

Maciel Ferraz, Hélvio Gledson; Milagres, Elisângela Aparecida; Coutinho Moreira,
Poliana; Silva Romeiro, Reginaldo

Métodos de dispensa do antagonista *Pseudomonas putida* (UFV-0073) no biocontrole
da mancha-bacteriana e pinta-bacteriana do tomateiro

Revista Brasileira de Ciências Agrárias, vol. 10, núm. 1, 2015, pp. 123-127

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Pernambuco, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119038296018>

Métodos de dispensa do antagonista *Pseudomonas putida* (UFV-0073) no biocontrole da mancha-bacteriana e pinta-bacteriana do tomateiro

Hélvio Gledson Maciel Ferraz¹, Elisângela Aparecida Milagres¹, Poliana Coutinho Moreira¹, Reginaldo Silva Romeiro¹

¹ Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitopatologia, Av. PH Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.
E-mail: hgmferraz@yahoo.com.br; elisangelajsc@yahoo.com.br; polianacoutinho@yahoo.com.br; rromeiro@ufv.br

RESUMO

Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR's) normalmente são dispensadas por microbiolização de sementes e bactérias residentes do filoplano também o são por pulverização da parte aérea da cultura. No presente trabalho testou-se outros métodos de dispensa do agente de biocontrole *Pseudomonas putida*, isolado UFV-0073, autóctone do filoplano de tomateiro e selecionado para o controle biológico de doenças da parte aérea da cultura são eficientes contra *Xanthomonas gardneri* (Xg) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst). Os experimentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação em que foram testados quatro métodos de dispensa: 1-microbiolização de sementes, 2- pulverização com suspensão bacteriana, 3- a aplicação dos tratamentos 1 e 2 conjuntamente e 4- pulverização com o sobrenadante da suspensão bacteriana. As bactérias fitopatogênicas Xg e Pst foram inoculadas por pulverização da parte aérea das plantas de tomateiro. Para os dois patossistemas estudados os melhores métodos de dispensa foram a pulverização do filoplano associada à microbiolização de sementes e a pulverização do filoplano com o sobrenadante da suspensão aquosa do agente de biocontrole.

Palavras-chave: controle biológico, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, residente de filoplano, *Solanum lycopersicum*, *Xanthomonas gardneri*

*Delivery methods of the antagonist *Pseudomonas putida* (UFV-0073) for the control of bacterial spot and bacterial speck of tomato*

ABSTRACT

Promoting Growth Plant Rhizobacteria (PGPR's) are usually delivery by seeds microbiolization and phylloplane resident bacteria are delivery by spraying the aerial part of the culture. In the present study, we tested whether other methods of delivery biocontrol agent *Pseudomonas putida* (UFV-0073), phylloplan eautochthonous of tomato and selected for the biological control of foliar diseases are efficient against *Xanthomonas gardneri* (Xg) and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst). The experiments were conducted under greenhouse conditions, and four methods of delivery were tested: 1- seeds microbiolization, 2- spraying bacterial suspension, 3-combination of treatments 1 and 2 and 4- spraying the supernatant of the bacterial suspension. Plant pathogenic bacteria Pst and Xg were inoculated by spraying tomato leaves. For both pathosystems studied, the best delivery methods were spraying phylloplane associated seeds microbiolization and spraying the phylloplane with the supernatant of the suspension of the biocontrol agent.

Key words: biological control, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, phylloplane residente, *Solanum lycopersicum*, *Xanthomonas gardneri*

Introdução

A mancha bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic 1957) Jones et al. 2006, é uma das doenças mais importantes da parte aérea da cultura no Brasil, sendo todos estádios fenológicos da cultura suscetíveis à doença (Lopes & Quezado-Duval, 2005). Já a pinta bacteriana, ocasionada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie, 1978 é uma doença economicamente importante para o tomateiro em condições ambientais propícias para a infecção, visto que reduz a produtividade pela destruição de tecido foliar e pela derrubada de frutos em formação (Lopes & Ávila, 2005).

Essas doenças são de difícil controle e vários fatores contribuem para isto, tais como: eficiência variável do controle químico, com poucos produtos registrados; indisponibilidade de cultivares com resistência adequada; rápida disseminação nas lavouras em condições favoráveis e a transmissão por sementes contaminadas (Lopes & Ávila, 2005).

Como não existem produtos químicos registrados para o controle de bactérios ou, se há, os mesmos são pouco eficientes, o emprego de bactérias antagonistas se torna uma medida de manejo muito promissora. Por exemplo, para o controle da mancha-bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas gardneri*, não há nenhum produto registrado e para o controle da pinta-bacteriana, cujo agente causal é *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, existe um produto à base de cobre e um indutor de resistência (benzotiadiazol) registrados para a cultura do tomateiro no Brasil (Agrofit, 2013).

Um gargalo para a utilização do controle biológico no manejo de doenças de plantas é a escolha do método de dispensa do agente de biocontrole. Segundo a literatura nacional, dá-se o nome de “dispensa” à maneira pela qual uma bactéria agente de biocontrole ou promotora de crescimento em plantas é colocada em contato com a planta alvo (Ferraz et al., 2008; Romeiro, 2007).

Para bactérias residentes do filoplano, o método de dispensa mais comumente utilizado é a pulverização da parte aérea da planta com suspensão aquosa do agente de biocontrole, tanto para a promoção de crescimento (Hayat et al., 2010), como para o controle de doenças (Ferraz et al., 2008; Haddad et al., 2009; Halfeld-Vieira et al., 2004). Entretanto e dependendo de como o agente de controle biológico ou promotor de crescimento é dispensado, a interação pode ser prejudicial para a planta alvo. Como exemplo, *Burkholderia ambifaria* (MCI 7) quando dispensada por microbiolização de sementes de milho promoveu significativamente o crescimento das plantas; ao contrário, sua incorporação ao solo por encharcamento com suspensão aquosa do isolado bacteriano, reduziu o crescimento da cultura (Ciccillo et al., 2002).

Este trabalho teve, como objetivo, definir qual o melhor método de dispensa da bactéria *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895, isolado UFV-0073, no controle da mancha-bacteriana e da pinta-bacteriana na cultura do tomateiro.

Material e Métodos

Origem, cultivo e preservação dos microrganismos

O antagonista UFV-0073 foi selecionado previamente como agente de biocontrole para doenças da parte aérea do tomateiro (Halfeld-Vieira, 2002). As bactérias patogênicas LBPCB 17 e LBPCB 06 foram isoladas do tomateiro de uma lavoura comercial com sintomas de mancha-bacteriana e pinta-bacteriana, respectivamente, no município de Coimbra, MG, Brasil.

Os microrganismos foram cultivados em meio 523 (Kado & Heskett, 1970), preservados e após a identificação incorporados à coleção de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, e recuperados quando necessário. As culturas bacterianas foram preservadas em glicerina (30%) e armazenadas em ultrafreezer, a -80 °C (Romeiro, 2007).

Identificação dos microrganismos pela análise da região parcial do gene 16S rDNA

Para a identificação dos isolados UFV-0073, LBPCB 17 e LBPCB 06, foi realizado o sequenciamento da região parcial do gene 16S rDNA utilizando-se os oligonucleotídeos universais fd2 (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') e rP1 (5'-ACGGTTACCTTGTACGACTT -3') (Weinsburg et al., 1991).

Para a extração do DNA genômico as culturas bacterianas, armazenadas em glicerol (-80 °C) foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio líquido 523 por 24h a 28 °C. Posteriormente, 1 mL de suspensão foi transferido para tubos (2 mL) e as células bacterianas foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 3 min. Em seguida, o DNA foi extraído usando-se o kit Wizard® de extração e purificação de DNA genômico (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante para bactérias gram negativas. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração ajustada para 10 ng μ L⁻¹.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 μ L, contendo 0,6 μ M de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Promega), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Invitrogen), 5 × de tampão de reação (Promega), 2,5 mM MgCl₂, 20 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume de reação. Para a amplificação procedeu-se a uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, amplificação a 52 °C por 30 seg e elongação a 72 °C durante 2 min, sendo finalizada com uma elongação a 72 °C por 5 min.

As amplificações foram realizadas em termociclador e os produtos da PCR separados em gel de agarose 1,4% a 100 V durante 60 min. Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de foto documentação L.PIX (Loccus Biotecnologia); em seguida, os fragmentos de tamanho esperado foram purificados usando-se o Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado através do sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems)

utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos usados para amplificação do DNA. As sequências foram analisadas e editadas usando-se o Seq Scanner 2 (Applied Biosystems) e posteriormente comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o programa Blastn (Altschul et al., 1997).

Crescimento das plantas de tomateiro

Na semeadura foram utilizadas sementes da cv. Sta. Clara, sendo semeadas cinco sementes por vaso e após a emergência foi deixada uma planta por vaso. As plantas foram conduzidas em vasos de plástico contendo 2 dm³ de substrato. O substrato utilizado foi uma mistura de solo esterilizado, húmus e areia, na proporção 3:1:1 (v:v:v). Para cada dm³ de substrato foi adicionado 1,63 g de fosfato de cálcio monobásico. Quinze dias após a semeadura, as plantas de tomateiro receberam, em cada vaso, 100 mL de solução nutritiva contendo, em mg L⁻¹, 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de MgSO₄.7H₂O, 61 de ureia, 0,27 de NH₄MO₇O₂₄.4H₂O, 1,61 de H₃BO₃, 6,67 de ZnSO₄, 1,74 de CuSO₄.5H₂O, 4,10 de MnCl₂.4H₂O, 4,08 de FeSO₄.7H₂O e 5,58 de EDTA bisódico. A solução também foi aplicada na segunda e na terceira semana após semeadura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa de 75%) e irrigadas diariamente.

Métodos de dispensa dos antagonistas

Para o preparo da suspensão do antagonista, isolado UFV-0073, colônias foram semeadas por espalhamento em meio 523 sólido e incubadas durante 24 h, a 28 °C. A suspensão de células do agente de biocontrole foi preparada em água de torneira e a concentração ajustada em espectrofotômetro (modelo SPECTRONIC® 20, GENESYSTEM, Rochester, USA). Nos tratamentos cujas sementes foram microbiolizadas as mesmas permaneceram 12 h em suspensão aquosa do antagonista.

Os métodos de dispensa do antagonista foram: 1- sementes microbiolizadas com suspensão aquosa do antagonista (DO_{540nm} = 0,3) e, logo em seguida, semeadas; 2- pulverização do filoplano do tomateiro com suspensão aquosa do antagonista (DO_{540nm} = 0,3); 3- a aplicação dos tratamentos 1 e 2, conjuntamente; 4- pulverização do filoplano com o sobrenadante de suspensão do agente de biocontrole. Para obtenção do sobrenadante, *P. putida* foi cultivada por 24 h em meio 523 sólido a 28 °C; após a incubação foi feita suspensão de células do agente de biocontrole com adição de água de torneira e a turbidez foi ajustada para DO_{540nm} = 1,0. Posteriormente, a suspensão de células bacterianas foi centrifugada a 17500 g por 20 minutos e o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro Millipore (poro= 0,22 µm).

Para os tratamentos em que os antagonistas foram dispensados por pulverização do filoplano, as mudas de tomateiro estavam com 40 dias após a semeadura, ou seja, 4 dias antes da inoculação com os patógenos.

Inoculação das plantas de tomateiro com os isolados LBPCB 17 e LBPCB 06 e avaliação da severidade das doenças

Quando as plantas estavam com o quinto par de folhas completamente desenvolvidos (44 dias após a semeadura) foram

atomizadas com suspensão aquosa dos patógenos desafiantes, LBPCB 17 e LBPCB 06, com auxílio de depressurizador De Vilbs nº 15. As suspensões aquosas dos patógenos desafiantes, LBPCB 17 e LBPCB 06, foram obtidas após o cultivo em meio sólido (Kado & Heskett, 1970) por 24 h a 28 °C, sendo as concentrações ajustadas em espectrofotômetro para DO_{540nm} = 0,15 ($\approx 5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

A testemunha foi composta por sementes imersas em água de torneira, por 12 h e, posteriormente, pulverizadas com água de torneira quando da aplicação dos antagonistas no filoplano (40 dias após a semeadura). Para comparar o efeito dos antagonistas em reduzir a severidade das doenças, adicionou-se um tratamento composto por plantas de tomateiro, com idade de 40 dias após a semeadura, pulverizadas com o fungicida oxicloreto de cobre (1,6g i.a. L⁻¹). Antes e após as inoculações dos patógenos desafiantes as plantas foram acondicionadas em câmara úmida, por 24 h.

Quando do aparecimento dos sintomas (7 dias após a inoculação), a severidade da doença foi estimada utilizando-se o software SEVERITY PRO 1.0 para mancha bacteriana e foi contado o número de lesões por folíolo, para pinta bacteriana

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Dois experimentos foram realizados, em que no primeiro as plantas foram inoculadas com LBPCB 17 e, no segundo, com LBPCB 06. Os experimentos foram repetidos três vezes ao longo do tempo e instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e seis repetições. Para a comparação entre as médias dos tratamentos foi utilizado o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Em todos os experimentos cada unidade experimental correspondeu a um vaso plástico contendo uma planta de tomateiro. Para análises estatísticas utilizou-se o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Resultados e Discussão

As sequências parciais do gene 16S rDNA apresentaram cerca de 1300 pb para cada isolado. A comparação dessas sequências com outras disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o programa Blastn permitiu identificar o isolado UFV-0073 como *Pseudomonas putida* (número de acesso Genbank KM463763), LBPCB 17 como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (número de acesso Genbank KM463764) e LBPCB 06 como *Xanthomonas gardneri* (número de acesso Genbank KM463765) com valores de identidade superiores a 99 % para os três isolados.

A identificação do isolado UFV-0073 utilizando a sequência parcial do gene 16S rDNA correspondeu a uma identificação prévia utilizando o perfil de ácidos graxos, que também permitiu a identificação do isolado UFV-0073 como sendo *P. putida* (dados não publicados). Além da identificação utilizando a sequência parcial do gene 16S rDNA foram realizados testes bioquímicos, fisiológicos e biológicos que também apontaram o isolado LBPCB 17 como *P. syringae* pv. *tomato* e LBPCB 06 como *X. gardneri* (dados não publicados).

Para os dois patossistemas estudados no presente trabalho, os melhores métodos de dispensa do isolado UFV-0073 de *P. putida* foram a microbiolização de sementes associada à

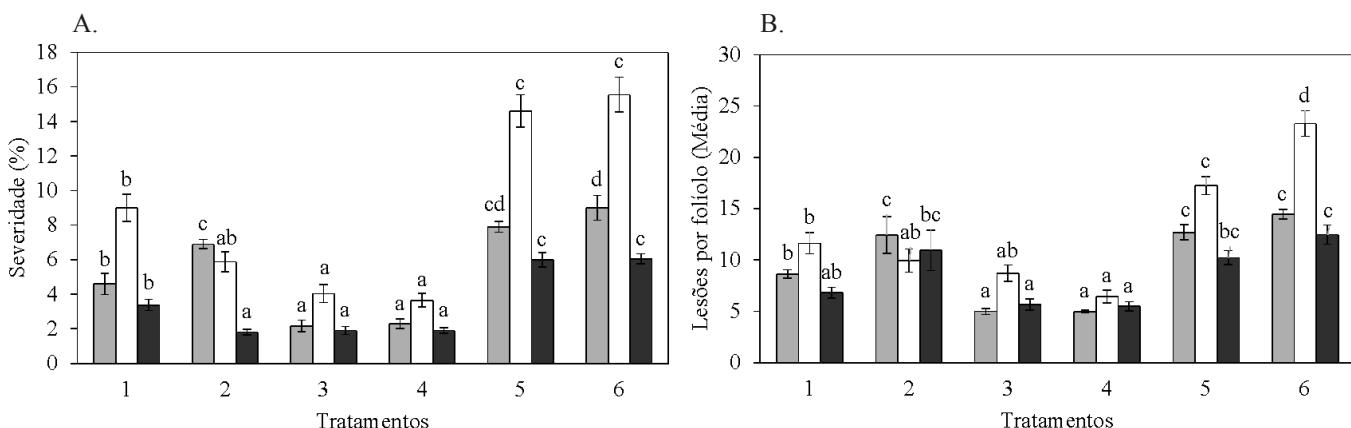


Figura 1. Severidade da doença e número de lesões em plantas de tomateiro inoculadas com *Xanthomonas gardneri* (LBPCB 17) (A) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (LBPCB 06) (B), respectivamente e tratadas com o isolado UFV-0073 de *Pseudomonas putida* usando-se diferentes métodos de dispensa. Tratamentos: 1- microbiolização de sementes, 2- pulverização do filoplano; 3- microbiolização de sementes associada à pulverização do filoplano, 4- pulverização com sobrenadante obtido da suspensão bacteriana, 5- pulverização com oxicloreto de cobre (1,6 g i.a. L⁻¹) e 6- pulverização com água. Barras representam o erro padrão da média. Colunas cinza, branca e preta representam os três experimentos realizados. Médias seguidas da mesma letra são significativamente iguais ($P \leq 0,05$), pelo teste Tukey, $n = 6$

pulverização do filoplano e a pulverização da parte aérea das plantas com o sobrenadante obtido da suspensão bacteriana, diferindo do controle (plantas pulverizadas com água) e do tratamento cujas plantas foram pulverizadas com o fungicida cúprico, nas três repetições do experimento (Figura 1).

A microbiolização de sementes reduziu em média 45%, a pulverização do filoplano reduziu em média 52 % e a combinação desses dois métodos de dispensa reduziu a severidade da mancha-bacteriana em 73 %, em relação ao tratamento controle. Para a pinta-bacteriana a redução média da severidade foi de 45 %, 28 % e 61 % para os tratamentos microbiolização de sementes, pulverização do filoplano e para a combinação desses dois métodos de dispensa, respectivamente. Os resultados do presente trabalho revelaram que a combinação dos métodos de dispensa por microbiolização de sementes e pulverização do filoplano é melhor para a redução da severidade da mancha-bacteriana e da pinta-bacteriana do tomateiro do que os métodos de dispensa aplicados individualmente (Figura 1). Entretanto, Mafia et al. (2009) não verificaram diferença na combinação dos métodos de dispensa de rizobactérias por encharcamento de substrato com suspensão aquosa de rizobactérias e imersão de miniestacas de eucalipto na mesma suspensão aquosa, em comparação com os métodos de dispensa aplicados individualmente para o controle de *Cylindrocladium* spp.

A pulverização da parte aérea com o sobrenadante da bactéria foi o melhor método de dispensa a semelhança do tratamento 3, para os dois patossistemas, nas três repetições do experimento (Figura 1). Apesar das plantas pulverizadas com sobrenadante da cultura do isolado UFV-0073 não conterem células vivas do antagonista, a severidade da mancha-bacteriana e da pinta-bacteriana do tomateiro foi reduzida, em média, em 73 % e 65 %, respectivamente, em comparação com o controle. Tal resultado pode ser explicado pela possibilidade do sobrenadante conter substâncias antimicrobianas, como ácido cianídrico (Plociniczak et al., 2013), antibióticos (Mavrodi et al., 2012) e esideróforos (Puopolo et al., 2011). Como neste tratamento a densidade ótica da suspensão bacteriana foi superior às dos demais tratamentos ($DO_{540nm} =$

1), pode ter ocorrido maior concentração dessas substâncias antimicrobianas, potencializando o controle biológico, mesmo na ausência de células vivas do isolado UFV-0073.

Tanto no experimento em que as plantas foram inoculadas com *X. gardneri*, como no experimento em que foram inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato*, a dispensa do antagonista por microbiolização de sementes foi significativamente superior ao controle e ao tratamento 5 (plantas pulverizadas com oxicloreto de cobre), nas três repetições do experimento. Esses resultados sugerem que moléculas quelantes de Fe⁺⁺⁺ (pioverdininas) produzidas por *Pseudomonas putida* UFV-0073, tenham transformado o ambiente da rizosfera e rizoplano inóspito para o crescimento de microrganismos não produtores de transportadores de Fe⁺⁺⁺ para o interior das células. Assim, a população desses microrganismos pode ter sido reduzida e um ambiente mais favorável para o crescimento das raízes pode ter sido criado (Kloepper et al., 1980).

A priori, previa-se que o método de dispensa do antagonista por pulverização do filoplano fosse mais eficiente no controle da mancha-bacteriana e da pinta-bacteriana uma vez que o agente de biocontrole foi inicialmente isolado da parte aérea do tomateiro. Entretanto, em uma repetição do experimento cujas plantas foram inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato*, a severidade foi igual às plantas pulverizadas com oxicloreto de cobre e em duas repetições das plantas inoculadas com *X. gardneri* a severidade foi igual à das plantas pulverizadas com oxicloreto de cobre e ao tratamento controle. É provável que o isolado UFV-0073 não tenha conseguido, de forma consistente, manter sua população em nível ótimo devido às adversidades do ambiente do filoplano (Romeiro, 2007). As constantes variações de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponíveis, tornam o ambiente do filoplano altamente complexo (Andrews & Harris, 2000; Beattie & Lindow, 1999).

São necessários mais trabalhos para a elucidação dos reais mecanismos de controle exercido pelo antagonista UFV-0073 e também para verificar a reprodutibilidade em campo dos tratamentos que apresentaram os melhores resultados em casa de vegetação.

Conclusão

Para reduzir a severidade das plantas inoculadas com *X. gardneri* e *P. syringae* pv. *tomato* os melhores métodos de dispensa do antagonista UFV-0073 foram a pulverização do filoplano associada à microbiolização de sementes e a pulverização do filoplano com o sobrenadante de suspensão aquosa do agente de biocontrole.

Literatura Citada

- Agrofit. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plataforma de pesquisa de agrotóxicos registrados para o Brasil. <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. 12 Jun. 2013.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997. <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>>.
- Andrews, J. H.; Harris, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, v. 38, p. 145-180, 2000. <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.145>>.
- Beattie, G.A.; Lindow, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, v.89, 5, p. 353-359, 1999. <<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.5.353>>.
- Ciccillo, F.; Fiore, A.; Bevvino, A.; Dalmastrí, C.; Tabacchioni, S.; Chiarini, L. Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. *Environmental Microbiology*, v.4, n.4, p.238-245, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00291.x>>.
- Ferraz, H. G. M.; Romeiro, R. S.; Garcia, F. A. O.; Souza, A. N. Biocontrole da mancha-alvo do tomateiro por *Bacillus cereus* em função do modo de dispensa na planta. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v.2, n.2, p.35-39, 2008. <http://www.ccaa.ufma.br/revistatropical/artigos%20_vol%202_%20nr%202/agronomia/biocontrole_mancha_agro_art.pdf>. 13 Jun. 2013.
- Haddad, F.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Teixeira, H. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control*, v.49, n.2, p.114-119, 2009. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.004>>.
- Halfeld-Vieira, B. A.; Romeiro, R. S.; Mizubuti, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.6, p.638-643, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000600007>>.
- Halfeld-Vieira, B. A. Bactéria residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 108p. Tese Doutorado. <<http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/fitopatologia/2002/174967f.pdf>>. 13 Jun. 2013.
- Hayat, R.; Ali, S.; Amara, U.; Khalid, R.; Ahmed, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annual Microbiology*, v.60, n.4, p.579-598, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>>.
- Kado, C. I.; Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v.60, n.6, p.969-976, 1970. <<http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-60-969>>.
- Klopper, J. W.; Leong, J.; Teintze, M.; Schrotth, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plantgrowth-promoting rhizobacteria. *Nature*, v.286, p.885-886, 1980. <<http://dx.doi.org/10.1038/286885a0>>.
- Lopes, C.A.; Quezado-Duval, M.A. Doenças bacterianas. In: Lopes, C.A.; Ávila, A.C. (Eds.). Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa-CNPH/Embrapa Hortaliças, 2005. p. 62-64.
- Lopes, C. A.; Ávila, A. C. Doenças do tomateiro. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 2005. 152p.
- Mafia, R. G.; Alfenas, A. C.; Maffia, L. A.; Ferreira, E. M.; Binoti, D. H. B.; Siqueira, L. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. *Revista Árvore*, v.33, n.5, p.789-797, 2009. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622009000500002>>.
- Mavrodi, O. V.; Mavrodi, D. V.; Parejko, J. A.; Thomashow, L. S.; Weller, D. M. Irrigation differentially impacts populations of Indigenous antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology*, v.78, n.9, p.3214-3220, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07968-11>>.
- Plociniczak, T.; Kukla, M.; Watroba, R.; Piotrowska-Seget, Z. The effect of soil bioaugmentation with strains of *Pseudomonas* on Cd, Zn and Cu uptake by *Sinapis alba* L. *Chemosphere*, v.91, n.9, p.1332-1337, 2013 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.008>>.
- Puopolo, G.; Raio, A.; Pierson, L. S.; Zoina, A. Selection of a new *Pseudomonas chlororaphis* strain for the biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici*. *Phytopathologia Mediterranea*, v.50, n.2, p.228-235, 2011. <<http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view/9407>>. 13 Jun. 2013.
- Romeiro, R. S. Controle biológico de plantas: fundamentos. Viçosa: Editora UFV, 2007. 269p.
- Weinsburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*, v.173, n.2, p.697-703, 1991. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207061/pdf/jbacter00092-0291.pdf>>. 09 Nov. 2014.