



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

AMANDA CONCHETA MASCAI PIVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS
PRODUZIDOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA
LV CONTRA *XANTHOMONAS VASICOLA* PV.
*VASCULORUM***

Londrina
2020

AMANDA CONCHETA MASCAI PIVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS
PRODUZIDOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA
LV CONTRA *XANTHOMONAS VASICOLA* PV.
*VASCULORUM***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P693a Piva, Amanda Concheta Mascari.
Atividade antibacteriana de compostos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* / Amanda Concheta Mascari Piva. - Londrina, 2020.
69 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Atividade antimicrobiana apresentada pela fração F4A e composto organometálico (OAC), extraídos de metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* contra a estria do milho causada por *X. vasicola* pv. *vasculorum*. - Tese. I. Andrade, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 574

AMANDA CONCHETA MASCAI PIVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS
PRODUZIDOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA
LV CONTRA *XANTHOMONAS VASICOLA* PV.
*VASCULORUM***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Miguel Pérez Navarro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Bárbara Gionco Cano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de março de 2020.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia, CCB, da Universidade Estadual de Londrina

À Deus. Ao meu noivo Pedro Miyadaira e família,
por absolutamente tudo. Ao time LEM, e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria para seguir sempre em frente. Obrigada por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos. E por me permitir realizar todos os meus sonhos.

Ao professor Galdino e à equipe do laboratório LEM, muito obrigada por me acolher, ensinar e auxiliar na realização desse trabalho. Sem vocês nada disso seria possível. Meus eternos agradecimentos !

Aos meus pais, Concheta e Eduardo, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditar em mim, e não medir esforços para a concretização dos meus sonhos. Vocês são inspiração, equilíbrio e porto seguro nos momentos de tribulação. Sem vocês, nada seria possível. Amo vocês com amor eterno!

Ao meu noivo Pedro, por todo o amor, paciência, carinho e apoio que me deu durante todos esses anos. Sem você a realização desse trabalho não seria possível. Agradeço por ter aparecido em minha vida. Você é um ser humano maravilhoso. Te amo muito.

À minha irmã Elaize e aos meus amigos, vocês são muito importantes em minha vida. Mesmo com a distância, sempre se fizeram presentes e estarão sempre em meu coração. Obrigada pelo companheirismo, apoio e amizade incondicional. Amo vocês!

PIVA, A. C. M. **Atividade antibacteriana de compostos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum***. 2020. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O milho é um dos grãos mais consumidos no mundo, não se restringindo apenas ao consumo humano mas também como alimento para animais. O Brasil está entre os maiores produtores de milho no mundo, ficando para trás apenas dos Estados Unidos e da China. E cerca de 70% desse milho, no Brasil, é utilizado para alimentação de suínos e aves, e devido à isso a produção de milho no mundo tende a aumentar. Sendo assim, é de suma importância prevenir e combater as possíveis doenças que podem acometer essa planta. Uma das doenças que vem preocupando os agricultores é a estria bacteriana do milho, causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv). Essa bactéria já foi encontrada em outros países como na Argentina e nos Estados Unidos, onde atingiu níveis epidêmicos, recentemente foi isolada e caracterizada no Brasil, principalmente na região do Paraná, por isso é necessário buscar métodos eficientes de controle. Por conseguinte o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de infecção do isolado de Xvv em plantas de milho e a capacidade dos metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV (F4A e OAC) em controlar a estria bacteriana do milho. Foram realizados experimento in vitro e in vivo, em condições de casa de vegetação. Os experimentos in vitro foram: teste de disco difusão onde foram utilizadas as concentrações de 250 µg e 50 µg para F4A, o qual obteve um halo de inibição em média de 63 mm e 64,5 mm respectivamente, e 50 µg para OAC, que obteve médio de 69,5 mm de inibição; também foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM), que teve como resultado 0,25 µg mL⁻¹ para F4A e para o OAC 0,06 µg mL⁻¹, esses resultados definiram as concentrações que foram usadas no experimento in vivo. No experimento em casa de vegetação foi possível realizar a infecção e observar os sintomas da doença. Após isso, foi avaliado o efeito da fração semi-purificada F4A e de um composto organometálico (OAC) purificado, para isso utilizamos como método a aplicação ectópica de 3 concentrações de F4A: 0,5, 5 e 10 µg mL⁻¹; e 3 concentrações de OAC: 0,12, 1 e 4 µg mL⁻¹. As aplicações foram realizadas antes (tratamento pré) e após (tratamentos pós) a inoculação com *X. vasicola* pv. *vasculorum*. Aos 14 dias após a infecção o desenvolvimento da doença foi avaliada periodicamente por 21 dias. As análises estatísticas mostraram que 3 tratamentos foram mais eficientes no controle da doença: F4A 10 µg mL⁻¹ pré, F4A 10 µg mL⁻¹ pós e OAC 4 µg mL⁻¹. E por fim foi realizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foi possível constatar que as amostras tratadas com F4A e OAC tinham uma quantidade bem menor de bactéria, e grande parte estava com morfologia anormal, diferente do controle que apresentou grande quantidade de bactéria, com morfologia sem alteração. Com base nesses resultados pode-se afirmar que a F4A e o OAC apresentam uma ação antimicrobiana contra Xvv.

Palavras-chave: estria bacteriana de milho; postulado de Koch; controle químico natural ; OAC; F4A; MEV.

PIVA, A.C. M. **Antibacterial activity of compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain LV against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum***. 2020. 59 p. Dissertation (Master in Microbiology) - Londrina State University, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Corn is one of the most consumed grains in the world, not being restricted only to human consumption but also as food for animals. Brazil is among the largest corn producers in the world, behind only the United States and China. And about 70% of that corn, in Brazil, is used to feed swine and poultry, and because of that, corn production in the world tends to increase. Therefore, it is extremely important to prevent and combat the possible diseases that can affect this plant. One of the diseases that has been worrying farmers is the bacterial streak of corn, caused by the bacteria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv). This bacterium has already been found in other countries such as Argentina and the United States, where it reached epidemic levels, recently it was isolated and characterized in Brazil, mainly in the Paraná region, so it is necessary to seek efficient methods of control. Therefore, the objective of the work was to evaluate the infection capacity of the Xvv isolate in corn plants and the ability of the secondary metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* strain LV (F4A and OAC) to control the bacterial streak of corn. Experiments were carried out *in vitro* and *in vivo*, under greenhouse conditions. The *in vitro* experiments were: disk diffusion test where the concentrations of 250 µg and 50 µg for F4A were used, which obtained an inhibition halo on average of 63 mm and 64.5 mm respectively, and 50 µg for OAC, which obtained a mean of 69.5 mm of inhibition; the minimum inhibitory concentration test (MIC) was also performed, which resulted in 0.25 µg mL⁻¹ for F4A and for OAC 0.06 µg mL⁻¹. These results defined the concentrations that were used in the *in-house* experiment alive. In the greenhouse experiment it was possible to carry out the infection and observe the symptoms of the disease. After that, the effect of the semi-purified fraction F4A and of a purified organometallic compound (OAC) was evaluated, for that we used as method the ectopic application of 3 concentrations of F4A: 0.5, 5 and 10 µg mL⁻¹; and 3 OAC concentrations: 0.12, 1 and 4 µg mL⁻¹. The applications were performed before (pre treatment) and after (post treatments) inoculation with *X. vasicola* pv. *vasculorum*. At 14 days after infection, the development of the disease was evaluated periodically for 21 days. Statistical analyzes showed that 3 treatments were more efficient in controlling the disease: F4A 10 µg mL⁻¹ pre, F4A 10 µg mL⁻¹ post and OAC 4 µg mL⁻¹. Finally, scanning electron microscopy (SEM) was performed, where it was possible to verify that the samples treated with F4A and OAC had a much smaller amount of bacteria, and a large part had abnormal morphology, different from the control that presented a large amount of bacteria, with unchanged morphology. Based on these results, it can be said that F4A and OAC have an antimicrobial action against Xvv.

Key words: *xanthomonas vasicola*; *zea mays*; antimicrobial; Koch's postulate; natural product; OAC; F4A; MEV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Fotografia mostrando planta de milho infectada por Xv, apresentando os sintomas observados no 8º dia de infecção: lesões lineares longas de cor escura, que atingem todo o comprimento da folha.....24

ARTIGO

- Figura 1** - Level of infection and severity reduction of plant infected with *X. vasicola* pv. *vasculorum* and treated with F4A, FC and DMSO + Oil after 32 days of germination. The small letters corresponding the significative differences among symptom reduction and capital letters for infection reduction of ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$)48
- Figura 2** - Scanning electron microscopy of corn Balu-929 V hybrid leaf treated with antimicrobial F4A fraction and FC against *X. vasicola* pv. *vasculorum* after eight days of infection and 24 h of application. (A and B) non-treated and infected leaf ; (C and D) Plant treated with 10 mL of F4A ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) after 8 days of infection and 24 h of application ; (E and F) Plant treated with 4 mL of FC ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) after 8 days of infection and 24 h of application. Figures A, C and E ($3,000 \times$) and B, D and F ($15,000 \times$)4949

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - The average of infection and severity levels of corn 30F52 hybrid caused by *Xanthomonas vasculorum*, on 21 days for pre-treatment and 23 days for post-treatment after germination. The infection level measure using scale ranging from 0 (non-lesion) to 1 (with lesion). The severity level of disease ranging from 0 (non-lesion) to 25 (plant extremely damaged by lesion). The asterisk showed significative difference ($p < 0.05$) when compared with non-treated and infected plant the according to ANOVA and Tukey test. Control 1 (non-infected and non-treated) ; Control 2 (infected and non-treated). Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$)58
- Tabela 2** - The average of infection and severity levels on corn of corn 929 V hybrid caused by *Xanthomonas vasculorum*, on 21 days for pre-treatment and 23 days for post-treatment after germination. The infection level measure using scale ranging from 0 (non-lesion) to 1 (with lesion). The severity level of disease ranging from 0 (non-lesion) to 25 (plant extremely damaged by lesion). The asterisk showed significative difference ($p < 0.05$) when compared with non-treated and infected plant the according to ANOVA and Tukey test. Control 1 (non-infected and non-treated) ; Control 2 (infected and non-treated). Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$)59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALG	Alginato
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
F4A-ALG	Alginato de sódio incorporado a fração F4A
IND	Indolinona
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OAC	Organometálica
PCA	Phenazine-1-carboxylic acid
PCN	Phenazine-1-carboxamide
Xvv	Xanthomonas vasicola pv. vasculorum

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MILHO NO MUNDO	18
3.2	XANTHOMONAS	19
3.2.1	Doenças Provocadas por Xanthomonas	20
3.2.2	Xv e a Estria do Milho	21
3.2.3	Possíveis Formas de Controle da Estria Bacteriana do Milho: Vantagens e Desvantagens.....	23
3.3	BIOATIVOS OBTIDOS POR DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA LV	24
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5	ARTIGO	40
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do milho começou na região onde hoje é situado o México, e juntamente com o desenvolvimento de tecnologias atingiu um aumento do índice de sua produção, atualmente a semente do milho foi modificada geneticamente e seu cultivo é possível em muitos países com diferentes características ambientais. Dentre os países que mais produzem milho estão os Estados Unidos, a China, Argentina e o Brasil. O Brasil em 2017 ficou em terceiro na produção de milho, passando a Argentina (FAOSTAT, 2018). O milho mundialmente tem maior utilização para atividades de criação de aves e suínos, e a estimativa é que o consumo continue crescendo (CONAB, 2010), devido às suas características fisiológicas, a cultura do milho tem alto potencial produtivo.

A cultura do milho sempre sofreu com a ocorrência de pragas e doenças, causadas por insetos fungos e bactérias. As bacterioses são as doenças mais graves que podem acometer as plantas, pelo fato de ainda não existirem formas de tratamentos preventivos e curativos eficazes para curar ou até mesmo controlar uma planta infectada (ROMERO, 2005). Dentre as bacterioses que atingem o milho podemos citar a estria do milho, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (LANG et al., 2017).

As bactérias do gênero *Xanthomonas*, são conhecidas como agentes causais de muitas doenças, como cancro cítrico (*X. citri* subsp. *citri*), mancha-bacteriana (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*), também causam doença na banana (*X. vasicola* pv. *mussacearum*), no sorgo (*X. vasicola* pv. *holciola*) e por fim (*X. vasicola* pv. *vasculorum*) causando doença no milho (MUNHOZ et al., 2015; EPPO 2017; NAKATO et al., 2018; HARTMAN et al., 2020).

Reportada pela primeira vez em regiões produtoras de milho na África do Sul em 1949 (DYER, 1949) a bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) (COBB 1894), foi recentemente isolada em regiões do norte do Paraná (LEITE et al., 2018). O patógeno é um bacilo Gram negativo que provoca a patogenia quando a bactéria entra no hospedeiro por meio de aberturas naturais (estômatos e hidatódios), ou por meio de ferimentos presentes o hospedeiro (KAY; BONAS, 2009).

Nos Estados Unidos a doença, em 2016, atingiu níveis epidêmicos, atingindo ceca de sete estados, apesar da porcentagem de perda em razão da doença ainda não ter sido estimada (LANG et al., 2017). Na Argentina a bacteriose ocorreu em

várias regiões em 2017, com pesquisas constataram que o isolado de *Xvv* encontrado na Argentina tinha 99% de similaridade com o genoma dos isolados da África do Sul e dos Estados Unidos (PLAZAS, 2018). Em 2018 a *Xvv* foi encontrada em culturas de milho no estado do Paraná, sendo a primeira vez reportada no Brasil, o que tem alarmado os produtores (LEITE Jr et al.; 2018).

Pelo fato de as bacterioses apresentarem certa dificuldade em seu controle e a *Xvv* afetar uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, é necessário o estudo de métodos eficazes para tratamentos preventivos e curativos, para evitar que a estria do milho atinja níveis epidêmicos como ocorreu nos Estados Unidos acarretando em uma crise econômica no país (LANG et al., 2017)

Dentre as formas de controle é possível citar o plantio de variedades resistentes representa o melhor método para o controle de doenças bacterianas (MATSUOKA, 2016; MANTOVANI et al., 2006), no entanto, um estudo realizado por Mantovani et al. (2006), foram testados três híbridos de milho e todos apresentaram susceptibilidade, portanto na ausência de híbridos com características de resistência, outras medidas de controle devem ser adotadas.

Entre elas está a utilização de defensivos agrícolas. Esse método, porém, pode ser muito prejudicial tanto ao meio ambiente quanto à saúde humana, uma vez que provoca o acúmulo de substâncias tóxicas em ambientes como riachos, lagos e solo, gerando um desequilíbrio nesses ecossistemas. Além disso, alguns estudos mostram uma relação da pulverização de pesticidas com o risco do desenvolvimento de câncer (SOUZA et al., 2017; STEWART, 2012). Sendo assim, como forma de amenizar esses problemas, o controle químico natural por meio da utilização de moléculas extraídas do metabolismo secundário de microrganismos podem ser utilizadas como uma ferramenta alternativa para o controle de organismos fitopatogênicos.

Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de ecologia microbiana na UEL, foram analisadas as frações F3, F3d e F4A, obtidas por meio da purificação e fracionamento de metabólitos secundário de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV); tais frações demonstraram alta atividade antimicrobiana contra *Pectobacterium carovora*, *Botrytis cinerea*, *Lactobacillus* spp., *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), *Staphylococcus aureus* e *Xanthomonas* spp.

(DE OLIVEIRA et al., 2011; CARDOZO et al., 2013; GÓIS et al., 2013; KERBAUY et al., 2013; MUNHOZ et al., 2017, SIMIONATO et al., 2017).

Dentre os bioativos presentes na fração F4A esta o composto organometálico (OAC), que apresenta em sua estrutura um elemento cobre, devido a isso e como muitos estudos já demonstraram, apresenta resultados positivos quanto ao seu alto potencial antimicrobiano (DE OLIVEIRA et al., 2011; LOPES et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2016). Além dele também se encontra a indiolin-3-ona (IND), fenazina-1-carboxilica ácida (PCA) e a fenazina-1-carboxiamida (PCN), a PCN já foi demonstrada como indutora de resistência sistêmica contra *Pectobacterium carotovorum*, que provoca doença em plantas de tomate (MUNHOZ et al. 2017). Assim, neste estudo pretende-se avaliar o efeito dos metabólitos secundários extraídos da *cepa LV*, utilizando a fração F4A e o composto organometálica (OAC), sobre o controle de *Xvv* agente causador da estria bacteriana no milho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* da fração F4A e de seu bioativo purificado OAC produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra *Xvv* em milho.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar o postulado de Koch através da infectividade e patogenicidade de *Xvv*;
2. Padronizar a infecção experimental de *Xvv*;
3. Extrair e purificar os compostos bioativos a partir de métodos químicos, partição líquido-líquido, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida a vácuo;
4. Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos extracelulares frente a bactéria *Xvv*, através das técnicas de concentração inibitória mínima e teste de disco-difusão ;
5. Determinar a eficiência dos bioativos F4A e OAC no controle da estria bacteriana em casa de vegetação.
6. Analisar os efeitos morfológicos dos compostos extracelulares sobre a bactéria fitopatogênica através de microscopia eletrônica de varredura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Importância econômica do milho no mundo

O milho foi domesticado a partir de um ancestral selvagem, o teosinte, na região onde atualmente se situa o México. A partir disso, foi cultivado nas Américas, levado à Europa, África e Ásia, e atualmente, junto com o desenvolvimento de tecnologias, foi adaptado fazendo com que possa ser cultivado em diversos ambientes. O conhecimento do manejo de plantas aliado às inovações tecnológicas elaboradas tornou possível cultivar plantas de milho em locais que eram impróprios para o cultivo (VALOIS, 2001). Esse é um fator muito importante principalmente para o Brasil, pois é um país em que existe uma variedade de biomas, solos e climas, e o milho requer fatores determinados de solo e clima, que são ideais para o seu cultivo (EMBRAPA, 2002).

Com a difusão de tecnologias a partir da década de 1960 na agricultura brasileira, foi impulsionada a produção de diversas culturas e junto com elas a de milho também. Cerca de 20 anos a produção cresceu em 193,55%, e o Brasil em 2017 produziu 97,84 milhões de toneladas de milho, ficando atrás apenas da soja (CONAB, 2018). Sua utilização não se restringe ao consumo humano, mas também serve como alimento para animais, devido a isso, é um dos grãos mais produzidos no mundo (GARCIA; MATTOSO; ANDRADE, 2006).

Os maiores produtores de milho do mundo são os Estados Unidos, a China e o Brasil. O Brasil ficou em terceiro na produção em 2017, passando a Argentina (FAOSTAT, 2018). E de 70 à 80% do milho produzido no Brasil é utilizado na cadeia produtiva de suínos e aves (GARCIA et al., 2006). E deve-se considerar que conforme a urbanização aumenta, o consumo de produtos de origem animal cresce em maior quantidade quando comparado ao consumo de arroz e trigo (GARCIA; MATTOSO; ANDRADE, 2006).

O milho é cultivado em diversas regiões do Brasil, aproximadamente 46,7% da produção se concentra na região Centro-Oeste, 29,8% na Sul, 13,1% na Sudeste, 7,4% na Nordeste e 3% na Norte (CONAB, 2015). Grande parte dessa produção é destinada ao segmento de proteínas animais, e que dentre eles a produção de carne de frango é a que mais cresce no país. O Brasil é um dos maiores exportadores de

carne de frango, e seus maiores consumidores são os países do Oriente Médio, da Ásia e da Europa.(GARCIA et al., 2006). No estado do Paraná, em 2017/18 produziu 11 milhões de toneladas de milho (MENELAU, 2017).

Devido a esses fatores, é de suma importância econômica, manter as culturas de milho livres de pragas e doenças. Pois, caso houver uma diminuição na produção do milho, toda uma cadeia produtiva acaba sendo interrompida, por isso é necessário o estudo de métodos que busquem tratamentos eficazes contra doenças que atingem essa cultura.

Dentre as doenças que mais atingem culturas de milho podemos citar: a mancha-de-turcicum, (*Exserohilium turcicum*); a cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis*); ferrugem-polissora (*Puccinia polysora*); mancha-de-curvularia (*Curvularia ssp.*), a mancha-branca (*Pantoea ananatis*) e a estria do milho (*Xanthomonas vasicola* pv. *vaculorum*), sendo as última as única causadas por bactérias (COSTA et al., 2018). As bacterioses são as doenças mais difíceis de serem tratadas, visto que ainda não foi desenvolvido produtos químicos eficazes para a promoção da cura de uma planta infectada por bactéria ou até mesmo como forma de tratamento preventivo (ROMEIRO, 2005).

3.2. Xanthomonas

Muitas bactérias tem por característica causarem doenças em plantas, e por isso geram grandes perdas para a agricultura. Os patógenos de plantas em grande maioria são bactérias Gram-negativas, como as dos gêneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* e *Xanthomonas*. Grande parte delas possuem uma planta que é um hospedeiro específico, porém em outras plantas ela também pode causar patogenia (COLLMER, 1998, PRIOR et al., 2016; SILVA et al., 2020).

O gênero *Xanthomonas* é formado por 27 espécies que justas causam patogenias em aproximadamente 400 hospedeiros, tendo como característica uma alta especificidade hospedeiro-planta. É composto por bastonetes Gram-negativos, aeróbios obrigatórios, oxidase negativa, catalase positiva, crescem na faixa de temperatura de 6°C à 36°C, possuem um flagelo polar e estão amplamente distribuídas, podendo viver em diversos ambientes. Pertence à classe gama do filo proteobacteria (RYAN et al., 2011; RODRIGUEZ-R et al., 2012).

A maioria possui mucoides, formam colônias lisas e de coloração amarelada, apresentam um pigmento amarelo insolúvel chamado de xantomadina. Podem infectar ao todo, cerca de 120 espécies de monocotiledôneas e cerca de 270 de dicotiledôneas. E atingem culturas de grande importância econômica no Brasil como: mandioca, feijão, maracujá, cana-de-açúcar, tomate e citros, o que tem causado grandes perdas para a agricultura, principalmente na região centro-sul do país (BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001; WHITE et al., 2009 ; RYAN et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2012).

3.2.1. Doenças provocadas por Xanthomonas

Para a infecção, as bactérias crescem na superfície da folha e entram no hospedeiro por meio de aberturas naturais (estômatos e hidatódios), que são mantidos abertos por mais tempo devido ao aumento da umidade, ou através de ferimentos presente no hospedeiro, dessa forma se multiplicam no espaço intercelular e no xilema. Algumas espécies podem sobreviver no solo, fazendo com que ocorra a contaminação em futuras plantações, por meio de ferimentos nas raízes (RYAN et al., 2011; KAY; BONAS, 2009; TURKINGTON et al. 2004; LICHTENBERG, 1989).

Uma das doenças mais conhecidas causada por *Xanthomonas* é o Cancro cítrico. Ele tem como agente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri* – XaC), e ataca todas espécies de citros de importância econômica, formando no início pequenas lesões semelhantes a uma bolha, depois passam a causar lesões maiores e de tonalidade marrom deixando com aspecto intumescente acompanhado por lesões cloróticas no tecido da planta. Está presente em países como Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. É considerado um dos principais problemas fitossanitários no Brasil (SANCHES et al., 2014; CABI, 2017; EPPO, 2017). Como medidas para o controle da doença podemos citar: a utilização de espécies e variedades mais resistentes, o uso de quebra ventos, aplicação de cobre, indutores de resistência, entre outras (FEICHTENBERGER et al., 2005; BEHLAU, SALA, e BASSANEZI, 2017).

Outra doença causada por *Xanthomonas* que também acomete plantas de importância comercial no Brasil é a mancha-bacteriana ou mancha oleosa, causada

pela *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (*X. passiflorae* – Xap), que uma das doenças mais graves que acomete plantas de maracujá no país, causando lesões necróticas marrom-avermelhadas, e conforme a progressão da doença ocorre a perda da produtividade da planta, podendo levar à morte (FISCHER et al., 2005; ISHIDA e HALFELD-VIEIRA, 2009; MUNHOZ et al., 2015).

As regiões responsáveis pela maior produção do fruto também fornecem umidade e climas favoráveis à multiplicação da bactéria, tornando seu controle mais difícil (ISHIDA e HALFELD-VIEIRA, 2009). Como medidas de controle é possível citar o tratamento térmico de sementes (como método de prevenção) e o plantio de plantas de espécie e variedade com resistência à doença. Outro método de controle utilizado em algumas regiões é a integração do controle químico e genético (LIMA et al., 2006; ISHIDA e HALFELD-VIEIRA, 2009).

As espécies de *Xanthomonas vasicola* tem por característica a infecção em plantas que tem grande importância econômica. Como por exemplo, *X. vasicola* pv. *musacearum* (Xvm) que é um agente patogênico de milho e banana e *X. vasicola* pv. *holciola* (Xvh) que provoca doença em sorgo (NAKATO, et al., 2018). E por sua vez a *X. vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) é conhecida por causar doença em cana-de-açúcar, levando a planta a danificação vascular e necrose foliar. Também causa doença em palma e sorgo, porém este não foi verificado no campo ainda. E recentemente foi reportada no Brasil como agente causador da estria bacteriana do milho (HARTMAN et al., 2020).

3.2.2. Xvv e a estria do milho

A Xvv foi reportada pela primeira vez na África em 1949 (DYER, 1949) e somente foi identificada como agente causal da estria do milho em 2016, na África do Sul. A partir de então, causou perdas econômicas em sete estados dos Estados Unidos em 2016 e em 2017 essa doença foi reportada na Argentina (PLAZAS, 2018 ; LANG et al., 2017). Contudo, em 2018 na região sul do Brasil foi reportada a presença desse patógeno nas culturas de milho, o que tem alarmado produtores. Os sintomas iniciais começam nas folhas inferiores das plantas, e durante o crescimento do milho as lesões se deslocam para a parte superior. Os sintomas são caracterizados por lesões com margens irregulares, lineares, amarelas e castanhas.

As plantas com maior tempo de infecção apresentam lesões longas de cor escura, que podem atingir grandes extensões ao longo da folha (Figura 1) (LEITE Jr et al.; 2018; KORUS et al. 2017).



Figura 1. Fotografia mostrando planta de milho infectada por *Xv*, apresentando os sintomas observados no 8º dia de infecção: lesões lineares longas de cor escura, que atingem todo o comprimento da folha

Acredita-se que o maior impacto causado pela infecção dessa bactéria no milho é à perda de tecido fotossintético que essa doença gera, devido as estrias necróticas nas folhas, e que pode causar um impacto maior caso atinja as folhas da parte superior das plantas (HARTMAN 2018). Apesar dessa doença causar preocupações, ainda não se tem um método de controle eficaz, dentre as alternativas utilizadas está o uso de químicos de origem sintética, plantações de híbridos resistentes a doença e o controle químico natural.

3.2.3. Possíveis formas de controle da *Estria bacteriana* do milho: vantagens e desvantagens

Para o controle de patógenos de plantas o método mais utilizado é a aplicação de químicos de origem sintética, como os herbicidas que contém em sua formulação o Glifosato ou até mesmo alguns fungicidas com ativos específicos, esses compostos podem ter atuação contra o microrganismo hospedeiro (HARTMAN et al., 2020). Entretanto, seu uso pode ser prejudicial tanto ao meio ambiente quanto à saúde humana, uma vez que é responsável pelo acúmulo de substâncias tóxicas em ambientes como solo, riachos e lagos, causando um desequilíbrio nesses ecossistemas. Alguns estudos mostram uma relação da pulverização de pesticidas com o risco do desenvolvimento de câncer (SOUZA et al., 2017; STEWART, 2012).

Outra forma de controle de doenças bacterianas é o plantio de variedades resistentes ao patógeno (MATSUOKA, 2016; MANTOVANI et al., 2006). Entretanto, um estudo realizados por Mantovani et al. (2016), 31 espécies de gramíneas foram avaliadas com relação a susceptibilidade à *Xvv*. A infecção foi bem-sucedida em híbridos de sorgo, aveia e milho. Em milho foram testados três híbridos e todos apresentaram susceptibilidade (MANTOVANI et al., 2006). Portanto na ausência de híbridos com características de resistência outras medidas de controle devem ser adotadas.

Dentre os métodos alternativos de controle está o controle biológico, onde se leva em consideração as interações do patógeno, do hospedeiro e do possível antagonista; e que pode ser conseguido através de práticas que viabilizem os antagonistas nativos ou por meio da introdução de microrganismos selecionados. O sucesso do biocontrole depende da atividade antagonista (XU et al. 2013; LANNA FILHO, 2010). A forma de utilização pode ser por meio de sua aplicação direta, quando estão vivos; ou indiretas, através do uso de seus metabólitos (REMUSKA; PRIA, 2007). Para esses dois casos é necessário o uso de produtos para que se mantenha a característica de seus metabólitos ou do microrganismo em si.

Por fim, a possibilidade que foi testada e já tem demonstrado ação contra diversos patógenos é o controle químico natural, que por meio da utilização de moléculas extraídas do metabolismo secundário de microrganismos pode ser utilizado como uma ferramenta alternativa para o controle de doenças em plantas.

Onde um metabólito produzido por um microrganismo, depois de passar por um processo de separação e purificação, tem ação prejudicial ao patógeno, gerando um controle da doença (BETTIOL; GHINI, 1995).

Frações extraídas do metabolismo secundário de *P. aeruginosa cepa LV* demonstraram ter atividade antimicrobiana contra vários fitopatógenos como: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Botrytis cinerea* e *Candidatus liberibacter* (PISTORE, 2014; MURATE et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2016; MUNHOZ et al., 2017; SIMIONATO et al., 2017). Algumas frações e compostos apresentaram alta atividade antimicrobiana contra bactérias do gênero *Xanthomonas*, espécies como *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*, *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* obtiveram resultados positivos, em estudos anteriores, quanto ao controle da doença com a utilização dos compostos (DE OLIVEIRA et al., 2016; MURATE et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2014; LOPES et al. 2012). Portanto existe possibilidade do uso dos compostos produzidos pela *cepa LV* como possível forma de controle da estria do milho.

3.3. Bioativos obtidos por de *Pseudomonas aeruginosa LV*

O gênero *Pseudomonas*, pertence à família *Pseudomonadaceae* e tem cerca de 253 espécies e 18 subespécies. A espécie *P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, é flagelar e pode ser encontrada na forma planctônica ou em colônias, gerando biofilmes, que podem estar aderidos à superfícies com vários tipos de textura, vivos ou não. Este microrganismo é ubíquo, podendo habitar a água, solo e ter uma variedade de hospedeiros, como insetos, animais e plantas (PUOPOLO et al., 2006). Essa capacidade de ocupar diferentes nichos é decorrente de sua complexidade genética, fazendo com que se adapte a praticamente todos os ambientes do planeta.(MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A versatilidade conferida pela quantidade de genes reguladores presentes em seu genoma, faz com que tenha um amplo conjunto de determinantes de virulência, além de ter capacidade de evitar a ação de alguns tratamentos antimicrobianos, fazendo com que seja um dos patógenos que despenda grandes preocupações na

área médica (GELLATLY; HANCOCK, 2013; BREIDENSTEIN et al., 2011; SILBY et al., 2011).

Um dos gêneros de bactéria que tem maior utilização como agentes de controle químico natural são *Bacillus* e *Pseudomonas*, pelo fato de produzirem muitos compostos que tem possibilidade de promover um controle efetivo da bactéria alvo, por serem organismos antagonista de algumas espécies da bacterias (PAGANI et al., 1998; SHODA, 2000; CHU et al., 2010). O gênero *Pseudomonas*, desde 1990, tem sido utilizado como forma um biopesticida, controlando doenças em plantas nos Estado Unidos (STOCKWELL; STACK, 2007). Portanto, como esse gênero tem uma ampla distribuição, e é considerado uma dos que tem mais ação antagonista, seus metabólitos podem ser utilizados como estratégia para um controle químico natural (GARDENER, 2007).

A bactéria *P. aeruginosa*, quando presente no solo, tem grande importância ecológica. Obtém recursos a partir de exsudatos radiculares que os vegetais liberam e em compensação beneficiam as plantas, como por exemplo regular o crescimento da planta hospedeira, com a síntese de hormônios semelhantes aos produzidos pelos vegetais; além de fazer com que as plantas possam ter respostas imunológicas antecipadas, ativando as vias de resistência sistêmica (KUMAR et al., 2017 ; HANELT; JANOBY, 2004).

Ademais, *P. aeruginosa* produz compostos antimicrobianos, devido a competição com outros organismos presente na região da rizosfera, que protege a planta contra infecções de patógenos presentes no solo (UPADHYAY; SRIVASTAVA, 2011). Além disso, a bactéria auxilia na nutrição das plantas, liberando sideróforos, que são moléculas que sequestram íons metálicos formando complexos em maior quantidade e também mais assimiláveis pelos vegetais (SAHA et al., 2016).

Rampazo (2004) selecionou a *cepa* LV, no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo deste trabalho era realizar a bioprospecção de plantação de laranjas infectadas pela *bactéria Xanthomonas citri* pv *citri*, com o intuito de isolar bactérias que tivessem ação antimicrobiana contra o patógeno. Dentre as colônias analisadas, as cepas LV e LN, obtiveram resultados, tanto in vitro quanto in vivo em condições de casa de vegetação, positivos contra a infecção (RAMPAZO, 2004).

A partir de então o grupo de pesquisas do LEM desenvolveu métodos de para isolar, purificar e identificar os compostos bioativos que essas cepas produzem, especialmente a *cepa LV* (SIMIONATO et al., 2017; SILVA VASCONCELLOS et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2011). Testes realizados mostraram que os compostos que a *cepa LV* produziu induz o crescimento e resistência sistêmica das plantas e, além disso, apresenta alta atividade antimicrobiana (MUNHOZ et al., 2017).

Para conseguir as frações e compostos usados como antimicrobianos nos estudos realizados pelo laboratório, primeiramente é realizado o processo denominado de produção, que consiste na aeração constante da bactéria em meio caldo nutriente modificado com adição de 5mg/L de CuCl₂, já foi demonstrado que *P. aeruginosa* crescendo em meio com maior concentração de cloreto de cobre faz a regulação celular, promovida pela expressão de genes, produzindo pelo seu metabolismo um excesso de compostos de cobre com alta atividade antimicrobiana (GIONCO et al., 2017). Depois o sobrenadante é separado e reduzidos, para passar pelo método de partição líquido-líquido, que tem como produto extraído a fase diclorometano (FD), com dlicorometano na razão 2:1 (PISTORE et al., 2018).

A FD posteriormente passa por cromatografia líquida a vácuo (CLV), nessa etapa são extraídas frações, denominadas de Fs, com variações de números e letras, de acordo com a sequência de solventes utilizados. A F4A, que é a fração utilizada esta trabalho, é obtida utilizando diclorometano : acetato de etila [1 : 1]. Já o composto organometálico (OAC), também usado no trabalho, é obtido com a fração FD submetida a cromatografia flash (CF), e para o monitoramento das frações obtidas é realizada a cromatografia de camada delgada (CCD), com diclorometano : acetato de etila [95 : 05] (PISTORI et al., 2018, como modificação).

Em estudos anteriores foi verificado que frações como F3, F4 e F4A, extraídas do metabolismo secundário de *P. aeruginosa*, apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias como *Lactobacillus* spp., *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC). *Staphylococcus aureus*, *Pectobacterium carovora*, *Botrytis cinerea* e *Xanthomonas* spp. (DE OLIVEIRA et al., 2011; CARDOZO et al., 2013; GÓIS et al., 2013; KERBAUY et al., 2013; MUNHOZ et al., 2017, SIMIONATO et al., 2017). Os principais bioativos obtidos estão presentes na fração denominada de F4A, e foram identificados como organometálica (OAC), que tem um elemento cobre em sua estrutura e por isso é um composto que tem atividade contra fungos e bactérias. A

fenazina-1-carboxilica ácida (PCA), fenazina-1-carboxiamida (PCN) e indolin-3-ona (IND). Ademais, estudos mostraram que a PCN induziu resistência sistêmica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) contra a bactéria *Pectobacterium carotovorum* (MUNHOZ et al. 2017).

Os estudos com bactérias do gênero *Xanthomonas* que foram realizados por nosso grupo de estudo, apresentaram resultados positivos quanto a atividade antimicrobiana de frações como F3, F4A e o composto organometálico foram realizados tanto testes *in vitro* como o de disco difusão e concentração inibitória mínima (CIM) quanto *in vivo* em casa de vegetação (DE OLIVEIRA et al., 2011; LOPES et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2016).

Com *X. axonopodis*, a fração F3 obteve um halo de inibição de 30,5 mm e CIM de 100 µg.mL⁻¹, e os testes *in vivo* apresentação 93,9% de redução de sintomas, quando comparados ao controle, além disso a microscopia eletrônica de varredura mostrou que, com a aplicação da fração, a morfologia das bactérias sofreram alterações e a camada de exopolissacarídeos (EPS) foi danificada (LOPES et al., 2012). A fração F3 também foi utilizado no estudo contra a *X. arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), os testes *in vitro* tiveram para a concentração de 1000 µg.mL⁻¹ um halo de inibição de 32.33 mm. A microscopia também demonstrou alterações morfológicas e na EPS, e os experimentos *in vivo* demonstraram que quanto maior a concentração de F3 ocorre um melhor controle da doença (VASCONCELLOS et al., 2014).

A camada EPS é necessária para a vida da bactéria, por permitir que ela adentre o hospedeiro e multiplica no interior, causando a infecção, sendo assim, esta associada ao nível de virulência das bactérias. Além disso também tem a função de protege-las da desidratação que pode sobre no meio em que se encontra. Já foi relatado (KEMP et al., 2004) que as bactérias que não eram capazes de produzirem EPS não obtinham sucesso na infecção do hospedeiro, portanto não causavam sintomas nas plantas. Sendo assim, a deficiência na produção da camada pode ser considerada o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana que as frações testadas e o composto OAC apresentam (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Ademais, com a bactéria *X. citri* pv. *citri* cepa 306, estuda por de Oliveira et al. (2011), a fração F3 se mostrou melhor do que a F4, tanto em ágar difusão, apresentado um halo de inibição de 10 mm para F4 e 38,5 mm para F3, quanto no CIM, que obteve 2500 µg.mL⁻¹ para F4, e 19,53 µg.mL⁻¹ para F3. Os resultados na

microscopia também demonstraram que a F3 teve um efeito significativo nas células, alterando a morfologia e a camada EPS. Por fim, ocorreu uma diminuição dos sintomas das plantas tratadas com F3. Por conseguinte tal fração obteve resultados positivos quanto a ação antimicrobiana e redução dos sintomas na plantas infectadas.

Outro estudo com *X. citri* subsp. *citri* cepa 306, demonstrou que as frações F3, F3d e o composto organometálico purificado (OAC) obtiveram resultados positivos para a ação antimicrobiana, tanto in vivo quanto in vitro. No teste de ágar difusão as frações mais purificadas apresentaram maior halo de inibição, sendo 26,5 mm para F3, 42 mm para F3d.3 e 67mm para OAC. A CIM para F3 foi de 19,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para OAC foi 0,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A microscopia mostrou que com a fração F3d a morfologia da bactéria sofreu alteração assim como a camada EPS. Nesse estudo também foi demonstrado que ocorreu redução dos sintomas em 97% com a fração F3d (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Portanto, de acordo com as propriedades da fração F4A e do composto OAC e com base nos estudos apresentados, pode ser dizer que é possível que a fração F4A seja um composto vantajoso para ser usado em vegetais, pois promover o crescimento nas plantas, induz a resistência sistêmica do vegetal e, proporcionada pelo composto OAC tem atividade antimicrobiana, além disso foi demonstrado que podem atuar contra espécies do gênero *Xanthomonas* que causam bacteriose em plantas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. B. Cancro cítrico: Medidas essenciais de controle. **Fundo de Defesa da Citricultura**. Araraquara, São Paulo: Fundecitrus, 2017. 24p.
- BETTTIOL, W.; GHINI. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ceres, p.717-728, 1995.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Ferry Lane, Inglaterra: International Mycological Institute, p. 332 . 1986.
- BREIDENSTEIN, Elena B.m.; LAFUENTE-NÓÑEZ, César de; HANCOCK, Robert E.w.. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.419-426, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
- CABI, 2017. Xanthomonas citri subsp. citri. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc. Disponível em . Acesso em: 26 de dez. 2019.
- CARDOZO, Viviane F; OLIVEIRA, Admilton G; NISHIO, Erick K; PERUGINI, Marcia Re; ANDRADE, Célia Gtj; SILVEIRA, Wanderley D; DURÁN, Nelson; ANDRADE, Galdino; KOBAYASHI, Renata Kt; NAKAZATO, Gerson. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a Pseudomonas strain against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 12, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-12-12>.
- CHU, Guixin; WAKELIN, Steven A.; CONDRON, Leo; STEWART, Alison. Effect of soil copper on the response of soil fungal communities to the addition of plant residues. **Pedobiologia**, [s.l.], v. 53, n. 6, p. 353-359, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2010.04.002>.
- COLLMER, A. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 1, p. 329-335, 1998.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Central de Informações Agropecuárias. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em: 20 dez 2019.

COSTA, R. V. da; COTA, L. V.; SILVA, D. D. da; CAMPOS, L. J. M.; ALMEIDA, R. E. M. de; BERNARDES, F. P.; PEREIRA, L. A. O. A. Reação de híbridos comerciais de milho à mancha-de-bipolaris em diferentes épocas de semeadura. **Circular Técnica**. Sete Lagoas, MG, EMBRAPA, 238, p. 01 - 11. 2018.

DOOKUN, Asha; STEAD, David E.; AUTREY, L. Jean-claude. Variation among Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* from Mauritius and other Countries Based on Fatty Acid Analysis. **Systematic And Applied Microbiology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.148-155, abr. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(00\)80056-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(00)80056-9).

DYER, R.A. Botanical surveys and control of plant diseases. Farming in South Africa. **Annu. Rep. Dep. Agric. S. Afr**, v. 275, p. 119-121, 1949.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Cultivo do milho: clima e solo. Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 2002.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation), online (2017) **EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System**. Disponível em: Acesso em 25 set. 2018.

FAOSTAT - FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Comparação de dados. Produção. 2017. Disponível em: <www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 01 mai. 2018.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE- JÚNIOR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.239-269

FERREIRA, Polliana Silva Franco; TEBALDI, Nilvanira Donizete. Métodos de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujazeiro e biofertilizantes na inibição do crescimento bacteriano in vitro. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 45, n. 2, p.207-209, abr. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/185793>.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 467-474.

GARCIA, João Carlos *et al.* Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. **Circular técnica**, [S. l.], p. 1 - 12, 10 ago. 2006.

GARCIA, João Carlos; MATTOSO, Marcos Joaquim; ANDRADE, Jason de Oliveira. Importância do milho em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, p. 7 -12, 20 jul. 2006.

GARDENER, Brian B. Mcspadden. Diversity and Ecology of BiocontrolPseudomonasspp. in Agricultural Systems. **Phytopathology**, [s.l.], v. 97, n. 2, p. 221-226, fev. 2007. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-97-2-0221>.

GELLATLY, Shaan L.; HANCOCK, Robert E.w.. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens And Disease**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.159-173, 15 mar. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/2049-632x.12033>.

GIGLIOTI, E.A.; MATSUKA, S. False red stripe. In: Rott, P.; Bailey, R.A.; Comstock, J.C.; Croft, B.J. **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: Cirad Publications Service, p.27-31, 2000.

GIONCO, Bárbara; TAVARES, Eliandro R.; OLIVEIRA, Admilton G. de; YAMADA-OGATTA, Sueli F.; CARMO, Anderson O. do; PEREIRA, Ulisses de Pádua; CHIDEROLI, Roberta T.; SIMIONATO, Ane S.; NAVARRO, Miguel O. P.; CHRYSSAFIDIS, Andreas L.. New Insights about Antibiotic Production by Pseudomonas aeruginosa: a gene expression analysis. : A Gene Expression Analysis. **Frontiers In Chemistry**, [s.l.], v. 5, 15 set. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2017.00066>.

HANELT, B.; JANOBY, J. Untying a Gordian knot: The domestication and laboratory maintenance of a Gordian worm, Paragordius varius (Nematomorpha: Gordiida). **Journal of Natural History**, v. 38, n. 8, p. 939–950, 2004.

HARTMAN, T.; HARBOUR, J.; THARNISH, B.; VAN METER, J.; JACKSON-ZIEMS, T. A.. Agronomic Factors Associated with Bacterial Leaf Streak Development Caused by Xanthomonas vasicola pv. vasculorum in Corn. **Phytopathology**®, [s.l.], p. 01-36, 5 maio 2020. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-02-20-0043-r>.

HARTMAN, T.; THARNISH, B.; HARBOUR, J.; YUEN, G. Y.; JACKSON-ZIEMS, T. A.. Alternative Hosts in the Families Poaceae and Cyperaceae for Xanthomonas vasicola pv. vasculorum, Causal Agent of Bacterial Leaf Streak of

Corn. **Phytopathology**TM, [s.l.], p. 01-06, 17 mar. 2020. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-04-19-0132-r>.

HARTMAN, Terra Marie. **Investigation of alternative hosts and agronomic factors affecting *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agente of bacterial leaf streak of corn**. 2018. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Master Of Science, University Of Nebraska, Nebraska, 2018.

ISHIDA, A. K.; HALFELD-VIEIRA, B. de A. Mancha-Bacteriana do Maracujazeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*): Etiologia e Estratégias de Controle. Belém: **EMBRAPA Amazônia Oriental**, 2009. 23p. (EMBRAPA Amazônia Oriental, Documentos 357).

KAY, S.; BONAS, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. **Current Opinion in Microbiology**, 12:37–43. 2009

KERBAUY, Gilselena; VIVAN, Ana C.p.; SIMÕES, Glenda C.; SIMIONATO, Ane S.; PELISSON, Marsileni; VESPERO, Eliana C.; COSTA, Silvia F.; ANDRADE, Celia G.t. de J.; BARBIERI, Daiane M.; MELLO, João C.p.. Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 389-397, 15 fev. 2016. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138920101704160215171649>.

KORUS, K.; LANG, J. M.; ADESEMOYE, A. O.; BLOCK, C. C.; PAL, N.; LEACH, J. E.; JACKSON-ZIEMS, T. A.. First Report of *Xanthomonas vasicola* Causing Bacterial Leaf Streak on Corn in the United States. **Plant Disease**, [s.l.], v. 101, n. 6, p. 1030, jun. 2017. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-16-1426-pdn>.

KUMAR, V. et al. Probiotics and plant health. **Probiotics and Plant Health**, p. 1–600, 2017.

LANG, J. M. et al. Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. **Phytopatology, Lincon**, v. 107, n. 11, p.1312-1321, jun. 2017.

LANNA FILHO, R. ,FERRO, H. M. e DE PINHO R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, N. 2, p. 12, 2010.

LEITE, R. P.; CUSTÓDIO, A. A. P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I. M.; SUGAHARA, V. H.. First Report of the Occurrence of Bacterial Leaf Streak of Corn

Caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, [s.l.], v. 103, n. 1, p. 145-145, jan. 2019. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-06-18-1100-pdn>.

LICHTENBERG, E. Land quality, irrigation development, and cropping patterns in the northern high plains. **American Journal of Agricultural Economics**, v 71(1), p. 187-194, 1989.

LIMA, A. de A.; NORONHA, A. C. da S.; BORGES, A. L.; CARDOSO, C. E. L.; RITZINGER, C. H. S. P.; BARBOSA, C. de J.; BARBOSA, C. de J.; SANTOS FILHO, H. P.; FANCELLI, M.; CUNHA, M. A. P. da; SANCHES, N. F. A cultura do maracujá. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical. 3. ed. ver. amp. Brasília: **EMBRAPA Informação Tecnológica**, 2006. 124p. (EMBRAPA Informação Tecnológica, Coleção Plantar, 51).

LOPES, Lucilene P. et al . Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Trop. plant pathol.**, Brasília , v. 37, n. 4, p. 233-238, Aug. 2012 .

LOVEDAY, H. P. et al. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: A rapid systematic review. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, n. 1, p. 7–15, 2014.

MANTOVANI, E. S., MARINI, D. C.; GIGLIOTI, E. A. Host range of *Xanthomonas* sp., causal agent of the false red stripe of sugarcane, among grasses. **Summa Phytopathologica**, v.32, n. 2, p. 124-130, 2006

MATSUOKA, Hiroaki et al. Changes in volatiles in carrots inoculated with ACC deaminase-producing bacteria isolated from organic crops. **Plant And Soil**, [s.l.], v. 407, n. 1-2, p.173-186, 18 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-015-2769-x>.

MC DOUGALL, G.J., STEWART, D. Berries and health: a review of the evidence. **Food and health innovation, 2012.** http://www.northsearegion.eu/files/repository/20131219103705_UK-Enclosure53_sep12.pdf. Accessed 17 Nov 2014

MENELAU, A. S. Análise do mercado. p. 81–92, 2017.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Biotecnologia do Solo. p. 729, 2006.

MUNHOZ, C. F.; SANTOS, A. A.; ARENHART, R. A.; SANTINI, L.; MONTEIROVITORELLO, C. B.; VIEIRA, M. L.C. Analysis of plant gene expression during passion fruit– *Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n. 1, p. 135–155, 2015. Disponível em: . Acesso em: 26 dez. 2017.

MUNHOZ, L. D. et al. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food & Agriculture**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-16, 19 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2017.1282592>.

MURATE, Letícia Sayuri; OLIVEIRA, Admilton Gonçalves de; HIGASHI, Allan Yukio; BARAZETTI, André Riedi; SIMIONATO, Ane Stefano; SILVA, Caroline Santos da; SIMÕES, Glenda Cavallari; SANTOS, Igor Matheus Oliveira dos; FERREIRA, Marlon Renan; CELY, Martha Viviana Torres. Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. **Agricultural Sciences**, [s.l.], v. 06, n. 03, p. 295-303, 2015. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2015.63030>.

NAKATO, Gloria Valentine; WICKER, Emmanuel; COUTINHO, Teresa A.; MAHUKU, George; STUDHOLME, David J.. A highly specific tool for identification of *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* based on five *Xvm*-specific coding sequences. **Heliyon**, [s.l.], v. 4, n. 12, p. 1-11, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01080>.

NAVARRO, Miguel Octavio Pérez; SIMIONATO, Ane Stefano; PÉREZ, Juan Carlos Bedoya; BARAZETTI, André Riedi; EMILIANO, Janaina; NIEKAWA, Erika Tyemi Goya; ANDREATA, Matheus Felipe de Lima; MODOLON, Fluvio; DEALIS, Mickely Liuti; ARAĐJO, Eduardo José de Almeida. Fluopsin C for Treating Multidrug-Resistant Infections: in vitro activity against clinically important strains and in vivo efficacy against carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae*. : In vitro Activity Against Clinically Important Strains and in vivo Efficacy Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 01-12, 25 out. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02431>.

OLIVEIRA, Admilton G. de; SPAGO, Flavia R.; SIMIONATO, Ane S.; NAVARRO, Miguel O. P.; SILVA, Caroline S. da; BARAZETTI, André R.; CELY, Martha V. T.; TISCHER, Cesar A.; MARTIN, Juca A. B. San; ANDRADE, Célia G. T. de Jesus. Bioactive Organocopper Compound from *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the

Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 7, p. 01-12, 9 fev. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00113>.

OLIVEIRA, Admilton Gonçalves de; MURATE, Letícia Sayuri; SPAGO, Flavia Regina; LOPES, Lucilene de Paula; BERANGER, Jamile Priscila de Oliveira; MARTIN, Juca Abramo Barrera San; NOGUEIRA, Marco Antonio; MELLO, João Carlos Palazzo de; ANDRADE, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus; ANDRADE, Galdino. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, [s.l.], v. 56, n. 2, p. 125-131, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.008>.

PAGANI, C., SILVEIRA, E., WALLASEK, W. and SOLARES, E. (1998) Advances in the identification at the moment on the major susceptibility of the fruit infection of peach tree. *Technical Meeting about Fruit Trees Protection*, National Research Institute of Agronomy, Uruguay, 37.

PISTORI, J. F. Controle de Candidatus *Liberibacter asiaticus* em plantas de *Citrus sinensis* mediado por biocomposto [Control of Candidatus *Liberibacter asiaticus* on *Citrus sinensis* plants mediated by biocompound] (91 p., Dissertação (Mestrado em Microbiologia)). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil, 2014.

PISTORI, Juliana F. et al. Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Tropical Plant Pathology**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.289-296, 10 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-018-0231-3>.

PLAZAS, M. C. et al. First Report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Causing Bacteria Leaf Streak of Maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, [s.l.], v. 102, n. 5, p.1026-1026, maio 2018. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-17-1578-pdn>.

PRIOR, Philippe; AILLOUD, Florent; DALRING, Beth L.; REMENANT, Benoit; SANCHEZ, Borja; ALLEN, Caitilyn. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 1-11, 1 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>.

PUOPOLO G, et al. Insights on the susceptibility of plant pathogenic fungi to phenazine-1-carboxylic acid and its chemical derivatives. **Nat Prod Res** v. 27, p. 956–966, 2013. doi: 10.1080/14786419.2012.696257

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L.e.; NOWELL, D.c.. Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zeaean* can be distinguished from other pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.183-186, jun. 1990. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07060669009501024>.

RAMPAZO, L. G. L. Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões foliares do cancro cítrico. 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

REMUSKA, A. C., PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* E *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra**, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa, v.13 (3), p. 31-36, 2007.

RICAUD C, AUTRY L. J. C. Gumming disease. In: Ricaud C, Egan BT, Gillaspie AG, Hughes CG, eds. **Diseases of sugarcane**. Amsterdam: Elsevier,21–38, 1989.

RODRIGUEZ-R, L.M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M.L.; RESTREPO,S.; BERNAL,A. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiology**, v.12, p. 43. 2012.

ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas. 2.ed, Viçosa MG. UFV. 2005.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, V.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011. Disponível em: . Acesso em: 26 dez. 2017.

SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.

SANCHES, A. L. R.; DE MIRANDA, S. H. G.; BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R. B. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 52, n. 3, p. 549-566, 2014. Disponível em: . Acesso em: 21 set. 2018.

SCHAAD, N W; JONES, J B; CHUN, W. **Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: American Phytopathological Society (aps Press), 3 ed, p. 375, 2001.

SHODA, Makoto. Bacterial control of plant diseases. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 89, n. 6, p. 515-521, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)80049-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723(00)80049-3).

SILBY, Mark W. et al. Pseudomonasgenomes: diverse and adaptable. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.652-680, jul. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.

SILVA VASCONCELLOS, F. C. DA et al. Evaluation of antibiotic activity produced by Pseudomonas aeruginosa LV strain against Xanthomonas arboricola pv. pruni. **Agricultural Sciences**, v. 05, n. 01, p. 71–76, 2014.

SILVA, Adelaide Siqueira; LUZ, José Magno Queiroz; TEBALDI, Nilvanira Donizete; MORAIS, Tâmara Prado de. Diversity of Pectobacterium strains by biochemical, physiological, and molecular characterization. **Bioscience Journal**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 316-323, 11 fev. 2020. EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlandia. <http://dx.doi.org/10.14393/bj-v36n2a2020-46256>.

SILVA, Tatiana Borges; TEBALDI, Nilvanira Donizete. Caracterização de isolados de Pantoea ananatis e reação de genótipos de milho à bactéria. **Summa phytopathol.**, Botucatu , v. 44, n. 3, p. 283-285, Sept. 2018 .

SIMIONATO, Ane S.; NAVARRO, Miguel O. P.; JESUS, Maria L. A. de; BARAZETTI, André R.; SILVA, Caroline S. da; SIMÕES, Glenda C.; BALBI-PEÑA, Maria I.; MELLO, João C. P. de; PANAGIO, Luciano A.; ALMEIDA, Ricardo S. C. de. The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of Botrytis cinerea Produced by Pseudomonas aeruginosa LV Strain. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 01-10, 14 jun. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>.

SOUZA, Gustavo dos Santos et al . Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro , v. 22,n. 10,p. 3269-3280, Oct. 2017 .

SOUZA, R. O.; TEIXEIRA, S. M. Produtividade Total dos Fatores na Agricultura Goiana: Uma Análise para as Culturas de Cana-de-açúcar, Milho e Soja. *Revista de Economia e Agronegócio-REA*, v. 11, n. 2, p. 211-234, 2015.

SPAGO, Flávia Regina. **Eficiência de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* no controle de três espécies do gênero *Xanthomonas***. 2012. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

STEWART, Bernard W. Priorities for cancer prevention: lifestyle choices versus unavoidable exposures. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.126-133, mar. 2012. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70221-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70221-2).

STINTZI, Alain; EVANS, Kelly; MEYER, Jean-marie; POOLE, Keith. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasRllas mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. : lasRllas mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 166, n. 2, p. 341-345, set. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13910.x>.

STOCKWELL, Virginia O.; STACK, James P.. Using *Pseudomonas* spp. for Integrated Biological Control. **Phytopathology**, [s.l.], v. 97, n. 2, p. 244-249, fev. 2007. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-97-2-0244>.

THIEME, Frank; KOEBNIK, Ralf; BEKEL, Thomas; BERGER, Carolin; BOCH, Jens; BÜTTNER, Daniela; CALDANA, Camila; GAIGALAT, Lars; GOESMANN, Alexander; KAY, Sabine. Insights into Genome Plasticity and Pathogenicity of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Revealed by the Complete Genome Sequence. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 187, n. 21, p. 7254-7266, 1 nov. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.187.21.7254-7266.2005>.

TURKINGTON, T.K; KUZYK, A.; DUNN, R.; MCLAREN, D.; IRVINE, B.; CLEAR, R. M.; PATRICK, S.K. Irrigation and plant disease management. **Plant Disease**, v. 81, p. 49-52, 2004.

UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Phenazine-1-carboxylic acid is a more important contributor to biocontrol *Fusarium oxysporum* than pyrrolnitrin in *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. **Microbiological Research**, v. 166, n. 4, p. 323–335, 2011.

VALOIS, A. C. C. Importância dos transgênicos para a agricultura. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, v. 18, n. 1, p. 27-53, 2001.

WHITE, F.F, et al. The type III effectors of Xanthomonas. **Molecular plant pathology**, v. 10(6), p. 749–766, 2009.

XU Z, et al. Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 contributes to antifungal activity and biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 79, p. 755, 2013.

5. ARTIGO

Effect of bioactives compound against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing corn streak

Amanda Concheta Mascari Piva¹, Barbara Gionco-Cano, Ane Stefano Simionato, Guilherme, Erika, Leandro, Mickely, Andreas, Galdino Andrade ^{1*}

¹ Microbial Ecology Laboratory, Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

***Corresponding Author:**

Galdino Andrade, State University of Londrina, Department of Microbiology, Microbial Ecology Laboratory, Londrina, PR, PO Box 10011, 86057-970, Brazil.

Phone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

Abstract

The agent of the corn bacterial streak is *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*), that was recently isolated and characterized in Brazil. Despite the disease has not caused significant damage in Brazil in the United States the pathogen has reached epidemic levels, consequently indicating the need to search for efficient methods of control. The aim of this study was to evaluate the ability of infection of the *Xvv* in corn plants and the activity of the secondary metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain LV to control of *X. vasicola* pv *vasculorum*. The experiments to induce infection of *Xvv* and infection control were carried out in a greenhouse. The antibiotic activity of the semi-purified fraction F4A and a purified organometallic compound, fluopsin C (FC), both produced by the secondary metabolism of *P. aeruginosa* strain LV, against *Xvv* was evaluated. Disc diffusion test and minimum inhibitory concentration (MIC) determined the activity of the compounds *in vitro* conditions. Trials under greenhouse conditions were carried out using three F4A concentrations: 0.5; 5 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and three FC concentrations: 0.12; 1 and 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and was performed before (pre-treatment) and after (post-treatment) inoculation of *Xvv*. The antimicrobial activity of both

compounds was evaluated to control the bacterial streak in corn. Infected leaf was collected and the scanning electron microscopy (SEM) was performed for ultrastructural analysis of the effect of bioactives on *Xvv* cells and disease control. The disc diffusion, concentrations of 250 µg and 50 µg of F4A formed inhibition halos of 63 mm and 64.5 mm respectively, and 50 µg of FC showed halos of 69.5 mm. The MIC of F4A was 0.25 µg mL⁻¹ and FC 0.06 µg mL⁻¹. The highest antibiotic activity on the control of lesions formation was observed in pre and post-treatment of F4A 10 µg and FC 4 µg mL⁻¹, in corn 30F52 hybrid the effect was more effective than in corn 929 V hybrid. In the SEM analysis plants treated with F4A and FC decreased *Xvv* population on lesion when compared to the control. The results showed that the F4A semi-purified fraction and the pure antibiotic could help in the control of *Xvv* in corn.

Keywords: *Xanthomonas vasicola*; *Zea mays*; MEV; natural chemical control; organometallic compound.

1. Introduction

The *Xanthomonas* genera comprise Gram-negative bacilli, belonging to the Gamma division of the phylum Proteobacteria that can cause infections in plants with great economic importance [1]. *Xanthomonas. vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*) causes Bacterial Leaf Streak of Corn (*Zea mays* L.), infecting through natural openings (stomata and hydathodes) or by wounds and multiplying in the intercellular space of xylem [2]. The *Xvv* was first reported in South Africa in 1949 [3], but was only identified as a causal agent of streak of corn in 2016.

The disease has been reported in South Africa [4], United States [5 - 6] and Northeast Argentina [7], and was responsible for economic losses in many states in US between 2016 and 2018 [8 - 9]. In Brazil, the Bacterial Leaf Streak of Corn was described in northern and west Paraná [10 - 11]. The symptoms begin with water-soaked lesions on the leaves that expand along the veins producing irregular long necrotic streaks, and dark yellow to brown colored lesions and it is believed that the

major impact caused by the infection is the loss of photosynthetic tissue that the disease generates [12].

The methods to control disease are based on the use of agrochemicals, an alternative harmful to the environment and human health [13 - 14], and on the planting of resistant varieties [15 - 16]. One alternative to the currently agrochemicals control should be used molecules extracted from the secondary metabolism of microorganisms. Bioactive compounds isolated from the secondary metabolism of an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa*, LV strain, have been demonstrated antimicrobial activity against several phytopathogens, including *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *X. arboricola* pv. *pruni* and *X. citri* subsp. *citri* [17 - 20]. The semi-purified active fraction partitioned from the crude extract of the LV strain, named F4A, has in its composition four main components: indolin-3-one (IND), phenazine-1-carboxylic acid (PCA), phenazine-1-carboxamide (PCN) and an organocopper antibiotic compound, Fluopsin C (FC) [19, 17]. The objective of this work was to evaluate the effect of a semi-purified fraction F4A (IND, PCA, PCN and FC) and the purified FC, produced by *P. aeruginosa* LV strain to control Bacterial Leaf Streak of Corn.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms

The *X. vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*) was isolated from corn leaves containing lesions similar to bacterial streaks, collected in Palotina city – PR, Brazil. The identification was determined by a genetic analysis performed at the Citrus Culture Institute Sylvio Moreira and the Koch's postulate was carried out in our Laboratory in greenhouse conditions as follow [7]. The *Xvv* strain was inoculated corn of two varieties 30F53 and Balu 929 V, using a hypodermic syringe, applying 1 mL of a cell suspension of 10^8 UFC mL⁻¹ to the stem portion of the plant located at 5 cm from soil. After 14 days of inoculation, striated marks were formed in a longitudinal way on leaves. The *Xvv* was re-isolated from the lesions formed in leaves, that is confirming the pathogen.

The antagonist bacteria *P. aeruginosa* LV strain (GenBank accession number CP058323 [BioProject PRJNA450135, BioSample SAMN08930812]) was isolated

from an old citrus canker lesion on orange leaves (*Citrus sinensis* cv. *Valencia*) in Astorga - PR, Brazil [21 - 22].

All bacteria were maintained in glycerol at 40% at -20 °C and in liquid nitrogen and deposited in the microbial culture collection of the Microbial Ecology Laboratory, Londrina State University, Brazil.

2.2 Production and purification of the F4A and OAC fraction

P. aeruginosa LV strain was cultivated for 10 days at 28 °C in a constant aeration method in nutrient broth medium (2 g L⁻¹ of peptone and 1.2 g L⁻¹ of meat extract) with the addition of 5 mg L⁻¹ CuCl₂. After that the supernatant was centrifuged (9,000 rpm for 15 min, -4 °C) the pellet was discarded and the liquid phase was concentrated at a forced aeration oven, at 60 °C, reducing 90% of the initial volume.

The supernatant was submitted to liquid-liquid partition with dichloromethane 2:1 three times, and was concentrated at 45 °C in a rotary evaporator (Büchi R-215, Switzerland) and called dichloromethane phase (DP). After, the DP was purified by vacuum liquid chromatography (VLC) in a glass column (20 mm in diameter, 350 mm in height) packed with silica gel 60 (0.063 - 0.200 mm, Merck). As a mobile phase, organic solvents with a crescent polarity according to Navarro et al [23]. The F4A fraction was obtained using as mobile phase dichloromethane: ethyl acetate (1:1 v/v)

In order to obtain the purified FC compound, DP was fractioned by flash chromatography using a glass column (10 mm diameter x 350 mm high) coupled to a medium pressure pump (50 kPa). Silica gel 60 (0.04 – 0.063 mm, Macherey-Nagel) was used as stationary phase and the organic solvents with increasing polarity were used as mobile phase (Navarro et al. 2019). Followed to checked the fractions obtained in the extraction and the purification processes, a thin layer chromatography (TLC) in silica gel plates (Merck 60 F254) with as a mobile phase: dichloromethane: ethyl acetate (95:05, v:v) was carried. The spots were visualized in ultraviolet (UV) light at 254 nm and 366 nm.

2.3 In vitro antimicrobial evaluation

To evaluate the antimicrobial activity of F4A and FC against *Xvv*, the agar diffusion disc technique was performed. Nine Petri dishes were prepared containing

20 mL of nutrient agar (AN) plus yeast extract (EL), were inoculated 10^8 CFU / mL of *Xvv*. The paper discs were prepared with 250 and 50 μg of F4A and 50 μg of FC per disc, using three replicates per concentration, and were left on culture media surface after cell suspension inoculation. The plates were incubated at 28 °C / 48 h and the evaluation was performed by measuring the inhibition halos (mm).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using a broth microdilution method according to the modified methodology recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [24] using cultures plates with 96 wells. The concentrations used for MIC tests were from 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for F4A fraction and from 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 0.015 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for FC. The plates were incubated at 28 °C / 48 h. The MIC was determined when there was 100% inhibition of bacterial growth when compared to the control without adding the substance. The MICs obtained were used to determine the concentrations that were applied in the greenhouse experiments.

2.4 Evaluation of antimicrobial activity in vivo

All experiments were done in greenhouse conditions 14 h/10 day/night at 28 °C. The corn seeds were sowed in pots 2 L carrying a mixture of soil and sand [3: 1] fertilized with 2 g of NPK 10-10-10. To correct the acidity, 3 g of dolomitic limestone was used per pot. Two experiments with an entirely randomized design were performed, on the first, to standardized the experimental infection of *Xvv* in corn leaf, and on the second, the evaluation of the antimicrobial activity of F4A and FC to control bacterial streak in leaf.

2.4.1 Standardization of the experimental infection of X. vasicola pv. vasculorum

In order to analyze the best method for infection caused by *Xvv* in corn plants, seeds of 30F53 hybrid (Pioneer Corteva) and 929-V hybrid (Balú) plants of each hybrid were grown in greenhouse conditions, at 21 days after germination (DAG) each plant was kept in the dark humid chamber for 24 h before and after inoculation (totaling 48 h). After 24h, plants were infected with the bacterium *Xvv*, the treatments consisted of ten plants of both hybrids, 5 mL of bacterial suspension was sprayed per plant in saline solution containing 10^8 CFU mL^{-1} of *Xvv*. In addition, in the other ten of each hybrid, 1 mL of saline containing 10^8 CFU mL^{-1} was injected into the plant stem.

During eight days, was observed the presence and absence of the symptoms. A scale of the symptom degree was created, ranging from 0 to 25, where 0 was a plant with no infection and 25 a plant completely infected. All data were analyzed by ANOVA, Tukey test $p < 0.05$.

2.4.2 Evaluation of the antibiotic activity of F4A fraction and FC on X. vasicola pv. vasculorum in corn plants

In the first experiment, was evaluated the effect of the application of F4A and FC on infection caused by *Xvv* in corn plants, one seed of 30F53 hybrid (Pioneer Corteva) was sowed in 2 L pots containing the same mixture described above. Plants were infected with *Xvv* suspension in saline sterile containing 10^8 CFU mL^{-1} at 22 DAG with a hypodermic needle in the stem of plants.

Based on the MIC the concentrations used were F4A 0.5, 5.0 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; and FC, 0.12, 1.0, and $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ and was considered as a control DMSO plus mineral oil 0.25 mL/L^{-1} (which were used as a diluent of the compounds), and the non-treated and non-inoculated plant was also considered a negative control, with five replicates per treatment. The application was carried out at 21 DAG (preventive) or 23 DAG (curative) of each treatment, containing 5 mL per plant using a manual spray.

After eight days of inoculation when was observed the lesions caused by *Xvv*, samples of leaf were collected. The injured leaf tissue was cut into squares of approximately 0.5 cm, passed in alcohol 70 GL per one minute, washed three times with destined sterile water and dried. The 0.5 g of sample was placed in a tube with 4.5 mL of sterile saline and kneaded with a pistil, and a ten-fold serial dilution was performed and inoculated into Petri dishes containing AN+EL. Symptom development was monitored daily for 21 days, and the data were analyzed by ANOVA and Tukey's test $p < 0.05$.

In the second experiment, was evaluated the effect of the application of F4A and FC when the pathogen was inoculated by spraying, the experiment was conducted under the same conditions as described above. The inoculation was carried out at 22 DAG by spraying 5 mL of bacterial suspension in sterile saline containing 10^8 CFU mL^{-1} of *Xvv* per plant on corn plant of two varieties 30F53 (Pioneer Corteva) and 929-V (Balu), to assess whether pathogen protection with the

application of compounds that is possible with the variation of the hybrid. To maintain humidity and stoma opening, plants were placed in a humid chamber for 24 h before and after inoculation (totaling 48 h). The treatments and evaluations were carried as described above in the first experiment.

2.5 Evaluation by Scanning Electron Microscopy

To perform the Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis was carried out with samples of leaves. Six pots were planted with Balu-929 V hybrid because this variety showed more susceptible to *Xvv* infection. After 22 DAG plants were infected by spraying with *Xvv* and after eight days of infection, three plants for each treatment with lesions were sprayed with 10 mL of F4A (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and 4 mL of FC (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). After 24 hours of application, samples of the injured leaf tissue were collected and placed in Eppendorff tubes with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), overnight at 4 °C. Subsequently, they were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) and post-fixed in a 1% osmium tetroxide solution in sodium cacodylate buffer for 1 hour in the dark. Samples were dehydrated in ethanol series (70, 80, 90, and 100%), and subsequently, critical point dried with CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). Samples were fractured, to observe the inside of the leaf, then they were coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed in a FEI Quanta 200 SEM operating at 30kV.

3. Results

3.1 In vitro antibiotic evaluation by disk diffusion test

The halos formed for 250 mg and 50 mg of F4A were 63 mm and 64.5 mm, respectively, and the FC the inhibition halo was 69.5 mm for the concentration 50 μg .

In addition, *Xvv* showed a MIC of 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for F4A and 0.06 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for FC. Based on these results, the concentrations tested in the *in vivo* experiment were determined.

3.2 Evaluation of antimicrobial activity in vivo

3.2.1 Standardization of the experimental infection of X. vasicola pv. vasculorum

The symptoms of anasarca chlorotic streaks on the leaf blade and discoloration around the inoculation point was observed after the eighth day of infection. The most effective method to produce the infection on corn plants in the 30F43 hybrid (Pioneer Corteva) was the injection of the bacterial suspension in the meristem, since, through the spraying method, that was not observed plant with leaf lesions by *Xvv*. For the 929-V (Balu) corn hybrid, the spraying method was more effective, obtaining 100% infection in plants.

3.2.2 Evaluation of the antibiotic activity of F4A fraction and FC against X. vasicola pv. vasculorum in corn plants

For the performance of the statistical analysis of the experiments executed greenhouse, two variables were analyzed: the presence of infection and the degree of infection. The results were expressed in relation to the control non-treated and infected named positive control.

The F4A fraction and FC showed antibiotic activity against *Xcc* in the two hybrids tested, 30F43 and 929-V, in both hybrids were not observed 100% of the disease control. Corn 30F43 treated with F4A in a pre-treatment only F4A 10 showed significant difference with high antibiotic activity when compared with positive control. In the post-treatment F4A 5 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were effective to control infection but the effect was lower than was observed in the pre-treatment. The FC was more effective in the pre-treatment where all concentrations were effective and in the post-treatment only FC 4 reduced infection (Table 1). The disease severity decreased in plants treated with F4A in the pre-treatment and post-treatment in all concentrations treated, but the severity showed high decrease when plants were treated with F4A 5 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the post-treatment (Table 1).

F4A and FC were less effective to control bacterial infection in 929 V hybrid in pre and post-treatment. The severity also decreases when plants were treated with F4A but only F4A 10 in pre and post-treatments. The same effect was observed in plants treated with FC where the severity decreased only in FC 1 in the pre-treatment 0.12 and 4.0 in the post-treatment (Table 2)

Comparing the effect on reduction symptom and severity, the F4A fraction showed 31.4% and FC 33% and the severity was reduced 26% with F4A and 23% with FC (Figure 1).

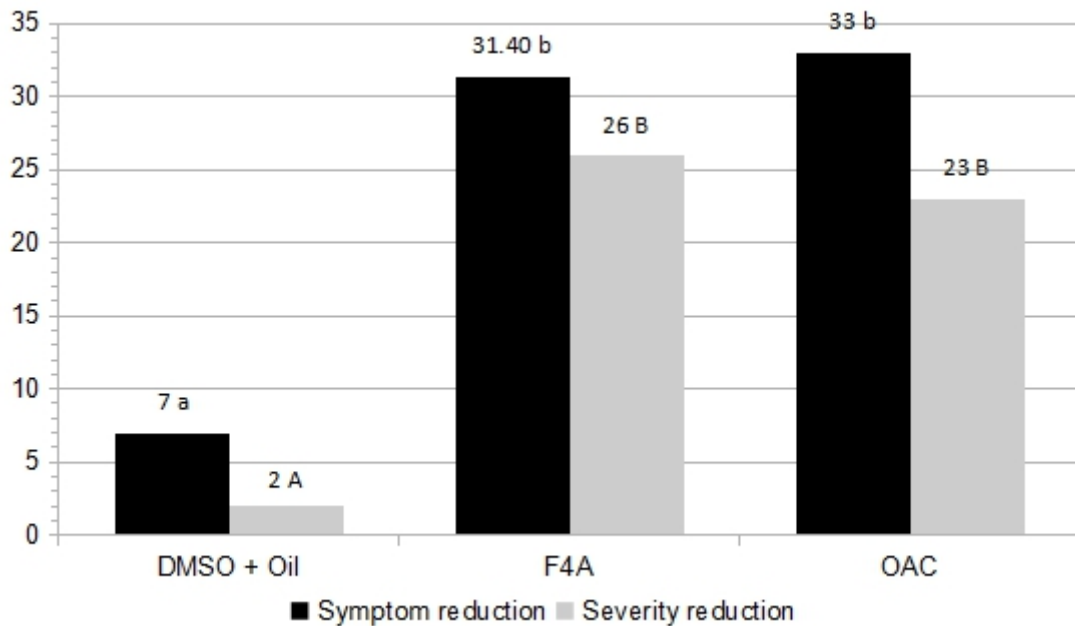


Fig. 1 Level of infection and severity reduction of plant infected with *X. vasicola* pv. *vasculorum* and treated with F4A, FC and DMSO + Oil after 32 days of germination. The small letters corresponding the significative differences among symptom reduction and capital letters for infection reduction of ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).

3.3 Evaluation by Scanning Electron Microscopy (SEM)

By SEM was observed a large number of Xvv cells on the leaf surface as well as in leaf inside tissues (Figures 2A and B). Plant treated with F4 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) the bacterial number is very low and the cells present are disrupted (Figures 2C and D). The same effect was observed in plants treated with FC ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$), in addition, it was possible to observe a decrease in exopolysaccharides (EPS) by Xvv on the leaf surface (Figures 2E and F).

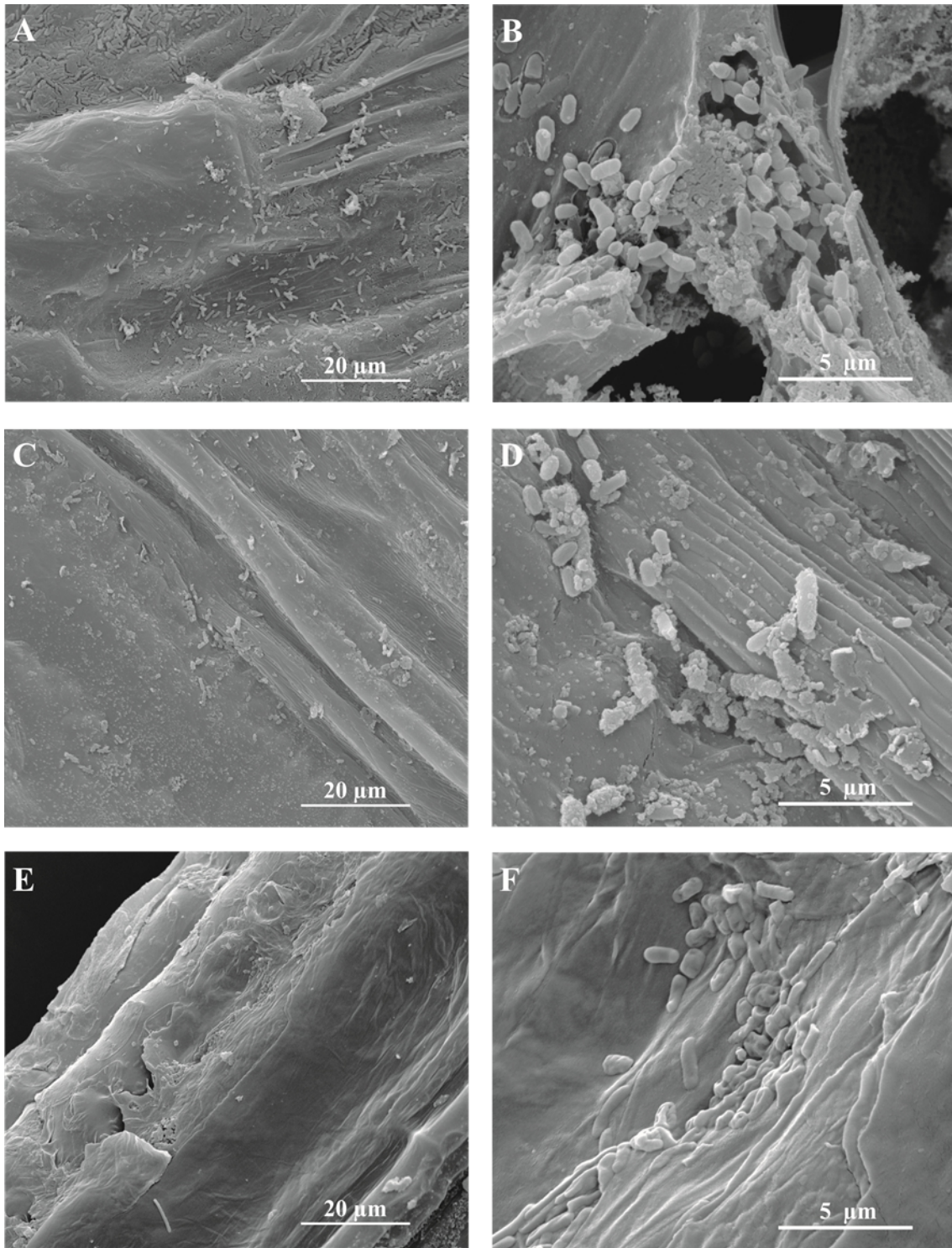


Fig. 2 Scanning electron microscopy of corn Balu-929 V hybrid leaf treated with antimicrobial F4A fraction and FC against *X. vasicola* pv. *vasculorum* after eight days of infection and 24 h of application. (A and B) non-treated and infected leaf ; (C and D) Plant treated with 10 mL of F4A ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) after 8 days of infection and 24 h of application ; (E and F) Plant treated with 4 mL of FC ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) after 8 days of

infection and 24 h of application. Figures A, C and E (3,000 X) and B, D and F (15,000 X)

4. Discussion

The first report of corn bacterial leaf streak, caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* was in 2014 in the United States, and in 2016 was identified in Argentina and Brazil [5 - 6, 10]. According to Ortiz-Castro [25] *Xvv* colonizing nonvascular apoplastic tissues of the plant, but is considering a leaf bacterial pathogen. Our study is the first report of *Xvv* infectious methods in corn plants. The corn varieties showed different levels of *Xvv* infection and disease severity when used different methods of infection. Foliar spray of *Xvv* cells suspension was more effective in 929V hybrid than 30F53 hybrid. On the other hand, the injection of *Xvv* cells suspension in the stalk of corn plants was more effective in the 30F53 hybrid than 929V which led to higher leaf symptoms in each variety. Probably the difference observed was related to the pathogen susceptibility showed for hybrids, but further study needs to be carried.

An alternative to control plant bacteriosis is use compounds produced by bacteria isolated from soil. Usually, the biocontrol products contain bacteria cells or spores [26], for eg. *Bacillus amyloliquefaciens* strain showed high antagonistic activity against bacteria that cause leaf streak in different cultures [27]. On the other hand, Oliveira et al. [28] found the effectiveness of the natural compound Gluconacin, produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus*, to control *Xvv* that causes leaf streak in sugarcane.

According to the experiments carried out *in vitro* and *in vivo*, the semi-purified fraction F4A and the compound FC showed antimicrobial activity against *Xvv* in low concentrations. Previous studies carried out by our research group have demonstrated that the compounds extracted from the LV strain have activity in the control of bacteria of the genus *Xanthomonas*, such as *X. citri* pv. *citri* (causing citrus canker), *X. axonopodis* (pathogen of *Eucalyptus* spp.), *X. arboricola* pv. *pruni* (causal agent of the disease that affects *Prunus persica*) and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* [19, 22, 29 - 30].

In experiments carried in a greenhouse, the F4A fraction showed 26% efficiency in controlling the disease and FC 23%. There was a reduction in symptoms

by 31.4% of plants for F4A and 33% for FC, similar results have been described in the control of other diseases caused by the genus *Xanthomonas* [18 - 19, 22, 29 - 30]. In addition, preventive and curative treatments were equally effective, with no significant differences between them. This result has also been observed in work with *X. arboricola* pv. *pruni*, using fractions extracted from the LV strain [30].

In electron microscopy analysis was noted that the application of the compounds caused a decrease in population density and the formation of EPS by the microorganism, in addition to generating changes in cell morphology. Studies by Oliveira et al. [19, 22], Lopes et al. [29] and Vasconcellos et al. [30] corroborate the results presented in this work. The authors demonstrated that the application of fractions F3 and F3d.3, isolated from the LV strain, were able to modify the morphology of bacteria of the genus *Xanthomonas*. EPS is associated with the level of virulence in *Xanthomonas* species, because it facilitates infection in the host and protects the microorganism from dehydration [31 - 33]. Kemp et al. [34] reported that a mutant strain of *X. axonopodis* pv. *manihotis*, with a deficiency in synthesizing EPS, were unable to multiply and cause the symptoms of bacteriosis in cassava cultures. Thus, we suggest that the decrease in EPS production is related to the application of the compounds.

5. Conclusion

The F4A fraction and the FC compound produced by *P. aeruginosa* LV strain showed activity *in vitro* and *in vivo* against the pathogen-causing streak of the corn leaf, *Xvv*. The reduction of symptoms in plants treated did not affect plant growth and protected against *Xvv*. The F4A fraction and the FC should be used as an alternative to control *Xvv*.

6. References

1. Rodriguez-R LM, Grajales A, Arrieta-ortiz ML, RestrepoS, Bernal A (2012) Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. BMC Microbiology 12:43. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-43>.
2. Kay S, Bonas U (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. Current Opinion in Microbiology 12:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.006>.
3. Dyer, RA (1949) Botanical surveys and control of plant diseases. Farming in South Africa. Annu. Rep. Dep. Agric. S. Afr.275:119-121
4. Karamura G, Smith J, Studholme D, Kubiriba J, Karamura E (2015) Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugarcane and banana. African Journal of Plant Science 9:385-400. <https://doi.org/10.5897/AJPS2015.1327>.
5. Korus K, Lang JM, Adesemoye AO, Block CC, Pal N, Leach JE, Jacson-Ziems TA (2017) First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. Plant diseases 101:1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN>.
6. Lang JM, DuCharme E, Caballero JI, Luna E, Hartman T, Ortiz-Castro M, Korus K, Rascoe J, Jackson-Ziem TA, Broders K, Leach JE (2017) Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. Phytopatology, Lincon 107:1312-1321. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R>.
7. Plazas MC, De Rossi RL, Brucher E, Guerra FA, Vilaró M, Guerra GD, Wu G, Ortiz-Castro MAC, Broders K (2018) First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. Plant Disease 102:1026-1026. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN>.
8. Damicone J, Cevallos F, Olson J (2017) First Report of Bacterial Leaf Streak of Corn Caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Oklahoma. Plant Disease 102. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0523-PDN>.

9. Jamann TM, Plewa D, Mideros SX, Bissonnette S (2019) First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Illinois. *Plant disease*, 103:1018-1018. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1895-PDN>.

10. Leite RP, Custódio AAP, Madalosso T, Robaina RR, Duin IM, Sugahara VH (2019) First report of occurrence of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. *Plant disease* 103:145-145. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN>.

11. Sagata E, da Hora BT, Tebaldi ND, Piazzoli D, Klosowski AC, de Brito CH, Juliatti FC (2018) First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacterial leaf streak of maize (*Zea mays*) in Brazil. *Plant disease*. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1174-PDN>.

12. Hartman T, Tharnish B, Harbour J, Van Meter J, Eskridge K, Jackson-Ziems TA (2018) Distribution of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Nebraska and factors that influence its development. *Phytopathology* 108:S2.27. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0043-R>.

13. Stewart BW (2012) Priorities for cancer prevention: life style choices versus unavoidable exposures. *The Lancet Oncology* 13: 126-133. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70221-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70221-2).

14. Souza GS, da Costa LCA, Maciel AC, Reis FDV, Pamplona YAP (2017) Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. *Ciênc. Saúde coletiva* 22: 3269-3280. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.18342017>.

15. Mantovani ES., Marini DC, Giglioti EA (2006) Host range of *Xanthomonas* sp., causal agent of the false red stripe of sugarcane, among grasses. *Summa Phytopathologica* v.32:124-130. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000200005>.

16. Matsuoka H, Ohwaki Y, Terakado-Tonooka J, Tanaka F (2016) Changes in volatiles in carrots inoculated with ACC deaminase-producing bacteria isolated

- from organic crops. *Plant and Soil* 407:173-186. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2769-x>.
17. Pistori JF, Simionato AS, Navarro, MOP, Andreatta MFL, Santos IMO, Meneguim L, Leite Junior RP, de Oliveira AG, Andrade G (2018) Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Tropical Plant Pathology* 43:289-296. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0231-3>.
 18. Murate LS, de Oliveira AG, Higashi AY, Barazetti AR, Simionato AS, da Silva CS, Navarro MOP (2015) Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. *Agricultural Sciences* 6: 295–303. <https://doi.org/10.4236/as.2015.63030>.
 19. de Oliveira AG, Spago FR, Simionato AS, Navarro MO P, da Silva CS, Barazetti AR, Novello CR (2016) Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Frontiers in Microbiology* 7: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00113>.
 20. Munhoz LD, Pistore J, Santos IMO, Navarro MOP, Simionato AS, Goya ET, Rezende MI, Balbi-Peña MI, de Oliveira AG, Andrade G (2017) Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Cogent Food & Agriculture* 3:1-16. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1282592>.
 21. Rampazo, LGL (2004) Evaluation of the Effect of Biological Agents and Their Products into the Incidence of Citrus Canker Lesions. Master's, Universidade Estadual de Londrina
 22. de Oliveira AG, Murate LS, Spago FR, de Paula Lopes L, de Oliveira Beranger JP, San Martin JAB, Andrade G (2011) Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control* 56:125. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.008>.
 23. Navarro MOP, Simionato AS, Pérez JCB, Barazetti AR, Emiliano J, Niekawa ETG, Andreatta MFL, Modolon F, Dealis ML, Araújo EJA, Carlos TM, Scarpelim OJ, da Silva DB, Chryssafidis AL, Bruheim P, Andrade G (2019) Fluopsin C for

treating multidrug-resistant infections: *in vitro* activity against clinically important strains and *in vivo* efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Frontier in Microbiology* 10:1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02431>.

24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) CLSI document M07-A9. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard, 19th Edn.
25. Ortiz-Castro M (2019) Understanding the disease ecology of the corn bacterial leaf streak pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. MSc. Dissert. Colorado State University, Fort Collins, CO.
26. Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg Willem J (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Front. Plant Sci.*, 19, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.
27. Zhi Y, Wu Q, Xu Y (2017) Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strain. *Bioresource Technology* 235:96-103. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090>.
28. Oliveira MM, Ramos ETA, Drechsel MM, Vidal MS, Schwab S, Baldani JI (2018) Gluconacin from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 is an active bacteriocin against phytopathogenic and beneficial sugarcane bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 125:1812-1826. <https://doi.org/10.1111/jam.14074>.
29. Lopes LP, de Oliveira AG, Beranger JPO, Góis CG, Vasconcellos FCS, San Martin JAB, Andrade CGTJ, Mello JCP, Andrade G (2012) Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Trop. plant pathol* 37:233-238. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000400001>.
30. Vasconcellos FCS, de Oliveira AG, Lopes-Santos L, Beranger JPO, Cely MVT, Simionato AS, Pistori JF, Spago FR, de Mello JCP, San Martin JAB, Andrade CGTJ, Andrade G (2014) Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences* 5 : 71-76. <https://doi.org/10.4236/as.2014.51008>.

31. Katzen F, Ferreiro DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Puhler A, Ielpi L (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *Journal of Bacteriology* 7:1607-1617. <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1607-1617.1998>.
32. Dharmapuri S, Sonti RV (1999) A transposon insertion in the gum Ghomologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiology Letters* 179:53-59. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08707.x>.
33. Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* 5:1-15. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2004.00197.x>.
34. Kemp BP, Horne J, Bryant A, Cooper RM (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gum D gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.08.007>.

TABELAS

Table 1. The average of infection and severity levels of corn 30F52 hybrid caused by *Xanthomonas vasculorum*, on 21 days for pre-treatment and 23 days for post-treatment after germination. The infection level measure using scale ranging from 0 (non-lesion) to 1 (with lesion). The severity level of disease ranging from 0 (non-lesion) to 25 (plant extremely damaged by lesion). The asterisk showed significative difference ($p < 0.05$) when compared with non-treated and infected plant the according to ANOVA and Tukey test. Control 1 (non-infected and non-treated) ; Control 2 (infected and non-treated). Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Treatments	Infection	Severity
Control 1	0*	0*
Control 2	1	25
DMSO+oil pre	1	24
DMSO+oil post	0.93	25
F4A 0.5 pre	0.6	13*
F4A 5.0 pre	0.8	14*
F4A 10.0 pre	0.2*	16*
F4A 0.5 post	0.73	18*
F4A 5.0 post	0.46*	8*
F4A 10.0 post	0.46*	8*
FC 0.12 pre	0.6*	14*
FC 1.0 pre	0.6*	12*
FC 4.0 pre	0.6*	15
FC 0.12 post	0.66	15*
FC 1.0 post	0.8	21
FC 4.0 post	0.53*	10*

Table 2. The average of infection and severity levels on corn of corn 929 V hybrid caused by *Xanthomonas vasculorum*, on 21 days for pre-treatment and 23 days for post-treatment after germination. The infection level measure using scale ranging from 0 (non-lesion) to 1 (with lesion). The severity level of disease ranging from 0 (non-lesion) to 25 (plant extremely damaged by lesion). The asterisk showed significative difference ($p < 0.05$) when compared with non-treated and infected plant the according to ANOVA and Tukey test. Control 1 (non-infected and non-treated) ; Control 2 (infected and non-treated). Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Treatments	Infection	Severity
Control 1	0*	0*
Control 2	1	25
DMSO+oil pre	1	24
DMSO+oil post	1	19*
F4A 0.5 pre	1	30
F4A 5.0 pre	1	21
F4A 10.0 pre	0.86	18*
F4A 0.5 post	1	24
F4A 5.0 post	1	21
F4A 10.0 post	0.8	15*
FC 0.12 pre	1	20
FC 1.0 pre	1	18*
FC 4.0 pre	1	22
FC 0.12 post	0.73	15*
FC 1.0 post	1	22
FC 4.0 post	0.8	17*