selective agar medium for isolation *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. *Phytopathology*, St. Paul, **75**: 260-263.
- TAYLOR, J.D., 1970. The quantitative estimation of the infestation of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burker) Dowson. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, **66**: 29-36.
- TRUJILLO, G.E. & A.W. SAETTLER, 1979. A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. *Journal of Seed Technology*, East Lansing, **4**(2): 35-41.
- TRUJILLO, G.E. & A.W. SAETTLER, 1980. A liquid semi-selective medium for *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. East Lansing, Michigan University/Agricultural Experimental Station. 7p.(Research Report, 411).
- VELASQUEZ, N.C. & G. TRUJILLO, 1984. Comparacion de metodologias para la deteccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Semith.) Dye. *Agronomia Tropical*, Maracay, **34**(1/3): 29-41.

VIEIRA, R.F. & A. SARTORATO, 1984. **Recomendações Técnicas para Produção de Sementes de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) de Alta Qualidade.** Goiânia, EMBRAPA / Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. 46p. (Circular Técnica, 10).

WALLEN, V.R. & M.D. SURRON, 1965. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field bean in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 43: 437-446.