

---

## **Avaliação de custos e eficiência de meios de cultura para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* direcionados para estudos *in vitro***

### **Evaluation of costs and efficiency of culture media for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* targeted for *in vitro* studies**

---

#### **Paula Thaís Requena Nocchi**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8455-8340>

Universidade Estadual de Maringá, Brazil

E-mail: [wmcnunes@uem.br](mailto:wmcnunes@uem.br)

#### **Carlos Alexandre Zanutto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8455-8340>

Universidade Estadual de Maringá, Brazil

E-mail: [cazanutto@uem.br](mailto:cazanutto@uem.br)

#### **Terezinha Aparecida Guedes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5364-609X>

Universidade Estadual de Maringá, Brazil

E-mail: [taguedes@uem.br](mailto:taguedes@uem.br)

#### **William Mário de Carvalho Nunes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3445-5487>

Universidade Estadual de Maringá, Brazil

E-mail: [wmcnunes@uem.br](mailto:wmcnunes@uem.br)

---

### **RESUMO**

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é uma das doenças mais importantes da citricultura. O estudo das condições de isolamento e manutenção de isolados de *X. citri* subsp. *citri*, o conhecimento de sua exigência nutricional e escolha de um meio de cultura eficiente para seu desenvolvimento é imprescindível para posteriores estudos *in vitro*, como no estudo de sua diversidade genética. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de 8 diferentes meios de cultura na manutenção de isolado de *X. citri* subsp. *citri* proveniente de cultura pura (isolado Xcc 306) obtida junto ao acervo de culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Este isolado foi cultivado nos meios Nutriente Agar (NA), Manitol Glutamate Yeast (MGY), Kado (D5), 523, Luria Bertani (LB), Dextrose Yeast Glutamate (DYGS), Yeast Dextrose Carbonate (YDC) e Wilbrink (WB). Todos os isolados apresentaram diferença de crescimento nos meios de cultura estudados, entretanto, o meio D5 não se mostrou eficiente. O meio MGY foi o mais eficiente e com o menor custo dentre os meios de cultura estudados.

**Palavras-chave:** Cancro cítrico; Meios de cultura Bacteriano; Isolado Xcc 306.

---

## ABSTRACT

Citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is one of the most important citrus diseases. Thus, assessments of the isolation conditions and strains maintenance of *X. citri* subsp. *citri*, as well as the knowledge of their nutritional requirements are important for choosing a medium suitable for the studies development of this organism *in vitro* culture. Among these, there are genetic diversity studies, as it provides evidence of the evolutionary process and pathogen behavioral, contributing to the identification of genes involved in bacteria pathogenicity. Thereby, the main objective was to evaluate the efficiency of eight different culture media for maintenance of *X. citri* subsp. *Citri* from pure culture (isolate Xcc 306) obtained from the collection of pure cultures of the Citrus Defense Fund (Fundecitrus). Thus, the isolate was cultured in media Nutrient Agar (NA), Manitol Glutamate Yeast (MGY), Kado (D5), 523, Luria Bertani (LB), Dextrose Yeast Glutamate (DYGS), Yeast Dextrose Carbonate (YDC) and Wilbrink (WB). Of all the media, only D5 medium was not efficient. The MGY medium has been shown to be effective for the development of bacteria and had the lowest preparation cost among the culture media.

**Keywords:** Citrus canker, Bacterial culture media, Xcc 306 isolate.

---

## INTRODUÇÃO

Apesar do grande potencial produtivo, a citricultura é ameaçada por diversas doenças que resultam na queda da produtividade e da qualidade dos frutos (ALEGRIA et al., 2005). Dentre as doenças podemos destacar o cancro cítrico devido à ausência de controle curativo (BELASQUE JR. & BERGAMIM FILHO, 2006) e severidade desta (LARANJEIRA et al., 2005), muitas vezes aumentada devido a presença da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton) (GOTTWALD et al., 2002).

O isolamento da *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) em meio de cultura é o primeiro passo para a pesquisa com este microrganismo, sendo que, raras metodologias são possíveis de se conduzir, com bactérias, sem cultivá-las (ROMEIRO, 2001). Desta forma, os meios de cultura representam importante papel, sendo que sua finalidade é o cultivo e manutenção *in vitro* de microrganismos. Podem então ser considerados como valiosas ferramentas em fitobacteriologia para diversos objetivos.

A maioria dos organismos cultiváveis crescem em meios contendo uma fonte de carbono e nitrogênio, além de outros elementos em menor quantidade (ALFENAS & MAFIA, 2007). Geralmente, a maioria dos meios de cultura utilizados rotineiramente em laboratórios de Fitopatologia, presta-se ao isolamento, ao cultivo e à manutenção de bactérias fitopatogênicas não fastidiosas (SCHAAD, 1988; ROMEIRO, 2001).

Diversos são os meios de cultura existentes para o cultivo de bactérias, porém, poucos são os trabalhos que estudam a eficácia ou a qualidade destes meios de cultura. Ao testar diferentes meios de cultura, pode-se conhecer melhor a necessidade

nutricional dos microrganismos e conhecer a eficiência de tais suplementos o que é muito útil na escolha do melhor meio a ser utilizado. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de diferentes meios de cultura na manutenção de isolados de Xcc.

## MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo foi preparado a partir de cultura pura de Xcc (isolado Xcc 306), obtida junto ao acervo de culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus - isolado Xcc 306 teve sua sequência nucleotídica determinada – DA SILVA et al., 2002) e mantida em tampão fosfato salino (PBS - 137 mM NaCl - 8,0g; 2,7 mM KCl - 0,2g; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro - 1,189g; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,2g; Água destilada q.s.p. - 1,0 L, pH 7,2 - 7,4) em refrigerador. Para reativação, uma alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana foi transferida para o meio de cultura Nutriente Agar (NA) em placas de Petri e espalhada com alça Drigalski.

As placas foram então incubadas a 28 °C para o desenvolvimento da bactéria. Com 48 horas de incubação foi possível visualizar as colônias individualizadas de Xcc. As colônias foram então repicadas em novas placa de Petri contendo meio NA com o auxílio de uma alça de platina e após nova incubação a 28 °C por 48 horas houve multiplicação em colônias bem individualizadas deste microrganismo, sendo, desta forma, coletadas e mantidas em solução tampão fosfato salino para posterior utilização na avaliação dos meios de cultura.

Procedeu-se a extração de DNA deste o isolado bacteriano (Xcc 306), a fim de identificar como sendo Xcc, foi realizada uma amplificação do DNA através da técnica de PCR utilizando um par de primer específicos (COLETTA-FILHO et al., 2006). Após, o produto da PCR foi observado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo utilizado brometo de etídio para visualização das bandas no gel. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

O meio de cultura Kado D5 é um meio seletivo usado para isolar *Xanthomonas*. Composto por Celobiose (10g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3g), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1g), NH<sub>4</sub>Cl (5g), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,3g), Ágar (15g) e Água destilada (1000mL), favorece o crescimento de bactérias do gênero *Xanthomonas* e *Agrobacterium*, mas suprime o crescimento de *Pseudomonas* (KADO & HESKETT, 1970). Outro meio seletivo é o meio Wilbrink

(Bacto Peptona, 5 g; Sacarose, 10 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25 g; Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0,05 g; Ágar, 15 g; H<sub>2</sub>O, 1.000 mL) para isolamento de *Xanthomonas albilineans*, é um meio descrito para isolamento de bactérias fastidiosas (ALFENAS & MAFIA, 2007).

NA é o meio de cultura composto de extrato de carne (3,0g), peptona (5,0g), Ágar (15,0g) e água destilada (1000 mL) (ROMEIRO, 2001). O meio 523 de KADO & HESKETT (1970), composto de sacarose (10g), caseína ácida hidrolizada (8g), extrato de levedura (4g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2g), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,3g), Ágar (15g), água destilada (1000 mL), suporta o crescimento da maioria das espécies de fitobactérias não fastidiosas (bactérias que não possuem requerimentos nutricionais elevados), proporcionando rápido crescimento e boa transparência (ROMEIRO, 2001).

Outro meio de cultura é o Mannitol Glutamato Extrato de Levedura (MGY), podendo ser utilizado com ou sem ágar, conforme a finalidade. De acordo com BENDER et al. (1990) e COOKSEY & AZAD (1992), este é um meio padrão utilizado para avaliar resistência de Xcc ao cobre *in vitro*. O meio MGY com Ágar é composto por: 15,0g de Ágar; 10,0g de Manitol; 2,0g de Ácido L-Glutâmico; 0,5g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 de NaCl; 0,2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 1L de água destilada (BEHLAU et al., 2012a; BEHLAU et al., 2012b).

SCUDERI et al. (2010), estudando *X. citri* subsp. *citri* com foco na sua viabilidade e sobrevivência sob diferentes condições de estresse, utilizou o meio de cultura denominado caldo Luria-Bertani (LB), um meio rico nutricionalmente. O meio LB é composto por: 10,0g de bacto-14 triptona; 5,0g de extrato de levedura; 10,0g NaCl; 1,0g de glicose e 1L de água destilada com pH ajustado para 7,0 com 1 N de NaOH (BERTANI, 1951).

O meio Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), composto por 5,0 g de Dextrose; 1,5 g de Peptona; 2,0 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de Ácido L-Glutâmico; 0,3 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 15,0 g de Ágar e 1L de água destilada. Este meio foi descrito por RODRIGUES NETO; MALAVOLTA; VICTOR (1986), como um meio simples para cultivar Xcc.

YDC é um meio semisseletivo e sua utilização permite o crescimento de *Xanthomonas* spp. ao identificar o crescimento de colônias amarelas neste meio (SCHAAD et al., 2001). O meio YDC é composto por: 20,0 g de Carbonato de Cálcio;

20,0 g de Dextrose; 10,0 g de Extrato de Levedura; 15,0 g de Ágar e 1L de água destilada (DUARTE et al., 2005).

Para os ensaios laboratoriais, foram preparados 8 diferentes meios de cultura, sendo estes, o meio Nutriente Agar (NA), Manitol Glutamato Yeast (MGY), Kado (D5), 523, Luria Bertani (LB), Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Yeast Destrose Carbonate (YDC) e Wilbrink (WB). Os meios de cultura foram preparados, autoclavados à 121°C por 20 minutos e vertidos em placas de Petri.

Para a comparação dos meios de cultura estudados, foi realizado o ajuste de concentração da suspensão bacteriana em tampão fosfato salino (PBS) com auxílio de aparelho espectrofotômetro (ThermoPlate TP-reader–USA) para  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (UFC-unidades formadoras de colônias), correspondente a uma leitura de 0,3 à 630nm de comprimento de onda (BELASQUE JR & JESUS JR, 2006). Da suspensão com concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, uma alíquota de 25µL foi transferida para microtubo contendo 225 µL de solução salina. Este procedimento foi repetido por sete vezes ( $10^{-7}$ ), tendo a finalidade de obter uma suspensão bacteriana menos concentrada, para ser possível a visualização, contagem e mensuração do diâmetro das colônias individualizadas nos diferentes meios de cultura testados. Posteriormente ao ajuste de concentração e diluições, uma alíquota de 25µL da suspensão bacteriana foi transferida para as placas de Petri contendo os meios de cultura a serem avaliados. As placas foram incubadas em estufa à 28°C e a avaliação foi realizada de 12 em 12 horas durante 5 dias. Foram realizadas 5 repetições para cada isolado e meio de cultura testado. As colônias bacterianas foram analisadas quanto à cor, viscosidade e formato. O número total de colônias em cada placa foi contado e o diâmetro das colônias nas placas foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo - Japão).

O número e o diâmetro de colônias por placa foram analisados, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2010) para determinar qual o meio de cultura que mostrou ser mais eficiente para o desenvolvimento bacteriano. Os custos de preparo de cada meio de cultivo foram calculados de acordo com o preço de mercado. A quantidade e o respectivo preço dos componentes de cada meio de cultivo foram discriminados para que junto com as outras avaliações pudessem ser analisadas o custo-benefício de cada meio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as colônias de Xcc desenvolvidas nos diferentes meios de cultura apresentaram cor amarela, aspecto mucóide, forma circular e superfície convexa. Estes resultados são muito semelhantes aos resultados de TEBALDI; SOUZA; MACHADO (2007), ao estudarem meios de cultura semisseletivos no cultivo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

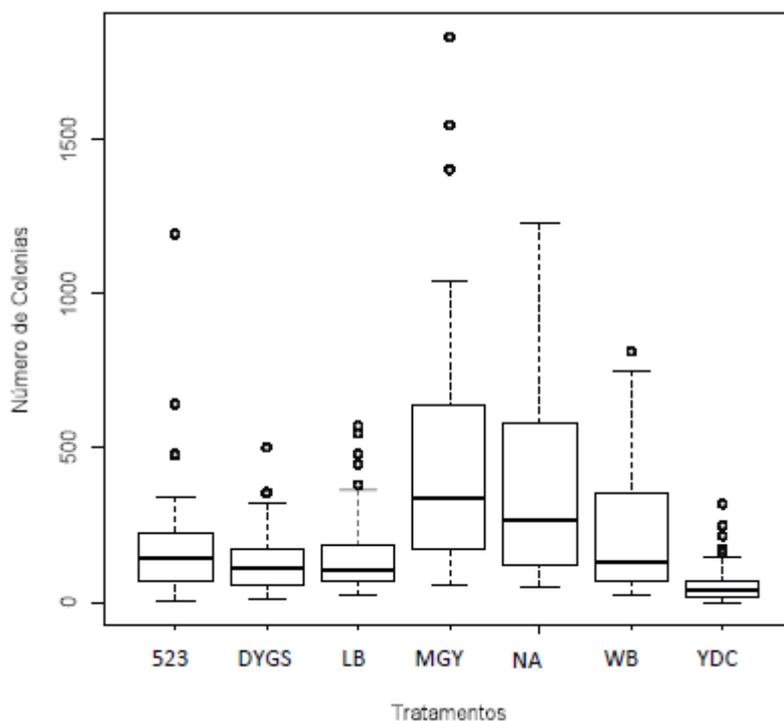
De todos os meios de cultura avaliados, apenas um não se mostrou eficiente. Apesar de ser um meio de cultura seletivo para *Xanthomonas*, não foi observado crescimento bacteriano no meio D5. Este resultado difere dos resultados de KADO & HESKETT (1970), ao exporem que este meio favorece o crescimento de *Xanthomonas* e espécies de *Agrobacterium*, porém suprime o crescimento de espécies de *Pseudomonas*. Quanto aos demais meios de cultura avaliados, em todos foi observado o crescimento bacteriano.

No que concerne ao número de colônias (Figura 1), o meio MGY com uma média aproximada de 446 colônias foi o que apresentou a maior média de número de colônias quando comparado aos demais meios de cultura. Em seguida o meio NA com média aproximada de 365 colônias e em terceiro está o meio de cultura WB apresentando cerca de 225 colônias. Em seguida estão os meios 523, LB e DYGS com médias de 173, 150 e 129 colônias, respectivamente. Por último, o meio YDC se mostrou com eficiência bem inferior aos demais quando se trata de crescimento bacteriano, apresentando apenas 54 colônias. Considerando que o número de colônias por placa para contagem deve variar de 30 a 300 (MAPA, 1993; WANG et al., 2011; MARTINS; FIÚZA; MARTINS, 2013), o meio MGY e NA ultrapassaram este limite.

O maior número de colônias bacterianas apresentado pelo meio MGY pode ser justificado quando a sua composição é analisada. De acordo com RAMOS (2012), o fornecimento de nitrogênio influencia na produção de goma xantana, sendo que uma elevada concentração deste componente no meio é necessária para um rápido crescimento celular. Segundo este mesmo autor, o glutamato, o nitrato de sódio e o nitrato de amônio podem servir como fontes de nitrogênio, sendo que o glutamato é considerado a melhor fonte. Além do nitrogênio, o fósforo e o magnésio influenciam o crescimento de células de *Xanthomonas* e o enxofre favorece a produção da goma xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Desta forma, o meio MGY é o único que possui esses três componentes juntos, sendo o glutamato a fonte de nitrogênio, o fosfato de potássio a fonte de fósforo e o sulfato de magnésio pentahidratado a fonte de magnésio e enxofre. O resultado apresentado pelo meio YDC reforça esta hipótese, visto que justamente este foi o meio que apresentou o pior resultado e não possui nem um dos três componentes em sua composição.

**Figura 1** - Distribuição do número de colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* nos meios de cultivo 523, Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Luria Bertani (LB), Manitol Glutamato Yeast (MGY), Nutriente Agar (NA), Wilbrink (WB) e Yeast Dextrose Carbonate (YDC).

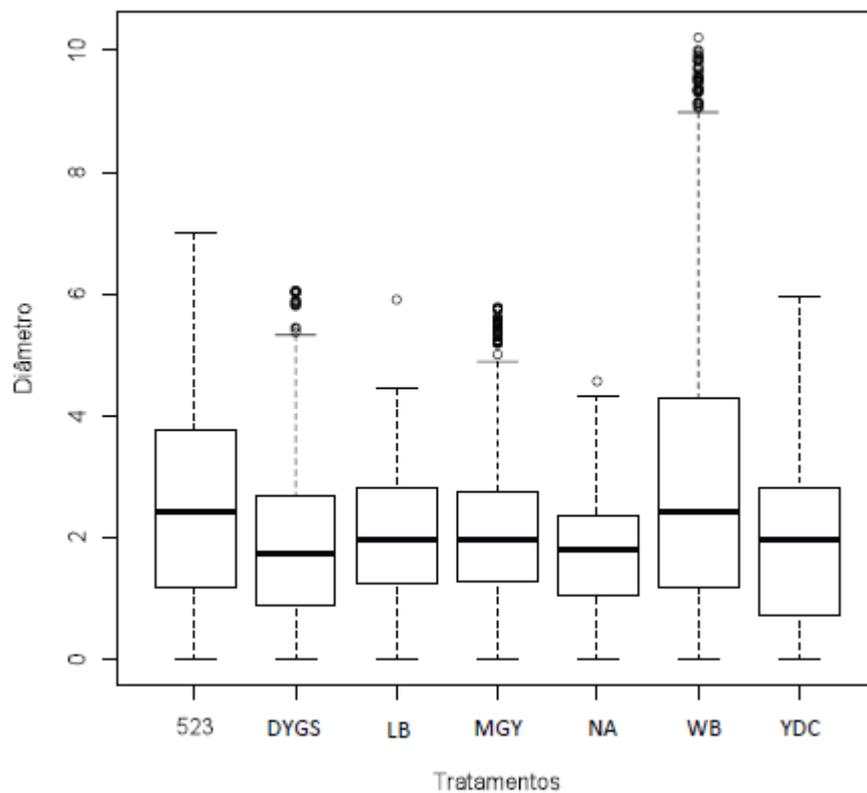


Fonte: Autores (2024)

Quanto ao diâmetro destas colônias (Figura 2), o meio WILBRINK apresenta o maior diâmetro, com colônias medindo aproximadamente 2,81 cm, seguido do meio 523 que apresentou colônias com média de diâmetro de 2,56 cm. O meio MGY e LB apresentaram médias próximas, sendo 2,05 e 2,00 cm, respectivamente. Os meios DYGS e YDC apresentaram a mesma média de diâmetro de colônias, de 1,84 cm, ficando na frente apenas do meio NA que apresentou a menor média de diâmetro de colônias bacterianas, sendo esta 1,79 cm. Apesar do meio NA ter apresentado grande número colônias, este meio não foi muito eficiente para o desenvolvimento das colônias no decorrer do tempo.

Ainda assim, continua sendo um bom meio de cultura ao ser utilizado rotineiramente em laboratório de fitopatologia quando se trata de isolamento bacteriano, sendo que o objetivo de isolamento é alcançado. Porém quando se trata de cultivo bacteriano, objetivando-se um crescimento rápido, o meio WB foi o que mostrou mais eficiente para o crescimento e desenvolvimento.

**Figura 2** - Box plot representando o diâmetro de colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* nos meios de cultivo 523, Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Luria Bertani (LB), Manitol Glutamato Yeast (MGY), Nutriente Agar (NA), Wilbrink (WB) e Yeast Destrose Carbonate (YDC).

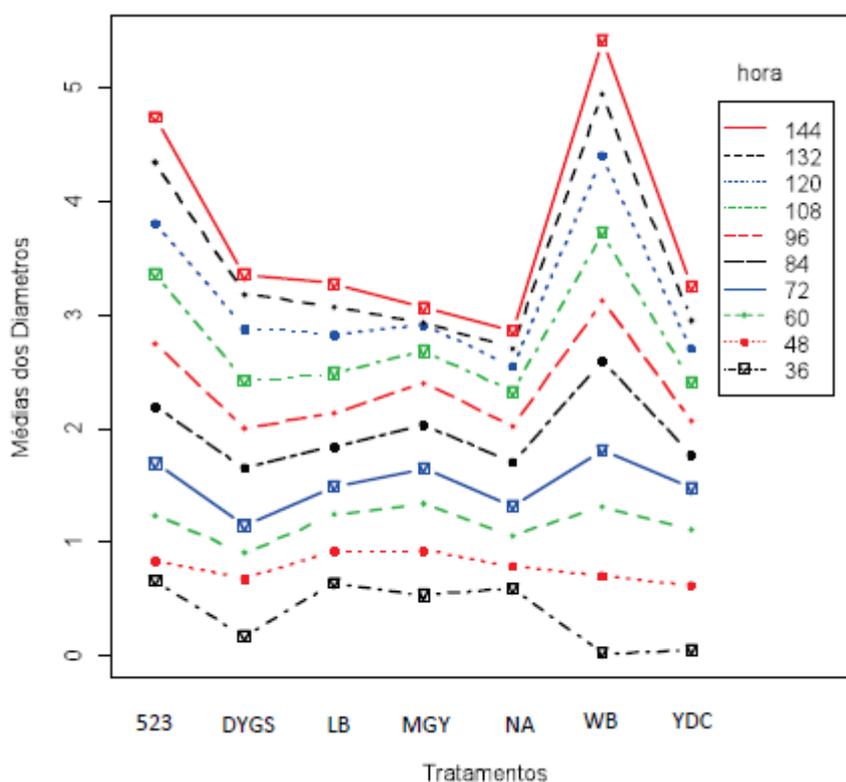


Fonte: Autores (2024)

De acordo com a figura 3, o diâmetro das colônias bacterianas na superfície do meio WB possui um aumento contínuo no decorrer do tempo, não sendo observado qualquer estagnação de crescimento. O meio 523 apresenta colônias bacterianas com crescimento contínuo desde o primeiro até o último período de avaliação. Em meio

MGY, as colônias de Xcc apresentaram crescimento contínuo até o período de avaliação de 96 horas, sendo que a partir desse período pode ser observada uma tendência para estagnação nos diâmetros das colônias. Visto que todos os meios de cultura foram avaliados das 36 horas até 144 horas após o isolamento, num intervalo de 12 em 12 horas, é interessante ressaltar que 72 horas é o tempo mais importante a ser avaliado, visto que é neste período após o isolamento que geralmente se replica as colônias bacterianas para se obter intensa multiplicação do microrganismo.

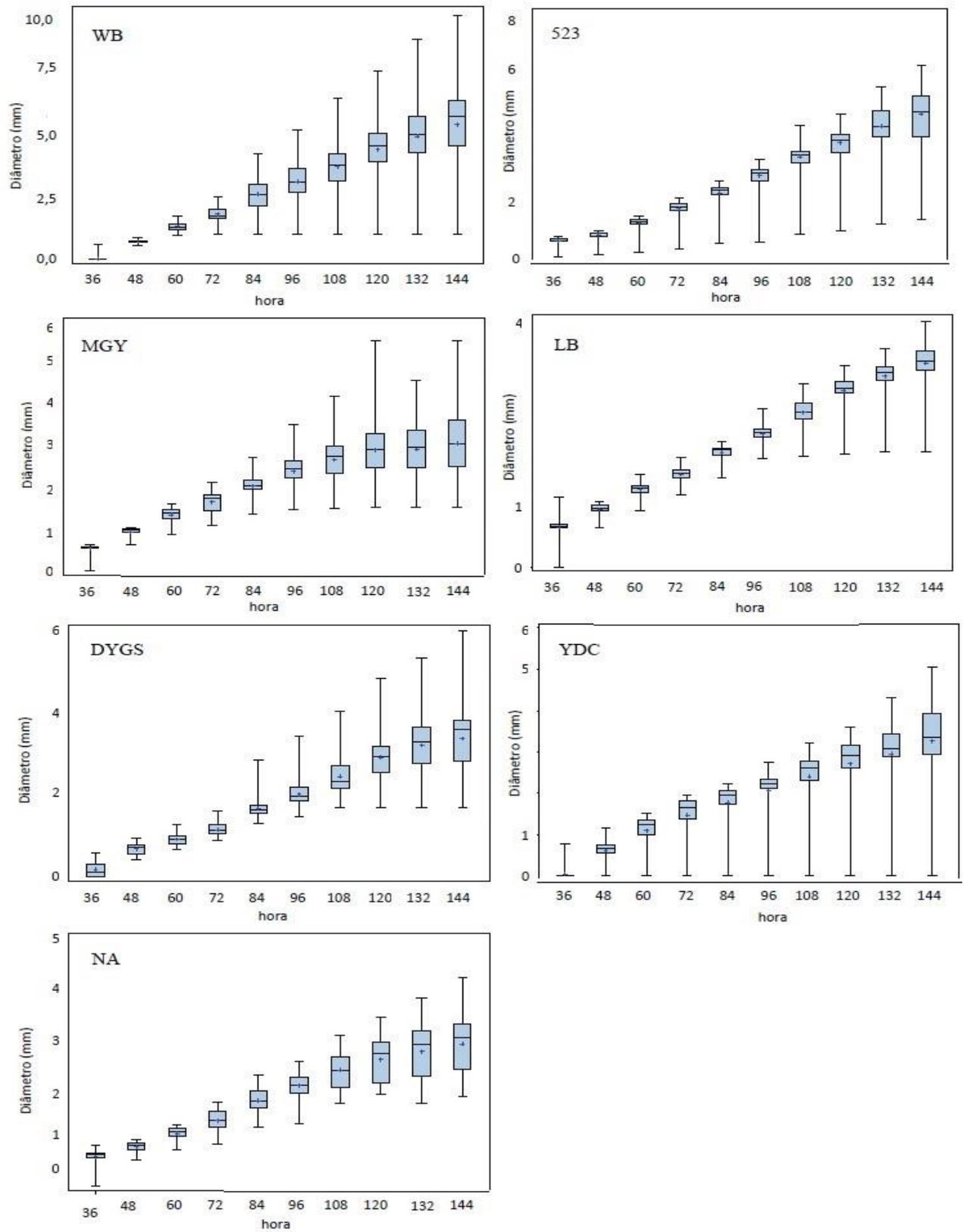
**Figura 3** - Perfis representando o diâmetro de colônias para os meios de cultivo 523, Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Luria Bertani (LB), Manitol Glutamato Yeast (MGY), Nutriente Agar (NA), Wilbrink (WB) e Yeast Destrose Carbonate (YDC) em todos os períodos de avaliação.



Fonte: Autores (2024)

Observou-se que neste período todos os meios mostraram eficiência, dando condições necessárias para o desenvolvimento da bactéria Xcc. Porém, o lugar de destaque permanece para o meio WB, que neste período de 72 horas também é o meio que possui os maiores diâmetros de colônias desta bactéria. A Figura 4 representa a média do diâmetro das colônias dos isolados em todos os períodos de avaliação.

**Figura 4** - Box plot dos diâmetros de colônias em cada período de avaliação e em cada meio de cultura avaliado.



Fonte: Autores (2024)

O meio LB apresentou colônias com os maiores diâmetros no primeiro período de avaliação, porém o crescimento se manteve baixo e constante nos demais períodos, assim como para o meio DYGS. O meio YDC apresentou crescimento bacteriano somente no segundo período de avaliação, se mantendo baixo e com tendência à estagnação.

O meio NA foi o meio de cultura que apresentou o maior diâmetro de colônias às 36 horas após incubação bacteriana, porém foi também o meio que apresentou os menores diâmetros no decorrer do tempo, apresentando forte tendência à estagnação do aumento de diâmetros das colônias nos últimos períodos de avaliação.

Apesar de ser observado que o meio WB foi o que permitiu o melhor desenvolvimento de tamanho de colônias de Xcc e o meio MGY o que apresentou o maior número de colônias bacterianas em sua superfície, é necessário observar outros aspectos na escolha de um meio de cultura.

O último período de avaliação, correspondente a 144 horas, não é o melhor período a ser observado, sendo que neste momento, a maiorias das células bacterianas podem estar inviáveis.

O período de 72 horas de cultivo corresponde ao melhor período de avaliação, visto que nesse momento a maioria das células bacterianas estão viáveis e em desenvolvimento, sendo este o período em que comumente se realiza a repicagem das colônias bacterianas.

Como pode ser verificado, de todos os meios de culturas testados, apenas o meio D5 não permitiu o desenvolvimento da bactéria. Os demais apresentaram resultados satisfatório para obtenção de colônias no período de avaliação de 72 horas.

Mas, outro aspecto a ser analisado é o custo de preparo de cada meio. Sendo assim, o meio MGY, além de apresentar o maior número de colônias em sua superfície e mostrar bons resultados quanto ao diâmetro destas colônias, melhor que o meio NA (mais utilizado), foi ainda o meio que apresentou o menor custo de preparo (Tabela 1).

**Tabela 1** - Custos de preparo por litro dos meios de cultivo Manitol Glutamate Yeast (MGY), Dextrose Yeast Glutamate (DYGS), Wilbrink (WB), 523, Luria Bertani (LB), Nutriente Agar (NA), Yeast Dextrose Carbonate (YDC), Kado (D5). Valores em Dólar Americano (US\$).

Meios de cultura	Custos/L (US\$)
MGY	1.06
DYGS	1.16
WB	1.21
523	1.25
LB	1.28
NA	1.37
YDC	1.69
D5	20.78

Fonte: Autores (2024)

## CONCLUSÃO

Considerando todos os aspectos de eficiência para um meio de cultura, o meio MGY é o mais indicado para ser utilizado rotineiramente para isolamento e manutenção de *X. citri* subsp. *citri*, visto sua eficiência nutricional em permitir um desenvolvimento de grande número de colônias bem como do diâmetro destas, além de apresentar baixo custo de preparo em comparação aos demais meios estudados.

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pela agência Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) por meio do projeto 302809/2022-8 - W.M.C. Nunes e por bolsistas do CNPq e da agência Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

## REFERÊNCIAS

- ALEGRIA, M.C.; SOUZA, D.P.; ANDRADE, M.O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.; da SILVA, A.C.R.; FARAH, C.S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 2315-2325, 2005.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, 2007. 382p.
- BEHLAU, F.; GRAHAM, J.H.; JONES, J.B. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *European Journal of Plant Pathology*, v.133, p.949-963, 2012 a.
- BEHLAU, F.; JONES, J.B.; MYERS, M.E. e GRAHAM, J.H. Monitoring for resistant populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and epiphytic bacteria on citrus trees treated with copper or streptomycin using a new semi-selective medium. *European Journal of Plant Pathology*, v.132, p. 259–270, 2012 b.
- BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A. Estratégias de controle do cancro cítrico. *Summa Phytopathologica*, v. 32, p. 143-148, 2006.
- BELASQUE JUNIOR, J.; JESUS JURNIOR, W.C. Concentração de inoculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Laranja*, 27, n.2, p. 263-272, 2006.
- BENDER, C.L.; MALVICK, D.K.; CONWAY, K.E.; GEORGE, S.; PRATT, P. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* v.56, p.170-175, 1990. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.56.1.170-175.1990>
- BERTANI, G. Estudos sobre lysogenesis. I. O modo de libertação de fagos por *Escherichia coli* lisogênico. *J. Bacteriol*, v. 62. p. 293-300, 1951.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; SOUZA, A.A.; NETO, J.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; HARTUNG, J.S.; MACHADO, M.A. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants, *Journal of Applied Microbiology*, v.100, n.2, Feb/2006, p.279–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02787.x>
- COOKSEY, D.A.; AZAD, H.R. Accumulation of Copper and Other Metals by Copper-Resistant Plant-Pathogenic and Saprophytic Pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* v.58, p.274-278, 1992. <https://doi.org/10.1128/aem.58.1.274-278.1992>
- DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.; DO AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICALI, R.M.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.; FERREIRA, R.C.; FERRO, M.I.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.;

SENA, J.A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R.F.; SPINOLA, L.A.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, v. 417, p. 459-463, 2002.

DUARTE, V.; DALBOSCO, M.; TASSA, S.O.M.E. Ocorrência de Crestamento Bacteriano do Gerânio, Causado por *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, no Brasil. *Fitopatol. Bras.* v.30, n.3, p. 434, jul/ago 2005.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnology Advances*. v. 18, p.549-579, 2000.

GOTTWALD, T.R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J.H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E.L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, v.92, p. 361-377, 2002.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v. 44, p. 693-695, 1970.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA-FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D., et al. *Citros*. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 509 -566, 2005.

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993. Disponível em: <<http://www.crmvgo.org.br/legislacao/OVOS/POR00000101.pdf>> Acessado em: 09 ago 2014.

MARTINS, S.C.S.; FIÚZA, L.M.C.G.; MARTINS, C.M. Comparação de diferentes meios de cultivo para a avaliação da viabilidade celular de fermentos biológicos. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.9, n.16; p. 2478-2486 ,2013.

RAMOS, L.C. Produção de goma xantana utilizando açúcar demerara por diferentes linhagens de *Xanthomonas*. 74f. 2012. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos. Aracaju. Universidade Tiradentes, 2012.

RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA, J.R., VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica.*, v.12, n.16, 1986.

ROMEIRO, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa. UFV, 2001. 279p.

SAS Institute. SAS language reference, v. 9.3. Cary, NC: SAS Institute, 2010.

SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2.ed. St. Paul: APS Press, 1988. 158p.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3.ed. St. Paul: APS Press, 2001. 373p.

SCUDERI, G.; GOLMOHAMMADI, M.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; CIRVILLERI, G.; LLOP, P. Development of a simplified NASBA protocol for detecting viable cells of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under different treatments. *Plant Pathology*, v.59, p. 764–772, 2010.

TEBALDI, N.D.; SOUZA, R.M.; MACHADO, J.C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em Sementes de Feijão em Meio de Cultura Semi Seletivo. *Fitopatologia Brasileira*. v. 32, 2007.

WANG, N.; STRUGNELL, R.; WIJBURG, O.; BRODNICKI, T. Measuring Bacterial Load and Immune Responses in Mice Infected with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Visualized Experiments*, v. 54, p. 1-10, 2011.