

EFEITO “IN VITRO” DE ANTIBIÓTICOS E RIZOBACTÉRIAS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS AO *Eucalyptus* spp.¹

Jeane de Fátima Cunha², Edgard Augusto de Toledo Picoli³, Acelino Couto Alfenas⁴ e Rivadalve Coelho Gonçalves⁵

RESUMO – Doenças causadas por bactérias constituem um novo desafio à cultura do *Eucalyptus* spp., podendo, inclusive, limitar o uso de clones suscetíveis. O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência de antibióticos e rizobactérias na inibição do crescimento “in vitro” de isolados de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. na fase de viveiro e de campo. O antibiótico sulfato de amicacina e a rizobactéria S1 (*Bacillus subtilis*) destacaram-se quanto à inibição do crescimento do isolado fitopatogênico IP1-05 (*Pseudomonas chichorii*), enquanto a cefoxitina causou maior inibição dos isolados BSV16 e RVV11 (*Rhizobium* sp.). Os antibióticos de uso comercial na área agrônômica, Mycoshield (oxitetraciclina) e Agrimicina (estreptomicina e tetraciclina) foram pouco efetivos. Este trabalho proporciona embasamento a alternativas para controle biológico de doenças bacterianas em mudas de *Eucalyptus* spp. na fase de viveiro.

Palavras-chave: Bactérias fitopatogênicas, rizobactérias, antibióticos, *Eucalyptus* spp. e clonagem.

“IN VITRO” EFFECT OF ANTIBIOTICS AND RHIZOBACTERIA ON THE CONTROL OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA IN *Eucalyptus* spp.

ABSTRACT – Diseases caused by bacteria represent a new challenge for *Eucalyptus* spp. and may also limit the use of susceptible clones. Our study aimed at an evaluation of the efficiency of antibiotics and rhizobacteria in inhibiting “in vitro” growth of phytopathogenic bacteria isolates in *Eucalyptus* spp. during the nursery stage and in the field. The antibiotic amicacine sulfate and rhizobacterium S1 (*Bacillus subtilis*) stood out inhibiting the growth of the phytopathogenic isolate IP1-05 (*Pseudomonas chichorii*), whereas cefoxitin caused a greater inhibition of the isolates BSV16 and RVV11 (*Rhizobium* sp.). The commercial antibiotics for agricultural use Mycoshield (oxitetracycline) and Agrimycin (streptomycin and tetracycline) were little effective. This study offers a base for alternatives of biological control of bacterial diseases in *Eucalyptus* spp. nursery seedlings.

Keywords: Phytopathogenic bacteria, rhizobacteria, antibiotics, *Eucalyptus* spp. and cloning.

1. INTRODUÇÃO

A demanda por madeira e a competição de mercados estimulam a busca de alternativas para o aumento da produtividade dos plantios de *Eucalyptus* spp. A clonagem de genótipos promissores vem possibilitando um considerável avanço na silvicultura intensiva dessa espécie no Brasil (SANTOS, 1994), pois permite a

manutenção plena das características da planta-matriz e envolve as fases de seleção e resgate de material genético, testes clonais e multiplicação comercial de matrizes superiores (ALFENAS e ZAUZA, 2002). A clonagem de *Eucalyptus* spp. em escala comercial pode ser feita por meio de estaquia (macroestaquia), microestaquia ou miniestaquia (ALFENAS e ZAUZA,

¹ Recebido em 21.01.2005 e aceito para publicação em 13.09.2006.

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal de Viçosa-UFV. E-mail: <jeanefcunha@yahoo.com.br>.

³ Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV. E-mail: <epicoli@alunos.ufv.br>.

⁴ Departamento de Fitopatologia da UFV. E-mail: <aalfenas@ufv.br>.

⁵ EMBRAPA/ Acre.

2002). E o sucesso na implantação dessa planta depende da qualidade das mudas que serão levadas para o campo.

Recentemente, a mancha-foliar e a desfolha causadas por bactérias foram relatadas como sintomas de uma doença nova para a eucaliptocultura nacional, podendo provocar danos expressivos nas fases de viveiro e campo (GONÇALVES et al., 2001). Essa doença caracteriza-se pela indução de manchas foliares úmidas e translúcidas (anasarca), nas fases iniciais da infecção, como conseqüência do extravasamento de conteúdo de células para os espaços intercelulares. Com o progresso da enfermidade, as lesões tornam-se necróticas e ressecadas, podendo ser confundidas com manchas causadas pelo fungo *Phaeophleospora epicoccooides* ou por deriva de herbicida. Seu diagnóstico preciso requer exame laboratorial, mediante testes de exsudação em gota de pus bacteriano que sai das lesões. Outros sintomas também associados a essa enfermidade são o anelamento e morte de porções apicais.

Estudos sobre a etiologia e o controle da bacteriose do eucalipto foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal/Genética Interação Planta - Patógeno (UFV). Como se trata de uma doença nova, a identificação das espécies foi realizada recentemente, evidenciando-se a presença dos gêneros: *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Rhizobium* (GONÇALVES, 2003). A sua penetração é passiva, isto é, ocorre pelas aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou por ferimentos, requerendo molhamento foliar para o sucesso da infecção (ALFENAS, 2001).

A bacteriose do eucalipto tem sido encontrada na Argentina (Província de Corrientes), no Amapá (Tartarugalzinho), Pará (Monte Dourado), Rio Grande do Sul (Barra do Ribeiro), Bahia (Teixeira de Freitas), São Paulo (Mogi-Guaçu e Itapetinga) e Minas Gerais (Ipatinga e Bom Despacho) (ALFENAS e ZAUZA, 2002). Para o controle de bacterioses de culturas agrônômicas, têm sido recomendados os antibióticos Mycoshield (oxitetraciclina) e Agrimicina (estreptomicina e tetraciclina) (A.C. Alfenas - informação pessoal).

Resultados de pesquisas obtidos no Laboratório de Patologia Florestais da UFV comprovaram que rizobactérias aplicadas no substrato de mudas de *Eucalyptus* spp. promoveram o enraizamento e, além de aumentarem a massa radicular, induziram a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*), podridão de estacas (*Botrytis cinerea*, *Cylindrocladium* spp. e *Rhizoctonia* spp.) ao anelamento da haste e à mancha-foliar causada por *Sporotrix eucalypti* (ALFENAS e ZAUZA, 2002).

Visando encontrar alternativas para o controle de bacteriose em mudas de eucalipto na fase de viveiro, avaliou-se, neste trabalho, a inibição “in vitro” do crescimento de três isolados de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp., provenientes de Mogi-Guaçu, SP (IP1-05), Barra do Ribeiro, RS (RVV11), e Teixeira de Freitas, BA (BSV16).

2. MATERIALE MÉTODOS

2.1. Seleção de antibióticos “in vitro” para o controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp.

Neste ensaio, testou-se nove antibióticos contra três isolados de bactérias fitopatogênicas ao eucalipto, IP1-05 (*Pseudomonas chichorii*), RVV11 (*Rhizobium* sp.) e BSV16 (*Rhizobium* sp.). Os três isolados provocam manchas foliares e desfolha em mudas de eucalipto, o que foi comprovado mediante a inoculação em plantas de *Eucalyptus* spp. (não hospedeiras) por injeção de inóculo (GONÇALVES, 2003). Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 10 placas de Petri (diâmetro de 9,0 cm e altura de 1,5 cm). Em cada placa, colocou-se um disco de papel contendo o antibiótico. Discos de papel sem antibiótico serviram de testemunha. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SAEG, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

2.1.1. Antibióticos e dosagens

Os antibióticos avaliados neste ensaio foram: cefalexina (30 µcg), vancomicina (30 µcg), sulfato de ampicilina (30 µcg), ceftriaxona (30 µcg), cefadroxil (30 µcg), oxacilina (5 µcg), polimixina (30 µcg), cefoxitina (30 µcg) e oxitetraciclina-cálcio (Mycoshield) (0,002 µg). Os antibióticos foram impregnados em discos de papel Wathman nº 1 (0,7 cm de diâmetro), nas concentrações citadas anteriormente.

2.1.2. Preparo das suspensões de bactérias fitopatogênicas e calibração da densidade de inóculo

As bactérias fitopatogênicas foram isoladas e armazenadas em glicerina a -80 °C. Após serem repicadas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo meio MBI sólido, foram incubadas a 28 °C/48 h. A seguir, foram novamente repicadas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio MB1 líquido e incubadas sob agitação constante a 150 rpm e 28

°C, por 24 h. Após incubação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 5.000 rpm, por 30 min, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,85%). Posteriormente, as absorbâncias foram ajustadas para 0,1 ($\lambda = 550$ nm) valor correspondente a 10^8 ufc/mL.

2.1.3. Preparo das placas

De cada suspensão de bactéria fitopatogênica, previamente calibrada a 10^8 ufc/mL, 10 μ L foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio MB1 semi-sólido. Após a homogeneização, o meio infestado foi vertido para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro e 1,5 altura) esterilizadas. Em seguida, um disco com antibiótico foi colocado no centro de cada placa. As placas foram mantidas a 28 °C e, após 48 h mediu-se o halo de inibição formado com o auxílio de régua com precisão de 1 mm.

2.2. Antibiose “in vitro” de rizobactérias contra bactéria fitopatogênica a *Eucalyptus* spp.

Neste ensaio, foram testados os isolados de rizobactérias S1, S2 e 3918 de *Bacillus subtilis*, e o isolado RC3 (não identificado) contra o isolado de bactéria fitopatogênica IP1-05 (*Pseudomonas chichorii*), que causa mancha-foliar no *Eucalyptus* spp. Esse isolado foi escolhido de forma aleatória. Os antibióticos oxitetraciclina 0,002 g/mL (Mycoshield) e sulfato de estreptomicina 0,002 g/mL (Agrimicina) foram usados como controles. Eles foram diluídos diretamente em uma solução de H₂O e ETOH (etanol) na proporção de 1:1 (u/u), e posteriormente em H₂O. 2 μ L da solução de cada antibiótico foram pipetados individualmente em discos de papel-filtro Wathman n° 1 (0,7 cm de diâmetro).

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada uma constituída de uma placa de Petri (9,0 de diâmetro e 1,5 de altura) com quatro discos de papel (0,7 cm de diâmetro) contendo um isolado de rizobactéria. O mesmo procedimento foi realizado nos tratamentos-controle, com antibióticos e sem antibióticos e rizobactérias. As análises estatísticas foram feitas no programa SAEG, cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de significância.

A ativação das bactérias fitopatogênicas foi realizada como descrito no item 2.1.2. As rizobactérias foram isoladas e armazenadas em glicerina a -80 °C.

Após serem repicadas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo meio MBI sólido, elas foram incubadas a 28 °C/48 h. Após o crescimento das colônias de rizobactérias, acrescentou-se solução salina (cloreto de sódio 0,85%). As colônias foram raspadas com alça de Drigalsky e a suspensão, recolhida em béqueres separadamente. As absorbâncias foram determinadas e ajustadas para 0,5 ($\lambda = 550$ nm). Espalharam-se 10 μ L da suspensão de bactéria fitopatogênica em placas de Petri (9,0 de diâmetro e 1,5 cm de altura), contendo meio MB1 sólido. Discos de papel foram embebidos nas suspensões de rizobactérias e, em seguida, colocados quatro em cada placa, sendo elas incubadas a 28 °C, durante 48 h, quando, então, mediu-se o halo de inibição com régua de 1 mm de precisão.

3. RESULTADOS

3.1. Seleção de antibióticos para controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp.

Apenas os antibióticos sulfatos de amicacina, ceftriaxona, polimixina, oxitetraciclina e vancomicina inibiram o crescimento do isolado de bactéria fitopatogênica IP1-05, tendo o sulfato de amicacina sido superior a esses quatro, e os antibióticos cefoxitina, cefalexina, ceftriaxona, cefadroxil, polimixina e oxitetraciclina foram efetivos na inibição dos isolados BSV16 e RVV11, tendo o antibiótico cefoxitina se destacado como o mais efetivo, diferindo significativamente de cefalexina, ceftriaxona, cefadroxil, polimixina e oxitetraciclina (Quadro 1).

3.2. Antibiose “in vitro” de rizobactérias contra bactéria fitopatogênica ao *Eucalyptus* spp.

Todos os tratamentos inibiram significativamente o crescimento do isolado fitopatogênico IP1-05. O isolado de rizobactéria S1 de *Bacillus subtilis* foi o que promoveu maior inibição do crescimento da bactéria IP1-05, seguido de Mycoshield diluídos em água e Mycoshield diluído em etanol e água, S2, Agrimicina diluída em etanol e Agrimicina diluída em água, 3918 e RC3, em comparação com a testemunha (Quadro 2).

Os produtos comerciais Mycoshield e Agrimicina diluídos tanto em água quanto em etanol não diferiram entre si, pois o tamanho do halo de inibição formado foi o mesmo, embora o Mycoshield tenha apresentado melhores resultados para inibição do crescimento em relação à Agrimicina.

Quadro 1 – Médias do halo de inibição formado para cada antibiótico
Table 1 – Means of the inhibition halo formed for each antibiotic

Nome técnico	Nome comercial	Halo de inibição (cm)					
		Médias					
		IP1-05		BSV16		RVV11	
cefotaxima	Mefoxin	0,0	D	3,1	A	3,2	A
cefalexina	Keflex	0,0	D	2,6	B	2,7	B
ceftriaxona	Rocefin	1,2	B	2,5	B	2,6	B
cefadroxil	Cefamox	0,0	D	2,2	B	2,6	B
polimixina	Panotil	1,0	B	1,3	C	1,4	C
oxitetraciclina	Mycoshield	0,4	C	1,0	C	0,7	D
vancomicina	Vancomicina	0,0	C	0,2	D	0,1	E
sulfato de ampicilina	Novamin	1,6	A	0,1	D	0,1	E
oxacilina	Staficilin	0,0	D	0,0	D	0,0	E
testemunha	-	0,0	D	0,0	D	0,0	E

*Médias seguidas de mesma letra em uma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância. CV (BSV) = 12,8%, CV(RVV11) = 9,6% e CV (IP1-05) = 30,2 %.

Quadro 2 – Médias do halo de inibição formado para rizobactérias e antibióticos

Table 2 – Means of the inhibition halo formed for rhizobacteria and antibiotics

Tratamentos	Halo de inibição(cm)-médias IP105	
S1 (<i>Bacillus subtilis</i>)	1,25	A
Mycoshield (água)	0,53	B
Mycoshield (água+etanol)	0,50	B
S2 (<i>Bacillus subtilis</i>)	0,50	B
Agrimicina (etanol)	0,30	C
Agrimicina (água)	0,30	C
3918 (<i>Bacillus subtilis</i>)	0,20	D
RC3 (não identificada)	0,20	D
Testemunha	0,00	E

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. CV = 11,6 %

O isolado S2 de *Bacillus subtilis* e Mycoshield não diferiram entre si, mas foram superiores a Agrimicina.

4. DISCUSSÃO

Antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos que, atuando em baixas concentrações, inibem o crescimento ou a multiplicação de outros microrganismos (WAKSMAN, 1959).

Os antibióticos Mycoshield (oxitetraciclina) e Agrimicina (estreptomomicina e tetraciclina) são utilizados na área agrônômica para controle da bacteriose da batata causada por *Erwinia carotovora* e do pimentão e tomate causada por *Xanthomonas vesicatoria*; além da recomendação para essas culturas, a Agrimicina é utilizada em café, maracujá, ameixa e pêssego (referência). Embora

sem eficiência comprovada, esses antibióticos também têm sido usados, em menor escala, para controle de bacteriose do eucalipto (A. C. Alfenas – informação pessoal). O presente trabalho evidenciou que, ainda com eficiência relativamente baixa, Mycoshield foi mais efetivo no controle do isolado IP1-05, em comparação a Agrimicina, o que permite inferir que a eficiência da oxitetraciclina é superior à da estreptomomicina e tetraciclina para controle dessas fitobacterioses. Em trabalhos futuros, é fundamental testar a eficiência desses antibióticos contra outros isolados dos patógenos.

Segundo Cruz Filho (1979), a estreptomomicina é muito solúvel em água, moderadamente solúvel em etanol e muito pouco solúvel em outros solventes orgânicos, como éter, acetona e acetato de etila. Os antibióticos incluídos no grupo das tetraciclinas são: oxitetraciclinas, clorotetraciclinas, dimetilclorotetraciclina, metaciclina, doxiciclina e minociclina (KURYLOWICZ, 1981). O modo de ação das tetraciclinas e oxitetraciclinas ocorre por meio da inibição da síntese de proteínas em bactérias, por interferirem na incorporação de aminoácidos ativados (aminoacil-tRNA) à cadeia protéica em formação, em nível de ribossoma. As estreptomomicinas podem atuar tanto no início da síntese de proteína, por bloquear a formação do complexo iniciante (associação do aminoacil-tRNA aos ribossomas), quanto interferindo na leitura correta do código genético, o que causa a incorporação de aminoácidos diferentes dos esperados, resultando numa enzima inativa ou não-funcional (KURILOWICZ, 1981).

As melhores respostas para inibição de crescimento dos isolados de bactérias fitopatogênicas foram para

os produtos comercializados para uso humano. Será também importante testar a eficiência desses antibióticos “in vivo”, para posteriormente serem usados em ampla escala para controle de bacterioses em *Eucalyptus* spp.

Tendo em vista a eficiência relativamente baixa de antibióticos e os problemas ambientais de seu uso na área agrônômica e florestal, é importante avaliar outras alternativas de controle, como o biológico. Segundo Romeiro (1995), o controle biológico pode acontecer por meio da indução de resistência, produção de bacteriocinas ou por parasitismo direto.

Inoculação de plantas com isolados avirulentos de bactérias fitopatogênicas ou com bactérias não-patogênicas tem sido capaz de proteger plantas contra doenças bacterianas, em condições experimentais (MCINTYR et al., 1973; WHEELER, 1988).

Bacteriocinas são compostos semelhantes a antibióticos produzidos por bactérias e capazes de inibir outras bactérias filogeneticamente relacionadas com as produtoras. Vidaver (1986) relacionou várias espécies bacterianas fitopatogênicas ou não, produtoras de bacteriocinas, lembrando ser possível controlar doenças bacterianas por meio da utilização de espécies não-patogênicas ou mutantes avirulentos, produtores de bacteriocinas. Para o controle da fitobacteriose da parte aérea seria interessante a possibilidade de se encontrar um bom antagonista, fúngico ou bacteriano, que pudesse ser pulverizado nas partes aéreas de plantas, que sobrevivesse e se multiplicasse no filoplano, produzindo bacteriocinas e, assim, as protegesse contra um patógeno específico ou contra vários patógenos ao mesmo tempo (ROMEIRO, 1995).

No parasitismo direto seriam usados microrganismos que exercessem algum tipo de hiperparasitismo sobre o fitopatógeno bacteriano a ser controlado (ROMEIRO, 1995). No início da década de 1970, o grupo de trabalho do Dr. Allen Kerr, da Universidade de Adelaide (Austrália), obteve, de solo, isolamentos de *Agrobacterium radiobacter* (saprófita) fortemente antagonico a *A. tumefaciens* “in vitro”. A continuidade das pesquisas indicou que esse antagonismo era também obtido “in vivo”, sendo um caso de controle biológico de uma bacteriose que funciona em nível de campo, adotado como prática cultural rotineira em muitos países do mundo (KERR, 1980).

O termo rizobactérias foi usado para denominar as bactérias que colonizam o sistema radicular

(SCHOROTH e HANCOCK, 1982). A interação entre bactérias e raízes de plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra (SCHIPPERS et al., 1987). Rizobactérias benéficas são encontradas na rizosfera de diversas culturas, e 2 a 5% dos isolados dessas rizobactérias podem apresentar efeito positivo no crescimento de plantas (SCHROTH e HANCOCK, 1981). Aquelas que exercem efeito benéfico no desenvolvimento de plantas através da promoção do crescimento e, ou, proteção contra organismos patogênicos são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas ou Plant Growth-Promoting Rizobacteria – PGPR (KLOEPPER et al., 1990; LUZ, 1996). Nesse contexto, a utilização de isolados de rizobactérias no substrato de mudas de *Eucalyptus* spp. tem apontado efeito positivo no controle de doenças causadas por vários fungos, por meio de indução de resistência (ALFENAS e ZAUZA, 2002).

Em testes, comprovou-se que isolados de rizobactérias inibem o crescimento “in vitro” de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp., além de promoverem aumento no crescimento do sistema radicular e parte aérea dessa espécie.

Em testes “in vitro”, o isolado S1 de *Bacillus subtilis* destacou-se quanto à inibição do crescimento do isolado da bactéria fitopatogênica IP1-05 (*Pseudomonas chichorii*), diferindo significativamente das rizobactérias S2 (*B. subtilis*), 3918 (*B. subtilis*), RC3 e dos produtos comerciais Mycoshield e Agrimicina.

Embora a rizobactéria S2 não tenha apresentado bom resultado para inibição do crescimento do isolado da bactéria fitopatogênica IP1-05, em comparação com a rizobactéria S1, esta foi superior à Agrimicina.

A eficiência de alguns isolados de rizobactérias testados em relação aos antibióticos evidencia seu potencial uso no controle de fitobacterioses em *Eucalyptus* spp., considerando-se que a utilização de antibióticos pode desequilibrar o ecossistema e causar danos à saúde humana; além da dificuldade de se translocar na planta e de ser facilmente lixiviado, a busca de agentes ou alternativas para o controle biológico é essencial. Se comprovada a eficácia das rizobactérias “in vivo” para controle de bacteriose em *Eucalyptus* spp., estas poderão ser usadas em substituição ao Mycoshield e Agrimicina, reduzindo, significativamente, o impacto ambiental causado pelo uso desses produtos.

5. CONCLUSÕES

Dentre os antibióticos testados “in vitro”, sulfato de amicacina, cefoxitina, cefalexina, ceftriaxona e cefadril apresentaram potencial de uso, pois promoveram a inibição do crescimento dos isolados de bactérias fitopatogênicas testados, sendo que o sulfato de amicacina apresentou melhor resposta para o controle do isolado IP1-05 (*Pseudomonas chichorii*), enquanto cefoxitina, cefalexina e cefadroxil foram os mais eficazes para os isolados BSV16 e RVV11 (*Rhizobium* sp.) e ceftriaxona foi eficaz para os três isolados testados, superando Mycoshield e Agrimicina, que são os produtos comerciais atualmente utilizados por algumas empresas produtoras de eucalipto. Testes “in vivo” devem ser realizados para confirmação dos resultados obtidos “in vitro”.

O isolado de rizobactéria S1 de *Bacillus subtilis* destacou-se como o mais efetivo para inibir o crescimento do isolado IP1-05 (*Pseudomonas chichorii*), podendo substituir o uso de antibióticos ou minimiza-lo. O emprego dessa nova tecnologia apresenta-se como uma alternativa em potencial para o controle da bacteriose causada por esse patógeno em nível de campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V. **Clonagem e algumas doenças de *Eucalyptus* em viveiro e campo.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 40 p.
- ALFENAS, A. C. **Clonagem e doenças associadas à propagação vegetativa de *Eucalyptus*.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 37 p.
- CRUZ FILHO, J. **Fungicidas, nematicidas e antibióticos empregados no controle de enfermidades de plantas.** Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 1979. 92 p.
- GONÇALVES, R. C. et al. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto, causada por fitobactérias no Brasil e na Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 294, 2001. suplemento.
- GONÇALVES, R. C. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil.** 2003. 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.
- KERR, A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. **Plant Disease**, v. 64, n. 1, p. 24-30, 1980.
- KLOPPER, J.W.; ZABLOTOWICZ, R.M.; LIFSHITZ, R. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Eds). **The rhizosphere and plant growth.** Dordrecht: Academic Publishers, 1990. p. 315-326.
- KURYLOWICZ, W. **Antibióticos – uma revisão crítica.** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1981. 341p.
- LUZ, W.C. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção.** RAPP. Passo Fundo: Pe. Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 1996. v. 4. 50 p.
- MCINTYR, J. L.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Protection of pear against fire blight by bacteria and bacterial sonicates. **Phytopathology**, v. 63, p. 872-887, 1973.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 283 p.
- SANTOS, P. E. T. O uso da clonagem na silvicultura intensiva. **Silvicultura**, v. 15, n. 57, p. 28-29, 1994.
- SCHIPPERS, B. et al. Beneficial and deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v. 5, p. 339-358, 1987.
- SCHOROTH, M. N.; HANCOCK, J. Selected topics biological control. **Annual Review Microbiology**, v. 35, p. 453-476, 1981.
- SCHOROTH, M. N.; HANCOCK, J. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v. 216, p. 1376, 1982.
- VIDAVER, A. K. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. **Annual Review Phytopathology**, v. 14, p. 451-465, 1986.
- WAKSMAN, S. A. Strain specificity and production of antibiotic substances. X-Characterization and classification of species within the streptomyces griseus group. **Proceedings National Academy of Science**, n. 45, p. 1043-1047, 1959.
- WEELER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1988.