



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IZABELA MOURA DUIN

**ANÁLISE GENÔMICA E CONTROLE BIOLÓGICO DE
Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* AGENTE CAUSAL
DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO**

Londrina
2022

IZABELA MOURA DUIN

**ANÁLISE GENÔMICA E CONTROLE BIOLÓGICO DE
Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* AGENTE CAUSAL
DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientadora: Dr^a. Maria Isabel Balbi-Peña
Co-orientador: Dr. Rui Pereira Leite Júnior

Londrina
2022

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

D874a Duin, Izabela Moura.

Análise genômica e controle biológico de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* agente causal da estria bacteriana do milho / Izabela Moura Duin. - Londrina, 2022.
127 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.

Coorientador: Rui Pereira Leite Júnior.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.

Inclui bibliografia.

1. *Bacillus velezensis* - Tese. 2. Bioinformática microbiana - Tese. 3. Controle biológico - Tese. 4. Genômica bacteriana - Tese. I. Balbi-Peña, Maria Isabel . II. Leite Júnior, Rui Pereira . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

IZABELA MOURA DUIN

**ANÁLISE GENÔMICA E CONTROLE BIOLÓGICO DE
Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* AGENTE CAUSAL
DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria Isabel Balbi-Peña
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr^a. Viviane Yumi Baba
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa

Prof. Dr. Leandro Simões Azevedo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr^a. Mayara Mari Murata
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Prof. Dr. Sergio Fiorentino Pascholati
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 27 de julho de 2022.

A Deus, pelas conquistas até o momento.

Ofereço

Aos meus amados, mãe e pai (*in memoriam*),
irmão e sobrinha,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ter tornado tudo possível.

À minha mãe por ser meu exemplo de força e superação, ao meu irmão e minha sobrinha, por serem meu suporte, o seu amor me faz ir mais longe.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de realização do curso e conclusão de mais essa etapa da minha formação acadêmica. Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo acolhimento e suporte durante todo o trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudo.

Ao IDR-Paraná pelo suporte financeiro e pela disponibilidade das instalações e materiais fornecidos para a execução dos trabalhos.

Aos meus orientadores, Maria Isabel Balbi-Peña e Rui Pereira Leite Júnior pela orientação, direcionamentos, disponibilidade e incentivo. A sua confiança a mim depositadas me fizeram acreditar que seria capaz. Minha eterna gratidão, admiração e respeito.

Aos professores do Departamento de Agronomia pelos constantes ensinamentos, os quais colaboraram imensamente para minha formação.

Aos amigos do Laboratório LABAC: Carol e Bruna pela amizade e cumplicidade durante todos estes anos de trabalho e estudo. Em especial à Vanessa, pela amizade e ajuda durante a elaboração e execução dos experimentos. Aos agentes de pesquisa Israel e Cícero por todo suporte nos experimentos.

À Universidade da Flórida pela parceria e por abrir as portas para realização do meu intercâmbio e colaboração com minha pesquisa. Aos professores Jeffrey Jones e José Tapia pela supervisão, colaboração e receptibilidade, me senti parte do grupo de pesquisa desde o primeiro dia.

A todos que conheci em Gainesville e que fizeram a distância e a saudade de casa ser apenas um detalhe.

Enfim, a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas.

A ele seja a glória para sempre!

Amém.

Romanos 11:36

DUIN, Izabela Moura. **Análise genômica e controle biológico de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* agente causal da estria bacteriana do milho.** 2022. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho. Existem diversos fatores que reduzem a produtividade da cultura, entre eles doenças foliares, como a estria bacteriana do milho. Essa doença causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) é de recente ocorrência em importantes regiões produtoras do cereal e vem trazendo novos desafios à pesquisa e ao setor produtivo. Estudos envolvendo a caracterização genética de isolados brasileiros de Xvv são necessários para comparar com isolados de outros países. Ainda não existem métodos de controle eficientes para a doença, portanto, a busca por métodos biológicos de controle, incentivaram a execução desse estudo. Sendo assim, os objetivos do trabalho foram: i) fazer estudos comparativos do genoma de isolados brasileiros de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho, com genomas de isolados da bactéria de outras origens geográficas e também com outras espécies de *Xanthomonas*; e ii) avaliar a atividade antibacteriana contra Xvv e o controle da estria bacteriana do milho dos isolados LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03. Foram comparados seis isolados brasileiros de Xvv com 12 genomas de *X. vasicola*. O conteúdo G+C (%) encontrado nos genomas de Xvv foi de aproximadamente 63,25%. Os isolados brasileiros de Xvv se mostraram intimamente relacionados com isolados de milho da Argentina e da África do Sul, seguidos pelos dos EUA. Diferenças genômicas podem ser observadas nos genes que codificam sistemas de secreção de proteínas e ilhas genômicas. Um sistema de secreção do Tipo IV foi localizado estando presente apenas no genoma do isolado proveniente da Argentina. Todas as linhagens brasileiras de Xvv de milho analisadas não possuíam o efector XopAF, que está presente em linhagens de Xvv de cana-de-açúcar. Os isolados LAFUEL 01 e LAFUEL 02 foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* e, com o sequenciamento do genoma do isolado LAFUEL 03 foi possível identificá-lo como *B. velezensis*. Os isolados LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03, e seus metabólitos apresentaram atividade antibacteriana contra Xvv e foram capazes de controlar a estria bacteriana em plantas de milho. Essa é a primeira publicação de sequenciamento genômico de isolados brasileiros de Xvv de milho. Esse é o primeiro relato de controle biológico para Xvv por *Bacillus velezensis*.

Palavras-chave: *Bacillus velezensis*; Bioinformática microbiana; Controle biológico; Genômica bacteriana; Genômica comparativa; *Zea mays*.

DUIN, Izabela Moura. **Genomic analysis and biological control of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causal agent of the bacterial leaf streak of corn.** 2022. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Brazil is the third largest corn producer in the world. Several factors can reduce crop productivity, including foliar diseases, such as bacterial leaf streak of corn. The disease, caused by the bacterium *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv), of recent occurrence in important cereal producing regions, is bringing new challenges to research and to the productive sector. Studies involving the genetic characterization of Brazilian isolates of Xvv are needed to compare with corn isolates from other countries. There are still no efficient control methods for this disease, therefore, the search for biological control methods encouraged the execution of this study. Therefore, the objectives of our research were: i) to carry out comparative studies of the genome of Brazilian strains of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn, with the genomes of bacterial isolates from other geographic origins and also with other *Xanthomonas* species; and ii) to evaluate the antibacterial activity against Xvv and the control of bacterial leaf streak of maize by the strains LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03. Six Brazilian strains of Xvv were compared with 12 genomes of *X. vasicola*. The G+C content (%) found in the Xvv genomes was approximately 63.25%. The Brazilian strains of Xvv were closely related to corn strains from Argentina and South Africa, followed by those from the USA. Genomic differences can be observed in genes encoding protein secretion systems and genomic islands. A Type IV secretion system was found only in the genome of the isolate from Argentina. All Brazilian corn Xvv strains analyzed did not have the XopAF effector, which is present in sugarcane Xvv strains. The isolates LAFUEL 01 and LAFUEL 02 were identified as belonging to the genus *Bacillus* and, by sequencing the genome of the isolate LAFUEL 03, it was possible to identify it as *B. velezensis*. The isolates LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03, and their metabolites showed antibacterial activity against Xvv and were able to control bacterial leaf streak in corn plants. This is the first publication of Xvv Brazilian strains of corn genomic sequencing. This is the first report of biological control for Xvv by *Bacillus velezensis*.

Key words: *Bacillus velezensis*; Bacterial genomics; Biological control; Comparative genomics; Microbial bioinformatics; *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

- Figure 1.** Heatmap generated with the OrthoANI values calculated by OAT software for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strain RL1 and closely related *Xanthomonas vasicola* strains.....77
- Figure 2.** Identity ANI matrix for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains from Brazil and closely related *Xanthomonas vasicola* pathovars.....78
- Figure 3.** Phylogenetic tree reconstructed for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains from Brazil and closely related *Xanthomonas vasicola* pathovars.....79
- Figure 4.** Venn diagrams showing the sharing of orthologous genes for: (A) *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains Arg4A (Argentina), NE744 (USA), RL1 (Brazil) and SAM119 (South Africa); (B) *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains NCPPB1326 (isolate from sugarcane) and RL1 (isolate from corn); (C) *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola* strain Mex1 and *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strain RL1; and (D) *Xanthomonas vasicola* pv. *arecae* strain NCPPB902 and *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strain RL1.....80
- Figure 5.** Amplification of the xopAF gene from *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains. Lane L: 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Xvv Br1, Xvv Br2, Xvv Br3, Xvv Br4, Xvv Br5, Xvv Br6, Xvv Br7, RL1 and RL2, Brazilian corn strains of Xvv; NCPPB 1381; lane 11: NCPPB 795 and: NCPPB 796, sugarcane strains of Xvv; and NTC, no template control (NTC).....85

ARTIGO B

- Figure 1.** Agar diffusion test (pour plate) of the antagonism of LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* - Xvv RL1. Concentration of 10^8 CFU mL⁻¹ of Xvv –

RL1 and 10 μ L aliquots of cell suspension of each strain adjusted at O.D. $_{600nm} = 0.3$. The orange line shows the growth inhibition halos of *Xvv* – RL1. A, control; B, LAFUEL 01; C, LAFUEL 02; and D, LAFUEL 03. Bar = 30 mm.....104

Figure 2. Agar well diffusion test (pour plate) of the antagonism of LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* RL1. Concentration of 10^8 CFU mL⁻¹ of RL1 strain and 200 μ L aliquots of cell-free supernatant of each strain, fermented in LB (A) and ISP2 (B) media. A1, control; A2, LAFUEL 01; A3, LAFUEL 02; A4, LAFUEL 03; B1, control; B2, LAFUEL 01; B3, LAFUEL 02; and B4, LAFUEL 03. The orange line shows the growth inhibition halos of *Xvv* RL1 strain. Bar 40 mm.105

Figure 3. In vitro assays for biofilm formation and swarming motility. Pellicle formation on TSB medium: (A1) LAFUEL 01; (A2) LAFUEL 02; (A3) LAFUEL 03; and (A4) negative control. Motility test: (B1) negative control, (B2) LAFUEL 01, (B3) LAFUEL 02, and (B4) LAFUEL 03.108

Figure 4. Heatmap generated with the OrthoANI values calculated by OAT software for *Bacillus velezensis* strain LAFUEL 03 and closely related *Bacillus* species.110

Figure 5. Phylogenomic tree representing the similarity between strains of the *Bacillus subtilis* group. The matrix was generated by RaxML and exported to FigTree. The bootstrap value with 100 replications is shown on the nodes.....111

Figure S1. Probability of growth inhibition of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* RL1 strain by the isolates LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 in two culture media, LB and ISP2, according to the nonparametric Kaplan-Meier analysis (log-rank test)127

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

Table 1. List of <i>Xanthomonas vasicola</i> pathovars and strains included in this study.....	73
Table 2. Draft Genome characteristics of the sequencing and assembly of six <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> strains from Brazil causing bacterial leaf streak of corn.	75
Table 3. Number, size (bp) and type of genes in the genome islands present in the genomes of <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> strains RL1 and Arg4A.	82

ARTIGO B

Table 1. Treatments and doses of LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 and chemicals used in the experiment of control of bacterial leaf streak.....	99
Table 2. Growth inhibition halos (mm) of <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> RL1 strain in Nutrient Agar medium at a concentration of 10^8 CFU mL ⁻¹ and 200 μ L aliquots of cell-free cell supernatant of each strain fermented in LB and ISP2 media in the antagonism test using the agar well diffusion method (pour plate).....	105
Table 3. Severity and efficiency of control of bacterial leaf streak in IPR 164 hybrid corn plants treated with formulations of LAFUEL 01, LAFUEL 02, LAFUEL 03, mancozeb and cooper oxychloride. Severity was assessed in 3 rd and 4 th leaves at 21 days after inoculation with <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> RL1 strain	107
Table 4. Summary of the characteristics of the <i>Bacillus velezensis</i> LAFUEL 03 genome.....	109
Table 5. Genome comparison of <i>Bacillus velezensis</i> LAFUEL 03 with different <i>Bacillus</i> spp	111
Table 6. Biosynthetic Gene Clusters (BGCs) found in the <i>Bacillus velezensis</i> LAFUEL 03 genome using the webserver antiSMASH 6.0.....	113
Table 7. Genes related to biofilm formation/regulation on <i>Bacillus velezensis</i> LAFUEL 03.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANI	<i>Average nucleotide identity</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLS	<i>Bacterial leaf streak</i>
CDSs	<i>Coding DNA sequences</i>
CFS	<i>Cell-free supernatant</i> (sobrenadante livre de células)
CFU	<i>Colony forming unit</i> (unidade formadora de colônia)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
dDDH	<i>Digital DNA-DNA Hybridization</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPS	Polissacarídeos extracelulares
EUA	Estados Unidos da América
FIESP	Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GGDC	<i>Genome-to-Genome Distance Calculator</i>
GIs	<i>Genomic islands</i>
hrp	<i>Hypersensitive response and pathogenicity</i>
IDR	Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná
ISs	Sequências de inserção
ISP2	<i>International Streptomyces Project-2</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome</i>
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MGEs	<i>Mobile genetic elements</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MLSA	<i>Multilocus sequence analysis</i>
NA	<i>Nutrient agar</i> (ágar nutriente)
NB	<i>Nutrient broth</i> (caldo nutriente)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> (Sequenciamento de Próxima Geração)
O.D.	<i>Optical density</i> (densidade ótica)

OGRIs	<i>Genome related indices</i>
PCR	Reação de polimerase em cadeia
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
qPCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativa
rRNA	Ribosomal RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rPf	<i>Resuscitation promoting factors</i> (fatores de patogenicidade)
T2SS	Sistema de secreção Tipo II
T3SS	Sistema de secreção Tipo III
T3E	Efector tipo III
Tn	<i>Transposons</i>
TSA	<i>Trypticase soy agar</i>
TSB	<i>Trypticase soy broth</i>
USA	<i>United States of America</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
Xcc	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
Xacm	<i>Xanthomonas alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
Xc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xvh	<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>
Xvv	<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO	18
2.2	ESTRIA BACTERIANA DO MILHO	20
2.2.1	O AGENTE CAUSAL: <i>XANTHOMONAS VASICOLA</i> PV. <i>VASCULORUM</i>	22
2.2.2	SINTOMATOLOGIA.....	28
2.2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	29
2.2.4	MEDIDAS DE MANEJO E CONTROLE	31
2.3	GENÔMICA DE BACTÉRIAS.....	32
2.3.1	GENÔMICA COMPARATIVA.....	33
2.3.2	GENÔMICA DE <i>XANTHOMONAS</i> SPP.	36
2.3.3	GENÔMICA DE <i>BACILLUS</i> SPP.	40
2.4	CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS BACTERIANAS	43
	REFERÊNCIAS	49
3	ARTIGO A: COMPARATIVE GENOMIC OF <i>XANTHOMONAS VASICOLA</i> PV. <i>VASCULORUM</i> CAUSAL AGENT OF BACTERIAL LEAF STREAK OF CORN IN BRAZIL	69
	ABSTRACT	69
	INTRODUCTION	70
	MATERIALS AND METHODS	71
	RESULTS	75
	DISCUSSION	85
	CONCLUSIONS	87
	REFERENCES	88
4	ARTIGO B: GENOME INSIGHTS ON THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF <i>BACILLUS</i> SP. AND ITS POTENTIAL FOR THE BIOCONTROL OF BACTERIAL LEAF STREAK OF CORN CAUSED BY <i>XANTHOMONAS VASICOLA</i> PV. <i>VASCULORUM</i>	94
	ABSTRACT	94

INTRODUCTION	95
MATERIALS AND METHODS	96
RESULTS	103
DISCUSSION	115
CONCLUSIONS	118
REFERENCES	119
SUPPLEMENTARY	127

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo, com uma produção em torno de 1,19 bilhões de toneladas na safra 2021/2022. Existem diversos fatores que afetam a produtividade da cultura, como fatores climáticos, pragas e doenças. Entre as doenças de etiologia bacteriana, a estria bacteriana é uma doença foliar de ocorrência recente em importantes regiões produtoras de milho e vem trazendo novos desafios à pesquisa e ao setor produtivo.

A bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) (COBB 1894), agente causal da estria bacteriana do milho, foi relatada inicialmente na África do Sul, em 1949. Nos últimos anos, a doença foi relatada nos Estados Unidos em 2016 e na Argentina em 2017. Em 2018, a sua ocorrência foi constatada em regiões produtoras de milho no estado do Paraná, Brasil. Além de causar doença em milho, a Xvv também pode causar o 'gumming disease' em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*).

Além do milho e cana-de-açúcar, a Xvv já foi relatada como patógeno de palmeiras (*Dictyosperma album*, *Roystonea regia*, e *Areca catechu*), bambu (*Thysanolaena maxima*) e sorgo (*Sorghum* spp.). Estudos envolvendo inoculações artificiais com Xvv revelaram a patogenicidade em arroz (*Oryza sativa* L.), aveia (*Avena sativa* L.) e milho pipoca (*Zea mays* L.), o que sugere que essa bactéria apresenta diversas plantas hospedeiras.

Informações sobre o agente causal, o impacto da doença na cultura do milho e os danos econômicos causados pela estria bacteriana ainda são limitadas. O seu relato recente em importantes regiões produtoras de milho das Américas e sua ocorrência ainda restrita a algumas regiões produtoras contribuem com essa carência de informações.

Ainda não existem estudos sobre a caracterização molecular da bactéria Xvv isolada de milho no Brasil e a diferenciação genética em relação a outros isolados provenientes de lavouras de milho de outras regiões do mundo. Diferenças genéticas, em especial relacionadas à aquisição de genes de virulência, têm sido verificadas entre estirpes de Xvv isoladas de milho dos Estados Unidos, Argentina e África do Sul.

Ainda não está claro porque a estria bacteriana do milho continua a se disseminar nas Américas ou quão severas podem ser as futuras epidemias. Estudos epidemiológicos da doença e de caracterização da bactéria são imprescindíveis para desenvolver medidas eficientes visando a sua prevenção e controle. Além disso, entender como essa doença se originou e quais os fatores que favorecem a disseminação de seu agente causal é crucial para evitar perdas futuras.

Não existem métodos de controle efetivos para a doença após sua instalação na cultura. O método mais utilizado para controle de doenças bacterianas tem sido a utilização de produtos cúpricos. Entretanto, métodos alternativos, como o controle biológico, apresentam grande potencial e é uma estratégia que vem sendo empregada para o controle de doenças bacterianas de plantas.

O presente estudo teve por objetivos: i) fazer estudos comparativos do genoma de isolados brasileiros de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho, com genomas de isolados da bactéria de outras origens geográficas e também com o genoma de outras espécies de *Xanthomonas*; e ii) avaliar a atividade antibacteriana dos isolados LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03 contra *X. vasicola* pv. *vasculorum* e o controle da estria bacteriana do milho.

Objetivos específicos:

- Sequenciar o genoma de isolados brasileiros de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho;
- Comparar o genoma do isolado RL1, originário do Brasil, com os genomas de isolados de *Xvv* de outras origens geográficas e com o genoma de outros patovares de *X. vasicola*;
- Identificar regiões de interesse no genoma de *Xvv*;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos isolados LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03 contra o isolado RL1 de *Xvv*;
- Avaliar o controle da estria bacteriana do milho com isolados LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03.
- Identificar molecularmente os isolados LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03 e comparar com outros isolados do mesmo gênero;
- Sequenciar o genoma do isolado LAFUEL 03.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae (antiga família das gramíneas), subfamília Panicoideae. É uma espécie alógama e diploide, de ciclo anual, porte robusto e ereto (PATERNIANI, 1980). A planta possui ampla adaptação à diferentes condições de ambiente, podendo ser cultivada em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo, porém não tolera geada (MEGALHÃES *et al.*, 2002). Para a expressão do seu máximo potencial produtivo, o milho necessita de altas temperaturas, em torno de 24 a 30 °C, radiação solar elevada e adequada disponibilidade hídrica no solo (BORÉM; GIÚDICE, 2004). A planta apresenta elevado potencial produtivo e é bastante responsiva à tecnologia, sendo desta maneira uma das espécies vegetais mais comumente utilizadas em pesquisas genéticas em função da fácil manipulação das estruturas reprodutivas (TROJAN, 2016).

O milho possui grande importância social e econômica, principalmente pela geração de empregos na zona rural e urbana; e representa um dos principais e mais tradicionais cereais cultivados devido à sua importância nos diferentes elos da cadeia do agronegócio (GALVÃO *et al.*, 2014). Sua relevância é observada para pequenos produtores que abordam a cultura como matéria prima para alimentação familiar, ou mesmo na alimentação de animais, tendo um aspecto de sustentabilidade na condição minifundiária, seja com o uso de variedades crioulas, variedades melhoradas e/ou híbridas (ARAÚJO *et al.*, 2013).

A importância socioeconômica da cultura do milho no mundo provém da ampla extensão geográfica na qual é cultivado e por ser um dos principais cereais utilizados como fonte energética nas alimentações animal e humana, e em vários segmentos industriais (DUARTE; GARCIA; MATTOSO, 2005). Por essa razão, sua demanda no mercado nacional e internacional é bastante elevada, sendo caracterizada como importante *commodity* (FOCOAGRO, 2016).

Concomitantemente à sua importância em termos de produção, a cultura ainda se notabiliza pelos diversos usos, com estimativas apontando para mais de 3.500 aplicações deste cereal (CONTINI *et al.*, 2019). Além da relevância no

aspecto de segurança alimentar, na alimentação humana e, principalmente, na alimentação animal, é possível utilizar o milho para uma infinidade de produtos, tais como combustíveis, bebidas, polímeros, etc. (MIRANDA, 2018).

No Brasil, o milho é a segunda maior cultura do agronegócio e um importante produto de exportação, sendo cultivado em todas as regiões do País em mais de dois milhões de estabelecimentos agropecuários (CONTINI *et al.*, 2019). Nas últimas décadas, a produção brasileira de milho teve transformações profundas, reduzindo sua importância como cultura de subsistência de pequenos produtores e aumentando sua participação em uma agricultura comercial eficiente, com deslocamento geográfico e temporal da produção (CONTINI *et al.*, 2019).

Atualmente, os maiores produtores mundiais de milho são China com 380.8 milhões de toneladas, e Estados Unidos, com uma estimativa de produção para a safra de 2021/2022 de aproximadamente 366 milhões de toneladas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2021). O Brasil ocupa a terceira colocação no ranking de maiores produtores e a segunda posição como exportador mundial de milho (Federação das Indústrias do Estado de São Paulo - FIESP, 2021). De acordo com a FIESP (2021), em 2022, o consumo mundial deve crescer 3% em relação à safra anterior.

Além de fazer parte do consumo humano, o milho é um dos principais insumos agroindustriais da cadeia produtiva de frangos, suínos e pecuária leiteira, fornecendo a esses animais uma grande concentração de amido, óleos e vitaminas (ABIMILHO, 2022).

A produtividade do milho vem crescendo de maneira significativa em decorrência da evolução do sistema de produção, utilização de sistema de plantio direto, utilização de cultivares de alto potencial genético, uso intensivo do manejo integrado de pragas, doenças e plantas daninhas, uso de sementes melhoradas, entre outros (PEREIRA FILHO, 2015). No entanto, a exposição da cultura do milho aos mais variados estresses bióticos e abióticos dificultam a exploração do máximo potencial genético para a produtividade de grãos (BRITO *et al.*, 2013).

Embora o milho seja considerado tolerante à estresses, tem se manifestado vulnerável à incidência de patógenos, comprometendo dessa maneira a produtividade da cultura (PEREIRA, 2016). O agravamento da incidência e severidade das doenças acompanha a evolução da cultura (PEREIRA, 2016). Esse

agravamento tem sido atribuído principalmente à realização de plantio direto na palhada sem rotação de culturas, frequentemente em sucessão com a soja. Regiões de clima quente, onde o plantio de milho ocorre em vários meses do ano, proporcionam sobreposição do ciclo de doenças (PINTO *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2013; SOUZA; PEREIRA; SOUZA, 2015). A maior ocorrência de doenças na cultura do milho tem impactado a produtividade e a qualidade dos grãos, mesmo tendo disponíveis no mercado híbridos de milho com diferentes graus de resistência às diferentes doenças (PEREIRA, 2016).

As doenças que afetam o milho ocorrem em todas as regiões produtoras do Brasil, tornando-se uma preocupação para o produtor (MOTA, 2019). Quando afetado por doenças foliares de maneira severa, o milho pode sofrer danos irreparáveis que refletem na produtividade, tanto pela redução do número, quanto do tamanho e densidade total dos grãos (PEREIRA, 2016).

2.2 ESTRIA BACTERIANA DO MILHO

A estria bacteriana do milho, causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv), foi relatada pela primeira vez em lavouras de milho na África do Sul em 1949 (DYER, 1949). Em seu primeiro relato, causou poucos danos e foi considerada economicamente sem importância (COUTINHO; WALLIS, 1991). Hoje, a doença ocorre no oeste da África do Sul, em províncias quentes, onde o milho é cultivado com irrigação. Não existem cultivares resistentes disponíveis no mercado, porém, há diferença na suscetibilidade de genótipos para essa doença, indicando que a resistência pode ser quantitativa (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

Em 2016 a doença foi relatada nos Estados Unidos, ocorrendo em lavouras de milho de nove estados do centro oeste americano, porém, os primeiros sintomas foram observados em 2014 (KORUS *et al.*, 2017; LANG *et al.*, 2017). Na Argentina, os primeiros sintomas foram visualizados em 2010, e o primeiro relato foi em 2017, na província de Córdoba, e desde então foi constatada em importantes regiões produtoras de milho, estando hoje distribuída em nove províncias produtoras do cereal (PLAZAS *et al.*, 2018). Em 2018, a ocorrência da estria bacteriana foi relatada pela primeira vez no Brasil, em regiões produtoras de milho no estado do

Paraná (LEITE JÚNIOR *et al.*, 2018, 2019). Não há relatos da doença em outros países produtores de milho, como México, China e Austrália, mas é possível que a estria bacteriana do milho venha a ocorrer nestas regiões no futuro (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). A bactéria não é considerada uma praga quarentenária em termos fitossanitários no Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2018ab).

Embora a *Xvv* em milho tenha sido relatada pela primeira vez na África do Sul há mais de 70 anos, não está claro como e quando essa bactéria foi introduzida nos Estados Unidos e na Argentina. Perez-Quintero *et al.* (2020) sugeriram a ocorrência de dois eventos que poderiam ter levado à introdução de *Xvv* do milho para as Américas, um em torno de 1997 e outro em torno de 2010. A presença de isolados da Argentina como raízes de clados em análises filogenéticas sugere que essa introdução foi a primeira na América do Sul (PEREZ-QUINTERO *et al.*, 2020).

A estria bacteriana do milho atingiu grandes proporções em alguns estados americanos, como Nebraska, Colorado e Kansas, com níveis de incidência superiores a 90% e severidade maior de 50% de área foliar infectada em várias lavouras (KORUS *et al.*, 2017). A doença foi reportada em vários outros estados nos Estados Unidos, incluindo Iowa, Illinois, Minnesota, Oklahoma, Dakota do Sul, Wisconsin e Texas (DAMICONE *et al.*, 2018; JAMANN *et al.*, 2019; KORUS *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2018). Com base no desempenho histórico dos híbridos de milho na região, as perdas de produtividade estimada em áreas com maior severidade da doença variaram de 5 a 15% (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) emitiu uma declaração em 2016 indicando que não considerou a doença como sendo de quarentena significativa para o comércio interno e externo de milho (BOEHLAND, 2016).

No Brasil, a ocorrência da estria bacteriana foi relatada com base em isolamentos a partir de diversas amostras foliares de milho com sintomas de estria bacteriana coletadas em lavouras das regiões Norte, Oeste e Centro-Oeste do estado do Paraná. Os isolados obtidos destas amostras produziram colônias com características mucoides e de coloração amarela em meio ágar nutriente, típicas de bactérias do gênero *Xanthomonas* (LEITE *et al.*, 2018, 2019). A patogenicidade dos isolados bacterianos para o milho foi confirmada pela inoculação em plântulas de

milho de cultivares suscetíveis à doença, sendo possível observar o desenvolvimento de lesões semelhantes às das amostras provenientes do campo (LEITE *et al.*, 2018). A bactéria isolada apresentou células com formato de bastonete, reação gram-negativa, e crescimento não fluorescente e não fermentativo (LEITE *et al.*, 2018). A análise de sequências gênicas da região 16S do rDNA amplificadas por PCR, utilizando os iniciadores universais fD1 e rD1, revelou similaridade genética de 99% com *Xvv* estirpe SAM 119 (NCCPB No. 4614), patótipo do patovar, isolada de milho na África do Sul (LEITE *et al.*, 2018, 2019).

2.2.1 O agente causal: *Xanthomonas vasicola* pv. *vascolorum*

O gênero *Xanthomonas* compreende um grupo de bactérias fitopatogênicas de grande relevância por terem uma ampla gama de plantas hospedeiras e causarem perdas econômicas significativas para a agricultura. As bactérias desse gênero apresentam células do tipo bastonete, gram-negativas, móveis por um único flagelo polar, aeróbicas obrigatórias e formam em meio de cultura ágar nutriente colônias viscosas e brilhantes, de bordos lisos com pigmentação amarela intensa, ou brancas e de aspecto mucoide (SCHAAD; JONES; LACY, 2013).

Xvv pertencente à divisão Gamaproteobactéria (KORUS *et al.*, 2017; VAUTERIN *et al.*, 1995). É uma bactéria gram-negativa, com células em formato de bastonete, móveis, não fermentativa e não fluorescente (KORUS *et al.*, 2017; VAUTERIN *et al.*, 1995).

Ao contrário da estirpe de *Xvv* que infecta a cana-de-açúcar, a *Xvv* que causa a estria bacteriana não infecta sistemicamente o milho (HARTMAN, 2018; ORTIZ-CASTRO, 2019). A falta de movimento sistêmico em *Xvv* pode ser devido a diferenças na morfologia e fisiologia entre milho e cana-de-açúcar (NORTH, 1935 apud ORTIZ-CASTRO, 2019)¹ ou devido à ausência do efector *XopAf* ou algum outro efector necessário para a propagação sistêmica que está presente na *Xvv* de cana-de-açúcar. Cabe salientar que inoculações de *Xvv* de milho em cana-de-açúcar

¹ North DS, 1935. The gumming disease of sugarcane, its dissemination and control.

causaram infecção, porém, não causaram resposta sistêmica (ORTIZ-CASTRO, 2019).

Isolados de *Xvv* obtidos de cana-de-açúcar e palmeiras foram patogênicas para milho, sorgo e cana-de-açúcar (QHOBELA; CLAFLIN, 1992). Em contrapartida, isolados de *Xvv* obtidos de milho apresentaram patogenicidade apenas para milho, não sendo patogênicos para sorgo e cana-de-açúcar (QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990). Em inoculações artificiais, a bactéria isolada de milho também foi patogênica para arroz, aveia e milho pipoca (LEITE JÚNIOR *et al.*, 2019).

Em condições de laboratório, isolados de *Xvv* de milho e de cana-de-açúcar causaram doença em milho, cana-de-açúcar e sorgo, mas foram mais agressivos em milho e cana-de-açúcar (LANG *et al.*, 2017). Um patógeno muito próximo a *Xvv* é a *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola* (*Xvh*). Similarmente, *Xvh* infecta milho, sorgo e cana-de-açúcar, porém é mais agressiva em sorgo (LANG *et al.*, 2017). Enquanto *Xvv* nunca tenha sido isolada de sorgo, *Xvh* tem sido ocasionalmente isolada de milho em amostras de campo (MOFFETT, 1983; PÉROS *et al.*, 1994).

Em inoculação sob condições de casa de vegetação, isolados de *Xvv* dos Estados Unidos infectaram 15 espécies de plantas, principalmente monocotiledôneas, como arroz (*Oryza sativa*), aveia (*Avena sativa*), *Andropogon gerardii* e a tiririca amarela (*Cyperus esculentus*); sendo que 12 foram sintomáticas e três assintomáticas, com colonização endofítica (HARTMAN *et al.*, 2020b). Estudos de campo confirmaram esses resultados para *Andropogon gerardii* e *Setaria verticillata*, como hospedeiros em um sistema de ocorrência natural (HARTMAN *et al.*, 2020b). Pelo menos dois saltos de hospedeiro foram hipotetizados para *X. vasicola*, ou seja, de gramíneas para banana (TUSHEMEREIRWE *et al.*, 2004) e de cana-de-açúcar para *Eucalyptus* spp. (COUTINHO *et al.*, 2015). Isto sugere uma alta capacidade adaptativa da *Xvv*.

A estria bacteriana do milho já foi constatada em diferentes híbridos e variedades de milho comum, milho pipoca e milho doce, indicando a suscetibilidade de muitos genótipos disponíveis comercialmente (BRODERS *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2018). Entretanto, a severidade da doença varia consideravelmente entre os diferentes genótipos (LANG *et al.*, 2017; ROBAINA *et*

al., 2020). Um estudo brasileiro verificou a reação de 45 híbridos de milho à estria bacteriana do milho e permitiu estabelecer seis grandes grupos de suscetibilidade à doença. Os híbridos de milho mais resistentes formaram um grupo de treze híbridos, com severidade da doença abaixo de 5%, e o grupo mais suscetível foi composto por três híbridos de milho, com severidade acima de 35% (ROBAINA *et al.*, 2020).

Identificar *Xvv* pode ser um desafio, visto a quantidade de plantas hospedeiras e a complexidade taxonômica (STULBERG *et al.*, 2020). Existem diferenças na severidade da doença entre isolados para os diferentes hospedeiros, por exemplo milho e cana-de-açúcar, mas possivelmente não há diferenças bioquímicas e fisiológicas suficientes para justificar designações de patovares diferentes (QHOBELA *et al.*, 1990).

Em 1978, o patógeno causador da estria bacteriana do milho foi denominado de *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* (YOUNG *et al.*, 1978). Isolados da bactéria da estria bacteriana do milho da África do Sul foram diferenciados de *X. campestris* pv. *holcicola*, causadora da estria foliar bacteriana do sorgo, e de *X. campestris* pv. *vasculorum*, causadora do “gumming” em cana de açúcar, pela técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RAPD) (QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990; COUTINHO, 1988). Com base nessas diferenças, Qhobela, Clafin e Nowell (1990) e Coutinho (1988) propuseram a renomeação dos isolados de milho para *X. campestris* pv. *zeae*, com o objetivo de distinguir dos isolados de sorgo, *X. campestris* pv. *holcicola*, e de cana-de-açúcar, *X. campestris* pv. *vasculorum*. Posteriormente, através da hibridização DNA-DNA e análise de perfis de ácidos graxos, a espécie *X. vasicola* foi proposta para *X. campestris* pv. *zeae*, *X. campestris* pv. *holcicola* e *X. campestris* pv. *vasculorum*, com alguns isolados de cana sendo separados em uma segunda espécie, *X. axonopodis* (DOOKUN; STEAD; AUTREY, 2000; VAUTERIN *et al.*, 1995).

Em estudos mais recentes sobre filogenia, utilizando a técnica de *MLSA* (análises de sequências multilocus), foi proposta a denominação do patovar *X. vasicola* pv. *vasculorum* para os agentes causais do “gumming” da cana de açúcar e da estria bacteriana do milho (ARITUA *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2015; DOOKUN; STEAD; AUTREY, 2000; HARRISON; STUDHOLME 2014; KARAMURA *et al.*, 2015; LANG *et al.*, 2017; RADEMAKER *et al.*, 2005; STUDHOLME *et al.*, 2010; VAUTERIN *et al.*, 1995; WASUKIRA *et al.*, 2012).

A espécie *X. vasicola* está atualmente dividida em cinco grupos, incluindo três patovares: 1) *X. vasicola* pv. *vasculorum*, infectando milho e cana-de-açúcar; 2) *X. vasicola* pv. *holcicola*, comumente infectando sorgo; 3) *X. vasicola* pv. *musacearum*, infectando banana e ensete; 4) um grupo de isolados obtidos de *Tripsacum laxum* e; 5) isolados estabelecidos de areca (anteriormente denominada *X. campestris* pv. *arecae*) (LANG *et al.*, 2017; STUDHOLME *et al.*, 2020).

Uma importante diferença entre isolados de *Xvv* é de que isolados de cana-de-açúcar conseguem infectar o tecido vascular, enquanto isolados de milho infectam somente os tecidos do mesófilo foliar, não causando infecção sistêmica (KARAMURA *et al.*, 2015). Inoculações com isolados transformados em milho revelaram que a bactéria circunda as células vegetais no apoplasto e não se movem pelos vasos do xilema (ORTIZ-CASTRO, 2019). Além disso, as células bacterianas foram encontradas próximas às nervuras, mas não no tecido vascular (ORTIZ-CASTRO, 2019). Esses resultados são consistentes com os de Hartman (2018), que recuperou o patógeno apenas de folhas presentes no momento da inoculação, o que é condizente com uma doença não vascular em milho (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

A caracterização fenotípica mostrou que os isolados emergentes de *Xvv* de populações dos Estados Unidos e Argentina podem ter aumentado a agressividade em milho, comparado com isolados obtidos anteriormente (LANG *et al.*, 2017). Para entender os mecanismos genéticos no aumento da agressividade, Perez-Quintero *et al.* (2020) utilizaram mecanismos de comparação genética para determinar a aquisição de genes por *Xvv* dos Estados Unidos e Argentina. A comparação de todos os genomas disponíveis de *X. vasicola*, tanto de *Xvv* como de *Xvh*, mostrou a relação filogenética no grupo e identificou agrupamentos de genes associados às populações emergentes de *Xvv*. Os agrupamentos de genes recém-adquiridos mostraram evidências de transferência horizontal de *Xvh* para *Xvv* e incluíram possíveis fatores de virulência. Um agrupamento em particular correspondeu ao profago transferido de *Xvh* para todos os isolados de *Xvv* provenientes da Argentina e dos Estados Unidos e ausente no isolado da África do Sul. Esta região do profago foi provavelmente transferida horizontalmente de um ancestral para as populações americanas de *Xvv*. O profago contém proteínas putativas secretadas, que representam candidatos para determinantes de virulência

nestas populações e aguardam caracterização molecular adicional (PEREZ-QUINTERO *et al.*, 2020).

Em análises filogenéticas, a maioria dos isolados de *Xvv* de milho formam um grupo intimamente relacionado, separado de isolados de cana-de-açúcar. Além disso, os isolados argentinos de *Xvv* estão mais próximas dos isolados da África do Sul do que dos isolados dos EUA, sugerindo uma possível origem sul-americana para a epidemia atual. Consequentemente, os isolados argentinos também parecem conectados com isolados de *Xvh*, indicando que a transferência horizontal de genes do profago de *Xvh* a *Xvv* poderia ter ocorrido na América do Sul (PEREZ-QUINTERO *et al.*, 2020). Quando inoculados em milho, os isolados de *Xvv* da Argentina e dos EUA causaram sintomas mais severos do que os isolados sul-africanos, indicando que as populações emergentes americanas são fenotipicamente diferentes da população sul-africana mais velha (PEREZ-QUINTERO *et al.*, 2020).

Ortiz-Castro (2019) não encontrou diferenças significativas na agressividade dos isolados de *Xvv* e *Xvh* em milho. Isso sugere que o evento de transferência horizontal de genes proposto de *Xvh* para os isolados americanos de *Xvv* (PEREZ-QUINTERO *et al.*, 2020) não resultaram em aumento de agressividade (ORTIZ-CASTRO, 2019).

Transferência horizontal de genes se refere à aquisição de genes externos em diferentes organismos (JAIN *et al.*, 2003). Ao permitir a transferência de genes entre espécies relacionadas e não relacionadas, a transferência horizontal de genes aumenta a diversidade genética das espécies receptoras (JAIN *et al.*, 2003). Nesse contexto, é possível que a região do profago presente em isolados de *Xvv* das Américas contenha genes que desempenham um papel na resposta fenotípica à doença ou forneçam uma vantagem potencial de adaptação, permitindo que o patógeno bacteriano infecte e colonize o milho (ORTIZ-CASTRO, 2019). Os profagos têm diversos efeitos sobre as bactérias que os hospedam em seus genomas, incluindo aumento da agressividade pelo transporte aprimorado de fatores de virulência, aumento da adaptação e até mesmo diminuição da agressividade (AHMAD *et al.*, 2014; BRÜSSOW; CANCHAYA; HARDT; 2004; FIGUEROA-BOSSI *et al.*, 2001; BOSSI *et al.*, 2003). A variação fenotípica é um mecanismo adaptativo que pode levar ao aumento da colonização, persistência, disseminação e

sobrevivência dos organismos (SHRESTHA *et al.*, 2013). Embora Perez-Quintero *et al.* (2020) tenham mostrado a variabilidade de *Xvv* ao nível do genoma, não se sabe se a região transferida horizontalmente teve um efeito na resposta à estria bacteriana.

Wasukira *et al.* (2014), avaliando comparativamente o genoma de isolados de *Xvv* obtidos de cana-de-açúcar e milho, observaram que o isolado *Xvv* de milho perdeu um gene que codifica um homólogo do efetor de virulência, *xopAF*, que estava presente em todos os cinco isolados de cana-de-açúcar avaliados. Também relataram similaridade de 70% de quatro isolados de *Xvv* de cana-de-açúcar para com o plasmídeo *pXAC47* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, enquanto o isolado *Xvv* de milho não possui essa similaridade.

Uma análise recente de genomas mostrou que diferenças levaram a agrupamentos filogenéticos distintos de isolados de milho em comparação com isolados de cana-de-açúcar (WU *et al.*, 2019). Isolados de cana-de-açúcar ainda podem ser encontrados no milho, especialmente se as duas culturas forem cultivadas na mesma área geográfica, mas é de maior preocupação para produtores se os isolados que causam sintomas severos no milho estiverem presentes (COUTINHO; WALLIS, 1991). Nakato *et al.* (2019), utilizando análises de multilocus com números variáveis de repetições, identificaram um locus específico em *Xvv*.

Perez-Quintero *et al.* (2020) encontraram uma região no genoma de *Xvv* que contém oito genes presentes em *Pantoea ananatis*. Isso pode ser importante, pois *P. ananatis* foi encontrada em folhas de milho infectadas com *Xvv* (LANG *et al.*, 2017), mas seu papel no desenvolvimento da doença ainda não foi explorado. A relação entre *Xvv* e *P. ananatis* em plantas de milho ainda não foi elucidada mas existem três hipóteses: i) existência de uma interação entre elas para atuar como um complexo de doença e infectar plantas de milho em uma taxa mais elevada; ii) que sejam espécies antagônicas entre si; ou iii) que *P. ananatis* não tenha efeito sobre a *Xvv*. O estabelecimento dessa relação é importante porque, em alguns casos, *P. ananatis* demonstrou ser benéfica para o hospedeiro por ter atividade antimicrobiana (COUTINHO; VENTER, 2009; IIMURA; HOSONO, 1996) ou por induzir resistência sistêmica (KANG *et al.*, 2007). Em outros casos, *P. ananatis* foi descrita como um patógeno não convencional que infecta o eucalipto na África do Sul (COUTINHO; VENTER, 2009). Portanto, a interação entre essas bactérias pode

levar a soluções para reduzir a ocorrência da estria bacteriana ou a novas pesquisas sobre a existência de um complexo de patógenos afetando o milho (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

LANG *et al.* (2017) estabeleceram um teste de PCR convencional com iniciadores específicos para *Xvv* em milho utilizando isolados contemporâneos e históricos. Esta técnica permanece como o método de detecção de *Xvv* mais comum e com melhor custo/efetividade (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Esse método foi seguido pela detecção por análise de TaqMan qPCR (STULBERG *et al.*, 2020), o qual permite a quantificação de *Xvv* em resíduos e sementes. Um potencial método móvel usando amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) que poderia auxiliar na detecção no campo também foi desenvolvido (STULBERG *et al.*, 2020).

Baseado em observações em campo e casa-de-vegetação nos EUA, todos os híbridos comerciais disponíveis de milho se mostraram suscetíveis à estria bacteriana do milho, porém, apresentaram variações na severidade da doença (ORTIZ-CASTRO, 2019). Isso indica que a resistência poderia ser controlada por vários genes (QIU *et al.*, 2020). Identificação de efetores patogênicos envolvidos na virulência, assim como *Quantitative Trait Loci* (QTL) para resistência a doenças em milho irá ajudar no desenho de híbridos resistentes, os quais poderão se tornar o meio mais efetivo e prático de controle da doença (ORTIZ-CASTRO, 2019). Nesse sentido, Qiu *et al.* (2020) conduziram o primeiro estudo de mapeamento de QTL para estria bacteriana em três populações de milho. Eles identificaram cinco QTL significativos, além de cinco cromossomos em duas populações. Um QTL conferiu efeito moderado, enquanto o outro conferiu pequenos efeitos, confirmando que a resistência à estria bacteriana do milho é um traço poligênico. Adicionalmente, esse estudo revelou correlação positiva entre a resistência à estria bacteriana do milho com a resistência à ferrugem das folhas do milho em uma população.

2.2.2 Sintomatologia

Os sintomas iniciais de estria bacteriana são caracterizados pelo aparecimento de pequenas pontuações translúcidas e amareladas nas folhas, que se expandem ao longo das regiões internervais, formando estrias alongadas com

bordas onduladas e irregulares (KORUS *et al.*, 2017; LANG *et al.*, 2017). Outro sintoma característico é a translucência das lesões, quando observada contra a luz pela parte abaxial da folha. As lesões necróticas apresentam coloração amarela intensa a marrom e podem coalescer e atingir grande parte do limbo foliar (KORUS *et al.*, 2017, LANG *et al.*, 2017; LEITE JÚNIOR *et al.*, 2018). Essas lesões podem variar em quantidade, formato e tamanho de acordo com a susceptibilidade do genótipo de milho (KORUS *et al.*, 2017, LANG *et al.*, 2017; LEITE JÚNIOR *et al.*, 2018). Sob condições de ataque severo, esses sintomas podem ser observados nas brácteas das espigas (KORUS *et al.*, 2017, LANG *et al.*, 2017; LEITE JÚNIOR *et al.*, 2018).

Geralmente, os sintomas têm seu início na parte inferior da planta, evoluindo para as folhas superiores à medida que a doença progride (BORDERS *et al.*, 2017). Em ambientes particularmente úmidos, o patógeno também pode produzir exsudato amarelo na superfície das folhas, composto de xantomadina e polissacarídeos extracelulares (KORUS *et al.*, 2017; CHUN *et al.*, 1997), que possibilitam a disseminação da bactéria para outras folhas da planta e para plantas vizinhas.

Um desafio para os produtores de milho é a diagnose correta da doença visando um manejo mais adequado. Os sintomas na fase tardia podem ser confundidos com a cercosporiose, uma doença fúngica do milho causada por *Cercospora zea-maydis*. A identificação rápida e correta do patógeno possibilita uma tomada de decisão mais eficiente no controle da doença, visto que aplicações de fungicidas não têm efeito no controle da estria bacteriana. Além disso, nem todas as estirpes de *Xvv* causam doença severa em milho (STULBERG *et al.*, 2020).

2.2.3 Epidemiologia

O desenvolvimento da estria bacteriana do milho é favorecido por alta temperatura e umidade elevada (BRODERS *et al.*, 2017). Com base no conhecimento de outras doenças causadas por *Xanthomonas* spp., o agente causal da estria bacteriana provavelmente sobrevive em restos culturais e pode ser disseminado pelo vento, chuva e água de irrigação (BRODERS *et al.*, 2017).

Hospedeiros alternativos, como plantas daninhas e plantas voluntárias de milho, podem servir como fonte de inóculo primário e os exsudatos bacterianos encontrados nas lesões foliares podem servir como fonte de inóculo secundário (BRODERS *et al.*, 2017; LEITE JÚNIOR *et al.*, 2018; HARTMAN *et al.*, 2020b; ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

Os exsudados contendo células de *Xvv* observados na superfície das folhas podem ser disseminados para as plantas vizinhas através da água de chuva e/ou de irrigação. Isto é consistente com observações de campo em que os sintomas da estria bacteriana do milho vão das folhas baixas para a parte superior das plantas (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

Dados preliminares de Ortiz-Castro *et al.* (2020) sugerem que *Xvv* sobrevive em resíduos de milho infectados da safra anterior. Com base em análise por qPCR, a *Xvv* presente em resíduos de milho na superfície e incorporados ao solo durante um período de seis meses pode servir como inóculo primário para o desenvolvimento da doença, uma vez que o milho é frequentemente cultivado em sucessão (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Conforme as sementes são depositadas sob o resíduo, as plântulas emergem e entram em contato com a bactéria presente no resíduo e eventualmente são infectadas e desenvolvem a doença (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Assim, o resíduo infestado representa uma importante fonte potencial de inóculo para infecções iniciais dentro de uma lavoura. Por outro lado, o movimento da bactéria por longas distâncias pode estar relacionado à transmissão por sementes, que se constitui em um veículo de sobrevivência e introdução de fitobactérias em novas áreas (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

Entretanto, o potencial de transmissão de *Xvv* por sementes de milho ainda está em estudo. Arias *et al.* (2020) avaliaram a ocorrência e a transmissão de *Xvv* em sementes provindas de campos infestados, e descobriram que 22 dos 41 lotes de sementes coletados apresentavam presença de *Xvv* (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Porém, a transmissão da semente para a plântula tem apresentado baixo nível, não sendo o inóculo normalmente suficiente para resultar em plântulas doentes, visto que a contaminação da semente é basicamente superficial (ARIAS *et al.*, 2020).

Baseado em observações de campo e inoculações em casa de vegetação (HARTMAN *et al.*, 2020b), é provável que *Xvv* penetre através de

estômatos sem requerer necessariamente ferimentos para invadir a folha (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020; LEITE JÚNIOR *et al.*, 2018).

Pela sintomatologia da doença, é possível observar que a colonização do tecido foliar é normalmente limitada pelas nervuras principais da folha (LEITE JÚNIOR *et al.*, 2018). Células de *Xvv* mostraram-se agrupadas ao redor dos estômatos das folhas de milho, aparentando entrar como sair pelos estômatos (ORTIZ-CASTRO, 2019). No mesmo estudo, com isolados de *Xvv* transformadas com proteína fluorescente (GFP), a proteína foi encontrada somente nos espaços intercelulares e não no tecido vascular (ORTIZ-CASTRO, 2019).

2.2.4 Medidas de Manejo

Há pouca informação disponível sobre o manejo da doença devido a sua recente ocorrência em importantes regiões produtoras de milho. Estudos recentes de Hartman (2018) investigaram diferentes fatores agrônômicos que poderiam contribuir para a incidência da estria bacteriana do milho. Vários estudos revelaram que irrigação, rotação de cultura, estágio de desenvolvimento, tratos culturais e data de plantio são os fatores mais importantes para a ocorrência da doença (HARTMAN *et al.*, 2020a, KIM *et al.*, 2002; PAUL; MUNKVOLD, 2004).

Observações de campo sugerem que os híbridos de milho diferem na suscetibilidade à doença (BRODERS, 2017; MADALOSSO; CUSTÓDIO; LEITE JÚNIOR, 2018; ROBAINA *et al.*, 2020). Desta maneira, a utilização de híbridos de milho resistentes seria a melhor alternativa para controlar a estria bacteriana. Como outras doenças bacterianas, não há um controle químico eficaz. Portanto, a identificação correta da doença é necessária para evitar aplicações ineficazes de produtos químicos.

Práticas comuns de manejo de resíduos podem mitigar a incidência e severidade da doença causada por *Xvv*. Essas técnicas incluem práticas culturais para promover a degradação de resíduos infestados, além de reduzir o inóculo de anos anteriores (BARAK; KOIKE; GILBERTSON, 2001; GENT *et al.*, 2005). Rotação de culturas utilizando plantas não hospedeiras também é indicada, pois com isso há remoção do campo de hospedeiro primário e resíduos culturais infectados, o que por

sua vez, elimina fontes de sobrevivência do patógeno (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Impedir o movimento de resíduos entre lavouras e colher por último lavouras altamente infestadas, são estratégias que podem reduzir a incidência da doença na próxima safra (GENT *et al.*, 2005). Manejo de ervas-daninhas também é uma consideração importante, pois diversas espécies, especialmente gramíneas, as quais podem potencialmente servir como hospedeiros alternativos (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

O controle químico com bactericidas pode inibir o desenvolvimento de doenças (GENT; SCHWARTZ, 2005). Entretanto, os bactericidas disponíveis são na maioria compostos baseados em cobre, que são produtos de contato. Permanecem na superfície da planta sem ser absorvidos sistemicamente, necessitando assim de diversas aplicações para atingir um controle efetivo da doença. Isto pode ser inviável na maioria das lavouras de milho, pois seu benefício não justificaria a despesa (JACKSON; HARVESON; VIDAVER, 2007). Além disso, o milho se mostra altamente sensível aos produtos cúpricos, causando fitotoxicidade (JACKSON; HARVESON; VIDAVER, 2007; LONGHI *et al.*, 2022). Longhi *et al.* (2022) testaram diversos produtos químicos para o controle da estria bacteriana do milho, como kasugamicina, produtos à base de cobre, mancozeb, tebuconazole, entre outros. Segundo os autores, apenas o oxiclreto de cobre na concentração de 1,5 mL L⁻¹ reduziu significativamente a severidade da doença, no entanto, este composto causou fitotoxicidade às plantas de milho.

As informações sobre os danos econômicos causados pela estria bacteriana em milho ainda são limitadas. As perdas podem ser mínimas se a doença ocorrer somente no final do ciclo da cultura, ou seja, após o enchimento dos grãos. Porém, a severidade dos sintomas pode alcançar por volta de 40% da área foliar da planta infectada em híbridos suscetíveis (JARDINE; CAFLIN, 2016; MADALOSSO; CUSTÓDIO; LEITE JR, 2018). Estudos realizados nos Estados Unidos revelaram que em algumas regiões, onde a doença se tornou epidêmica, os níveis da incidência da doença foram acima de 90% e a severidade atingiu mais de 50% da área foliar em híbridos suscetíveis de milho (BRODERS, 2017).

2.3 GENÔMICA DE BACTÉRIAS

2.3.1 Genômica Comparativa

O advento do Sequenciamento de Próxima Geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS) permitiu a redução no tempo e custo do sequenciamento genômico (MARDIS, 2008; METZKER, 2005; HERT; FREDLAKE; BARRON, 2008). Com o uso desta ferramenta, houve um aumento exponencial no número de sequências de genomas completos depositadas em bancos de dados públicos como GOLD (Genomes Online Database). Nesse contexto, o grande número de genomas disponíveis impulsionou o desenvolvimento da genômica comparativa e, conseqüentemente, o surgimento da área pan-genômica (METZKER, 2010; TETTELIN *et al.*, 2008).

Desde os primeiros sequenciamentos de genomas nos anos de 1980, a análise por genômica comparativa vem sendo utilizada para traçar perfis evolutivos e funcionais de diferentes organismos (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). Com o avanço do conhecimento técnico e a redução dos custos para sequenciamentos, a aplicação da genômica comparativa foi se tornando mais extensa. Quando aliada às técnicas de biologia molecular e bioinformática, sua importância reflete diretamente não só no conhecimento básico da natureza como também no progresso científico (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

Com os avanços das tecnologias de sequenciamento e análises computacionais, a aplicação de ferramentas genômicas tem ampliado as fronteiras de estudo na área de ecologia microbiana (XU, 2006). O sequenciamento de genomas completos tem gerado novas descobertas sobre a evolução de diferentes gêneros de bactérias e contribuído para o entendimento dos mecanismos de adaptação patógeno-hospedeiro. Isto tem possibilitado o desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento de algumas enfermidades (GAO *et al.*, 2014).

Assim, a genômica comparativa tem sido utilizada para investigar variações intraespecíficas entre espécies filogeneticamente relacionadas ou não (GAO *et al.*, 2014, BORST *et al.*, 2015). Análises do conteúdo e organização gênica permitem identificar similaridades e diferenças entre dois ou mais genomas, incluindo redução, rearranjo, duplicação e aquisição de novos genes por meio de

transferência horizontal de genes. Esses estudos indicam que uma estirpe bacteriana pode não ser representativa de outros membros de uma mesma espécie (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2014).

Na genômica comparativa, o conteúdo genético de um organismo é comparado com o de outros organismos. Isto ajuda na predição da função de genes e de sequências da região codificadora, identificação de eventos evolutivos e na determinação de relações filogenéticas (GUIMARÃES *et al.*, 2015). A maioria das análises comparativas tem como objetivo identificar semelhanças e diferenças entre os organismos (ABBY; DAUBIN, 2007). Assim, o principal objetivo é obter uma melhor compreensão biológica de diferentes espécies (SIVASHANKARI; SHANMUGHAVEL, 2007). Além disso, as análises genômicas comparativas em espécies relacionadas mostraram uma extensa diversidade genômica intra-espécies e destacaram a promiscuidade bacteriana associada a elas (PALLEN; WREN, 2007). A genômica comparativa de bactérias intimamente relacionadas é uma abordagem poderosa para obter uma visão sobre o surgimento e evolução da patogênese (AN *et al.*, 2020; GORDON *et al.*, 2015; GARITA-CAMBRONERO *et al.*, 2016)

O core genômico é o subconjunto de genes que estão presentes em todos os genomas e pode ser determinado pela comparação dos diferentes genomas (MUZZI; MASIGNANI; RAPPUOLI, 2007). Normalmente, os genes presentes no núcleo do genoma estão associados à manutenção dos aspectos básicos da biologia do organismo e estão relacionados principalmente à replicação, tradução e manutenção da homeostase celular (TETTELIN *et al.*, 2005; MEDINI *et al.*, 2005). O número de genes que compõem o core genômico pode indicar a diversidade genética entre os organismos estudados. Assim, o core genômico torna-se menor quando a diversidade aumenta entre os organismos (LAWRENCE; HENDRICKSON, 2005). Por outro lado, genomas filogeneticamente relacionados tendem a compartilhar maior número de genes e, conseqüentemente, apresentar um core genômico maior (LAWRENCE; HENDRICKSON, 2005; LERAT; DAUBIN; MORAN, 2003).

A disponibilidade de um grande número de genomas de diferentes isolados do mesmo patógeno abriu a possibilidade de investigar várias características genômicas intrínsecas a uma ou mais espécies (TETTELIN *et al.*, 2005). Uma forma de investigar esses atributos é pela abordagem pan-genômica

(MUZZI; MASIGNANI; RAPPUOLI, 2007). O pan-genoma é definido como o número total de genes não redundantes presentes em um determinado clado, totalizando todo o repertório genômico do clado e codificando todos os nichos ecológicos possíveis das estirpes examinadas (TETTELIN *et al.*, 2005; SNIPEN; ALMØY; USSERY, 2009). O principal objetivo do pan-genoma é a comparação genômica de diferentes estirpes da mesma espécie, ou mesmo gênero (SNIPEN; ALMØY; USSERY, 2009; ALCARAZ *et al.*, 2010). A ideia de estudos pan-genômicos traz *insights* significativos sobre a compreensão da evolução bacteriana, adaptação de nicho, estrutura populacional e interação com o hospedeiro, bem como inferências em questões mais aplicadas, como vacinas e desenho de drogas e a identificação de genes de virulência (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

O pan-genoma consiste basicamente em três partes: i) core genômico, formado por genes compartilhados por todos os genomas e geralmente envolvidos em processos celulares essenciais; ii) genoma acessório ou dispensável, composto por genes ausentes em alguns isolados; e iii) genes específicos da espécie ou da estirpe, que são aqueles genes que estão presentes em um único genoma (TETTELIN *et al.*, 2005; MIRA *et al.*, 2010).

Outro significado de um pan-genoma é que ele pode fornecer uma resolução maior e ajudar na reconstrução da filogenia bacteriana de uma forma mais confiável do que a filogenia baseada em um ou vários genes (AGARWAL *et al.*, 2021). O pan-genoma fornece uma visão geral de todo o conjunto de genes (100% dos genomas) de uma determinada população, ao contrário de uma filogenia 16S rRNA que representa apenas uma pequena fração do genoma (~ 0,07%), ou análise de sequência multi-locus (MLSA) envolvendo genes de manutenção (~ 0,2%) (AGARWAL *et al.*, 2021).

O pan-genoma microbiano de uma espécie pode ainda ser considerado como 'aberto' ou 'fechado'. Um pan-genoma 'fechado' é altamente conservado e é tipicamente associado com espécies bacterianas que vivem em nichos selecionados, onde são isoladas do *pool* geral de genes microbianos ou têm uma capacidade diminuída de adquirir genes, como *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis* (MIRA *et al.*, 2010; MEDINI *et al.*, 2005). Em contraste, um pan-genoma 'aberto' é observado para espécies bacterianas que podem colonizar e explorar vários nichos ambientais diferentes e expandir seus acessórios

e pan-genoma por meio de diferentes meios de transferência lateral de genes (TETTELIN *et al.*, 2005; MIRA *et al.*, 2010; MEDINI *et al.*, 2005).

Os genomas bacterianos são entidades lábeis, flutuando em tamanho e conteúdo gênico ao longo do tempo. Essas flutuações do genoma são mantidas pelos processos de neutralização de ganho e perda de genes (TOUCHON *et al.*, 2009; NOWELL *et al.*, 2014). A transferência horizontal de genes pode resultar na substituição de segmentos genéticos por homólogos doadores, frequentemente dentro das espécies, através de recombinação homóloga ou via aquisição de novo material genético. As variantes de presença-ausência de gene são principalmente o resultado de vários eventos de transferência horizontal de genes na evolução bacteriana (AGARWAL *et al.*, 2021).

2.3.2 Genômica de *Xanthomonas* spp.

Após o sequenciamento da estirpe *Xanthomonas citri* subsp. *citri* A306 (Xcc A306), por um consórcio de pesquisadores paulistas, foi possível caracterizar importantes propriedades do genoma da variante A desse patovar bacteriano (DA SILVA *et al.*, 2002), assim como viabilizou os sequenciamentos de estirpes de outras variantes de *Xanthomonas* spp. (BODNAR *et al.*, 2017; JALAN *et al.*, 2013a; MOREIRA *et al.*, 2010; RICHARD *et al.*, 2017b). Isso também possibilitou traçar perfis comparativos entre elas e com outros fitopatógenos (ESCALON *et al.*, 2013; GORDON *et al.*, 2015; JALAN *et al.*, 2013b; MOREIRA *et al.*, 2004, 2005, 2010; VOJNOV *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2015).

As sequências genômicas completas de algumas fitobactérias foram determinadas, tais como *Agrobacterium tumefaciens* (HUANG *et al.*, 2015), *Pseudomonas syringae* (BALTRUS; CLARK, 2019), *Ralstonia solanacearum* (XU *et al.*, 2011), *Xylella fastidiosa* (VAN SLUYS *et al.*, 2003), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (QIAN *et al.*, 2005), *X. oryzae* pv. *oryzae* (LEE *et al.*, 2005), *X. vesicatoria* (POTNIS *et al.*, 2011) e *X. citri* subsp. *citri* (DA SILVA *et al.*, 2002). O sequenciamento do genoma de bactérias fitopatogênicas é um importante passo para o entendimento da especificidade dessas bactérias aos respectivos hospedeiros e das diferenças em seus processos de patogenicidade e virulência

(CARVALHO, 2006).

As quatro “Xanthomonadaceae” citadas acima possuem tamanhos cromossomais similares, entretanto, elas diferem muito em termos de conteúdo plasmidial. *X. vesicatoria* carrega quatro plasmídeos, *X. citri* subsp. *citri* possui dois plasmídeos, enquanto que as outras não possuem elementos extra-cromossomais (CARVALHO, 2006).

No genoma da Xcc A306 foi encontrada uma região denominada ilha de patogenicidade, com diversos *operons* contendo genes denominados *hrp* (*hypersensitivity response and pathogenicity*) que codificam para proteínas do sistema de secreção Tipo III (T3SS), envolvido na virulência e resistência às defesas do hospedeiro. Outro importante complexo proteico presente no genoma da variante Xcc A306 é o sistema de secreção Tipo II (T2SS), responsável pela secreção de exoenzimas associadas à degradação de tecidos do hospedeiro. Além destes, Xcc A306 possui genes envolvidos na degradação da parede celular, na síntese de flagelo e sistema quimiotático, reguladores de genes dos fatores de patogenicidade (*rpf*) e biossíntese da xantomonadina e goma xantana. O conjunto desses genes presentes no genoma da bactéria explicam a sua dinâmica de patogenicidade, adaptação e sobrevivência epifítica (MOREIRA *et al.*, 2004). O sequenciamento do genoma de Xcc possibilitou sua caracterização estrutural, o qual contém um cromossomo circular compreendendo 5.175.554 pares de bases (pb) e dois plasmídeos, o pXAC33 (33.699 pb) e o pXAC64 (64.920 pb) (DA SILVA *et al.*, 2002).

Comparações entre os genomas de *X. campestris* pv. *campestris* (patógeno de crucíferas) e *X. citri* subsp. *citri* revelou alto grau de similaridade, aproximadamente 80% (DA SILVA *et al.*, 2002). Apesar disso, ambos os genomas possuem um grande número de genes específicos para cada uma das estirpes sequenciadas. Esses genes podem explicar a especificidade de hospedeiro e as diferenças nos processos de patogênese (DA SILVA *et al.*, 2002). O genoma de *X. citri* subsp. *citri* aponta algumas características particulares, que devem estar relacionadas com a capacidade de adaptação do fitopatógeno ao seu hospedeiro, como presença de um grande número de genes codificadores de enzimas degradativas de parede celular e de transporte de açúcares; de genes putativos codificadores de proteínas efetoras de virulência que estão associadas ao sistema de secreção do tipo III; genes da biossíntese da goma xantana e de um completo

sistema flagelar e de quimiotaxia (MOREIRA *et al.*, 2004).

A análise comparativa, por bioinformática, de dados genômicos bacterianos como sequências de DNA, perfis de transcriptoma e proteoma, geraram informações sobre milhares de genes e proteínas deduzidas. No entanto, grande parte (aproximadamente 40%) destas proteínas deduzidas não possui uma função conhecida ou possui uma função hipotética (LEHOUX *et al.*, 2001).

A mesma conclusão pode se chegar quando se comparam os genomas das bactérias fitopatogênicas *X. campestris* pv. *campestris*, causadora da podridão negra das crucíferas (brócolis, couve flor, repolho, couve, etc), e *X. citri* subsp. *citri*. Dos 4.428 genes presentes em *X. citri* subsp. *citri* (cromossomo e plasmídeos), 800 não são compartilhados por *X. campestris* pv. *campestris* (18,07%). Destes, apenas 316 (39,5%) possuem função previamente caracterizada, e, portanto, 60,5% dos genes exclusivos de *X. citri* subsp. *citri* ainda são hipotéticos (SILVA *et al.*, 2002).

Xanthomonas alfalfae subsp. *citrumelonis* (*Xacm*) apresenta diferenças genéticas significativas em relação às outras espécies que infectam citros. Em contraste com as espécies A, B e C de *X. citri* subsp. *citri*, *Xacm* não possui nenhum plasmídeo. Isso pode explicar a diferença de virulência e sintomatologia, uma vez que os plasmídeos em *Xanthomonas* desempenham papéis importantes na patogenicidade por apresentar genes como *pth*, que conferem a capacidade de causar sintomas parecidos ao cancro. Outros efetores relacionados à sobrevivência e virulência como *xopE3*, *xopA1* e *hrpW* não foram encontrados em *Xacm*. Genes específicos de *Xacm* (*xopC2* e *xopW*) podem estar relacionados à sua distinta gama de hospedeiros em relação à Xcc A306 (JALAN *et al.*, 2011).

Lang *et al.* (2017) apresentaram uma extensa análise de patogenicidade e comparações genômicas entre isolados históricos e recentemente coletados de *Xanthomonas* de milho, sorgo e cana-de-açúcar. Os autores mostraram que as estirpes de *Xvv* dos EUA eram mais semelhantes (99,9% de identidade genômica) à estirpe histórica sul-africana SAM119 de *Xvv*, isolada de folhas de milho há mais de 25 anos (QHOBELA *et al.*, 1990). Os isolados dos EUA foram menos semelhantes, tanto filogeneticamente quanto na agressividade na planta hospedeira, a *Xvh*, o agente causal da estria foliar bacteriana de sorgo, que ocorre tanto nos EUA quanto na África do Sul ou a isolados de *Xvv* de cana-de-açúcar (QHOBELA *et*

al., 1991).

Com base em diversas evidências, cuidadosamente revisadas por Büttner e Bonas (2010) e mais recentemente por An *et al.* (2020), atualmente é reconhecido que a patogênese de *Xanthomonas* é dependente de uma série de fatores de patogenicidade e virulência, incluindo o sistema de secreção tipo III e efetores tipo III (T3E), e também outros sistemas de secreção envolvendo adesinas, polissacarídeos extracelulares (EPS), lipopolissacarídeos (LPS) e enzimas hidrolíticas da parede celular de plantas, entre outros. Além disso, foi sugerido que esses determinantes genéticos de patogenicidade e virulência estão sob o controle de mecanismos reguladores transcricionais e pós-transcricionais rígidos que permitem que bactérias infecciosas adiram, invadam os tecidos do hospedeiro da planta, se multipliquem e superem os mecanismos de defesa da planta (BÜTTNER; BONAS, 2010).

A resistência ao cobre foi observada pela primeira vez em *X. citri* pv. *citri* (Xcc) em 1994 na Argentina, e depois nas ilhas francesas de Réunion e Martinique (RICHARD *et al.*, 2016a; RICHARD *et al.*, 2016b). Esses relatos iniciais foram seguidos pela caracterização de um plasmídeo transmissível em Xcc carregando um operon de resistência ao cobre como genes passageiros em elementos genéticos móveis (MGEs), semelhantes aos transposons do tipo Tn3, conhecidos por mediar a resistência a antibióticos de transferência (NIU *et al.*, 2015; LAUF; MÜLLER; HERRMANN, 1998; PARTRIDGE, 2011). Juntos, esses resultados indicam que a transferência lateral de genes como um mecanismo-chave pelo qual a resistência ao cobre é rapidamente adquirida dentro da família Xanthomonadaceae (RICHARD *et al.*, 2017a).

Além da resistência ao cobre, a genômica comparativa revelou diversos mecanismos moleculares associados à evolução e adaptação acelerada do gênero *Xanthomonas* a diversos ambientes agrícolas e plantas hospedeiras, como proteínas associadas ao sistema de secreção Tipo III (AN *et al.*, 2020; TIMILSINA *et al.*, 2020). T3SS é um sistema de secreção de proteínas altamente conservado com componentes estruturais codificados por um grupo de genes de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*) (ALFANO, 1997). T3SS injeta proteínas desdobradas conhecidas como efetores Tipo III (T3E) diretamente dentro das células hospedeiras. Uma vez dentro das células do hospedeiro, o T3E interrompe as vias

de sinalização de defesa do hospedeiro e induz a doença ao interferir nas funções celulares do hospedeiro (ALFANO, 2004; GRANT *et al.*, 2006; GREENBERG; VINATZER, 2003). Em muitas bactérias fitopatogênicas, o T3E pode ser reconhecido por proteínas do hospedeiro, ativando as defesas da planta em algumas interações e suprimindo as respostas de defesa do hospedeiro em outras, limitando ou ampliando a gama de hospedeiros do patógeno e as respostas patogênicas (ALFANO, 1997; GRANT *et al.*, 2006; GREENBERG, 2003; BÜTTNER; BONAS, 2010; GÜRLEBECK; THIEME; BONAS, 2006).

Os genomas de *Xanthomonas* spp. contêm muitos MGEs diferentes, como sequências de inserção (ISs), transposons (Tn), ilhas genômicas (GIs) e plasmídeos (RYAN *et al.*, 2011). Estes podem estar associados à disseminação de T3E e fatores de virulência (FERREIRA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2018), promovendo variação genética e moldando a estrutura do genoma de diferentes estirpes. Por exemplo, estudos anteriores demonstraram que os genomas de *Xanthomonas* podem carregar GIs relacionados à patogenicidade e ao metabolismo primário (LIMA *et al.*, 2008). Os GIs têm um papel importante na adaptação e evolução bacteriana, uma vez que carregam genes acessórios que promovem a expansão e rearranjos do genoma, contribuindo para a adaptação microbiana a novos ambientes e surgimento de estirpes patogênicas (ALVARENGA *et al.*, 2018).

Considerando que estes patógenos são altamente específicos quanto ao hospedeiro, pode-se supor que este grande número de genes ainda desconhecidos estejam relacionados à aptidão para a patogênese e a sobrevivência no interior do hospedeiro específico. Por conseguinte, a identificação das funções destes genes gerará subsídios para o entendimento do processo de patogênese, virulência, da interação específica planta-hospedeiro, e para a identificação de possíveis vias de controle da doença.

2.3.3 Genômica de *Bacillus* spp.

Com o desenvolvimento de métodos moleculares para a identificação de estirpes bacterianas, especialmente a análise da sequência do gene 16S rRNA/DNA, algumas espécies de *Bacillus* spp. foram reclassificadas em novos

gêneros (WISOTZJSEY *et al.*, 1992) e novas espécies foram definidas para alocar esses isolados (GUINEBRETIERE *et al.*, 2013; JIMÉNEZ *et al.*, 2013). Porém, algumas espécies são estreitamente relacionadas, não sendo possível fazer a distinção entre as linhagens baseando-se somente em análises da sequência do gene 16S rRNA/DNA.

Assim foram estabelecidos no gênero *Bacillus* dois grupos, o grupo do *B. cereus* e o grupo do *B. subtilis*, compostos por espécies taxonomicamente muito relacionadas. Para o grupo do *B. cereus*, a diferenciação entre as espécies é realizada com base no seu habitat, patogenicidade para mamíferos e insetos, e suas características morfológicas e fisiológicas (FRITZE, 2004). Para o grupo do *B. subtilis*, as espécies podem ser diferenciadas pela análise da composição de ácidos graxos da parede celular, digestão por enzimas de restrição e hibridização DNA-DNA, mas são muito difíceis de serem diferenciadas pelas características fenotípicas (NAKAMURA; ROBERTS; COHAN, 1999).

A taxonomia baseada em rRNA 16S é rotineiramente usada para construir relações taxonômicas entre membros do domínio Bactéria. Entretanto, está bem estabelecido que esta técnica falha em resolver espécies de *Bacillus* intimamente relacionadas nas quais a divergência evolutiva é limitada. Dada à falta de poder discriminatório dos genes 16S rRNA, uma abordagem taxonômica polifásica que combina a análise da sequência 16S rRNA com características fenotípicas e homologia DNA-DNA foi recomendada para melhorar a resolução. Exemplos dessa abordagem incluem os membros do grupo *Bacillus cereus sensu lato* que atualmente compreende seis espécies, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (ZWICK *et al.* 2012), e o grupo *B. subtilis* que compreende três espécies, *B. subtilis*, *B. vallismortis* e *B. mojavensis* (ROBERTS *et al.*, 1994; 1996). No entanto, a topologia das árvores polifásicas nem sempre é robusta e pode diferir de árvores com base em 16S rRNA. Portanto, delinear espécies e limites de estirpes usando uma abordagem polifásica pode ser confusa.

Kim e colaboradores (2017) construíram o pangenoma de cinco espécies de *Bacillus* e concluíram que genes adquiridos por transferência horizontal compõem os seus genes específicos e sugerem, portanto, que os genes do core sejam usados como ferramenta para a classificação taxonômica dessas bactérias. A

comparação entre cromossomos das espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* mostra escassez de genes específicos e alto grau de sintonia e identidade de proteínas (ZWICK *et al.*, 2012; RASKO *et al.*, 2005). Entretanto, apesar disso, algumas diferenças são evidenciadas na ordem de genes, rearranjos cromossômicos, variações de nucleotídeos e a presença de fagos em algumas espécies (RASKO *et al.*, 2005).

Ao contrário de *B. anthracis*, estudos pangenômicos de *B. thuringiensis* demonstraram que essa espécie possui pangenoma aberto, assim como o de *B. cereus*. Isto sugere que essas duas últimas espécies podem facilmente trocar ou adquirir material genético com outras bactérias que se encontram no mesmo nicho colonizado (FANG *et al.*, 2011). Além disso, análises filogenéticas sugerem que *B. anthracis* representa uma linhagem genética distinta de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (RASKO *et al.*, 2005).

Em estudo pangenômico, incluindo *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis*, foi demonstrado que existe variabilidade em genes que acreditavam-se ser altamente conservados entre espécies pertencentes a *Bacillus*. Assim, são evidenciadas diferenças no conteúdo gênico envolvido com o processo de esporulação, tais como genes codificantes de sensores de quinases, proteínas de revestimento de esporos e pequenas proteínas solúveis em ácidos, envolvidas na dessecação e resistência à luz UV dos esporos (ALCARAZ *et al.*, 2010). Neste contexto, Alcaraz *et al.* (2010) sugerem que esses genes evoluíram para responder a sinais específicos para diferentes ambientes. A variação é então necessária para responder a diferentes estímulos ambientais, sugerindo que *Bacillus* se especializou geneticamente para permitir a ocupação de diversos habitats e nichos. De maneira semelhante, a análise comparativa entre as espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. subtilis* mostrou que, apesar das categorias funcionais de proteínas serem semelhantes em todos os genomas, são identificadas diferenças nas vias de transdução de sinal, transportadores de membrana, estruturas da parede celular e proteínas da camada S (ANDERSON *et al.*, 2005).

A identificação e as relações filogenéticas das bactérias do grupo *B. cereus* apresentam bastantes controvérsias. Liu *et al.* (2015), com o objetivo de melhorar a taxonomia dessas bactérias, realizou um estudo filogenético utilizando 224 genomas completos de bactérias do grupo *B. cereus*. Assim, de acordo com

seus resultados, de 224 genomas utilizados, 149 estão identificados erroneamente ao nível de espécie, em que espécies classificadas como *B. cereus* ou *B. thuringiensis*, por exemplo, deveriam ser reclassificadas como *B. anthracis*, e outras 19 estirpes anteriormente identificadas como *B. cereus* e uma como *B. weihenstephanensis* deveriam ser reclassificadas como *B. mycoides* (LIU *et al.*, 2015).

Além disso, Liu *et al.* (2015) mostraram que devido à sua alta conservação, a sequência de RNA ribossomal 16S não é suficiente para diferenciar bactérias dentro do grupo *B. cereus*. Os autores ainda propuseram uma identificação rápida de isolados dentro deste grupo a partir do gene *pycA* (Piruvato carboxilase) e, quando necessário, do gene *ccpA* (Proteína A de controle de catabólitos).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS BACTERIANAS

Segundo Cook e Baker (1983), “controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”. E os autores explicam que atividades determinantes de doenças envolvem crescimento, infectividade, virulência, agressividade e outras qualidades do patógeno, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. O biocontrole não consiste em erradicar o patógeno, mas sim em amenizar os prejuízos biológicos e econômicos de forma sustentável (GOVINDASAMY *et al.*, 2010). O controle biológico de doenças de plantas ocorre pelo emprego de microrganismos antagonistas contra microrganismos fitopatogênicos (ROMEIRO, 2007; MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018). Segundo Cook e Baker (1983), o controle biológico pode ser acompanhado por: práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambas; melhoramento da planta para aumentar resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades dos antagonistas; introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos ou agentes benéficos.

O principal objetivo do controle biológico é o de manter, através do

emprego de certas práticas e da introdução de uma biomassa de antagonistas, todos os componentes do agroecossistema em perfeito equilíbrio, constituído pelo hospedeiro cultivado juntamente com os patógenos e os organismos úteis (ROBBS, 1991). Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos, o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo aproveitar tanto o controle biológico natural como realizar a introdução de um agente de biocontrole (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Uma definição ampla também inclui metabólitos especializados, isolados, por exemplo, de interações ou extratos vegetais que podem ser úteis para controlar doenças (COLLINGE *et al.*, 2022). Estes incluem antibióticos ou atividades atrativas (por exemplo, feromônios), e são muitas vezes denominados biopesticidas (ROBERTS; TAYLOR, 2016). No entanto, Collinge *et al.* (2022) recomendam que o termo enganoso biopesticidas seja evitado e que o novo termo bioprotetores, como proposto por Stenberg *et al.* (2021), seja utilizado. Por isso, o termo bioproteção deve substituir o uso mais amplo do termo controle biológico mencionado acima, e incluem o uso de extractos e produtos naturais, bem como os mais estreitamente definidos controle biológico. Assim, o termo controle biológico pode ser reservado para situações em que um agente de controle biológico vivo é aplicado (STENBERG *et al.*, 2021).

O controle biológico oferece várias oportunidades para controle de doenças, especialmente onde as abordagens convencionais são limitadas ou comprometidas. Juntamente com o uso de cultivares resistentes a doenças, o controle biológico tem um papel importante na integração de estratégias de manejo de doenças com o objetivo de reduzir o uso de produtos químicos (COLLINGE *et al.*, 2022). O biocontrole pode ser utilizado como uma das estratégias mais econômicas e significativas para o controle de doenças de plantas com o mínimo impacto ao meio ambiente (DE SILVA *et al.*, 2019). Normalmente, o controle biológico oferece vantagens em relação ao uso de métodos convencionais como menor custo, facilidade de aplicação, transformação ou recuperação de solos contaminados, além de não deixar resíduos no ambiente, como ocorre com muitos produtos químicos (SOARES, 2006; NUNES, 2008). Segundo Robes (1991), o biocontrole pela introdução ou pelo manejo de bactérias antagônicas nos locais de colonização do patógeno é um processo económico e compatível com as comunidades agrícolas de

baixa renda, não causando impactos no ambiente, nem efeitos tóxicos.

O controle biológico também é publicamente percebido como natural e, portanto, menos prejudicial ao meio ambiente do que o controle químico. Em muitos casos isso é verdade, porque uma nova molécula não está sendo introduzida no meio ambiente. Por causa dessas percepções favoráveis, muitas formas de controle biológico são também aceitas para uso em cultivo orgânico (COLLINGE *et al.*, 2022).

O controle biológico é uma alternativa promissora e tem muitas vantagens em termos de sustentabilidade, modo de ação e toxicidade em comparação com pesticidas químicos convencionais (BALE; VAN LENTEREN; BIGLER, 2008). Os produtos à base de microorganismos são usado em plantações e estufas para reduzir doenças em diversos cereais, hortaliças, frutas, flores e plantas ornamentais causadas por patógenos foliares ou de pós-colheita. (CAWOY *et al.*, 2011). Decompõem-se mais rapidamente no ambiente e são geralmente menos tóxicos para espécies não-alvo (THAKORE, 2006). Além disso, por apresentarem geralmente diferentes modos de ação dos pesticidas convencionais, eles podem ajudar a suprimir patógenos resistentes (BHATTACHARYYA; GOSWAMI; BHATTACHARYYA, 2016; MARASCO *et al.*, 2012).

Um dos desafios do controle biológico é a eficácia confiável. O controle biológico é muitas vezes considerado menos confiável e eficiente do que o controle químico ou a resistência do hospedeiro, provavelmente porque a exposição ao ambiente externo é em grande parte uma variável incontrolável. Um contra-argumento é que alguns tipos de controle biológico, ao contrário de alguns mecanismos de resistência do hospedeiro, podem ter um efeito contra múltiplas doenças, especialmente nos quais a resistência induzida ou resistência *priming* é um mecanismo subjacente (COLLINGE *et al.*, 2022).

Dentre os principais agentes de biocontrole utilizados, podemos destacar o uso de bactérias (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp.) e fungos (*Trichoderma* spp.) (HEYDARIA; PESSARAKLI, 2010, RAZA *et al.*, 2013). Em particular, bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* podem ser destacadas como potenciais agentes de controle para diferentes espécies de *Xanthomonas* (MARIN *et al.*, 2019).

Os agentes de controle biológico podem atuar sobre o patógeno

utilizando um ou mais mecanismos antagônicos, e isto faz com que se tenha maior estabilidade e espectro de ação. Estes mecanismos de ação são divididos em antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo, indução de resistência e promoção de crescimento (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Um programa de controle biológico é baseado na seleção de microorganismos antagonistas *in vitro* ou *in vivo*, por bioensaios em condições de laboratório ou em casa de vegetação, na presença de fitopatógeno e da planta hospedeira, envolvendo órgãos inteiros ou destacados (MARIANO, 1993). Para elaboração de um bioproduto, pode-se utilizar desde as mais variadas espécies de bactérias, fungos filamentosos e até mesmo leveduras (NAYAKA *et al.*, 2009). Bactérias antagonistas e leveduras como agentes de controle biológico no manejo de bactérias fitopatogênicas têm sido estudadas por vários autores (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2015).

Bactérias endofíticas habitam as plantas em tecidos internos e podem competir com fitopatógenos, podendo ser usadas como agentes de biocontrole (BERG *et al.*, 2005). Elas se confrontam com os patógenos por meio de metabólitos ativos com atividades antimicrobiana e antifúngica, secreção de enzimas que degradam a parede celular de fungos, competição por espaço e nutrientes, e induzindo sistemas de defesa na planta (HONG *et al.*, 2016; AKTAN; SOYLU, 2020).

Os agentes de controle biológico mais bem-sucedidos são concorrentes efetivos no ambiente biótico do solo e no holobioma vegetal (a combinação da planta e seu microbioma associado), à medida que evoluíram mecanismos para tolerar toxinas de outros organismos e são adaptados às condições de estresse nesses ambientes, que incluem crescimento em raízes, caules, folhas e flores e em tecidos feridos (COLLINGE *et al.*, 2022). Endófitos, definidos como microrganismos que colonizam o interior de plantas (a endosfera) sem causar doenças (JØRGENSEN *et al.*, 2020), estão adaptados ao nicho ecológico da endosfera e, são parcialmente protegidos do ambiente externo e colonizam o mesmo nicho que os patógenos. Portanto, sugere-se que os endófitos têm o potencial de serem mais consistentes do que organismos puramente epífíticos, especialmente aqueles na filosfera.

Dentre estes possíveis agentes de biocontrole, bactérias do gênero *Bacillus* vêm sendo amplamente estudadas por sua capacidade de sintetizar

biomoléculas com ação antifúngica e bactericida, além de produzirem substâncias que promovem o crescimento de plantas. Estes microrganismos podem formar endósporos em condições adversas, característica importante para sobrevivência do antagonista em formulações de bioprodutos e colonização dos órgãos vegetativos da planta (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Diversas investigações foram realizadas para entender os mecanismos envolvidos no controle biológico de doenças de plantas por espécies de *Bacillus* (CAO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013). As espécies de *Bacillus* são aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram positivas, em forma de bastonete, formam endósporos (MADIGAN *et al.*, 2016). E são capazes de controlar doenças de plantas por uma variedade de mecanismos, incluindo produção de antibióticos e sideróforos, indução de respostas de defesa na planta hospedeira, competição para fontes de nutrientes e por espaço (MORA; CABREFIGA; MONTESINOS, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2012).

A formação de endósporos, que são estruturas de resistência, é característica deste gênero que possibilita sua sobrevivência e colonização rizosférica. Possui a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e de interesse para o desenvolvimento de bioprodutos para a agricultura (PAZ *et al.*, 2018).

Muitos estudos foram realizados sobre os efeitos benéficos de bactérias endofíticas e epifíticas como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos (SOYLU *et al.*, 2005; BEN ABDALLAH *et al.*, 2016). *B. subtilis* pode inibir vários fungos fitopatogênicos importantes, incluindo *Sclerotium rolfsii* (DE CURTIS *et al.*, 2010), *Fusarium* sp. (ZHAO *et al.*, 2013), *Rhizoctonia solani* (SOYLU *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2012) e *Verticillium dahliae* (LI *et al.*, 2013). Assim como o controle biológico por microrganismos, como *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. e seus produtos tem se mostrado eficientes no controle de espécies de *Xanthomonas* (MURATE *et al.*, 2015; DAUNGFU; YOUNPENSUK; LUMYONG, 2019; LANNA FILHO; ROMEIRO; ALVES, 2010; PRÍNCIPE *et al.*, 2018).

Agentes de controle biológico microbiano são produzidos por aproximadamente 200 fabricantes no mundo (DUNHAM, 2015), e cerca de 209 linhagens microbianas de 94 espécies diferentes estão comercialmente disponíveis para controle de pragas e/ou doença (VAN LENTEREN *et al.*, 2018). Os autores

ainda estimam que o controle biológico com organismos invertebrados e microbianos é aplicado em mais de 30 milhões de hectares globalmente, inclusive, os agricultores orgânicos adotaram amplamente as técnicas envolvendo pesticidas microbianos (BAKER; GREEN; LOKER, 2020).

Alguns produtos de controle biológico contra *Xanthomonas* spp. estão disponíveis comercialmente. O Serenade® OPTI (BAYER) contém uma estirpe de *Bacillus subtilis* (QST 713) que pode ser usado contra *Xanthomonas* spp. que causam doenças em tomate, pimentão, berinjela e batata; *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causadora do cancro cítrico (BAYER- Bula Serenade); e *Xanthomonas arboricola* responsável pelas principais doenças de árvores frutíferas de nozes (MARIN *et al.*, 2019). O bactericida AgriPhage™ é um produto a base de bacteriófagos usado para controle biológico de mancha bacteriana em tomate e pimentão (*Xanthomonas* spp.) e cancro cítrico (AGRIPHAGE-Bula).

REFERÊNCIAS

ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 135–141, 2007.

ABIMILHO - Associação Brasileira das Indústrias do Milho. 2022. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/> Acesso em: 19/06/2022.

AHMAD, A. A.; ASKORA, A.; KAWASAKI, T.; FUJIE, M.; YAMADA, T. The filamentous phage xacf1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causative agent of citrus canker disease. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, 2014.

AGARWAL, G.; CHOUDHARY, D.; STICE, S. P.; MYERS, B. K.; GITAITIS, R. D.; VENTER, S. N.; KVITKO, B. H.; DUTTA, B. Pan-genome-wide analysis of *Pantoea ananatis* identified genes linked to pathogenicity in onion. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, 2021.

AKTAN, Z. C.; SOYLU, S. Prevalence and characterization of plant growth promoting mechanisms of endophytic and epiphytic bacterial species isolated from almond trees growing in Diyarbakır province of Turkey. **KSU Journal of Agriculture and Nature**, Onikişubat, v. 23, p. 641–654, 2020.

ALCARAZ, L. D.; MORENO-HAGELSIEB, G.; EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; HERRERA-ESTRELLA, L.; OLMEDO, G. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. **BMC Genomics**, Londres, v. 11, p. 332, 2010.

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 5655-5662, 1997.

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 385-414, 2004.

ALVARENGA, D.O.; MOREIRA, L.M.; CHANDLER, M.; VARANI, A.M. A practical guide for comparative genomics of mobile genetic elements in prokaryotic genomes. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1704, p. 213-242, 2018.

AN, S.-Q.; POTNIS, N.; DOW, M.; VORHÖLTER, F.-J.; HE, Y.-Q.; BECKER, A.; TEPER, D.; LI, Y.; WANG, N.; BLERIS, L.; TANG, J.-L. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 1-32, 2020.

ANDERSON, I.; SOROKIN, A.; KAPATRAL, V.; REZNIK, G.; BHATTACHARYA, A.; MIKHAILOVA, N.; D'SOUZA, M. Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 250, n. 2, p. 175184, 2005.

- ARAÚJO, A. V.; BRANDÃO, JUNIOR, D. S.; FERREIRA, I. C. P. V.; COSTA, C. A.; PORTO, B. B. A. Desempenho agronomico de variedades crioulas e híbridos de milho cultivados em diferentes sistemas de manejo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 4, p. 885-892, 2013.
- ARIAS, S. L.; BLOCK, C. C.; MAYFIELD, D. A.; SANTILLANA, G.; STULBERG, M. J.; BRODERS, K. D.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; MUNKVOLD, G. P. Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Maize in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1139-1146, 2020.
- ARITUA, V.; PARKINSON, N.; THWAITES, R.; HEENEY, J. V.; JONES, D. R.; TUSHEMEREIRWE, W.; CROZIER, J.; REEDER, R.; STEAD, D. E.; SMITH, J. Characterization of the *Xanthomonas* sp. causing wilt of enset and banana and its proposed reclassification as a strain of *X. vasicola*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, p. 170-177, 2008.
- BALE, J.S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 363, p. 761–776, 2008.
- BALTRUS, D. A.; CLARK, M. A complete genome sequence for *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* PP1 highlights the importance of multiple modes of horizontal gene transfer during phytopathogen evolution. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 1013–1018, 2019.
- BARAK, J. D.; KOIKE, S. T.; GILBERTSON, R. L. Role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 169-178, 2001.
- BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 104095, 2020.
- BEN ABDALLAH, R. A.; MEJDOUB-TRABELSI, B.; NEFZI, A.; JABNOUN-KHIAREDDIN, H.; DAAMI-REMADI, M. Isolation of endophytic bacteria from *Withania somnifera* and assessment of their ability to suppress *Fusarium* wilt disease in tomato and to promote plant growth. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, Hyderabad, v. 7, n. 352, p. 1–11, 2016.
- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 51, p. 215–229, 2005.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.
- BHATTACHARYYA, P. N.; GOSWAMI M. P.; BHATTACHARYYA, L. H. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 8, p. 26–41, 2016.

BRITO, A. H.; VON PINHO, R. G.; PEREIRA, J. A. R.; BALESTRE, M. Controle químico da Cercosporiose, Mancha Branca e dos grãos ardidos em milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 5, p. 629-635, 2013.

BRODERS, K. Status of bacterial leaf streak of corn in the United States. In: INTEGRATED CROP MANAGEMENT CONFERENCE, 2017, Iowa. **Proceedings...** Iowa: ICM, 2017. Disponível em: <https://lib.dr.iastate.edu/icm/2017/proceedings/18/>. Acesso em: 28 abr. 2019.

BRÜSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiology Molecular Biology Review**, Washington, v. 68, p. 560–602, 2004.

BODNAR, A. M.; SANTILLANA, G.; MAVRODIEVA, V.; LIU, Z.; NAKHLA, M.; GABRIEL, D. W. Complete genome sequences of three *Xanthomonas citri* strains from Texas. **Genome Announcements**, Washington, v. 5, n. 28, 2017.

BOEHLAND, P. 2016. Statement on *Xanthomonas vasicola* pv *vasculorum*. https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/news/sa_by_date/newsroom-2016/sa-08/statement-corn-xvv

BOSSI, L.; FUENTES, J. A.; MORA, G.; FIGUEROA-BOSSI, N. Prophage contribution to bacterial population dynamics. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 6467–6471, 2003.

BORÉM, A.; GIÚDICE, M. P. Cultivares transgênicos. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção de milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 85-108.

BORST, L. B.; SUYEMOTO, M. M.; SCHOLL, E. H.; FULLER, F. J.; BARNES, H. J. Comparative genomic analysis identifies divergent genomic features of pathogenic *Enterococcus cecorum* including a type IC CRISPR-Cas system, a capsule locus, an epa-like locus, and putative host tissue binding proteins. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 10, p. e0121294, 2015.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 34, p. 107–133, 2010.

CARVALHO, F. M. de S. Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira. Tese de doutorado. Ribeirão Preto, 117 p., 2006.

CAO, Y.; XU, Z.; LING, N.; YUAN, Y.; YANG, X.; CHEN, L.; SHEN, B.; SHEN, Q. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 135, p. 32–39, 2012.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. Bacillus-Based Biological Control of Plant Diseases. In: Soytcheva M (ed). **Pesticides in the Modern World-pesticides use and management**. InTech, Rijeka, p. 273–302, 2011.

CHUN, W.; CUI, J.; POPLAWSKY, A. Purification, characterization and biological role of a pheromone produced by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Physiological and Molecular Plant Pathology, Cambridge, v. 51, p. 1-14, 1997.

COLLINGE, D. B.; JENSEN, D. F.; RABIEY, M.; SARROCCO, S.; SHAW, M. W.; SHAW, R. H. Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? **Plant Pathology**, Oxford, v. 71, n. 5, p. 1024-1047, 2022.

CONCEIÇÃO, C. S.; FELIX, K. C. S.; MARIANO, R. L. R.; MEDEIROS, E. V.; SOUZA, E. B. Combined effect of yeast and silicon on the control of bacterial fruit blotch in melon. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 174, p. 164-170, 2014.

CONTINI, E.; MOTA, M.M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R.A.; SILVA, A.F.; SILVA, D.D.; MACHADO, J.R.A.; COTA, L.V.; COSTA, R.V.; MENDES, S.M. **Milho - Caracterização e Desafios Tecnológicos**. Embrapa, 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf> Acesso em: 08/11/2021.

COSTA, R. V. da; CASELA, C. R.; COTA, L. V. **Cultivo do milho: Doenças. Sistemas de produção**. Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), 6ª edição, set. 2010.

COUTINHO, T. Bacterial leaf streak of maize: a study on host specificity and cultivar susceptibility. Tese - University of Natal, Pietermaritzburg, 1988.

COUTINHO, T. A.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; ROUX, J.; MCFARLANE, S. A.; AND VENTER, S. N. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64, p. 576-581, 2015.

COUTINHO, T.; WALLIS, F. Bacterial streak disease of maize (*Zea mays* L.) in South Africa. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 133, p. 112-112, 1991.

CUNHA, J. F.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Efeito “*in vitro*” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n. 6, p. 871-876, 2006.

DAMICONE, J.; CEVALLOS, F.; OLSON, J. First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Oklahoma. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, p. 437, 2018.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V.

- R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETÚBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Berlim, v. 417, p. 459-463, 2002.
- DAUNGFU, O.; YOUNPENSUK, S.; LUMYONG, S. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. **Tropical Life Sciences Research**, Penang, v. 30, n. 1, p. 73–88, 2019.
- DE CURTIS, F.; LIMA, G.; VITULLO, D.; DE CICCIO, V. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 663–670, 2010.
- DE SILVA, N. I.; BROOKS, S.; LUMYONG, S.; HYDE, K. D. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, Amstredam, v. 33, p. 133–148, 2019.
- DE SILVA, R. S. DA. Bactérias de solos supressivos com atividade antimicrobiana sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Dissertação de mestrado. São Cristóvão, 56 p. 2016.
- DOOKUN, A.; STEAD, D. E.; AUTREY, L. J. Variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* from Mauritius and other countries based on fatty acid analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 23, p. 148-155, 2000.
- DUARTE, J. de O.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. **Análise de Custos de Produção de Milho Transgênico x Não Transgênico**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2005. 24 p.
- DUNHAM, W. C. Evolution and future of biocontrol. Paper presented at the 10th Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM), Basel, Switzerland, October 20th, 2015. Disponível em:
http://www.abim.ch/index.php?eID=tx_nawsecuredl&u=0&g=0&t=1489234639&hash=9a70d39f93f7e559c74c63844ae047a9aa3c37ea&file=fileadmin/abim/documents/presentations2015/Keynote_Dunham_ABIM_2015.pdf. Acessado em: 16/06/2022.
- DYER, R. A. Botanical surveys and control of plant diseases. **Farming in South Africa**, Pretoria, v. 24, n. 275, p. 119-121, 1949.
- ESCALON, A.; JAVEGNY, S.; VERNIÈRE, C.; NOËL, L. D.; VITAL, K.; POUSSIER, S.; HAJRI, A.; BAUREAU, T.; PRUVOST, O.; ARLAT, M.; GAGNEVIN, L. Variations in Type III Effector Repertoires, Pathological Phenotypes and Host Range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotypes. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 483–496, 2013.
- FANG, Y.; LI, Z.; LIU, J.; SHU, C.; WANG, X.; ZHANG, X.; ZHANG, J. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, Amsterdam, v. 38, n. 12, p. 567-576, 2011.

FERREIRA, R. M.; DE OLIVEIRA, A. C. P.; MOREIRA, L. M.; BELASQUE, J.; GOURBEYRE, E.; SIGUIER, P.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A.; CHANDLER, M.; VARANI, A. M. A TALE of transposition: Tn3-like transposons play a major role in the spread of pathogenicity determinants of *Xanthomonas citri* and other *Xanthomonads*. **mBio**, Washington, v. 6, n. 1, p. e02505-14, 2015.

FIESP - Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Safra Mundial de Milho 2021/22 - 1º Levantamento do USDA. FIESPE: Informativo Maio de 2021.

FIGUEROA-BOSSI, N.; UZZAU, S.; MALORIOL, D.; BOSSI, L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in salmonella. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 39, p. 260-271, 2001.

FOCOAGRO. **Veja como funciona a negociação de milho e soja no mercado de commodities**. Disponível em: <http://www.focoagro.com.br/noticias/38-veja-como-funciona-anegociacao-de-milho-e-soja-no-mercado-de-commodities> Acesso em: 20/02/2022.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endosporeforming bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p.1245-1248, 2004.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, p. 819- 828, 2014.

GARITA-CAMBRONERO, J.; PALACIO-BIELSA, A.; LÓPEZ, M. M.; CUBERO, J. Comparative genomic and phenotypic characterization of pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* reveals insights into the infection process of bacterial spot disease of stone fruits. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 11, p. e0161977, 2016.

GAO, X. Y.; ZHI, X. Y.; LI, H. W.; KLENK, H. P.; LI, W. J. Comparative genomics of the bacterial genus *Streptococcus* illuminates evolutionary implications of species groups. **PloS ONE**, São Francisco, v. 9, p. e101229, 2014.

GENT, D. H.; LANG, J. M.; BARTOLO, M. E. SCHWARTZ, H. F. Inoculum sources and survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* in Colorado. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 507-514, 2005.

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H. F. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 631-639, 2005.

GORDON, J. L.; LEFEUVRE, P.; ESCALON, A.; BARBE, V.; CRUVEILLER, S.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Comparative genomics of 43 strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri* reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. **BMC Genomics**, Londres, v. 16, p. 1098, 2015.

GOVINDASAMY, V.; SENTHILKUMAR, M.; MAGHESHWARAN, V.; KUMAR, U.; BOSE, P.; SHARMA, V.; ANNAPURNA, K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential

PGPR for sustainable agriculture. In: **Plant growth and health promoting bacteria**. Springer Berlin Heidelberg, p. 333-364, 2010.

GRANT, S.R.; FISHER, E.J.; CHANG, J.H.; MOLE, B.M.; DANGL J.L. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 60, p. 425-449, 2006.

GREENBERG, J. T.; VINATZER, B. A. Identifying type III effectors of plant pathogens and analysing their interaction with plant cells. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 6, p. 20-28, 2003.

GUIMARÃES, L. C.; FLORCZAK-WYSPIANSKA, J.; DE JESUS, L. B.; VIANA, M. V.; SILVA, A.; RAMOS, R. T.; SOARES, S.; SOARES, S. Inside the Pan-genome - Methods and Software Overview. **Current Genomics**, Sharjah, v. 16, n. 4, p. 245–252, 2015.

GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; SARRAU, B.; BUYSER, M.L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E.; LERECLUS, D.; VOS, P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Cambridge, v. 63, p. 31 - 40, 2012.

GÜRLEBECK, D.; THIEME, F.; BONAS U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 163, p. 233-255, 2006.

HARRISON, J.; STUDHOLME, D. J. Draft genome sequence of *Xanthomonas axonopodis* pathovar *vasculorum* NCPPB 900. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 360, p. 113-116, 2014.

HARTMAN, T. M. Investigation of alternative hosts and agronomic factors affecting *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn. Tese de doutorado. Lincoln, 116 p. 2018.

HARTMAN, T.; HARBOUR, J.; THARNISH, B.; VAN METER, J.; JACKSON-ZIEMS, T. Agronomic factors associated with bacterial leaf streak development caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1132-1138, 2020a.

HARTMAN, T.; THARNISH, B.; HARBOUR, J.; YUEN, G. Y.; JACKSON-ZIEMS, T. A. A. Alternative hosts in the families Poaceae and Cyperaceae for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1147-1152, 2020b.

HERT, D. G.; FREDLAKE, C. P.; BARRON, A. E. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 29, n. 23, p. 4618–4626, 2008.

- HEYDARIA, A.; PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of Biological Sciences**, Canberra, v. 10, n. 4, p. 273-290, 2010.
- HONG, C. E.; KWON, S. Y.; PARK, J. M. Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with *Arabidopsis thaliana*. **Microbiology Research**, Amsterdam, v. 185, p. 13–21, 2016.
- HUANG, Y. Y.; CHO, S. T.; LO, W. S.; WANG, Y. C.; LAI, E. M.; KUO, C. H. Complete Genome Sequence of *Agrobacterium tumefaciens* Ach5. **Genome announcements**, Washington, v. 3, n. 3, e00570-15, 2015.
- JACKSON, T. A.; HARVESON, R. M.; VIDAVER, A. K. Reemergence of Goss's wilt and blight of corn to the central high plains. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 8, p. 44, 2007.
- JAIN, R.; RIVERA, M. C.; MOORE, J. E.; LAKE, J. A. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 20, p. 1598-1602, 2003.
- JALAN, N.; ARITUA, V.; KUMAR, D.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n. 22, p. 6342–6357, 2011.
- JALAN, N.; KUMAR, D.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WANG, N. Complete genome sequence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain Aw12879, a restricted-host-range citrus canker-causing bacterium. **Genome Announcements**, Washington, v. 1, n. 3, p. e00235-13, 2013a.
- JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, Londres, v. 14, p. 551, 2013b.
- JAMANN, T.; PLEWA, D.; MIDEROS, S.; BISSONNETTE, S. First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Illinois. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 103, p. 1018, 2019.
- JARDINE, D. J.; CLAFIN, L. E. **Compendium of corn diseases**. 4th. ed. St. Paul: Scientific Society, 2016.
- JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A.R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KØLSTO, A.-B.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J.F.; CODOÑER, F.M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 6, p. 383-391, 2013.

- JØRGENSEN, H. J. L.; COLLINGE, D. B.; ROJAS, E. C.; LATZ, M. A. C.; MANZOTTI, A.; NTANA, F.; JENSEN, B. **Plant endophytes**. In: Encyclopedia of life sciences. Wiley. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0028893> Acesso em: 16/06/2022.
- KARAMURA, G.; SMITH, J.; STUDHOLME, D.; KUBIRIBA, J.; KARAMURA, E. Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugarcane and banana. **African Journal of Plant Science**, Lagos, v. 9, p. 385–400, 2015.
- KIDO, K.; ADACHI, R.; HASEGAWA, M.; YANO, K.; HIKICHI, Y.; TAKEUCHI, S.; ATSUCHI, T.; TAKIKAWA, Y. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Amsterdam, v. 74, p. 302–312, 2008.
- KIM, K. S.; TAYLOR, S. E.; GLEASON, M. L.; KOEBLER, K. J. Model to enhance site-specific estimation of leaf wetness duration. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 179-185, 2002.
- KIM, Y.; KOH, I-S.; LIM, M. Y.; CHUNG, W-H.; RHO, M. Pangenome analysis of *Bacillus* for microbiome profiling. **Scientific Reports**, Berlím, v. 7, n. 1, p. 10984, 2017.
- KORUS, K.; LANG, J. M.; ADESEMOYE, A. O.; BLOCK, C. C.; PAL, N.; LEACH, J. E.; JACJSON-ZIEMS, T. A. First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, p. 1030, 2017.
- KUMAR, K. V. K.; YELLAREDDYGARI, S. K.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; LAWRENCE, K. S.; ZHOU, X.; SUDINI, H.; GROTH, D. E.; KRISHNAM RAJU, S.; MILLER, M. E. Efficacy of *Bacillus subtilis* MBI 600 against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* and on growth and yield of rice. **Rice Science**, Amsterdam, v. 19, p. 55–63, 2012.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, São Luís, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- LANNA FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1381–1387, 2010.
- LANG, J. M.; DUCHARME, E.; IBARRA CABALLERO, J.; LUNA, E.; HARTMAN, T.; ORTIZ-CASTRO, M.; KORUS, K.; RASCOE, J.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; BROEDERS, K.; LEACH, J. E. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, p. 1312-1321, 2017.
- LAUF, U.; MÜLLER, C.; HERRMANN, H. The transposable elements resident on the plasmids of *Pseudomonas putida* strain H, Tn5501 and Tn5502, are cryptic transposons of the Tn3 family. **Molecular Genetics and Genomics**, Hoboken, v.

259, p. 674-678, 1998.

LAWRENCE, J. G.; HENDRICKSON, H. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 572–578, 2005.

LEE, B. M.; PARK, Y. J.; PARK, D. S.; KANG, H. W.; KIM, J. G.; SONG, E. S.; PARK, I. C.; YOON, U. H.; HAHN, J. H.; KOO, B. S.; LEE, G. B.; KIM, H.; PARK, H. S.; YOON, K. O.; KIM, J. H.; JUNG, C. H.; KOH, N. H.; SEO, J. S.; GO, S. J. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 577-86, 2005.

LEHOUX, D.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R. C. PCR-based signature • tagged mutagenesis. **In vitro Mutagenesis Protocols, Methods in Molecular Biology**. Edited by Braman J. Humana Press, 2001.

LEITE JÚNIOR, R. P.; CUSTODIO, A. A. DE P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I. M.; RODRIGUES, V. H. S. Estria bacteriana do milho no Paraná. IAPAR, Londrina (**Informe da Pesquisa**, n.160), 18 p. 2018.

LEITE JÚNIOR, R. P.; CUSTODIO, A. A. DE P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I. M.; RODRIGUES, V. H. S. First report of the occurrence of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 103, p. 145, 2019.

LERAT, E.; DAUBIN, V.; MORAN, N. A. From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes: the case of the gamma-Proteobacteria. **PLoS Biology**, São Francisco, v. 1, n. 1, p. E19, 2003.

LI, S.; ZHANG, N.; ZHANG, Z.; LUO, J.; SHEN, B.; ZHANG, R.; SHEN, Q. Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 49, p. 295–303, 2013.

LIMA, W. C.; PAQUOLA, A. C. M.; VARANI, A. M.; VAN SLUYS, M.-A.; MENCK, C. F. M. Laterally transferred genomic islands in Xanthomonadales related to pathogenicity and primary metabolism **FEMS Microbiology Letter**, Oxford, v. 281, p. 87-97, 2008.

LIU, Y.; LAI, Q.; GÖKER, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; WANG, M.; SUN, Y.; SHAO, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**, Berlim, v. 5, p. 14082, 2015.

LONGHI, T. V.; ROBAINA, R. R.; LEITE JÚNIOR, R. P.; BALBI-PEÑA, M. I. Sensibility of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* to chemicals and efficiency of the chemical control of bacterial leaf streak on corn plants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 44, p. e54952, 2022.

MADALOSSO, T.; CUSTÓDIO, A. A. DE P.; LEITE JÚNIOR, R. P. Estria bacteriana. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 232, p. 36. 2018.

- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018a. Instrução normativa nº 38, de 1º de outubro de 2018. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/10/2018&jornal=515&pagina=14&totalArquivos=104>> Acesso em: 30 out. 2020.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018b. Instrução normativa nº 39, de 1 de outubro de 2018. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/10/2018&jornal=515&pagina=11&totalArquivos=104>> Acesso em: 30 out. 2020.
- MARASCO, R.; ROLLI, E.; ETTOUMI, B.; VIGANI, G.; MAPELLI, F.; BORIN, S. *et al.* A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, p. e48479, 2012.
- MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 387–402, 2008.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, v. 1, p. 369-409, 1993.
- MARIN, V. R.; FERRAREZI, J. H.; VIEIRA, G.; SASS, D. C. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 35, n. 5, p. 72, 2019.
- MEDEIROS, F. H. V.; MARTINS, S.J.; ZUCCHI, T.D.; de MELO, I.S.; BATISTA, L.R.; MACHADO, J.C. Biological control of mycotoxin-producing molds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, p. 483–497, 2012.
- MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1: Princípios e Conceitos. 5. ed. São Paulo: Ceres. p. 261-274, 2018.
- MEDINI, D.; DONATI, C.; TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; RAPPUOLI, R. The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, Amsterdam v. 15, p. 589–594, 2005.
- MEGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PALVA, E. Fisiologia do milho. **Circular técnico** 22, EMBRAPA, 2002. Disponível em: <http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/milho/circul22.pdf> Acesso em: 17/06/2022.
- MELO, E. A.; MARIANO, R. L. R.; LARANJEIRA, D.; SANTOS, L. A.; GUSMÃO, L. O.; SOUZA, E. B. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 40, n. 1, p. 56-64, 2015.
- METZKER, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. **Genome Research**, Oxford, v.15, n. 12, p. 1767–1776, 2005.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, Berlim, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.

- MIRA, A.; MARTÍN-CUADRADO, A. B.; D'AURIA, G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. **International Microbiology**, Madri, v. 13, p. 45-57, 2010.
- MIRANDA, R. A. de. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, v. 74, n. 829, p. 24-27, 2018.
- MOFFETT, M. L. Bacterial plant pathogens recorded in Australia. In: **Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide**, Academic Press, Sydney, p. 317–336. 1983.
- MORA, I.; CABREFIGA, J.; MONTESINOS, E. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. **International Microbiology**, Madri, v. 14, p. 213–223, 2011.
- MOREIRA, L. M.; SOUZA, R. F.; ALMEIDA JR., N. F.; SETUBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; DA SILVA, A. C. R. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 163-184, 2004.
- MOREIRA, L. M.; ALMEIDA JR, N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DE MORAES, F. E.; DE OLIVEIRA, J. C.; DE SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, W. W.; LAIA, M. L.; LEITE JR, R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; RODRIGUES NETO, J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA JR, H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A. SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, Londres, v. 11, p. 238, 2010.
- MOTA, R. P. D. Agressividade, caracterização molecular de isolados de *Pantoea ananatis* e nanopartículas no controle da bactéria na cultura do milho. Dissertação de mestrado. Uberlândia, 56 p. 2019.
- MURATE, L. S.; DE OLIVEIRA, A. G.; HIGASHI, A. Y.; BARAZETTI, A. R.; SIMIONATO, A. S.; SILVA, C. S.; SIMOES, G. C.; SANTOS, I. M. O.; FERREIRA, M. R.; CELY, M. V. T.; NAVARRO, M. O. P.; FREITAS, V. F.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, JOÃO C.P.; LEITE JUNIOR, R. P.; ANDRADE, G. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. **Agricultural Sciences**, Wuhan, v. 6, n. 3, p. 295–303, 2015.
- MUZZI, A.; MASIGNANI, V.; RAPPUOLI, R. The pan-genome: towards a knowledge-based discovery of novel targets for vaccines and antibacterials. **Drug Discovery Today**, Amsterdam, v. 12, n. 11-12, p. 429-439, 2007.
- NAYAKA, S. C.; SHANKAR, A. C. U.; REDDY, M. S.; NIRANJANA, S. R.; PRAKASH, H. S.; SHETTY, H. S.; MORTENSEN, C. N. Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. **Pest Management Science**, Londres, v. 65, p. 769-775, 2009.
- NIU, X.-N.; WEI, Z. Q.; ZOU, H. F.; XIE, G-G.; WU, F.; LI, K-J.; JIANG, W.; TANG, J-

- L.; HE, Y-Q. Complete sequence and detailed analysis of the first indigenous plasmid from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **BMC Microbiology**, Berlim, v. 15, p. 233, 2015.
- NUNES, H. T. Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos. Tese de doutorado. Jaboticabal, 75 p. 2008.
- NAKAMURA, L. K.; ROBERTS, M. S.; COHAN, F. M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov, and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 49, p. 1211-1215, 1999.
- NAKATO, G. V.; FUENTES ROJAS, J. L.; VERNIERE, C.; BLONDIN, L.; COUTINHO, T.; MAHUKU, G.; WICKER, E. A new multi locus variable number of tandem repeat analysis scheme for epidemiological surveillance of *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum*, the plant pathogen causing bacterial wilt on banana and enset. **Plos One**, São Francisco, v. 14, p. e0215090, 2019.
- NOWELL, R. W.; GREEN, S.; LAUE, B. E.; SHARP, P. M. The extent of genome flux and its role in the differentiation of bacterial lineages. **Genome Biology and Evolution**, Londres, v. 6, p. 1514–1529, 2014.
- OLIVEIRA, A. C. P.; FERREIRA, R. M.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A.; CHANDLER, M.; VARANI, A. M. Transposons and pathogenicity in *Xanthomonas*: acquisition of murein lytic transglycosylases by Tn Xax1 enhances *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 virulence and fitness. **PeerJ**, Durham, v. 6, p. e6111, 2018.
- OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F.T.; CASELA, C.R.; PINTO, N.F.J.A. **Doenças no milho: Identificação e Controle**. Sete Lagoas. Embrapa, 2005.
- ORTIZ-CASTRO, M.; HARTMAN, T.; COUTINHO, T.; LANG, J. M.; KORUS, K.; LEACH, J. E.; JACHSIN-ZIEMS, T.; BROEDERS, K. Current understanding of the history, global spread, ecology, evolution, and management of the corn bacterial leaf streak pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1124-1131, 2020.
- ORTIZ-CASTRO, M. C. Understanding the disease ecology of the corn bacterial leaf streak pathogen *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Dissertação de mestrado. Fort Collins, 98 p. 2019.
- PALLEN, M. J.; WREN, B. W. Bacterial pathogenomics. **Nature**, Berlim, v. 449, n. 7164, p. 835–842, 2007.
- PAPADIMITRIOU, K.; ANASTASIOU, R.; MAVROGONATOU, E.; BLOM, J.; PAPANDREOU, N. C.; HAMODRAKAS, S. J.; FERREIRA, S.; RENAULT, P.; SUPPLY, P.; POT, B. Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. **BMC Genomics**, Londres, v. 15, p. 272, 2014.

PARTRIDGE, S. R. Analysis of antibiotic resistance regions in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 35, p. 820-855, 2011.

PATERNIANI, E. **Melhoramento e Produtividade do Milho no Brasil**. Fundação Cargil. 650 p. 1980.

PAUL, P. A.; MUNKVOLD, G. P. A model-based approach to preplanting risk assessment for gray leaf spot of maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 1350-1357, 2004.

PAZ, I. C. P.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A. M.; ROSA, O. P. P. D.; QUECINE, M. C.; SILVA, M. C. P. E.; AZEVEDO, J. L.; MATSUMURA, A. T. S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. **Microbial Pathogenesis**, Amsterdam, v. 121, p. 106-109, 2018.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas 4 ed. São Paulo, Agronômica Ceres v 2, 2016.

PEREIRA FILHO, I. A. **Cultivo do milho**. 9ª edição. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção. 2015. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_lifecycle=0&p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_col_count=1&p_p_col_id=column-2&p_p_state=normal&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicId=8658&p_p_mode=view Acessado em: 16/06/2022.

PEREZ-QUINTERO, A. L.; ORTIZ-CASTRO, M.; WU, G.; LANG, J. M.; LIU, S.; CHAPMAN, T. A.; CHANG, C.; ZIEGLE, J.; PENG, Z.; WHITE, F. F.; PLAZAS, M. C.; LEACH, J. E.; BRODERS, K. Genomic acquisitions in emerging populations of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* infecting corn in the U.S. and Argentina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1161–1173, 2020.

PÉROS, J. P.; GIRARD, J. C.; LOMBARD, H.; JANSE, J. D.; BERTHIER, Y. Variability of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* from sugarcane and other gramineae in Reunion Island. Characterization of a different xanthomonad. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v.142, p. 177–188, 1994.

PINTO, N.F.J.A.; FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Milho: Controle de Doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de Doenças de plantas**: Grande culturas. Viçosa, p. 821-863. 1997.

PLAZAS, M. C.; ROSSI, R. L. DE; BRÜCHER, E.; GUERRA, F. A.; VILARÓ, M.; GUERRA, G. D.; WU, G.; ORTIZ-CASTRO, M. C.; BRODERS, K. First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 1026, 2018.

PRÍNCIPE, A.; FERNANDEZ, M.; TORASSO, M.; GODINO, A.; FISCHER, S. Effectiveness of tailocins produced by *Pseudomonas fluorescens* SF4c in controlling the bacterial-spot disease in tomatoes caused by *Xanthomonas vesicatoria*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 212–213, p. 94–102, 2018.

POTNIS, N.; KRASILEVA, K.; CHOW, V.; ALMEIDA, N. F.; PATIL, P. B.; RYAN, R.

P.; SHARLACH, M.; BEHLAU, F.; DOW, J. M.; MOMOL, M.; WHITE, F. F.; PRESTON, J. F.; VINATZER, B. A.; KOEBNIK, R.; SETUBAL, J. C.; NORMAN, D. J.; STASKAWICZ, B. J.; JONES, J. B. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. **BMC Genomics**, Londres, v. 12, p. 146, 2011.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E. Eastern and southern African strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* are distinguishable by restriction fragment length polymorphism of DNA and polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, p. 113-121, 1992.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E.; NOWELL, D. C. Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zearae* can be distinguished from other pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 12, p. 183-186, 1990.

QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S. X.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; LU, L. F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D. J.; TANG, H.; WU, W.; HAO, P.; WANG, L.; JIANG, B. L.; ZENG, S.; GU, W. Y.; LU, G.; RONG, L.; TIAN, Y.; YAO, Z.; FU, G.; CHEN, B.; FANG, R.; QIANG, B.; CHEN, Z.; ZHAO, G. P.; TANG, J. L.; HE, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 757-67, 2005.

QIU, Y.; KAISER, C.; SCHMIDT, C.; ROBERTSON, A.; JAMANN, T. M. Identification of quantitative trait loci associated with maize resistance to bacterial leaf streak. **Crop Science**, Madison, v. 60, p. 226-237, 2020.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; DE BRUIJN, F. J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 1098-1111, 2005.

RASKO, D. A.; ALTHERR, M. R.; HAN, C. S.; RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

RAZA, W.; FAHEEM, M.; YOUSAF, S.; FAHEEM, U. R.; YAMIN, M. Volatile and nonvolatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Journal of Materials Science Letters**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2013.

RICHARD, D.; BOYER, C.; JAVEGNY, S.; BOYER, K.; GRYGIEL, P.; PRUVOST, O.; RIOUALEC, A. L.; RAKOTOBE, V.; IOTTI, J.; PICARD, R.; VERNIÈRE, C.; AUDUSSEAU, C.; FRANÇOIS, C.; OLIVIER, V.; MOREAU, A.; CHABIRAND, A. First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotype a causing Asiatic Citrus canker in Martinique, France. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, p. 1946, 2016a.

RICHARD, D.; TRIBOT, N.; BOYER, C.; TERVILLE, M.A.; BOYER, K.; JAVEGNY, S.; ROUX-CUVELIER, M.; PRUVOST, O.; MOREAU, A.; CHABIRAND, A.; VERNIÈRE, C. First report of copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotype a

causing Asiatic Citrus canker in Réunion, France. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, p. 503, 2016b.

RICHARD, D.; RAVIGNÉ, V.; RIEUX, A.; FACON, B.; BOYER, C.; BOYER, K.; GRYGIEL, P.; JAVEGNY, S.; TERVILLE, M.; CANTEROS, B. I.; ROBÈNE, I.; VERNIÈRE, C.; CHABIRAND, A.; PRUVOST, O.; LEFEUVRE, P. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 26, p. 2131-2149, 2017a.

RICHARD, D.; BOYER, C.; VERNIÈRE, C.; CANTEROS, B. I.; LEFEUVRE, P.; PRUVOST, O. Complete Genome Sequences of Six Copper-Resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Strains Causing Asiatic Citrus Canker, Obtained Using Long-Read Technology. **Genome Announcements**, Washington, v. 5, n. 12, 2017b.

ROBAINA, R. R.; LONGHI, T. V.; ZEFFA, D. M.; GONÇALVES, L. S.; LEITE JÚNIOR, R. Development of a protocol and a diagrammatic scale for quantification of bacterial leaf streak disease on young plants of maize. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 104, n. 11, 2020.

ROBERTS, M. S.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 44, p. 256–264, 1996.

ROBERTS, M. S.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 46, p. 470–475, 1996.

ROBERTS, M. R.; TAYLOR, J.E. Exploiting plant induced resistance as a route to sustainable crop production. In: Collinge, D.B. (Ed.) **Biotechnology for plant disease control**. Wiley Blackwell, New York and London. pp. 319–339. 2016.

ROMEIRO, R. S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas: Procedimentos**. Editora UFV, Viçosa. 2007.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.-J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M.-A. V.; BOGDANOVA, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, Berlim, v. 9, p. 344–355, 2011.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; LACY, G. H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (eds). **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. Third Edition. APS Press, Saint Paul. 373 p. 2013.

SHEIBANI-TEZERJI, R.; NAVEED, M.; JEHL, M. A.; SESSITSCH, A.; RATTEI, T.; MITTER, B. The genomes of closely related *Pantoea ananatis* maize seed endophytes having different effects on the host plant differ in secretion system genes and mobile genetic elements. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 440, 2015.

SHRESTHA, R. K.; ROSENBERG, T.; MAKAROVSKY, D.; ECKSHAIN-LEVI, N.; ZELINGER, E.; KOPELOWITZ, J.; SIKORSKI, J.; BURDMAN, S. Phenotypic variation in the plant pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli*. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 9, e73189, 2013.

SIVASHANKARI, S.; SHANMUGHAVEL, P. Comparative genomics - a perspective. **Bioinformatics**, Pondicherry, v. 1, n. 9, p. 376-378, 2007.

SMITH, D.; GROVES, C.; HUDELSON, B.; LUELOFF, S. Bacterial leaf streak of corn confirmed for the first time in Wisconsin. **Wisconsin Crop Manager Newsletter**. 2018.

SNIPEN, L.; ALMØY, T.; USSERY, D. W. Microbial comparative pan-genomics using binomial mixture models. **BMC Genomics**, Londres, v. 10, p. 385, 2009.

SOARES, P. L. M. Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos. Tese de doutorado, Jaboticabal, 252 p., 2006.

SOUZA, L. T.; PEREIRA, J. A. R.; SOUZA, T. T. Avaliação da Produtividade de milho e controle de doenças foliares. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v7n32015700> Acesso em: 07/05/2021.

SOYLU, S.; SOYLU, E. M.; KURT, Ş.; EKICI, Ö. K. Antagonistic potentials of rhizosphere-associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dubai, v. 8, p. 43–48, 2005.

STENBERG, J. A.; SUNDH, I.; BECHER, P. G.; BJÖRKMAN, C.; DUBEY, M.; EGAN, P. A. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, Amsterdam, v. 94, p. 665–676, 2021.

STUDHOLME, D. J.; KEMEN, E.; MACLEAN, D.; SCHORNACK, S.; ARITUA, V.; THWAITES, R.; GRANT, M.; SMITH, J.; JONES, J. D. G. Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 310, p. 182-192, 2010.

STUDHOLME, D. J.; WICKER, E.; ABRARE, S. M.; ASPIN, A.; A BOGDANOVE, A.; BRODERS, K.; DUBROW, Z.; GRANT, M.; JONES, J. B.; KARAMURA, G.; LANG, J.; LEACH, J.; MAHUKU, G.; NAKATO, G. V.; COUTINHO, T.; SMITH, J.; BULL, C. T. Transfer of *Xanthomonas campestris* pv. *arecae*, and *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* to *Xanthomonas vasicola* (Vauterin) as *Xanthomonas vasicola* pv. *arecae* comb. nov., and *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* comb. nov. and description of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* pv. nov. **Phytopathology**, Saint Paul, v.110, n. 6, p. 1153-1160, 2020.

STULBERG, M.; SANTILLANA, G.; STUDHOLME, D. J.; KASIBORSKI, B.; ORTIZ-CASTRO, M.; BRODERS, K.; ARIAS, S. L.; BLOCK, C. C.; MUNKVOLD, G. P.; RASCOE, J. Genomics-informed molecular detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains causing severe bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1174. 2020.

TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIESLEWICZ, M. J.; DONATI, C.; MEDINI, D.; WARD, N. L.; ANGIUOLI, S. V.; CRABTREE, J.; JONES, A. L.; DURKIN, A. S.; DEBOY, R. T.; DAVIDSEN, T. M.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; MARGARIT Y ROS, I.; PETERSON, J. D.; HAUSER, C. R.; SUNDARAM, J. P.; NELSON, W. C.; MADUPU, R.; BRINKAC, L. M.; DODSON, R. J.; ROISOVITZ, M. J.; SULLIVAN, S. A.; DAUGHERTY, S. C.; HAFT, D. H.; SELENGUT, J.; GWINN, M. L.; ZHOU, L.; ZAFAR, N.; KHOUR, I H.; RADUNE, D.; DIMITROV, G.; WATKINS, K.; O'CONNOR, K. J.; SMITH, S.; UTTERBACK, T. R.; WHITE, O.; RUBENS, C. E.; GRANDI, G.; MADOFF, L. C.; KASPER, D. L.; TELFORD, J. L.; WESSELS, M. R.; RAPPUOLI, R.; FRASER, C. M. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 39, p.13950–13955, 2005.

TETTELIN, H.; RILEY, D.; CATTUTO, C.; MEDINI, D. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 472–477, 2008.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Biocontrol**, Berlim, v. 2, p. 194–208, 2006.

TIMILSINA, S.; POTNIS, N.; NEWBERRY, E. A.; LIYANAPATHIRANAGE, P.; IRUEGAS-BOCARD, F.; WHITE, F. F.; GOSS, E. M.; JONES, J. B. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, Berlim, v. 18, p. 415-427, 2020.

TOUCHON, M.; HOEDE, C.; TENAILLON, O.; BARBE, V.; BAERISWYL, S.; BIDET, P.; BINGEN, E.; BONACORSI, S.; BOUCHIER, C.; BOUVET, O.; CALTEAU, A.; CHIAPELLO, H.; CLERMONT, O.; CRUVEILLER, S.; DANCHIN, A.; DIARD, M.; DOSSAT, C.; KAROU, M. E.; FRAPY, E.; GARRY, L.; GHIGO, J. M.; GILLES, A. M.; JOHNSON, J.; LE BOUGUÉNEC, C.; LESCAT, M.; MANGENOT, S.; MARTINEZ-JÉHANNE, V.; MATIC, I.; NASSIF, X.; OZTAS, S.; PETIT, M. A.; PICHON, C.; ROUY, Z.; RUF, C. S.; SCHNEIDER, D.; TOURET, J.; VACHERIE, B.; VALLENET, D.; MÉDIGUE, C.; ROCHA, E. P.; DENAMUR, E. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genetics**, São Francisco, v, 5, p. e1000344, 2009.

TROJAN, D, G. Manejo de doenças na cultura do milho; óleos essenciais, fungicidas e híbridos. UENP, 2016. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/2306/1/DAIANE%20GARABELI%20TROJAN.pdf> Acesso em: 27/08/2021.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética: 2017.

TUSHEMERWE, W.; KANGIRE, A.; SSEKIWOKO, F.; OFFORD, L. C.; CROZIER, J.; BOA, E.; RUTHERFORD, M.; SMITH, J. J. First report of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* on banana in Uganda. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, p. 802–802, 2004.

USDA – United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service.

Grain: World Markets and Trade. Novembro, 2021.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 45, p. 472–489, 1995.

VAN SLUYS, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MIYAKI, C. Y.; FURLAN, L. R.; CAMARGO, L. E.; DA SILVA, A. C.; MOON, D. H.; TAKITA, M. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. A.; FERRO, M. I.; DA SILVA, F. R.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H.; LEMOS, M. V.; EL-DORRY, H.; TSAI, S. M.; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R., SIQUEIRA, W. J.; COUTINHO, L. L.; KIMURA, E. T.; FERRO, E. S.; HARAKAVA, R.; KURAMAE, E. E.; MARINO, C. L.; GIGLIOTI, E.; ABREU, I. L.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BAIA, G. S.; BLANCO, S. R.; BRITO, M. S.; CANNAVAN, F. S.; CELESTINO, A. V.; DA CUNHA, A. F.; FENILLE, R. C.; FERRO, J. A.; FORMIGHIERI, E. F.; KISHI, L. T.; LEONI, S. G.; OLIVEIRA, A. R.; ROSA, V. E. JR.; SASSAKI, F. T.; SENA, J. A.; DE SOUZA, A. A.; TRUFFI, D.; TSUKUMO, F.; YANAI, G. M.; ZAROS, L. G.; CIVEROLO, E. L.; SIMPSON, A. J.; ALMEIDA, N. F. JR.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 3, p. 1018-1026, 2003.

VAN LENTEREN, J. C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W. J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **Biocontrol**, Berlim, v. 63, n. 1, p. 39-59, 2018.

VOJNOV, A. A.; DO AMARAL, A. M.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 87, p. 467–477, 2010.

WASUKIRA, A.; COULTER, M.; AL-SOWAYEH, N.; THWAITES, R.; PASZKIEWICZ, K.; KUBIRIBA, J.; SMITH, J.; GRANT, M.; STUDHOLME, D. J. Genome sequencing of *Xanthomonas vasicola* pathovar *vasculorum* reveals variation in plasmids and genes encoding lipopolysaccharide synthesis, Type-IV Pilus and Type-III secretion effectors. **Pathogens**, Basel, v. 3, n. 1, p. 211-37, 2014.

WASUKIRA, A.; TAYEBWA, J.; THWAITES, R.; PASZKIEWICZ, K.; ARITUA, V.; KUBIRIBA, J.; SMITH, J.; GRANT, M.; STUDHOLME, D. J. Genome-wide sequencing reveals two major sub-lineages in the genetically monomorphic pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *musacearum*. **Genes**, Basiléia, v. 3, p. 361-377, 2012.

WISOTZJSEY, J. D.; JURTSUK, P. J.; FOX, G. E.; DEINHARD, G.; PORALLA, K. Comparative Sequence Analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 42, n. 2, 1992.

XU, J. Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 15, p. 1713-1731, 2006.

XU, J.; ZHENG, H. J.; LIU, L.; PAN, Z. C.; PRIOR, P.; TANG, B.; XU, J. S.; ZHANG, H.; TIAN, Q.; ZHANG, L. Q.; FENG, J. Complete genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* strain Po82. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n. 16, p. 4261–4262, 2011.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, p. 153-177, 1978.

ZHANG, Y.; JALAN, N.; ZHOU, X.; GOSS, E.; JONES, J. B.; SETUBAL, J. C.; DENG, X.; WANG, N. Positive Selection is the Main Driving Force for Evolution of Citrus Canker-Causing *Xanthomonas*. **The ISME Journal**, Berlim, v. 9, p. 2128–2138, 2015.

ZHAO, Q.; RAN, W.; WANG, H.; LI, X.; SHEN, Q.; SHEN, S.; XU, Y. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IV1. **Biological Control**, Amsterdam, v. 58, p. 283–292, 2013.

ZWICK, M.; E.; JOSEPH, S. J.; DIDELOT, X.; CHEN, P. E.; BISHOP-LILLY, K. A.; STEWART, A. C.; WILLNER, K.; NOLAN, N.; LENTZ, S.; THOMASON, M. K.; SOZHAMANNAN, S.; MATECZUN, A. J.; DU, L.; READ, T. D. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. **Genome Research**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 1512-1524, 2012.

3 ARTIGO A: Comparative genomic of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causal agent of bacterial leaf streak of corn in Brazil

Izabela Moura Duin^{1*}, Vanessa Hitomi Sugahara Rodrigues²; José Huguet-Tapia³;
Jeffrey Bryant Jones³; Rui Pereira Leite Jr.²; Maria Isabel Balbi-Peña¹

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil; ²Área de Proteção de Plantas, Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná, Londrina, PR, Brasil; ³Plant Pathology Department, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

*Corresponding author: izabeladuin@hotmail.com

ABSTRACT

Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* (*Xvv*) are the causal agent of bacterial leaf streak of corn. This disease has already been reported in South Africa in 1949 and recently in U.S.A., Argentina, and Brazil. We performed the genome sequencing of six Brazilian *Xvv* strains isolated from corn leaves with typical bacterial leaf streak symptoms in order to confirm their identity and to carry out a comparative genomic study to understand the relationship among *Xvv* strains, as well as with others *X. vasicola* pathovars. We compared the Brazilian *Xvv* strains with 12 genomes of *X. vasicola*. The G+C (%) content of the six *Xvv* strains ranged from 63.25% up to 63.30%. Our comparative analysis revealed that the genomes of the Brazilian *Xvv* strains were highly similar, with similarities of 99.99%. The Brazilian *Xvv* strains were closely related to the corn strains from Argentina and South Africa, followed by the ones from U.S.A. A total of 3329 genes represented the core genome of the 18 *Xvv* strains. Genomic differences could be observed in the genes encoding protein secretion systems and genomic islands. The proteins virB4 and virD4 was present in all strains and they are located in a genomic island in the genome of the strains Arg4A and RL1. Other virb4 protein was present only in the genome of the strain Arg4A, NCPPB 4379 and NCPPB 2417 and did not show similarity with typical T4SS of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. All the Brazilian *Xvv* corn strains analyzed did not have the bacterial effector *XopAF*, which was presented in the *Xvv* sugarcane strains. This is the first draft genome sequence of Brazilian *X. vasicola* pv. *vasculorum* corn strains.

Key words: Bacterial secretion systems, comparative genomics, draft genome, pangenome, *Zea mays*.

INTRODUCTION

Bacterial leaf streak of corn, caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*) (Cobb 1894), is a foliar disease that was recently reported for the first time in some important corn producing regions around the world and it has raised concerns for corn producers and technical people. The first report of bacterial leaf streak in corn (*Zea mays* L.) was in South Africa in 1949 (DYER, 1949). Recently, the disease was reported on corn in several states of the U.S.A. (DAMICONE *et al.*, 2018; JAMANN *et al.*, 2019; KORUS *et al.*, 2017; LANG *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2018), as well as in ten provinces of Argentina (PLAZAS *et al.*, 2018). In 2018, the presence of bacterial leaf streak was reported for the first time in Brazil, in corn fields in the West region of the state of Paraná (LEITE JR *et al.*, 2018; LEITE JR *et al.*, 2019). The molecular identification of *Xvv* RL1 strain isolated from corn leaves samples with bacterial leaf streak symptoms in Brazil was reported by Leite Jr *et al.* (2019). The confirmation of the bacterial pathogen was based on the analysis of polymerase chain reaction amplifying sequences of the 16S rDNA region, using the universal primers fD1 and rD1.

Identification of *Xvv* can be challenging, because the same bacterium can be isolated from different hosts and has a complex taxonomic history. In addition, there may be differences in symptoms and disease severity caused by isolates from different hosts, *i.e.* corn and sugarcane, biochemical and morphological differences are not enough to classify the strains in different species or pathovars (QHOBELA *et al.*, 1990). A subset of isolates, causing relatively severe symptoms on corn, could be differentiated from the sugarcane isolates by restriction fragment length polymorphism, suggesting genomic differences between the two groups of strains (COUTINHO; WALLIS, 1991; QHOBELA; CLAFLIN, 1992; QHOBELA *et al.*, 1990). Recent whole-genome analysis showed that these differences led to distinct phylogenetic clustering of the corn isolates compared to the ones from sugarcane (WU *et al.*, 2019). Sugarcane isolates can still be found on corn, particularly when the two crops are grown in the same geographical area, but it is of major concern to growers if the strains causing severe symptoms on corn are present (COUTINHO; WALLIS, 1991).

Genome analyses provide reliable and high informative means to study phylogenetic relationships among prokaryotes. Several genomic analyses and bioinformatic tools are available today, and the values obtained are known as overall genome related indices (OGRIs) (CHUN; RAINEY, 2014). Multilocus sequence analysis (MLSA) and whole genome comparisons are now a regular tool for classification of bacteria (ALMEIDA *et al.*, 2010; JACQUES *et al.*, 2016; LANGLOIS *et al.*, 2017; YOUNG *et al.*, 2008). Calculations of average nucleotide identity (ANI) from draft genomes are a widely accepted baseline for taxonomic placement of prokaryotes (BULL; KOIKE, 2015). While these tools are useful for placement of organisms into a common species (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009), the assignment of plant pathogens as pathovars still requires determining the organism's capacity to cause disease on reciprocal hosts compared with pathotype strains of several pathovars (YOUNG, 2001). This is complicated if a pathogen can infect multiple hosts, as in the case of the *X. vasicola* complex.

Thus, genomics is a powerful approach to develop diagnostic tools for the rapid and accurate disease diagnosis needed to inform disease mitigation strategies (LANG *et al.*, 2017). Due to the recent report of the disease in Brazil, there is still no information available on the genetic diversity and evolutionary aspects of *Xvv* that occurs in the Brazilian corn fields causing bacterial leaf streak. Hence, genome sequences of *Xvv* may provide important information on the aspects of its biology, including insights into the molecular mechanisms underlying its pathogenicity.

Considering the growing importance of bacterial leaf streak of corn in important producing regions of this cereal in Brazil and the limited information regarding the causal agent, the disease and its phylogenetic relationships, we turn available the draft genome sequence of six Brazilian strains of *X. vasicola* pv. *vasculatorum*. In this study, we used comparative genomic approaches to compare corn bacterial leaf streak isolates from Brazil to determine the phylogenetic relationships with other *Xanthomonas* pathovars.

MATERIALS AND METHODS

Source of the isolates

The six strains included in this study belong to the collection of phytopathogenic microorganisms of the Laboratory of Bacteriology of the *Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR/Emater (IDR/Paraná)*, Londrina, PR, Brazil. The strains were isolated from corn leaves with typical symptoms of bacterial leaf streak collected in crop fields in the western region of the state of Paraná, Brazil (LEITE JR. *et al.*, 2018; 2019). The isolates were tested for their pathogenicity in corn plants cv IPR 164, following the protocol described by Robaina *et al.* (2020). All isolates induced typical symptoms of bacterial leaf streak.

Twelve genomes of *Xanthomonas vasicola* of different hosts and pathovars, including one genome of *X. vasicola* pv. *musacearum*, were used in the comparative genomics and the phylogenetic analysis (Table 1).

Genome sequencing, assembly, and annotation

The *Xvv* isolates were cultivated in nutrient agar (NA) culture medium for 48 hours at 28 °C. After activation, the isolates were grown in nutrient broth (NB) at 28 °C for 16 h at 200 rpm agitation. The pellet obtained from 1 mL of bacterial suspension was used for total DNA extraction following the standard protocol of DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sequencing of RL1 strain was carried out on the Illumina MiSeq platform, using the MiSeq version 3 reagent kit (600-cycle, Illumina, San Diego, California, USA) in the Soil Biotechnology Laboratory of Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brazil.

For the other five *Xvv* Brazilian strains, 11.1, 11.11, 13.10, 16.11 e 34, high molecular weight genomic DNA was extracted using a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). The Microbial Genome Sequencing Center (Pittsburgh, PA, USA) performed the library preparation and sequencing using the MiSeq Illumina sequencing NextSeq 2000 platform.

The sequences quality of the raw reads was analyzed using the FastQC (ANDREWS, 2010), then trimmed using the Trim Galore! (v. 0.6.5) (KRUEGER, 2019). Clean reads were subjected to *De Novo* assembly using SPAdes

Table 1. List of *Xanthomonas vasicola* pathovars and strains included in this study.

Specie/Pathovar	Strain	GenBank accession	Origin	Host	Reference
<i>Xanthomonas vasicola</i>	-	-	-	-	-
pv. <i>vasculorum</i>	RL1	-	Brazil	<i>Zea mays</i>	This study
pv. <i>vasculorum</i>	11.1	-	Brazil	<i>Zea mays</i>	This study
pv. <i>vasculorum</i>	11.11	-	Brazil	<i>Zea mays</i>	This study
pv. <i>vasculorum</i>	13.10	-	Brazil	<i>Zea mays</i>	This study
pv. <i>vasculorum</i>	16.11	-	Brazil	<i>Zea mays</i>	This study
pv. <i>vasculorum</i>	34	-	Brazil	<i>Zea mays</i>	This study
pv. <i>vasculorum</i>	NE744	NZ_VOCJ01000001.1	USA	<i>Zea mays</i>	Lang <i>et al.</i> (2017)
pv. <i>vasculorum</i>	Xv1601	NZ_CP025272.1	USA	<i>Zea mays</i>	Unpublished
pv. <i>vasculorum</i>	SAM119 ^a	NZ_CP028127.1	South Africa	<i>Zea mays</i>	Lang <i>et al.</i> (2017)
pv. <i>vasculorum</i>	CO-5	NZ_VOBV01000001.1	USA	<i>Zea mays</i>	Perez-Quintero <i>et al.</i> (2020)
pv. <i>vasculorum</i>	Arg-4A	NZ_PYTE01000109.1	Argentina	<i>Zea mays</i>	Direct Submission
pv. <i>vasculorum</i>	X01	NZ_DUWK01000001.1	South Africa	<i>Zea mays</i>	Sanko <i>et al.</i> (2018)
pv. <i>vasculorum</i>	NCPFB 1326 ^b	NZ_KB373155.1	South Africa	<i>Saccharum officinarum</i>	Wasukira <i>et al.</i> (2012)
pv. <i>vasculorum</i>	NCPFB 1381	NZ_KB373240.1	South Africa	<i>Saccharum officinarum</i>	Wasukira <i>et al.</i> (2012)
pv. <i>holcicola</i>	Mex-1	NZ_VOCG01000001.1	México	<i>Sorghum sp.</i>	Perez-Quintero <i>et al.</i> (2020)
pv. <i>holcicola</i>	NCPFB 2417 ^c	NZ_JSBW02000027.1	New Zealand	<i>Sorghum bicolor</i>	Unpublished
pv. <i>arecae</i>	NCPFB 902	NZ_CP034657.1	Sri Lanka	<i>Tripsacum laxum</i>	Unpublished
pv. <i>musacearum</i>	NCPFB 4379	NZ_CP034655.1	Uganda	<i>Musa sp.</i>	Wasukira <i>et al.</i> (2012)

^a*Xanthomonas vasicola* pathotype strain. ^b*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* sugarcane reference strain. ^c*Xanthomonas vasicola* type strain.

incorporate in the Unicycler pipeline (WICK *et al.*, 2017). The quality of the subsequent assemblies and the genome G+C contents were assessed using the QUAST (GUREVICH *et al.*, 2013). Open reading frames and RNA genes were identified by the Prokka (SEEMANN, 2014).

Phylogenomic analyses

A heatmap was generated with the genome sequences of RL1 strain and the other *Xanthomonas vasicola* related strains, using the OrthoANI values calculated from the OAT software (LEE *et al.*, 2016). Subsequently, an in-depth phylogenetic analysis was performed using the ANIm method of pyani, generating a percentage of identity ANI matrix (<https://github.com/widdowquinn/pyani> v0.2.11; last accessed December 05, 2021) (PRITCHARD *et al.*, 2016), as described by Richter and Rosselló-Móra (2009).

Roary software (PAGE *et al.*, 2015) was used to carry out pan-genome analyses for species. All genomes used for Roary were annotated by Prokka (SEEMANN, 2014). The tree was built using an alignment of the core genome sequences with 70% BLAST ID derived from the Roary, based on the maximum likelihood method and bootstrapped 100 times using RaxML-NG (KOZLOV *et al.*, 2019). All visualizations of the phylogenetic trees were reconstructed with the FigTree program (RAMBAUT, 2018) version 1.4.4.

Gene composition

With the output file generated with 70% BLAST ID from Roary software, it was possible to search for genes of interest in the genomes and differences in the gene composition between genomes. A Venn diagram was created, using the web-based tool InteractiVenn (HEBERLE *et al.*, 2015) with the present genes in the genomes.

Alien Hunter software (version 1.7) was performed to detect signatures of horizontal gene transfer and genomic islands (VERNIKOS; PARKHILL,

2006). The data was visualized using Artemis (version 18.1.0) (RUTHERFORD *et al.*, 2000).

For *xopAF* detection, a 25 μ l PCR reaction was performed including 1 μ l 10 μ M of each primer *xopAF_F* (5' CCATTGCCATTGCTAGCACC 3') and *xopAF_R* (5' TATTCGACGGTTCCCACTGC 3') (LANG *et al.*, 2017), 15.7 μ l water, 5 μ l 5x GoTaq reaction buffer, 0.75 μ l 25 mM MgCl₂, 0.5 μ l 10 mM dNTP, and 0.05 μ l GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA). The optimized cycling conditions were an initial denaturation at 94 °C for 3 min followed by 30 cycles at 94 °C for 30 sec, annealing temperature at 60 °C for 30 sec, 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min (LANG *et al.*, 2017).

RESULTS

Genome assembly and annotation

The draft genomes were deposited in the GenBank database and received accession numbers (Table 2).

Table 2. Draft genome characteristics of the sequencing and assembly of six *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains from Brazil causing bacterial leaf streak of corn.

Attribute	<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> strain					
	RL1	11.1	11.11	13.10	16.11	34
Total length (pb)	4,813,893	4,769,748	4,704,698	4,741,321	4,762,140	4,735,769
G+C (%)	63.27	63.28	63.25	63.30	63.27	63.28
Contigs	129	93	103	121	106	114
N50	187,199	114,834	112,090	83,919	114,507	130,162
L50	10	12	12	17	13	11
Largest contig	349,678	453,682	443,968	295,799	453,677	454,371
CDS	4,695	4,646	4,603	4,663	4,659	4,617
RNA	54	48	57	48	54	48
GenBank accession no.						

The genome assembly of RL1 strain allowed a coverage of 98x assembled in 129 contigs, with an *N50* of 187,199 and an *L50* of 10. The RL1 genome was estimated to have 4,813,893 bp, and the Prokka annotation

(SEEMANN, 2014) identified 4,146 coding DNA sequences (CDSs). The statistical data for the other five *Xvv* strains can be seen in the Table 2.

The G+C content of RL1 strain was estimated in 63.2%, which is very similar to the content of the others *X. vasicola* pv. *vasculorum* strains from Brazil (Table 2), and the one from the United States (LANG *et al.*, 2017). Further, these G+C contents are typical for *Xanthomonas* spp. strains (ROUX *et al.*, 2015).

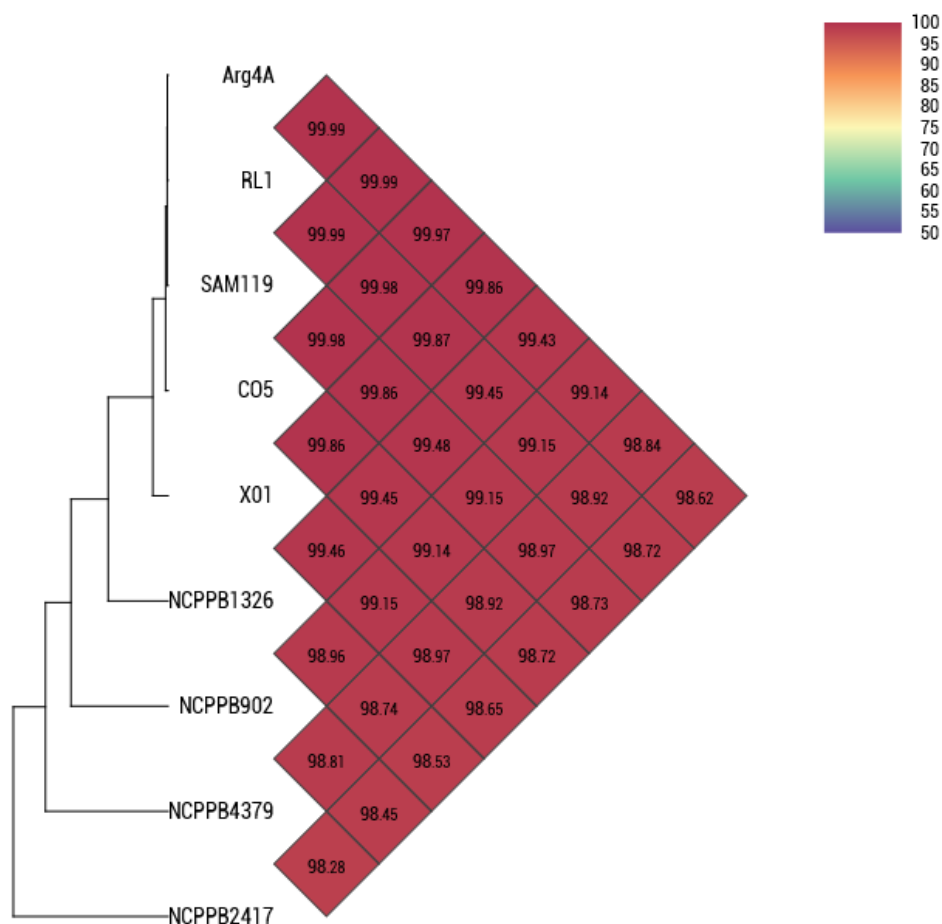
Phylogenomic analysis

In the heatmap of OrthoANI, Arg 4A, RL1 and SAM119 strains were clustered together, followed by CO-5 strain from USA and X01 strain from South Africa and followed by NCPPB 1326, NCPPB 902, NCPPB 4379 and NCPPB 2417 (Figure 1).

The ANI matrix (Figure 2) showed results similar to those obtained in the heatmap generated by the OrthoANI analyses. This matrix revealed a higher similarity among all corn and sugar cane *Xvv* strains (*i.e.*, NCPPB 1326 and NCPPB 1381), and lower similarity with *X. v. pv. musacearum* (NCPPB 4379), *X. v. pv. arecae* (NCPPB 902) and *Xvh* (Mex1 and NCPPB 2417). In the ANI matrix, the *Xvv* strains were divided in tree groups, *i.e.*, the sugar cane strains, the X01 strain of corn from South Africa and all the others *Xvv* strains from corn (Figure 2).

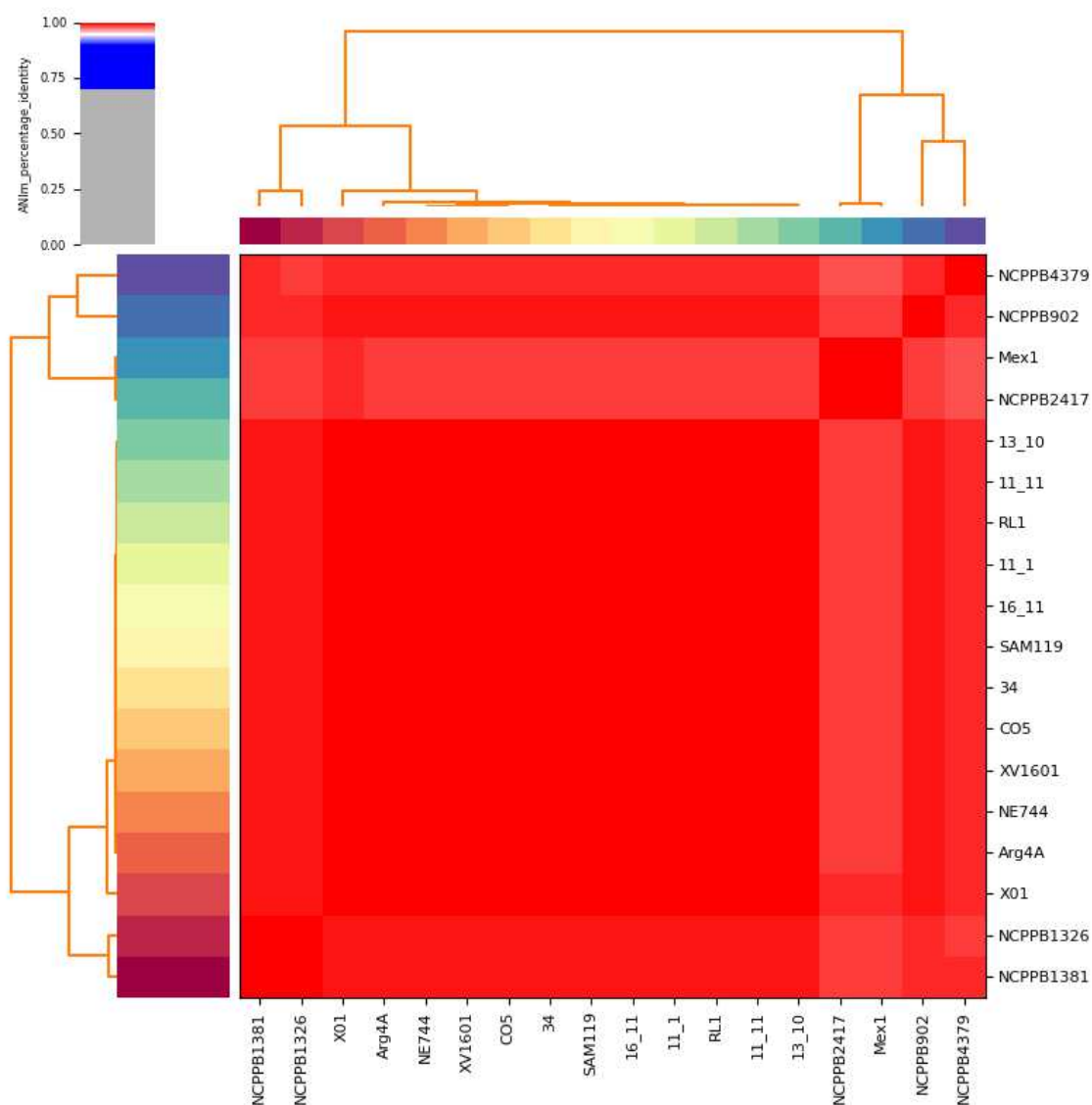
The phylogenetic tree reconstructed showed that all *Xvv* strains were in the same clade, but two major groups were formed (Figure 3). The first cluster comprised all corn *Xvv* strains, and the second, two sugarcane *Xvv* strains (*i.e.* NCPPB 1326 and NCPPB 1381). The six Brazilians *Xvv* corn strains analyzed were closely related with the Arg-4 and SAM119 corn strains, from Argentina and South Africa, respectively. In the next clade, there are *Xvv* corn strains from the USA: strains NE744, CO5 and XV1601; followed by *Xvv* corn strain X01 from South Africa. The other clades include all the other *Xvv* strains, NCPPB 902 (*X. vasicola* pv. *arecae*) and NCPPB 4379 (*X. vasicola* pv. *musacearum*); and finally, *Xvh* strains, Mex1 and NCPPB 2417.

Figure 1: Heatmap generated with the OrthoANI values calculated by OAT software for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strain RL1 and closely related *Xanthomonas vasicola* strains.



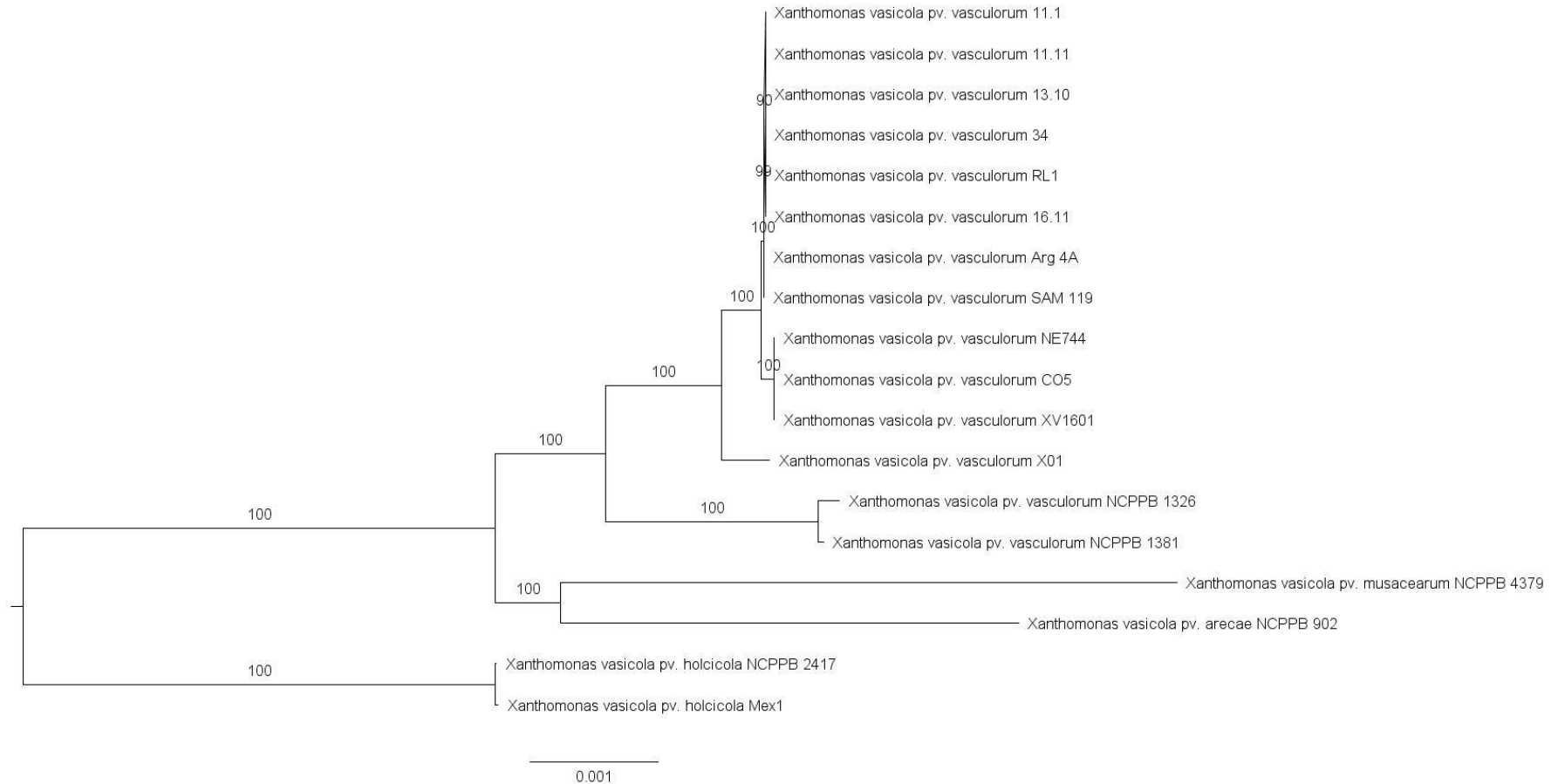
Arg4A (NZ_PYTE01000109.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. RL1: *X. vasicola* pv. *vasculorum* strain isolate from corn in Brazil. SAM119 (NZ_CP028127.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. CO5 (NZ_VOBV01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. X01 (NZ_DUWK01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NCPPB 1326 (NZ_KB373155.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NCPPB 902 (NZ_CP034657.1): *X. vasicola* pv. *arecae*. NCPPB 4379 (NZ_CP034655.1): *X. vasicola* pv. *musacearum*. NCPPB 2417 (NZ_JSBW02000027.1): *X. vasicola* pv. *holcicola*.

Figure 2. Identity ANI matrix for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains from Brazil and closely related *Xanthomonas vasicola* pathovars.



NCPPB 4379 (NZ_CP034655.1): *X. vasicola* pv. *musacearum*. NCPPB 902 (NZ_CP034657.1): *X. vasicola* pv. *arecae*. Mex1 (NZ_VOCG01000001.1): *X. vasicola* pv. *holcicola*. NCPPB 2417 (NZ_JSBW02000027.1): *X. vasicola* pv. *holcicola*. 34; 16_11; 11_1; 11_11; 13_10 and RL1: *X. vasicola* pv. *vasculorum* strains isolate from corn in Brazil. SAM119 (NZ_CP028127.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. CO5 (NZ_VOBV01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. XV1601 (NZ_CP025272.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NE744 (NZ_VOCJ01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. Arg4A (NZ_PYTE01000109.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. X01 (NZ_DUWK01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NCPPB 1326 (NZ_KB373155.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NCPPB 1381 (NZ_KB373240.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*.

Figure 3: Phylogenetic tree reconstructed for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains from Brazil and closely related *Xanthomonas vasicola* pathovars.



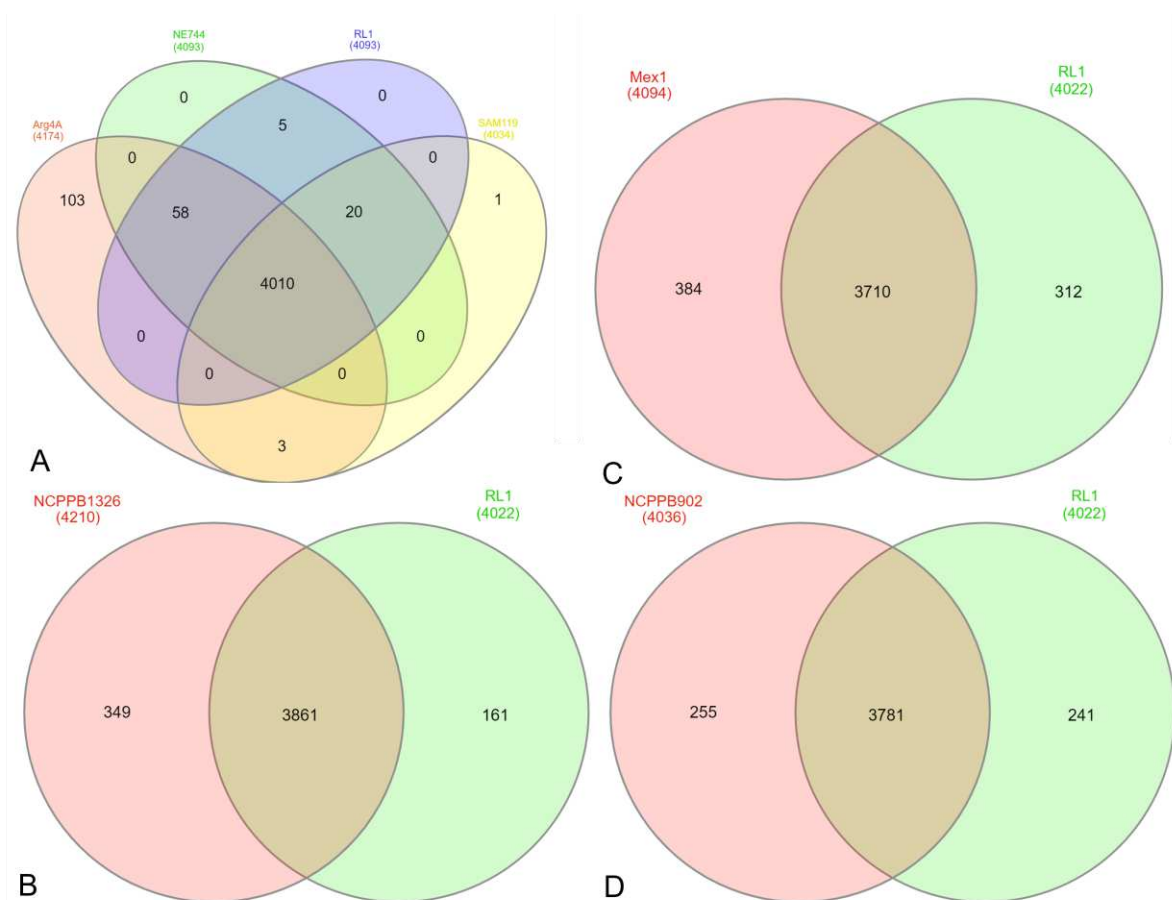
11.1; 11.11; 13.10; 34; RL1 and 16.11: *X. vasicola* pv. *vasculorum* strains isolate from corn in Brazil. Arg4A (NZ_PYTE01000109.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. SAM119 (NZ_CP028127.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NE744 (NZ_VOCJ01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. CO5 (NZ_VOBV01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. XV1601 (NZ_CP025272.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. X01 (NZ_DUWK01000001.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NCPBP 1326 (NZ_KB373155.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NCPBP 1381 (NZ_KB373240.1): *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NCPBP 902 (NZ_CP034657.1): *X. vasicola* pv. *arecae*. NCPBP 4379 (NZ_CP034655.1): *X. vasicola* pv. *musacearum*. NCPBP 2417 (NZ_JSBW02000027.1): *X. vasicola* pv. *holcicola*. Mex1 (NZ_VOCG01000001.1): *X. vasicola* pv. *holcicola*.

Gene composition

We clustered the orthologous groups of the genes predicted in the 18 genomes of this study to identify the core genome using Roary software (PAGE *et al.*, 2015). A total of 3,329 genes were common to all strains and are going to be referred as the core genome.

A Venn diagram was built to illustrate the sharing of the orthologous genes by four *Xv* genomes, Arg4A, NE744, RL1 and SAM119 (Figure 4A).

Figure 4. Venn diagrams showing the sharing of orthologous genes for: (A) *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains Arg4A (Argentina), NE744 (USA), RL1 (Brazil) and SAM119 (South Africa); (B) *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains NCPPB 1326 (isolate from sugarcane) and RL1 (isolate from corn); (C) *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola* strain Mex1 and *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strain RL1; and (D) *Xanthomonas vasicola* pv. *arecae* strain NCPPB 902 and *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strain RL1.



They share 4,010 genes. Arg4a and SAM 119 have 103, and 1 unique gene, respectively, while NE744 and RL1 do not have unique genes. In the same way, a Venn diagram illustrating the sharing of the orthologous genes by NCPPB 1326 (*Xvv* strain from sugarcane) and *Xvv* RL1 was constructed and comprised 3,861 orthologous genes (Figure 4B). Another Venn diagram illustrating the sharing of the orthologous genes by *Xvh* Mex1 and *Xvv* RL1 was also constructed and total of 3,710 orthologous genes were identified (Figure 4C). Finally, a Venn diagram illustrating the sharing of the orthologous genes by NCPPB 902 (*Xanthomonas vasicola* pv. *arecae*) and *Xvv* RL1 was constructed with 3,781 orthologous genes (Figure 4D).

The presence of a type IV secretion system protein virB4_2 was identified only in the strains Arg 4A, NCPPB 4379 and NCPPB 2417 and absent in other strains. The results of the tblastn analysis confirmed that the protein virB4_2 was not present in the genome of the other strains used in this study. The protein virB4 present in the strains has ~96% of similarity with *Xanthomonas populi* (GenBank: PPU91361.1) and *Xanthomonas campestris* pv. *durantae* (GenBank: OOX05280.1) and 100% with *Xanthomonas vasicola* (NCBI Reference Sequence: WP_123184442.1).

All the 18 strains included in this study presented a type IV secretion system protein virB4 and a protein virD4, and also other secretion systems, like type II proteins E, F and G; and type III secretin. The proteins virB4 from RL1 and virB4_2 from Arg4A present 24% of similarity. The *Xvv* strain NCPPB 1326 from sugar cane has more 18 type IV secretion systems than the other strains from corn.

The strain RL1 had 58 genomic islands, with sizes ranging from 5,000 up to 40,000 pb, while the strain Arg4A had 69 genomic islands, with sizes ranging from 5,000 up to 45,000 pb (Table 3). In the strains Arg4A and RL1 the proteins virB4 and virD4 were in a genomic island in the genome based on the Alien Hunter sequence visualization and annotation tool (RUTHERFORD *et al.*, 2000).

Table 3. Number, size (bp) and type of genes in the genome islands present in the genomes of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains RL1 and Arg4A.

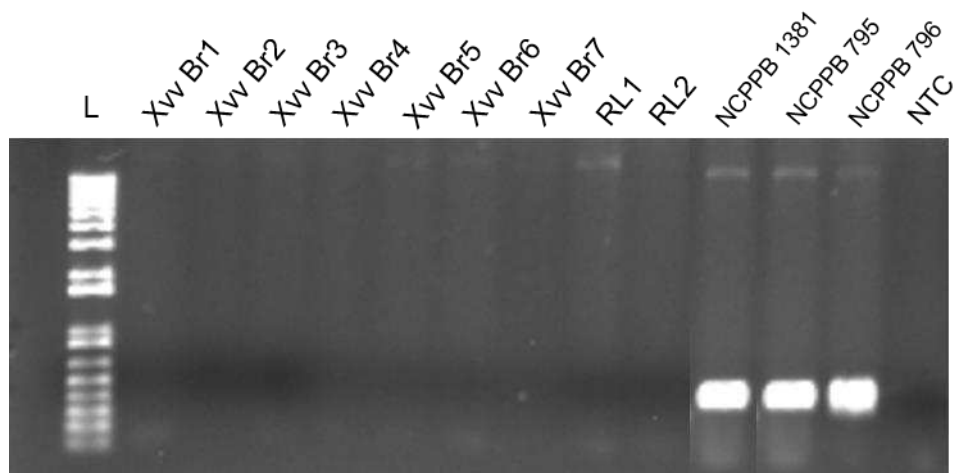
Island	Strain			
	RL1		Arg4A	
	Size (pb)	Type of gene	Size (pb)	Type of gene
1	27,500	virB4, ptlB, ptlF, virD4, uvrB, ppnN	5,000	nphR, cacC_1, kduD_1, aidA, mutS_2
2	5,000	nuoN, nuoM, nuoL	12,500	emrA_1, farB, lagD
3	5,000		7,500	
4	10,000	rhaS_1, argD_1	5,000	ligA, epmA
5	5,000		5,000	
6	7,500		7,500	norR
7	5,000		10,000	
8	7,500		15,000	egl_2, egl_3
9	5,000	mutS_1, aidA, kduD_1, nphR, bacC_1	5,000	recF, dnaN
10	37,500	katE, dinJ, hcaR	5,000	
11	22,500	cvaA_2, cvaA_3, apxIB_2	7,500	
12	5,000	Btub_11, hslO	5,000	
13	5,000	rcsC_9	7,000	
14	7,500	nicB_1, hopW1_1, pup, rpaR	7,500	oleA
15	7,500	nrdE, nrdB	5,000	
16	7,500	repA	5,000	
17	7,500	hutU, sldA	7,500	fadB_2, rpfC
18	7,500	intA_2	7,500	folE2, amiC, xylE
19	12,500	bgIB, lagD, farB	35,000	secY, rplo, prmD, rpsE, rplR, rplF, rpsH, rpsN, rplE, epIX, rplN, rplP, rpmC, rpsQ, rpsC, rplV, rpsS, rplB, rplW, rplD, rplC, rpsJ, tufa_1, fusA, rpsG, rpsL, rpoC, rpoB, rplL, rplJ, rplA, rplK, nusG, secE, tufA_2, ychF, pth
20	20,000	hin	5,000	hupB, ppiD, mltD

Island	Strain			
	RL1		Arg4A	
	Size (pb)	Type of gene	Size (pb)	Type of gene
21	5,000		7,500	moaA, bsn
22	10,000		10,000	purC, djIA
23	7,500	secF, secD	32,500	mnhE1, mrpF, mrpF, virB4_1, ptIB, ptIF, virD4, uvrB, ppnN
24	7,500	htpG_2, rsmD	5,000	nuoK, nuoL, nuoM
25	7,500	Map_2	5,000	
26	5,000		10,000	argD_1
27	12,500	kpsM, btuD_5, rmd, gmd, mshA_4	5,000	intA_1
28	7,500		7,500	cas4-cas1, cas2, fadD
29	7,500	glnE, pcp_3	5,000	
30	7,500	aceE, ding_2	15,000	
31	7,500	oleA, oleB	7,500	pvadh
32	7,500		5,000	
33	5,000		7,000	nanM, ble, por
34	5,000		10,000	coaE, outO, epsF, pile, speE_1, cptA,
35	5,000		7,500	
36	10,000	secY, rplO, rpmD, rpsE, rplR, rplF, rpsH, rpsN, rplE, rplX, rplN, rplP, rpmC, rpsQ, rpsC, rplV, rpsS, rplB, rplW, rplD, rplC, rpsJ	7,500	aceE, dinG_1
37	17,500	tufa_1, fusA, rpsG, rpsL, rpoC, ropB, rplL, rplJ, rplA, rplK, nusG, secE	32,000	dinJ, hcaR,
38	7,500		7,500	prtR
39	5,000		7,500	
40	5,000		10,000	dpnM, katE
41	7,500	moaA, ruvB_2	17,500	ipuC, metAA, phnW, gorB
42	5,000	hsdM	10,000	benM, nicB_1, alpha-LP, dpp5
43	7,500	Cas2, cas4-cas1	5,000	
44	15,000	btuB_24, btuB_25	5,000	

Island	Strain			
	RL1		Arg4A	
	Size (pb)	Type of gene	Size (pb)	Type of gene
45	5,000	fadB_2	5,000	
46	5,000	blue, por	5,000	pds
47	5,000	pilE, cptA, epsF, outO	20,000	cvaA_2, cvaA_3, xy13A_2, apxIB_3
48	5,000		5,000	gcvT, gcvH,
49	15,000	ipuC, meta, puuD_2, phnW, nicB_2	5,000	btuB_25
50	7,500	qorB	5,000	rcsc_14
51	5,000	amiC, folE2	7,500	rbn, nicB_2, hopW1_1, puuP
52	7,500	Man5A, regA, regB, pds	7,500	
53	7,500	fbp, nagR_2	7,500	fbp, azoR1
54	22,500	dmlR_6, azoR1, xerC_2,	20,000	nagR_2, xerC_2, soj_2
55	40,000	Probably region overlapping rRNA operon cavA_4, ltxB, btuB_31	7,500	
56	10,000	maa	7,500	
57	22,500	symE	12,500	nrdE, nrdB, panE, yadH_1
58	7,500		7,500	hutU
59	17,951		45,000	Probably region overlapping rRNA operon cvaA_4, btuB_28, ltxB, repA, guaA
60			22,500	
61			20,000	rhaS_2
62			15,000	
63			27,500	hin, fitB, maeB_2
64			25,000	symE
65			7,500	secF
66			7,500	
67			10,000	wapA
68			20,000	mshA_4, gmd, rmd, btuD_7 kpsM,
69			7,500	ompW 3

The presence of the bacterial effector *XopAF* in *Xv*v corn strains from Brazil was investigated. The effector gene was examined by PCR analysis using the *xopAF*-specific primers. No corn strain of *Xv*v from Brazil contains the effector *xopAF* (Figure 5). On the other hand, all sugarcane strains of *X. v. pv. vasculorum*, *i.e.* NCPPB 1381 from Zimbabwe, NCPPB 795 from South Africa, and NCPPB 796 from Mauritius, had the *xopAF* gene, regardless their geographic origin (Figure 5). The *Xv*v strains 1326 and 1381 have 100% of similarity with the sequence of gene *XopAF* (GenBank: ACHS01000051.1, bases 7184–7783; RefSeq: WP_010364039) and no hits were found in Brazilian *Xv*v strains.

Figure 5. Amplification of the *xopAF* gene from *Xanthomonas vasicola* *pv. vasculorum* strains. Lane L: 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); *Xv*v Br1, *Xv*v Br2, *Xv*v Br3, *Xv*v Br4, *Xv*v Br5, *Xv*v Br6, *Xv*v Br7, RL1 and RL2, Brazilian corn strains of *Xv*v; NCPPB 1381; NCPPB 795 and: NCPPB 796, sugarcane strains of *Xv*v; and NTC, no template control.



DISCUSSION

Results similar to the ones obtained in the present study for the genomic sequence of Brazilian strains of *Xv*v had also been reported for *Xv*v strains from the USA and Argentina in phylogenetic analysis using minimum spanning trees (MST) performed by Perez-Quintero *et al.* (2020). In both studies, *Xv*v strains from corn formed a closely related group, independent of the geographic origin and apart from the sugarcane strains.

The *Xvv* strains originating in Brazil were genetically very close to the Argentina ones and to the type strain SAM119 from South Africa, and less close to strains from the USA. According to Perez-Quintero *et al.* (2020), these results suggest a possible direct South African origin for the current bacterial leaf streak of corn epidemics in Argentina and, consequently, in Brazil, without the involvement of the strains present in the USA.

Perez-Quintero *et al.* (2020) reported that the Argentina's strains of *Xvv* were closely related to strains of *Xvh* and indicated that a horizontal transfer of prophage genes from *Xvh* to *Xvv* could have occurred in South America. In our study it was not possible to observe a relationship between the Brazilian *Xvv* strains and *Xvh*.

Based on the whole-genome SNP phylogenetic analysis, Stulberg *et al.* (2020) were able to delineate the *X. vasicola* clade in groups that correspond to the host pathogenicity. Interestingly, the corn isolates from the USA and the SAM119 strain formed a sub-group within the *Xvv* clade, consistent with other findings (WU *et al.* 2019). The focus was on a specific sequence that includes the 3' end of a predicted filamentous hemagglutinin (FHA) N-terminal domain-containing protein for detection assay design (STULBERG *et al.*, 2020).

The type IV secretion systems (T4SS) deliver DNA and/or proteins (effectors) into eukaryotic or bacterial targets (GONZALEZ-RIVERA; BHATTY; CHRISTIE, 2016; GROHMANN *et al.*, 2018; WAKSMAN, 2019). The T4SS apparatus typically consists of 12 proteins (VirB1 to VirB11 and VirD4) (GROHMANN *et al.*, 2018; CHRISTIE; WHITAKER; GONZALEZ-RIVERA, 2014; GHOSAL *et al.*, 2017). Many bacteria of the family Xanthomonadaceae carry a T4SS with unknown function but with several characteristics that distinguishes it from other T4SSs (ALEGRIA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2011). One of these distinguishing features is that the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* VirD4 protein (VirD4_{XAC2623}), a homologue of the coupling protein that recruits effectors to the T4SS for secretion (ALVAREZ-MARTINEZ; CHRISTIE, 2009), interacts with a set of uncharacterized *Xanthomonas* VirD4-interacting proteins (XVIPs) that contain a conserved C-terminal domain named XVIPCD (XVIP-conserved domain) (ALEGRIA *et al.*, 2005). Souza *et al.* (2015) showed that these XVIPs are toxins secreted by the *Xanthomonas* T4SS. Further, the secretion is dependent on the XVIPCD and this special T4SS, confers to

X. citri subsp. *citri* the capability to kill other Gram-negative cells in a contact-dependent manner, thereby providing a competitive growth advantage in mixed bacterial communities. Intriguingly, the *virB4* present in the RL1 strain and the *virB4_2*-encoded T4SS present in the strains Arg 4A, NCPPB 4379 and NCPPB 2417 show low similarity (~26%) with *VirB4* from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain 306 and *Xanthomonas vesicatoria* strain 85–10 T4SS. This point towards functional diversification of the T4SS among the *Xanthomonas* (DA SILVA *et al.*, 2002). On the other hand, the *virD4* from the RL1 strain presented 97% of similarity with the *VirD4*_{XAC2623}.

Genomic islands contribute to acquiring virulence genes, antimicrobial-resistance genes or genes that enable adaptation to a specific environment (JUHAS *et al.*, 2009). The presence of type VI secretion systems genes in genomic islands has been reported by Sarris *et al.* (2011) and Barbosa and Lery (2019). In agreement, we observed T4SS also in genomic islands.

The Brazilian *Xvv* strains included in this study did not show the presence of the *xopAF* gene, consistent with previous reports (STUDHOLME *et al.*, 2010; WASUKIRA *et al.*, 2014). Among the *Xvv* strains, only those from sugarcane contain the *xopAF* gene, an effector that may contribute to the host range and disease symptoms (STUDHOLME *et al.*, 2010; WASUKIRA *et al.*, 2014). Genome comparisons revealed variation among the *Xvv* isolates included in the study regarding the presence or absence of the *xopAF* gene that encodes the bacterial effector *XopAF* (STUDHOLME *et al.*, 2010; WASUKIRA *et al.*, 2014). The effector gene *xopAF* was reported in *X. euvesicatoria*, *X. translucens* pv. *translucens*, *X. citri* subsp. *citri* and *Xvv* from sugarcane but was absent in the strains of *Xvv* from corn, NCPPB206, and also in *X. v. pv. musacearum* (STUDHOLME *et al.*, 2010; WASUKIRA *et al.*, 2014; JALAN *et al.*, 2013).

CONCLUSIONS

This is the first draft genome sequence of *X. vasicola* pv. *vasculorum* isolates that cause bacterial leaf streak of corn in Brazil. The access to this information will allow future studies to further understand the biology of this

phytopathogen by comparison of its genome with those of other *X. vasicola* pv. *vasculorum* strains and *X. vasicola* pathovars. Availability of the genomic sequences may facilitate studies on interactions of the xanthomonads with corn. The information generated may also provide a source of sequences for molecular detection and diagnoses.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was granted by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (202819/2019-1 and 141213/2019-1) and the *Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR/Emater* (IDR/PR). We appreciate the collaboration of *Embrapa Soja*, Londrina, PR, Brazil, and the University of Florida, Gainesville, FL, USA.

REFERENCES

- ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H.; DA SILVA, A. C.; FARAH, C. S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 2315–2325, 2005.
- ALMEIDA, N. F.; YAN, S.; CAI, R.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN X.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant associated microbes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, p. 208–15, 2010.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; CHRISTIE, P. J. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 73, p. 775–808, 2009.
- ANDREWS, S. “FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data”, available at: [http:// www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) (accessed September 13, 2021) 2010.
- BARBOSA, V. A. A.; LERY, L.M.S. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation. **BMC Genomics** v. 20, p. 506, 2019.

- BULL, C. T.; KOIKE, S. T. Practical benefits of knowing the enemy: Modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, p. 157–180, 2015.
- CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the bacteria and archaea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Cambridge, v. 64, p. 316–324, 2014.
- CHRISTIE, P. J.; WHITAKER, N.; GONZALEZ-RIVERA, C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1843, p. 1578–1591, 2014.
- COUTINHO, T.; WALLIS, F. Bacterial streak disease of maize (*Zea mays* L.) in South Africa. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 133, p. 112–112, 1991.
- DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Berlin, v. 417, p. 459–463, 2002.
- DAMICONE, J.; CEVALLOS, F.; OLSON, J. First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Oklahoma. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, p. 437, 2018.
- DYER, R. A. Botanical surveys and control of plant diseases. **Farming in South Africa**, Pretoria, v. 24, n. 275, p. 119–121, 1949.
- GHOSAL, D.; CHANG, Y. W.; JEONG, K. C.; VOGEL, J. P.; JENSEN, G. J. In situ structure of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system by electron cryotomography. **EMBO Reports**, Heidelberg, v. 18, p. 726–732, 2017.
- GONZALEZ-RIVERA, C.; BHATTY, M.; CHRISTIE, P. J. Mechanism and function of type IV secretion during infection of the human host. **Microbiology Spectrum**, Washington, v. 4, p. VMBF-0024-2015, 2016.
- GROHMANN, E.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G.; BACKERT, S. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 107, p. 455–471, 2018.
- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies, **Bioinformatics**, Londres, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.
- HEBERLE, H.; MEIRELLES, G. V.; DA SILVA, F. R.; TELLES, G. P.; MINGHIM, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 16, p.169, 2015.
- JACQUES, M.-A.; ARLAT, M.; BOULANGER, A.; BOUREAU, T.; CARRÈRE, S.; CESBRON, S.; CHEN, N. W. G.; COCIANCICH, S.; DARRASSE, A.; DENANCÉ, N.; FISCHER-LE SAUX, M.; GAGNEVIN, L.; KOEBNIK, R.; LAUBER, E.; NOËL, L. D.; PIERETTI, I.; PORTIER, P.; PRUVOST, O.; RIEUX, A.; ROBÈNE, I.; ROYER, M.;

SZUREK, B.; VERDIER, V.; VERNIÈRE, C. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 54, p. 163–187, 2016.

JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, Londres, v. 14, p. 551, 2013..

JAMANN, T.; PLEWA, D.; MIDEROS, S.; BISSONNETTE, S. First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Illinois. **Plant Disease**, Saint Paul, v.103, p. 1018, 2019.

JUHAS, M.; VAN DER MEER, J. R.; GAILLARD, M.; HARDING, R. M, HOOD, D. W. et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 33:376–393, 2009.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 7, p. 2567-72, 2005.

KORUS, K.; LANG, J. M.; ADESEMOYE, A. O.; BLOCK, C. C.; PAL, N.; LEACH, J. E.; JACJSON-ZIEMS, T. A. First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, p. 1030, 2017.

KOZLOV, A. M.; DARRIBA, D.; FLOURI, T.; MOREL, B.; STAMATAKIS, A. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 35, p. 4453–4455, 2019.

LANG, J. M.; DUCHARME, E.; IBARRA CABALLERO, J.; LUNA, E.; HARTMAN, T.; ORTIZ-CASTRO, M.; KORUS, K.; RASCOE, J.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; BRODERS, K.; LEACH, J. E. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, p. 1312-1321, 2017.

LANGLOIS, P. A.; SNELLING J.; HAMILTON, J.; BRAGARD, C.; KOEBNIK, R.; VERDIER, V.; TRIPLETT, L.; BLOM, J.; TISSERAT, N.; LEACH, J. Characterization of the *Xanthomonas translucens* complex using draft genomes, comparative genomics, phylogenetic analysis, and diagnostic LAMP assays. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, p. 519–527, 2017.

LEE, I.; KIM, Y.; PARK, S.; CHUN, J. “OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity.” **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Cambridge, v. 66, p. 1100–1103, 2016.

LEITE JÚNIOR, R. P.; CUSTODIO, A. A. DE P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I. M.; RODRIGUES, V. H. S. Estria bacteriana do milho no Paraná. IAPAR, Londrina, **Informe da Pesquisa**, n.160, 18 p. 2018.

- LEITE JÚNIOR, R. P.; CUSTODIO, A. A. DE P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I. M.; RODRIGUES, V. H. S. First report of the occurrence of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.103, p. 145, 2019.
- PAGE, A. J.; CUMMINS, C. A.; HUNT, M.; WONG, V. K.; REUTER, S.; HOLDEN, M. T.; FOOKES, M.; FALUSH, D.; KEANE, J. A.; PARKHILL, J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, Basel, v. 31, n. 22, p. 3691-3, 2015.
- PEREZ-QUINTERO, A. L.; ORTIZ-CASTRO, M.; WU, G.; LANG, J. M.; LIU, S.; CHAPMAN, T. A.; CHANG, C.; ZIEGLE, J.; PENG, Z.; WHITE, F. F.; PLAZAS, M. C.; LEACH, J. E.; BRODERS, K. Genomic acquisitions in emerging populations of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* infecting corn in the U.S. and Argentina. **Phytopathology**, Saint Paul, v.110, n. 6, p. 1161–1173, 2020.
- PLAZAS, M. C.; ROSSI, R. L. DE; BRÜCHER, E.; GUERRA, F. A.; VILARÓ, M.; GUERRA, G. D.; WU, G.; ORTIZ-CASTRO, M. C.; BRODERS, K. First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 1026, 2018.
- PRITCHARD, L.; GLOVER, R. H.; HUMPHRIS, S.; ELPHINSTONE, J. G.; TOTH, I. K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analitical Methods**, Londres, v. 8, p. 12-24, 2016.
- QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. Eastern and southern African strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* are distinguishable by restriction fragment length polymorphism of DNA and polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 41, p. 113-121, 1992.
- QHOBELA, M.; CLAFLIN, L.; NOWELL, D. Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zeae* can be distinguished from other pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 12, p. 183-186, 1990.
- RAMBAUT, A. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed Dez 2021. 2018.
- RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 19126–31, 2009.
- ROBAINA, R. R.; LONGHI, T. V.; ZEFFA, D. M.; GONÇALVES, L. S.; LEITE JÚNIOR, R. Development of a protocol and a diagrammatic scale for quantification of bacterial leaf streak disease on young plants of maize. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 104, n. 11, 2020.
- ROBBS, C. F. IN: BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388 p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).
- ROUX, B.; BOLOT, S.; GUY, E.; DENANCÉ, N.; LAUTIER, M.; JARDINAUD, M. F.;

- FISCHER-LE, SAUX, M.; PORTIER, P.; JACQUES, M. A.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O.; LAUBER, E.; ARLAT, M.; CARRÈRE, S.; KOEBNIK, R.; NOËL, L. D. Genomics and transcriptomics of *Xanthomonas campestris* species challenge the concept of core type III effectome. **BMC Genomics**, Londres, v. 16, p. 975, 2015.
- RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Londres, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.
- SANKO, T. J.; KRAEMER, A. S.; NIEMANN, N.; GUPTA, A. K.; FLETT, B. C.; MIENIE, C.; BEZUIDENHOUT, C. C. Draft genome assemblages of 10 *Xanthomonas vasicola* pv. *zeae* strains, pathogens causing leaf streak disease of maize in South Africa. **Genome Announcements**, Washington, v. 6, p. e00532-18, 2018.
- SARRIS, P. F.; ZOUMADAKIS, C.; PANOPOULOS, N. J.; SCOULICA, E. V. Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 157–66, 2011.
- SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, Londres, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.
- SMITH, D.; GROVES, C.; HUDELSON, B.; LUELOFF, S. Bacterial leaf streak of corn confirmed for the first time in Wisconsin. **Wisconsin Crop Manager Newsletter**. 2018.
- SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; ARANTES, G. M.; FARAH, C. S.; SALINAS, R. K. A component of the Xanthomonadaceae type IV secretion system combines a VirB7 motif with a No domain found in outer membrane transport proteins. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 7, p. e1002031, 2011.
- SOUZA, D. P.; OKA, G. U.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; BISSON-FILHO, A. W.; DUNGER, G.; HOBEIKA, L. Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature Communications**, Berlin, v. 6, p. 6453, 2015.
- STUDHOLME, D. J.; KEMEN, E.; MACLEAN, D.; SCHORNACK, S.; ARITUA, V.; THWAITES, R.; GRANT, M.; SMITH, J.; JONES, J. D. G. Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 310, p. 182-192, 2010.
- STULBERG, M.; SANTILLANA, G.; STUDHOLME, D. J.; KASIBORSKI, B.; ORTIZ-CASTRO, M.; BRODERS, K.; ARIAS, S. L.; BLOCK, C. C.; MUNKVOLD, G. P.; RASCOE, J. Genomics-informed molecular detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains causing severe bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1174. 2020.
- VERNIKOS, G. S.; PARKHILL, J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. **Bioinformatics**, Londres, v. 22, p. 2196–203, 2006.

WAKSMAN, G. From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. **EMBO Reports**, Heidelberg, v. 20, p. e47012, 2019.

WASUKIRA, A.; COULTER, M.; AL-SOWAYEH, N.; THWAITES, R.; PASZKIEWICZ, K.; KUBIRIBA, J.; SMITH, J.; GRANT, M.; STUDHOLME, D. J. Genome sequencing of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* reveals variation in plasmids and genes encoding lipopolysaccharide synthesis, type-IV pilus and type-III secretion effectors. **Pathogens**, Basel, v. 3, p. 211–37, 2014.

WASUKIRA, A.; TAYEBWA, J.; THWAITES, R.; PASZKIEWICZ, K.; ARITUA, V.; KUBIRIBA, J.; SMITH, J.; GRANT, M.; STUDHOLME, D. J. Genome-wide sequencing reveals two major sub-lineages in the genetically monomorphic pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *musacearum*. **Genes**, Basel, v. 3, p. 361–77, 2012.

WICK, R. R.; JUDD, L. M.; GORRIE, C. L.; HOLT, K. E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computational Biology**, São Francisco, v. 13, n. 6, p. e1005595, 2017.

WU, G.; PEREZ-QUINTERO, A.; ORTIZ-CASTRO, M.; LANG, J.; LEACH, J.; LIU, S.; BRODERS, K. Comparative genomics of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* reveals a unique lineage infecting maize. **Phytopathology**, Saint Paul, 2019.

YOUNG, J. M. Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Cambridge, v. 51, p. 945-953, 2001.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; SHEARMAN, H. M.; FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p. 366-377, 2008.

4 ARTIGO B: Genome insights on the antibacterial activity of *Bacillus* sp. and its potential for the biocontrol of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*

Izabela Moura Duin^{1*}; Vanessa Hitomi Sugahara Rodrigues²; Rui Pereira Leite Jr²;
 Maria Isabel Balbi-Peña¹

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brazil; ²Área de Proteção de Plantas, Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná, Londrina, PR, Brazil.

*Corresponding author: izabeladuin@hotmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antagonism of three bacterial strains, LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03, against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*) and the biocontrol of bacterial leaf streak (BLS) of corn. Antagonism tests by agar diffusion method were performed to evaluate the antimicrobial activity of cell suspension, and cell-free supernatant (CFS) obtained from bacterial cultures grown in Luria Bertani (CFS LB) and International *Streptomyces* Project-2 (CFS ISP2) culture media. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using dilutions of each CFS. An *in vivo* experiment to evaluate the control of strains on BLS in corn plants was carried out under greenhouse conditions. The treatments were LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 bacterial suspensions at 10^8 CFU mL⁻¹ and mancozeb and copper oxychloride. Corn plants at V3 growth stage were sprayed with each treatment. After three days, the plants were inoculated with *Xvv* suspension at 10^8 CFU mL⁻¹. Disease severity was assessed 21 days after inoculation. Genus identification of the strains was performed by sequencing the 16S rRNA and LAFUEL 03 was selected for species identification by genome sequencing. Genes related to biofilm formation, swarming motility and clusters of secondary metabolites were searched in LAFUEL 03 genome. Agar diffusion test with antagonist cell suspensions produced inhibition halos of ~30 mm; and with CFS ~40 mm in diameter, without statistical difference between media or strains. MIC was 1:8 and 1:16 for CFS produced in LB and ISP2 media, respectively, with no statistical difference among them. In the *in vivo* experiments all antagonist strains significantly reduced the disease severity in 3rd and 4th leaves. 16S rRNA sequencing revealed that LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 belong to the genus *Bacillus*, and LAFUEL 03 has ~97% of similarity with *B. velezensis* strains. The search for genes of interest and clusters of secondary metabolism highlighted genes related to pathogen antagonism. LAFUEL 01 and LAFUEL 02 *Bacillus* sp. and LAFUEL 03 *B. velezensis* strains were able to control de bacterial leaf streak when

sprayed in corn plants before inoculation with *Xvv*. LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 strains produced metabolites with activity against *Xvv* and the characterization of these metabolites may provide new insights to elucidate the mechanisms involved in the control of bacterial leaf streak of corn by these promising biocontrol agents.

Keywords: Antimicrobial activity, *Bacillus velezensis*, bacterial genomics, biological control, biosynthetic gene clusters, molecular identification.

INTRODUCTION

The bacterial leaf streak (BLS) of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* is a disease reported for the first time in South Africa in 1949 (DYER, 1949). Despite that, the introduction of BLS in the American continent (KORUS *et al.* 2017; LANG *et al.* 2017; PLAZAS *et al.*, 2018; LEITE JR *et al.*, 2019) raised major concerns for corn production, leading to several studies on the pathogen and the disease management (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020; STULBERG *et al.*, 2020; PEREZ-QUINTERO *et al.*, 2020; STUDHOLME *et al.*, 2009; HARTMAN *et al.*, 2020a; HARTMAN *et al.*, 2020b).

Chemical control through bactericides may reduce disease development (GENT; SCHWARTZ, 2005). However, all available bactericides, which are mostly copper based compounds, have contact activity and require several applications to effectively control bacterial diseases (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). In addition to the low effectiveness, a major concern is the selection pressure that these chemicals may cause on plant pathogens, favoring the emergence of resistant strains (CAO *et al.*, 2011). An alternative to overcome this problem is the use of biological control, which is defined as the use of a microorganism to reduce the level of disease (PAL; GARDENER, 2006).

Biological control has many advantages in terms of sustainability, mode of action and toxicity compared to chemical pesticides (BALE *et al.*, 2008). They decompose more rapidly in the environment and are generally less toxic for non-target species (THAKORE, 2006). In addition, they may help to suppress resistant pathogens, as they exhibit generally different modes of action compared to conventional pesticides (BHATTACHARYYA *et al.*, 2016; MARASCO *et al.*, 2012).

Biological control agents may involve both bacteria and filamentous or yeast-like fungi (NAYAKA *et al.*, 2009). Further, bacteria have been studied extensively for this purpose. Among them, species within the genus *Bacillus* are of major interest due to the capability to form endospores, to have different mechanisms of action and to produce metabolites with biotechnological applications (LANNA FILHO; ROMEIRO; ALVES, 2010).

Studies on the control of bacterial leaf streak of corn are underway and effective methods for the disease management have not yet been established. A strategy to control bacterial plant diseases, including those caused by Xanthomonads, is biological control (GENT; SCHWARTZ, 2005). Several studies have been carried out to explore the beneficial effects of bacteria of the genus *Bacillus* as biocontrol agents for *Xanthomonas* spp., such as *X. citri* subsp. *citri* (DAUNGFU; YOUPENSUK; LUMYONG, 2019; DAS *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2012), *X. campestris* pv. *campestris* (MISHRA; ARORA, 2012), and *X. vesicatoria* (LANNA-FILHO *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018). Ortiz-Castro (2019) reported that *Pantoea ananatis* may have potential as biocontrol agent against BLS of corn.

In view of the relatively limited efficiency of chemicals and biocontrol strategy being a more eco-friendly and effective alternative for the control of bacterial diseases in plants, the objectives of this study were to raise genomic information on the antimicrobial potential of bacterial strains, to evaluate the *in vitro* antagonist activity of these strains against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, the causal agent of BLS of corn, and to determine their potential for the control of BLS in corn plants.

MATERIALS AND METHODS

Source and maintenance of the bacterial strains

Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* strain RL1 (LEITE *et al.*, 2019) belongs to the collection of plant pathogenic bacteria of the *Laboratório de Bacteriologia e Diagnose em Fitossanidade do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR/Emater (IDR/Paraná)*, Londrina, PR, Brazil. The isolates LAFUEL

01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 belong to the *Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL)*, Londrina, PR, Brazil. The bacterial isolates were grown on Nutrient Agar (NA) medium and incubated at 28 ± 2 °C for 48 h.

Production of metabolites and cell-free supernatant

After activation, the inoculum was prepared with LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 cell suspension, adjusted in a spectrophotometer to $O.D._{600nm} = 0,3$ and 40 μ L of the suspensions were inoculated into 40 mL of Luria Bertani (LB) broth ($g L^{-1}$: tryptone 10; extract of yeast 5; NaCl 5; pH 6.8-7.0), kept under 200 rpm agitation at 28°C for 24 h. After incubation, aliquots (1% v/v) of the inoculum were transferred to 250 mL of medium 1 LB broth and medium 2, International *Streptomyces* Project-2 (ISP2 broth: $g L^{-1}$: yeast extract 4; malt extract 10; dextrose 4) and kept under 200 rpm agitation at 28 °C for 72 h and 168 h for media 1 and 2, respectively. To obtain the cell-free supernatant (CFS), the fermented product (extract) was centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C for 15 min and filtrated through 0.22 μ m membrane.

Antimicrobial activity of LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 products

Two experiments were performed using the agar diffusion method (pour plate) in NA medium to evaluate the antimicrobial activity of LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 against RL1 strain of *X. vasicola* pv. *vasculorum*. A suspension at 10^8 CFU mL^{-1} was incorporated to the still-melting culture medium (54 °C) for a final concentration of 0.25% v/v. In the first experiment, 10 μ L aliquots of Xvv suspension was adjusted in a spectrophotometer to $O.D._{600nm} = 0.3$ and added to the medium. In the second experiment, 200 μ L aliquots of the CFS of each isolate were transferred to 8 mm diameter wells in the culture medium. Plates were maintained at 28 ± 2 °C for 72 h. The antagonistic capability of the CFS was also tested after freezing at -20 °C for 10 days. The antimicrobial activity was evaluated by

measuring the growth inhibition halo of RL1 strain and expressed in mm. Both experiments were performed three times and the results presents are the average of the experiments.

The experimental design was a completely randomized design in a two-factorial arrangement (2 culture medium x 3 strains) with 8 replications. The results were submitted to the analysis of variance and the means were compared by the Tukey test, at 5% probability level. Data that did not meet the assumptions of the analysis of variance according to the Shapiro-Wilk and Bartlett tests were transformed by Box-Cox (BOX; COX, 1964). Data analysis was performed using the statistical software R Studio (R Core Team, 2021).

Minimum inhibitory concentration

Serial dilutions of 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 and 1:64 of the CFSs were performed in 96-well polystyrene plate containing 100 μL of nutrient broth to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the CFS of each strain to inhibit the growth of *Xvv* RL1. The initial extracts of LAFUEL01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 used in the test were at the concentration of 3×10^8 CFU mL^{-1} , after fermentation. Then, 100 μL of RL1 bacterial suspension in nutrient broth at the concentration of 10^8 CFU mL^{-1} , was added to the wells and homogenized. Positive (RL1 + medium) and negative controls (CFS + medium) were included. The plates were maintained at 28 °C for 72 h. The evaluation of the RL1 bacterial growth was performed visually by the absence or presence of turbidity. Each treatment was constituted by three replications and the test was performed three times.

Inhibition curves were estimated by the non-parametric Kaplan-Meier method (KAPLAN; MEIER, 1958) to visually verify the capability of the CFS to inhibit bacterial growth as a function of the CFS dilutions. The log-rank test was used to formally compare the curves, as the observed and expected values of each treatment were compared under the hypothesis that the inhibition capability is the same for all treatments. This is equivalent to test if the dilution for inhibition of bacterial growth is similar for each treatment. Data analysis was performed using the statistical software R Studio (R Core Team, 2021).

Control of bacterial leaf streak of corn

The experiment was carried out in a semi-climatized greenhouse at the Londrina Experimental Station of the *Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR/Emater*, Londrina, PR, Brazil.

The maize hybrid IPR164 was sown in 5 L plastic pots containing a soil-sand-organic matter mixture (3:1:1 vol). Fifteen days after sowing, the maize plants at the V3 vegetative growth stage were sprayed with the treatments.

LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 extracts were prepared by fermentation in LB medium at a final concentration of 3×10^8 CFU mL⁻¹. Mancozeb and copper oxychloride were included as positive chemical controls and water as negative control. The products and doses used in the experiments are shown in Table 1. The doses of the chemical's products were applied as recommended by Longhi *et al.* (2022).

Table 1. Treatments and doses of LAFUEL 01, LAFUEL 02, LAFUEL 03 and chemicals used in the experiment of control of bacterial leaf streak.

Treatment	Dose
Water	-
LAFUEL 01	3×10^8 UFC mL ⁻¹
LAFUEL 02	3×10^8 UFC mL ⁻¹
LAFUEL 03	3×10^8 UFC mL ⁻¹
Mancozeb – 750 g Kg ⁻¹	2 g c.p. ¹ L ⁻¹
Copper oxychloride – 588 g L ⁻¹	2 g c.p. L ⁻¹

¹c. p. – commercial product

Three days after spraying the products, the corn plants were artificially inoculated with a suspension of the RL1 strain of *Xvv* at the concentration of 10^8 CFU mL⁻¹. The suspension was sprayed without wounding and approximately 10 mL of the bacterial suspension was applied on the leaves of each corn plant (ROBAINA *et al.*, 2020). All plants were maintained in a moist chamber 24 h before

and 24 h after pathogen inoculation. The disease severity was evaluated 21 days after inoculation on the 3rd and 4th leaves, based on the percentage of affected leaf area using the scale proposed by Robaina *et al.* (2020). The reduction in the disease affected leaf area was calculated as a percentage (%) of the disease severity in the control plants.

The experiment was carried out in a completely randomized design, with four replications. The experimental unit was a pot containing one plant. The experiment was performed twice. The data analysis for percentage of affected leaf area of the disease was performed using nonparametric statistics. In the first trial, the ANOVA Kruskal Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952) was applied to the data and the comparison of the treatments was performed by the Bonferroni test ($p < 0.05$). In the second trial, data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test ($p \leq 0.05$). The statistical analysis was performed using the software R Studio (R Core Team, 2021).

Swarming motility and biofilm formation assay

Motility of the strains LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 was evaluated by spreading the bacterium on tryptic soy agar plates 0,75 % (TSA, Acumedia, USA). The overnight culture was prepared, adjusted to O.D.₆₀₀ = 0.3, and 10 μ L of the inoculum was plated on the TSA medium in the center of a 60-mm Petri dish. The capability to colonize the whole surface of the medium was evaluated. For biofilm formation, a 24-well plate with 2 mL of tryptic soy broth medium (TSA, Acumedia, USA) was prepared and inoculated with 10 μ L of an overnight culture adjusted to O.D._{600nm} = 0,3. The biofilm formation capability was evaluated with visual observations.

Molecular characterization of the isolates

The isolates were subjected to molecular analysis of the 16S rRNA (ribosomal RNA) sequence for molecular identification of the species. The isolates

were cultivated in nutrient broth (NB) under 200 rpm agitation at 28°C for 16 h. Total DNA was extracted from a pellet of 1 mL of the bacterial suspension following the standard protocol of DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA quality was examined in agarose gel and quantification was performed using NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

For the 16S rRNA sequence gene, the DNA was amplified with universal primers fD1 CCGAATTCGTCGACAAC (forward) and rD1 AGAGTTGATCCTGGCTCAG (reverse) (WEISBURG *et al.*, 1991). Each PCR reaction was performed in a final volume of 25 µL, which includes 1 µL of genomic DNA; 2.5 µL of 10X PCR buffer; 1 µL of each primer at 10 µM; 0.8 µL of 50 mM MgCl₂; 1 µL of 5 mM dNTP; 0.1 µL of GoTaq DNA polymerase (Promega Corp., Madison, WI, USA) and 17.6 µL of sterile milliQ water. The optimized cycling program was initial denaturation at 94 °C for 3 min; followed by 30 cycles at 94 °C for 50 sec, annealing at 62.3 °C for 50 sec, and 72 °C for 1 min and 45 sec; ending with the extension at 72 °C for 7 min.

Amplified DNA was subjected to electrophoresis at 6 V/cm², in 1% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide and 1x TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8, 0). The gel was visualized under ultraviolet light (U.V.) and photo documented. PCR products were purified using the PureLink® Kit (Quick Gel Extraction Kit – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and run in an automated sequencer by the Sanger method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the *Universidade Estadual Paulista (UNESP)*, Jaboticabal, SP, Brazil.

Initially, the sequences were subjected to nucleotide similarity comparison with sequences deposited in the GenBank, accessed through the NCBI (National Center for Biotechnology Information). For this query, we used the local Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). The 16S rRNA gene sequences were also compared using the program RDP Classifier (version 2.2) (WANG *et al.*, 2007). The sequences were prepared for alignment using the program “BioEdit v5.0.9” (HALL, 1999) and later aligned with the program “MUSCLE” (EDGAR, 2004). For the distance matrix of the phylogenetic trees, the “Maximum Likelihood” tree construction method and “Tamura and Nei” algorithm (TAMURA; NEI, 1993) were used, with MEGA X software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR *et al.*, 2018).

Genome sequencing, assembly, and annotation of LAFUEL 03

For genome sequencing, the LAFUEL 03 strain was cultivated in NB under 150 rpm agitation at 28° C for 16 h. DNA was extracted using the DNA extraction kit, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sequencing of the LAFUEL 03 strain was carried out on the Illumina MiSeq platform, using the MiSeq version 3 reagent kit (600-cycle, Illumina, San Diego, CA, USA) in the Soil Biotechnology Laboratory of Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil.

The sequence quality of the raw reads was analyzed using FastQC (ANDREWS, 2010), then trimmed using Trim Galore! (v. 0.6.5) (KRUEGER F. Trim-Galore). Clean reads were subjected to *De novo* assembly using SPAdes incorporated in the Unicycler pipeline (WICK *et al.*, 2017). The genome G+C content was calculated using QUAST (GUREVICH *et al.*, 2013). Genome annotation was carried out using the RAST platform (AZIZ *et al.*, 2008), and coding sequence (CDS) were predicted and classified into subsystems.

Secondary metabolites cluster prediction of LAFUEL 03

The webserver antiSMASH that combines different databases of genetic data, antimicrobial molecules, and biosynthetic gene clusters (BGCs) was used to predict the chemical structures, position and possible function of the secondary metabolites clusters (BLIN *et al.*, 2019). The analysis was carried out with the final fasta file of LAFUEL 03.

Phylogenomic comparison and tree reconstruction for LAFUEL 03

For species identification of the LAFUEL 03 ANI (Average Nucleotide Identity) with others *Bacillus* spp. were performed using orthoANI (LEE *et al.*, 2016) and Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) (MEIER-KOLTHOFF *et al.*,

2013). The program Roary (PAGE *et al.*, 2015) was used to carry out pan-genome analyses for species. All genomes used for Roary were annotated by Prokka (SEEMANN, 2014). The tree reconstruction was carried out using an alignment of the core genome sequences with 70% BLAST ID derived from Roary (PAGE *et al.*, 2015) based on the maximum likelihood method and bootstrapped 100 times using RaxML-NG (KOZLOV *et al.*, 2019). All visualizations of the phylogenetic trees were produced with FigTree (RAMBAUT, 2018) version 1.4.4.

Biofilm formation related genes of LAFUEL 03

After genome annotation, a local BLASTN using a customized database containing the LAFUEL 03 genome was carried out using as query sequences a list of genes directly or indirectly related to biofilm formation/regulation found on SubtWiki (PEDREIRA; ELFMANN; STÜLKE, 2021) and other studies (ROBERTSON *et al.*, 1989; STRAUCH *et al.*, 1990, 2007; MSADEK *et al.*, 1991; KOBAYASHI, 2007; CHU *et al.*, 2008; PENHA *et al.*, 2020), related to biofilm formation of *Bacillus subtilis*.

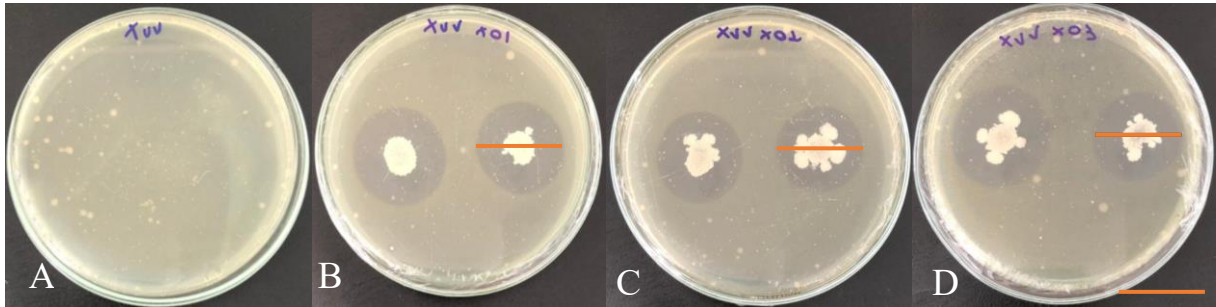
RESULTS

Antimicrobial activity against Xvv

In the agar diffusion experiments, the isolates, LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03, and their CFSs were able to inhibit the growth of Xvv based on the presence of inhibition halos in the NA plates (Figures 1 and 2).

In the first experiment, the inhibition halo formed by LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 were 31, 29 and 33 mm in size, respectively (Figure 1). However, no statistical differences were observed among the isolates in regard to their antimicrobial activity (Figure 1).

Figure 1. Agar diffusion test (pour plate) of the antagonism of LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* - *Xvv* RL1. Concentration of 10^8 CFU mL⁻¹ of *Xvv* – RL1 and 10 μ L aliquots of cell suspension of each strain adjusted at O.D. _{600nm} = 0.3. The orange line shows the growth inhibition halos of *Xvv* – RL1. A, control; B, LAFUEL 01; C, LAFUEL 02; and D, LAFUEL 03. Bar = 30 mm.



In the agar well diffusion method with CFS produced in the LB medium, the inhibition halos were 39, 40 and 38 mm for LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03, respectively (Figure 2 A2, A3 and A4). Further, the inhibition halo for LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 were 37, 39 and 38 mm, respectively, for the CFS produced in the ISP2 medium (Figure 2 B2, B3 and B4). The statistical analysis did not reveal any significant interaction between factors, and no difference in the inhibitory activity of the antagonists isolates or between culture media in the two experiments (Table 2). Furthermore, the freezing of the CFS did not interfere in the antimicrobial *in vitro* capability against *Xvv*, and there was no change when compared to the non-frozen SLC (data not shown).

Minimum inhibitory concentration

The growth of *Xvv* isolate RL1 was inhibited by the CFS obtained from cultures of LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 in LB medium at the concentration of 1:8 in the minimum inhibitory concentration (MIC) test. The growth of RL1 was inhibited by the CFS obtained from cultures of all three isolates in ISP2 medium at a concentration of 1:16. However, there was no significant difference regarding the isolates and the different culture media according to the non-parametric analysis of Kaplan-Meier (log-rank test) (Supplementary Figure S1). Therefore, the

CFS of each isolate produced in both media has the same capability to inhibit the growth of the *Xvv* RL1 strain.

Figure 2. Agar well diffusion test (pour plate) of the antagonism of LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* RL1. Concentration of 10^8 CFU mL⁻¹ of RL1 strain and 200 μ L aliquots of cell-free supernatant of each strain, fermented in LB (A) and ISP2 (B) media. A1, control; A2, LAFUEL 01; A3, LAFUEL 02; A4, LAFUEL 03; B1, control; B2, LAFUEL 01; B3, LAFUEL 02; and B4, LAFUEL 03. The orange line shows the growth inhibition halos of *Xvv* RL1 strain. Bar 40 mm.

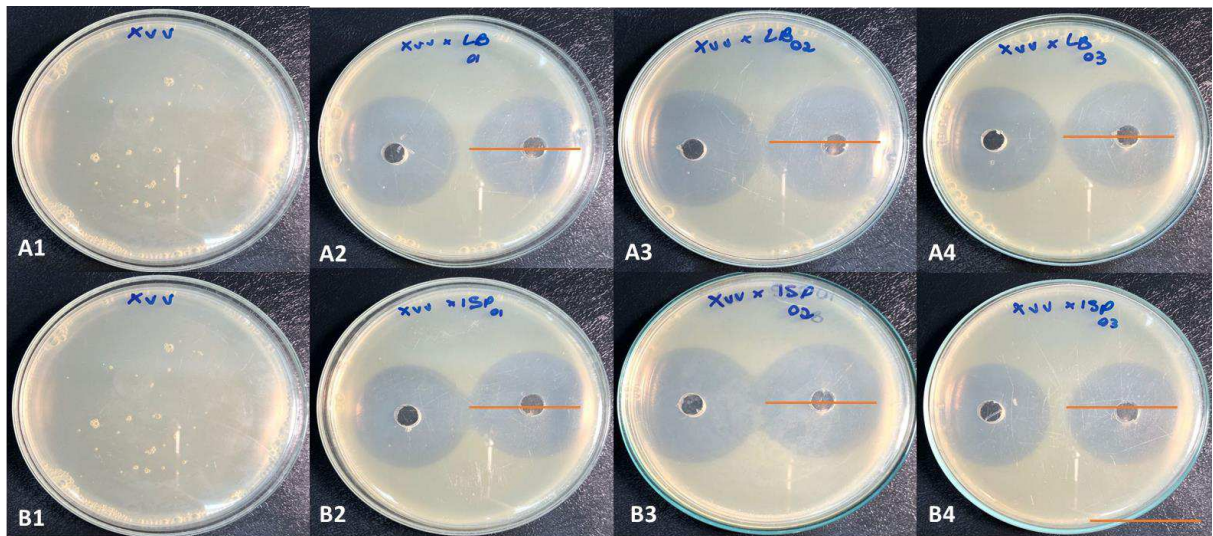


Table 2. Growth inhibition halos (mm) of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* RL1 strain in Nutrient Agar medium at a concentration of 10^8 CFU mL⁻¹ and 200 μ L aliquots of cell-free cell supernatant of LAFUEL 01, LAFUEL 02, and LAFUEL 03 fermented in LB and ISP2 media in the antagonism test by agar well diffusion method (pour plate).

Strain	Medium		Mean
	LB	ISP2	
LAFUEL 01	39,00	37,00	38,00 ^{n.s.}
LAFUEL 02	40,25	39,25	39,75
LAFUEL 03	38,25	38,50	38,37
Mean	39,17 ^{n.s.}	38,25 ^{n.s.}	

n.s. not significant $p < 0.05$.

Control of bacterial leaf streak of corn

Based on the bacterial leaf streak severity assessed on the 3rd and 4th leaves, LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 treatments significantly reduced disease severity and showed a better control of the disease than the mancozeb and copper oxychloride treatments (Table 3) for both experiments, Trial A and Trial B. The disease severity in Trial A is low, but the results present the same tendency of Trial B. For the Trial B, based on the 3rd leaf evaluation, the treatments with the strains LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 were able to provide a control of 33, 52 and 60% of the disease, respectively; while the mancozeb and copper oxychloride treatments controlled the disease by 45 and 60%, respectively. On the 4th leaf evaluation, the *Bacillus* sp. treatments controlled the disease in more than 75%, while mancozeb and copper oxychloride controlled by 47% and 43%, respectively.

***In vitro* assays for biofilm formation and swarming motility**

In vitro assays for the pellicle/biofilm formation on liquid-air interface on static liquid medium was evaluated in TSB and the motility capability was tested on a TSA 0.75 %. The three isolates, LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03, were able to colonize the whole surface of the medium in both assays. Pellicle formation on the air-liquid interface was visible covering the whole air-liquid surface of the well, where a thick layer was formed, resulting from cell growth (Figure 3A). For the motility test it was observed that the cell inoculum starting in the middle of the Petri dish was able to grow over the whole surface of the TSA 0.75 % medium (Figure 3B).

Identification molecular of the antagonists isolates and phylogenetic analysis

The molecular analyses of the 16S rRNA gene sequences based on the RDP Classifier (WANG *et al.*, 2007) and the search for similarity using BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) revealed that the LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 isolates belong to the genus *Bacillus*. However, the analyses of the 16S rRNA gene sequence did not allow the identification of the *Bacillus* sp. isolates at the species level.

Table 3. Severity (% of affected leaf area) and efficiency of control (% in relation to the water control) of bacterial leaf streak in IPR 164 hybrid corn plants treated with formulations of LAFUEL 01, LAFUEL 02, LAFUEL 03, mancozeb and cooper oxychloride. Severity was assessed in 3rd and 4th leaves at 21 days after inoculation with *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* RL1 strain.

Treatments*	Trial A ^a				Trial B ^b			
	Severity ^c (%)		Efficiency of control (%)		Severity ^c (%)		Efficiency of control (%)	
	Leaf stage		Leaf stage		Leaf stage		Leaf stage	
	3 rd	4 th	3 rd	4 th	3 rd	4 th	3 rd	4 th
Water	1.4 a	4.4 a	-	-	22.5 a	37.5 a	-	-
Mancozeb	0.5 ab	0.5 abc	64	89	10.0 b	20.0 b	56	47
Copper oxychloride	0.5 ab	1.5 ab	64	65	9.0 b	16.3 b	60	57
LAFUEL 01	0 b	0.2 bc	100	95	8.0 b	8.0 b	65	79
LAFUEL 02	0 b	0 c	100	100	15.0 b	8.8 b	33	77
LAFUEL 03	0 b	0.2 bc	100	95	10.8 b	8.3 b	52	78
CV (%)	-	-			39.05	55.56		

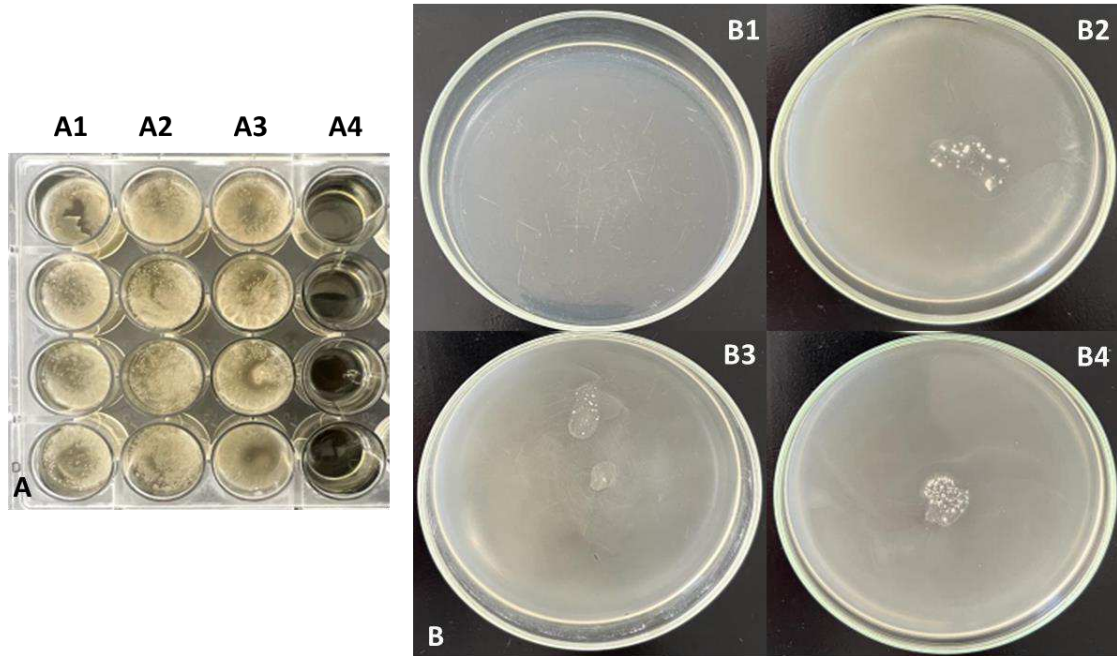
*Doses used in the experiments are shown in Table 1.

^aValues followed by the same letter in the column do not differ according to the Bonferroni test ($p < 0.05$);

^bValues followed by the same letter in the column do not differ according to the Tukey test ($p < 0.05$);

^cPercentage of affected leaf area based on the diagrammatic scale proposed by Robaina *et al.* (2020).

Figure 3. *In vitro* assays for biofilm formation and swarming motility. Pellicle formation on TSB medium: (A1) LAFUEL 01; (A2) LAFUEL 02; (A3) LAFUEL 03; and (A4) negative control. Motility test: (B1) negative control, (B2) LAFUEL 01, (B3) LAFUEL 02, and (B4) LAFUEL 03.



When compared to several strains, including type strains, of three main species of the *B. subtilis* group, the ANI indicated a closer similarity of 97.76% of the strain LAFUEL 03 with *B. velezensis* LABIM22 (Table 4, Figure 4). Other strains showing high ANI similarity with LAFUEL 03 were *B. velezensis* JS25R (97.69%), *B. velezensis* YAU B9601-Y2-1 (97.62%), and *B. velezensis* type strain FZB42 (97.56%), above the threshold for species delineation. When compared to *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7(T), the value of 93.99% for ANI indicate that LAFUEL 03 and the type strain DSM7(T) belong to different species. This classification is important for this group bacteria because of the inconsistent delimitation over the years (KIM *et al.*, 2015; DUNLAP *et al.*, 2016; FAN *et al.*, 2017). A lower similarity of LAFUEL 03 was shown with *B. subtilis* subsp. *subtilis* type strain 168 (76.91%). Based on the comparisons using RaxML and orthoANI, LAFUEL 03 was placed within a cluster containing most of the *B. velezensis* isolates (Figure 4 and 5).

Table 4. Genome comparison of *Bacillus velezensis* LAFUEL 03 with different *Bacillus* spp.

Strain	GenBank	ANI (%)	GC (%)	Bp (Gb)	Source/Reference
<i>B. velezensis</i>					
LAFUEL 03	-----	100	46.3	3,97	Contaminant (This study)
LABIM 22	CP045993	97.76	46.4	3.99	Soil (TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2021)
JS25R	CP009679.1	97.69	46.4	4.01	Not specified/ Unpublished
YAU B9601-Y2	NC_017912.1	97.62	45.9	4.24	Wheat rhizosphere (HE <i>et al.</i> , 2012)
FZB42	CP000560.2	97.56	46.5	3.91	Soil (CHEN <i>et al.</i> , 2009a)
<i>B. amyloliquefaciens</i>					
DSM7(T)	NC_014551.1	93.99	46.1	3.98	Not specified (RÜCKERT <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. subtilis</i>					
168	NC_000964.3	76.91	43.6	4.21	Type strain (KUNST <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. thuringiensis</i>					
ATCC	NZ_CM00075 3.1	66.29	34.7	6.26	Type strain (ZWICK <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. cereus</i>					
FRI-35	CP003747.1	66.45	35.4	5.38	Not specified/ Unpublished

Genome assembly and annotation of the LAFUEL 03 sequence

The genome of the *Bacillus velezensis* LAFUEL 03 was assembled in 39 contigs, with an *N50* of 985,989 and an *L50* of 2. The LAFUEL 03 genome was estimated to have 3,974,042 bp, and the annotation showed that the genome has 4,103 CDS with 83 of them related to RNAs sequences (Table 5).

antiSMASH analysis of secondary metabolism

The webserver antiSMASH 6.0 found 17 BGCs in the LAFUEL 03 genome (Table 6). Among the 17 clusters, 13 showed similarities with BGCs already described in the MiBiG (MEDEMA *et al.*, 2015). They were linked to the synthesis of surfactin, butirosin A/B, macrolactin H, bacillaene, fengycin, difficidin, rhizoctin A

bacillibactin, and bacilysin. Four of the 17 clusters did not show any similarity with clusters in the database.

Figure 4. Heatmap generated with the OrthoANI values calculated by OAT software for *Bacillus velezensis* strain LAFUEL 03 and closely related *Bacillus* species.

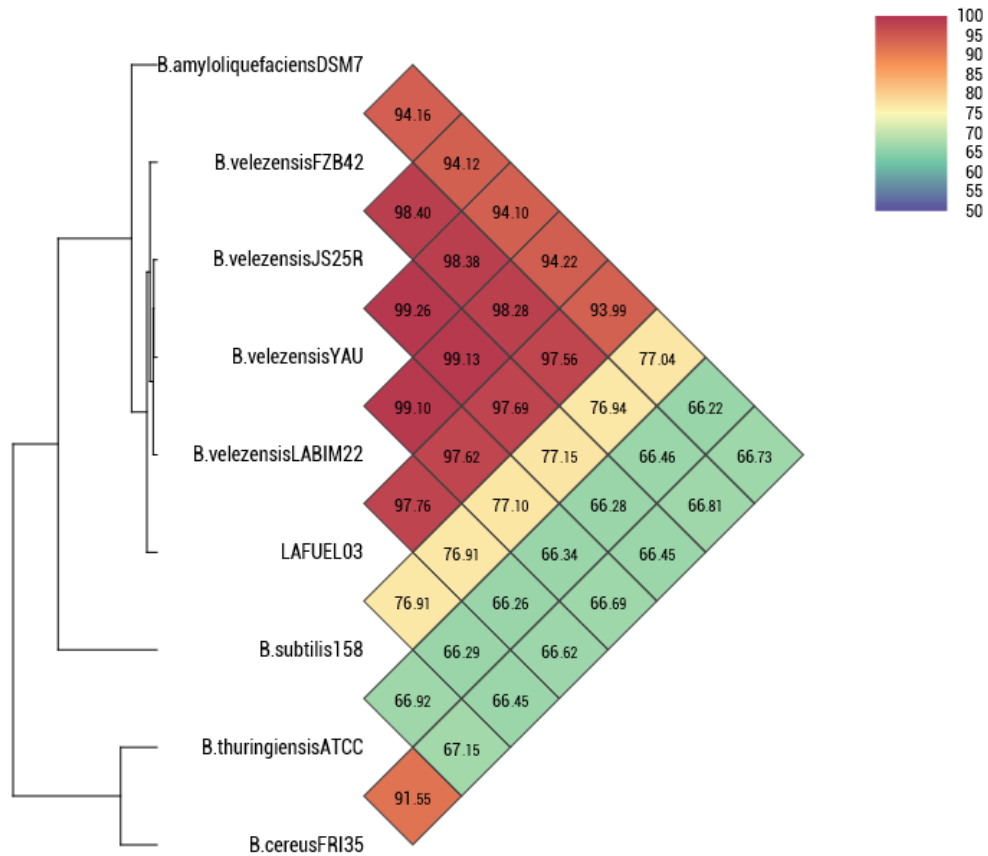


Table 5. Summary of the characteristics of the *Bacillus velezensis* LAFUEL 03 genome.

Attribute	Value
Genome size (bp)	3,974,042
GC content (%)	46.3
Contigs	39
<i>N50</i>	985,989
<i>L50</i>	2
Total predicted CDS	4,103
RNAs	83

Table 6. Biosynthetic Gene Clusters (BGCs) found in the *Bacillus velezensis* LAFUEL 03 genome using the webserver antiSMASH 6.0.

Cluster	Type	From (pb)	To (pb)	Most similar known cluster		Similarity
1	PKS-like	63,368	104,612	Butirosin A/B	Saccharide	7%
2	Terpene	186,633	207,373			
3	TransAT-PKS	543,564	634,934	Macrolacton H	Polyketide	100%
4	NRPS, transAT-PKS, T3PKS	859,722	962,368	Bacillaene	Polyketide + NRP	100%
5	NRPS, RiPP-like	73,713	125,505	Bacillicabtin	NRP	100%
6	Lantipeptide class II	289,489	315,857			
7	Other	640,076	681,494	Bacilysin	Other	100%
8	Terpene	84,718	106,601			
9	T3PKS	186,289	227,389			
10	TransAT-PKS	355,477	429,810	Difficidin	Polyketide + NRP	100%
11	NRPS	1	25,225	Surfactin	NRP: Lipopeptide	39%
12	NRPS, transAT-PKS	30,803	107,548	Rhizocticin A	Other	16%
13	NRPS	179,136	206,929	Surfactin	NRP: Lipopeptide	47%
14	NRPS, betalactone, transAT-PKS	1	87,594	Fengycin	NRP	80%
15	NRPS	1	12,861	Fengycin	NRP	20%
16	NRPS	1	9,388	Fengycin	NRP	18%
17	NRPS	1	9,172	Surfactin	NRP: Lipopeptide	8%

NRPS, non-ribosomal peptide synthetase; NRP, non-ribosomal peptide. PKS, polyketide synthetase. AT, acetyltransferase; T3PKS, type 3 Pks.

Genes in Bacillus velezensis LAFUEL 03 related to biofilm formation/regulation

A series of genes directly or indirectly related to biofilm production and root colonization were identified in the LAFUEL 03 genome (Table 7). Key genes such as *abrB*, *galE1*, *degU*, *degQ* and *remA* with 91, 98, 86, 87, and 98% of similarity, respectively, with genes obtained from the SubtWiki database were found within the genome using BLASTN. Important operons, such as *epsA - epsO* (97 - 99%), *sfrAA-AC* (80%, 75%, 87%) and *yqxX-sipW-tasA* (98%, 98%, 98%) were also found in the LAFUEL 03 sequence. On the other hand, sequences with similarities to the genes *bslA*, *comA*, *kinB - kinD*, *lytS*, *slrA* and *tapA* were not found.

DISCUSSION

The bacterial strains LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 were isolated as antagonistic contaminants in plates during fungal x yeast antagonism tests in the *Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL)*, Parana, Brazil. We tested the antagonistic capacity of cells of the strains against *Xvv*. And two culture media with the objective to establish the best conditions for fermentation and production of bioactive products from these strains against *Xvv*. We tested the potential of the three isolates for *in planta* control of bacterial leaf streak of corn. Furthermore, we performed 16 sRNA sequencing for the three strains and based in previous information on antagonism against other fungal and bacterial plant pathogens, LAFUEL 03 was selected to sequencing. The genes involved in the secondary metabolites production and the ones linked to biofilm regulation/formation were investigated to determine its potential as biocontrol agent against *Xvv*.

The double culture and CFS antagonism experiments assessed *in vitro* antagonism of LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03 against *Xvv*. *In planta* experiments also demonstrated their capability to control BLS. The results of the *in vitro* experiments suggest that metabolites produced would be responsible for the control of BLS in corn plants, which means a control based on antimicrobial substances, however, resistance induction cannot be discard. Several studies have reported *in vitro* antagonism against *Xanthomonas* spp., and

Table 7. Genes related to biofilm formation/regulation on *Bacillus velezensis* LAFUEL 03.

Gene	Position on <i>Bacillus velezensis</i> LAFUEL 03 (bp)	Identity with reference (%)	Described function on subtwiki	
<i>abrB</i>	45187 to 45476	91	Repressor of genes that induce sporulation	
<i>degQ</i>	71346 to 71211	87	Stimulates the production of degradative enzymes and extracellular poly-gama-glutamate	
<i>degU</i>	448510 to 449199	86	Capsule biosynthesis (along with SwrA), DegU non phosphorylated is necessary for motility on swarming	
<i>epsA</i>	353065 to 352358	98	Synthesis of extracellular polysaccharides	
<i>epsB</i>	352352 to 351672	99		
<i>epsC</i>	351427 to 349634	96	Motility and glycosyltransferase inhibitor needed for EPS biosynthesis	
<i>epsD</i>	349618 to 348479	97		
<i>epsE</i>	348482 to 347640	98		
<i>epsF</i>	347647 to 346511	98		
<i>epsG</i>	346507 to 345404	98		
<i>epsH</i>	345385 to 344348	98		
<i>epsI</i>	344343 to 343267	98		Synthesis of poli-N-acetyl glucosamine
<i>epsJ</i>	343270 to 342236	97		
<i>epsK</i>	340722 to 342239	98		Galactose utilization
<i>epsL</i>	340117 to 340725	97		
<i>epsM</i>	339473 to 340120	97		
<i>epsN</i>	338296 to 339468	98		
<i>epsO</i>	337352 to 338317	97		
<i>galE1</i>	344050 to 345042	98		
<i>kinA</i>	517186 to 519006	78		
<i>motA</i>	487638 to 486823	79		

Gene	Position on <i>Bacillus velezensis</i> LAFUEL 03 (bp)	Identity with reference (%)	Described function on subtwiki
<i>motB</i>	486851 to 486109	76	
<i>remA</i>	733387 to 733656	98	Transcriptional regulator of genes from the extracellular matrix, acts along with SinR, AbrB and DegU
<i>sigD</i>	808233 to 808997	87	
<i>sigH</i>	15391 to 16046	87	
<i>sigW</i>	21892 to 22455	83	
<i>sinI</i>	474811 to 474638	80	Biofilm formation control
<i>sinR</i>	474604 to 474269	97	Transcriptional regulator of post-exponential-phase responses genes
<i>sipW</i>	472788 to 473372	98	Bifunctional signal peptidase that controls surface-adhered biofilm formation and processes TasA and TapA
<i>spo0A</i>	507969 to 508769	99	Regulator of the sporulation initiation
<i>srfAA</i>	8 to 1141	80	Surfactin synthesis
<i>srfAB</i>	1361 to 6174	75	
<i>srfAC</i>	1389 to 5185	87	
<i>swrA</i>	424288 to 424624	85	Important activator of the flagellar biosynthesis, controls the number of flagellar basal bodies, controls degU activity
<i>swrB</i>	809025 to 809225	80	Controls SigD activity. Activates type 3 flagellar secretion by the protein membrane FlpP
<i>swrC</i>	217287 to 220430	80	
<i>tasA</i>	473436 to 474221	98	Major component of the biofilm matrix, forms amyloid fibers
<i>yhxB</i>	58091 to 59833	99	
<i>yqxM</i>	472145 to 472816	98	

the control of diseases caused by these bacteria by biocontrol agents such as *Bacillus* spp., *Pantoea* spp. and *Pseudomonas* spp. (LANNA FILHO *et al.*, 2010; ZHANG; BIRCH, 1997; MURATE *et al.*, 2015). However, there is only one study on biological control of *Xvv* (ORTIZ-CASTRO, 2019).

Ortiz-Castro (2019) performed antagonism experiments with *Xvv* against *Pantoea ananatis*. Although no antagonistic activity of *P. ananatis* strain was verified *in vitro*, less BLS severity in the plants inoculated with the biocontrol agent was observed *in vivo* (ORTIZ-CASTRO, 2019). Co-infiltrations of *Xvv* and *P. ananatis* resulted in significantly smaller lesions compared to those when *Xvv* was inoculated alone (ORTIZ-CASTRO, 2019). An average of 40% of leaves were infected in plants inoculated with *Xvv* alone, compared to an average of 19% of leaves infected in the co-inoculated *Xvv* + *P. ananatis* plants (ORTIZ-CASTRO, 2019).

In a study presented by Issazadeh *et al.* (2012), eight bacilli were tested against *X. campestris* pv. *campestris* (*Xc*) by plate diffusion technique. All the strains formed inhibition halos with an average of 20 mm. Strains of *B. subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* had an antagonistic activity against *Xc* (SINGH; DHAR; YADAV, 2010). Inoculations performed in cauliflower plants revealed that the combination of both bacteria applied one week before *Xc* inoculation reduced disease incidence to levels lower than chemical treatments with streptomycin. However, both antagonistic bacteria could not inhibit the growth of *Xc* *in vitro* at concentrations below 10^6 CFU mL⁻¹. These results point to the potential of both *B. subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol protective agents against plant pathogenic bacteria.

In our study, the inhibition zone in double culture experiment was ~30 mm and in CFS ~40 mm, for both media tested; higher values than the ones obtained by Mishra and Arora (2012). They evaluated the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis* against *Xc* *in vitro* and *in vivo*. The combined use of the strains produced an average inhibition zone of 18.1 ± 1.4 mm radius ($p < 0.05$). Both bacteria were able to control the black rot disease through foliar sprays or seed soak and soil drench techniques, with reductions ranging from 32 up to 60%. However, the strains applied in combined manner were significantly more effective, with 75% in disease reduction.

In their study addressing biocontrol of citrus canker using *B. thuringiensis*, Islam *et al.* (2019) found MIC values ranging from 0.625 mg mL⁻¹ up to 5.00 mg mL⁻¹, depending on the *Xcc* strain. The inhibition zones were 20.64 ± 0.69 and 19.91 ± 0.87 mm, for two strains of *B. thuringiensis*. Furthermore, they reduced canker incidence on infected leaves by 64.05% compared to the positive controls.

Das *et al.* (2014) conducted an assay under field conditions which consisted in spraying aqueous suspensions of bacterial cells of *B. subtilis* strain S-12 on acid lime trees for control of *Xcc*. The results showed that a single application of the cell suspension during the peak season of citrus canker resulted in a decrease of 5.21% in disease incidence when compared to the check treatment.

Bacillus pumilus and *Paenibacillus macerans*, epiphytic bacteria from leaves of healthy tomato plants, inhibited *X. vesicatoria* growth in antibiosis tests and protected the tomato plants against this plant pathogen. Tomato plants sprayed with *B. pumilus* and *P. macerans* had bacterial spot reduced by 63.5 and 56.6%, respectively, compared to the control plants (LANNA FILHO; ROMEIRO; ALVES, 2010). Later, the same authors have demonstrated that protein fractions from *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. pumilus*, isolated from tomato stems, could promote the induction of tomato plants resistance against *X. vesicatoria* (LANNA FILHO *et al.*, 2013).

The sequencing of the gene 16S rRNA allowed the taxonomic identification of the strains LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 as belonging to the genus *Bacillus*. Genomic analysis has revealed that the strain LAFUEL 03 has ~97% of similarity with several strains of *B. velezensis*. Further, the ANI of ≥ 95% is a threshold level to classify organisms in the same species (RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009; SANGAL *et al.*, 2016), whereas genomes of organisms with ANI values < 94% indicates that these organisms may belong to different species (SANGAL *et al.*, 2016). In this study, an ANI of ~97% confirmed that the LAFUEL 03 isolate belongs to the *B. velezensis* species.

The genome of the strain LAFUEL 03 has specific clusters of genes related to biosynthesis of secondary metabolites and genes involved in the biofilm formation and swarming motility, which may play significant role in pathogen antagonism. Other studies also described this potential of *B. velezensis* strains. As an example, the LABIM 22 strain presented almost the same genes related to biofilm

formation and swarming motility founded in the LAFUEL 03 strain, which are very similar to clusters of genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites (TEIXEIRA *et al.*, 2021). Besides pathogen antagonism, other studies also demonstrated the capability of plant growth promotion of *B. velezensis* strains, mainly for soybean (CHEN *et al.*, 2009a; SIBPONKRUNG *et al.*, 2017). The high genomic similarity of the LAFUEL 03 and the reference strain *B. velezensis* FZB42 suggests that the LAFUEL 03 strain could also present the capability of plant growth promotion.

Surfactins and fengicin clusters are well-known for their role in antimicrobial activity, (ONGENA *et al.*, 2007; DELEU; PAQUOT; NYLANDER, 2008), however LAFUEL 03 did not present high similarities with those molecules. Studies carried out with *B. velezensis* strain FZB42 associated its antagonistic activity against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight on apples, pears, and some other members of the family Rosaceae (MYUNG *et al.*, 2016), with the production of difficidin and bacilysin (CHEN *et al.*, 2009b). The results obtained herein indicated that two clusters found in the genome of the strain LAFUEL 03 that showed 100% similarity in the database MiBiG for the synthesis of these molecules, could also explain its potential against bacterial diseases, such the ones caused by *Xvv*. The LAFUEL 03 strain had 100% similarity with a gene cluster of bacillibactin production, an important siderophore (DERTZ *et al.*, 2006; MIETHKE *et al.*, 2006). *Bacillus* species with antifungal activity have already been reported by producing siderophores (YU *et al.*, 2011).

In addition to the results obtained from *in silico* analysis, *B. velezensis* strain LAFUEL 03 showed a high *in vitro* antagonism against *Xvv* and reduced BLS severity in corn plants. The results of our study indicated that the *Bacillus* sp. strains LAFUEL 01, LAFUEL 02 and *Bacillus velezensis* LAFUEL 03 are promising biological control agents for *Xvv*, the causal agent of bacterial leaf streak of corn.

CONCLUSIONS

The isolates LAFUEL 01, LAFUEL 02 of *Bacillus* sp. and LAFUEL 03 of *Bacillus velezensis*, and their metabolites have antagonistic activity against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strain RL1 and are able to control the bacterial leaf streak of corn. Further, the *Bacillus* sp. isolates can be considered promising agents for the biocontrol of bacterial leaf streak of corn. However, it is necessary to investigate the formulation, frequency, and mode of application of these potential biocontrol agents.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was ganted by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (202819/2019-1 and 141213/2019-1) and the *Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR/Emater* (IDR/Paraná). We appreciate the collaboration of *Embrapa Soja*, Londrina, PR, Brazil, and the University of Florida, Gainesville, FL, USA.

REFERENCES

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDREWS, S. "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data", available at: [http:// www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) (accessed September 13, 2021) 2010.
- AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, Londres, v. 9, p. 75, 2008.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, Londres, v. 363, p. 761–776, 2008.
- BHATTACHARYYA, P. N.; GOSWAMI, M. P.; BHATTACHARYYA, L. H. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 8, p. 26–41, 2016.

BLIN, K.; SHAW, S.; STEINKE, K.; VILLEBRO, R.; ZIEMERT, N.; LEE, S. Y. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 47, p. W81–W87, 2019.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Londres, v. 26, p. 211-252, 1964.

CAO, Y.; ZHANG, Z.; LING, N.; YUAN, Y.; ZHENG, X.; SHEN, B.; SHEN, Q. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. **Biology and Fertility of Soils**, Amsterdam, v. 47, p. 495-506, 2011.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 140, p. 27–37, 2009a.

CHEN, X. H.; SCHOLZ, R.; BORRISS, M.; JUNGE, H.; MÖGEL, G.; KUNZ, S. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 140, p. 38–44, 2009b.

CHU, F.; KEARNS, D. B.; MCLOON, A.; CHAI, Y.; KOLTER, R.; LOSICK, R. A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 68, p. 1117–1127, 2008.

DAUNGFU, O.; YOUNPENSUK, S.; LUMYONG, S. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. **Tropical Life Sciences Research**, Pulau Pinang, v. 30, n. 1, p. 73–88, 2019.

DAS, R.; MONDAL, B.; MONDAL, P.; KHATUA, D. C.; MUKHERJEE, N. Biological management of citrus canker on acid lime through *Bacillus subtilis* (S-12) in West Bengal, India. **Journal of Biopesticides**, Tamil Nadu, v. 7, p. 38-41, 2014.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 94, p. 2667– 2679, 2008.

DERTZ, E. A.; XU, J.; STINTZI, A.; RAYMOND, K. N. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 128, p. 22–23, 2006.

DUNLAP, C. A.; KIM, S.-J.; KWON, S.-W.; ROONEY, A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenom. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Cambridge, v. 66, p. 1212–1217, 2016.

DYER, R. A. Botanical surveys and control of plant diseases. **Farming in South Africa**, Pretoria, v. 24, n. 275, p. 119-121, 1949.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 1792-97, 2004.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H.-P.; BORRISS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers Microbiology**, Lausanne, v. 8: p. 22, 2017.

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H. F. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 631-639, 2005.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies, **Bioinformatics**, Londres, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.

HARTMAN, T.; HARBOUR, J.; THARNISH, B.; VAN METER, J.; JACKSON-ZIEMS, T. Agronomic factors associated with bacterial leaf streak development caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1132-1138, 2020a.

HARTMAN, T.; THARNISH, B.; HARBOUR, J.; YUEN, G. Y.; JACKSON-ZIEMS, T. A. A. Alternative hosts in the families Poaceae and Cyperaceae for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1147-1152, 2020b.

HE, P.; HAO, K.; BLOM, J.; RÜCKERT, C.; VATER, J.; MAO, Z.; WU, Y.; HOU, M.; HE, P.; HE, Y.; BORRISS, R. Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 281-91, 2012.

HUANG, T-P.; TZENG, D. D-S.; WONG, A. C. L.; CHEN, C-H.; LU, K-M.; LEE, Y-H. DNA Polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, n. 7, p. e42124, 2012.

ISLAM, M. N.; ALI, M. S.; CHOI, S. J.; HYUN, J. W.; BAEK, K. H. Biocontrol of citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using an endophytic *Bacillus thuringiensis*. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 35, n. 5, p. 486, 2019.

ISSAZADEH, K.; RAD, S. K.; ZARRABI, S.; RAHIMIBASHAR, M. R. Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovum* subsp. *carotovorum*. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 6, n. 7, p. 1615–1620, 2012.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations.

Journal of the American Statistical Association, Oxford, v. 53, p. 457–81, 1958.

KIM, S.-J.; KWON, S.-W.; DUNLAP, C. A.; ROONEY, A. P. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Cambridge, v. 65, p. 2104–2109, 2015.

KOBAYASHI, K. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 66, p. 395–409, 2007.

KORUS, K.; LANG, J. M.; ADESEMOYE, A. O.; BLOCK, C. C.; PAL, N.; LEACH, J. E.; JACJSON-ZIEMS, T. A. First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, p. 1030, 2017.

KOZLOV, A. M.; DARRIBA, D.; FLOURI, T.; MOREL, B.; STAMATAKIS, A. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 35, p. 4453–4455, 2019.

KRUEGER, F. Trim-Galore! 2018. Disponível em:
http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/ Acesso em: Dez 2021.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, 1952, v. 47, n. 260, pp.583-621.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A. M.; ALLONI, G.; AZEVEDO, V. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, Londres, v. 390, p. 249–256, 1997.

LANNA FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1381–1387, 2010.

LANNA FILHO, R.; SOUZA, R. M.; MAGALHÃES, M. M.; VILLELA, L.; ZANOTTO, E.; RIBEIRO-JÚNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V. Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. **Tropical Plant Pathology**, Amsterdam, v. 38, p. 295–302, 2013.

LANG, J. M.; DUCHARME, E.; IBARRA CABALLERO, J.; LUNA, E.; HARTMAN, T.; ORTIZ-CASTRO, M.; KORUS, K.; RASCOE, J.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; BROEDERS, K.; LEACH, J. E. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, p. 1312-1321, 2017.

LEITE JÚNIOR, R. P.; CUSTODIO, A. A. DE P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.;

DUIN, I. M.; RODRIGUES, V. H. S. First report of the occurrence of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 103, p. 145, 2019.

LIU, K.; MCINROY, J. A.; HU, C. H.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant-growth-promoting Rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, p. 67–72, 2018.

LONGHI, T. V.; ROBAINA, R. R.; LEITE JÚNIOR, R. P.; BALBI-PEÑA, M. I. Sensibility of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* to chemicals and efficiency of the chemical control of bacterial leaf streak on corn plants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 44, p. e54952, 2022.

MARASCO, R.; ROLLI, E.; ETTUOMI, B.; VIGANI, G.; MAPELLI, F.; BORIN, S. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, p. e48479, 2012.

MEDEMA, M. H.; KOTTMANN, R.; YILMAZ, P.; CUMMINGS, M.; BIGGINS, J. B. BLIN, K. Minimum information about a biosynthetic gene cluster. **Nature Chemical Biology**, Berlin, v. 11, p. 625–631, 2015.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H.-P.; GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 14, p. 60–14, 2013.

MIETHKE, M.; KLOTZ, O.; LINNE, U.; MAY, J. J.; BECKERING, C. L.; MARAHIEL, M. A. (2006). Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 61, p. 1413–1427, 2006.

MISHRA, S.; ARORA, N. K. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, p. 693–702, 2012.

MSADEK, T.; KUNST, F.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. DegS-DegU and ComPComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene degQ. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 2366–2377, 1991.

MURATE, L. S.; DE OLIVEIRA, A. G.; HIGASHI, A. Y.; BARAZETTI, A. R.; SIMIONATO, A. S.; SILVA, C. S.; SIMOES, G. C.; SANTOS, I. M. O.; FERREIRA, M. R.; CELY, M. V. T.; NAVARRO, M. O. P.; FREITAS, V. F.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, JOÃO C.P.; LEITE JUNIOR, R. P.; ANDRADE, G. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. **Agricultural Sciences**, Wuhan, v. 6, n. 3, p. 295–303, 2015.

MYUNG, I.-S.; LEE, J.-Y.; YUN, M.-J.; LEE, Y.-H.; LEE, Y.-K.; PARK, D.-H. Fire blight of apple, caused by *Erwinia amylovora*, a new disease in Korea. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, p. 1774–1774, 2016.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, p. 1084–1090, 2007.

ORTIZ-CASTRO, M.; HARTMAN, T.; COUTINHO, T.; LANG, J. M.; KORUS, K.; LEACH, J. E.; JACHSIN-ZIEMS, T.; BRODERS, K. Current Understanding of the History, Global Spread, Ecology, Evolution, and Management of the Corn Bacterial Leaf Streak Pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1124-1131, 2020.

ORTIZ-CASTRO, M. C. Understanding the disease ecology of the corn bacterial leaf streak pathogen *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Dissertação de Mestrado Fort Collins, 98 p. 2019.

PAGE, A. J.; CUMMINS, C. A.; HUNT, M.; WONG, V. K.; REUTER, S.; HOLDEN, M. T.; FOOKES, M.; FALUSH, D.; KEANE, J. A.; PARKHILL, J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, Londres, v. 31, n. 22, p. 3691-3, 2015.

PAL, K. K., GARDENER, B. M. **Biological control of plant pathogens**. The Plant Health Instructor, 2006.

PEDREIRA, T.; ELFMANN, C.; STÜLKE, J. The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 50, p. D875–D882, 2022.

PENHA, R. O.; VANDENBERGHE, L. P. S.; FAULDS, C.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. **Planta**, Amsterdam, v. 251, p. 70, 2020.

PEREZ-QUINTERO, A. L.; ORTIZ-CASTRO, M.; WU, G.; LANG, J. M.; LIU, S.; CHAPMAN, T. A.; CHANG, C.; ZIEGLE, J.; PENG, Z.; WHITE, F. F.; PLAZAS, M. C.; LEACH, J. E.; BRODERS, K. Genomic acquisitions in emerging populations of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* infecting corn in the U.S. and Argentina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1161–1173, 2020.

PLAZAS, M. C.; ROSSI, R. L. DE; BRÜCHER, E.; GUERRA, F. A.; VILARÓ, M.; GUERRA, G. D.; WU, G.; ORTIZ-CASTRO, M. C.; BRODERS, K. First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 1026, 2018.

RAMBAUT, A. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed Dez 2021. 2018.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 19126–19131, 2009.
- ROBAINA, R. R.; LONGHI, T. V.; ZECCA, D. M.; GONÇALVES, L. S.; LEITE JÚNIOR, R. Development of a protocol and a diagrammatic scale for quantification of bacterial leaf streak disease on young plants of maize. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 104, n. 11, 2020.
- ROBERTSON, J. B.; GOCHT, M.; MARAHIEL, M. A.; ZUBER, P. AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 8457–8461, 1989.
- RÜCKERT, C.; BLOM, J.; CHEN, X.; REVA, O.; BORRISS, R. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 155, p. 78–85, 2011.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Londres, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SANGAL, V.; GOODFELLOW, M.; JONES, A. L.; SCHWALBE, E. C.; BLOM, J.; HOSKISSON, P. A. Next-generation systematics: an innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. **Scientific Reports**, Nature, v. 6, p. 38392, 2016.
- SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, Londres, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.
- SIBPONKRUNG, S.; KONDO, T.; TANAKA, K.; TITABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. Genome sequence of *Bacillus velezensis* S141, a new strain of plant growth-promoting rhizobacterium isolated from soybean rhizosphere. **Genome Announcements**, Washington, v. 5, p. 7–8, 2017.
- SINGH, D.; DHAR, S.; YADAV, D. K. Effect of endophytic bacterial antagonists against black rot disease of cauliflower caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, n. 2, p. 122–126, 2010.
- STRAUCH, M. A.; BOBAY, B. G.; CAVANAGH, J.; YAO, F.; WILSON, A.; LE BRETON, Y. Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 7720–7732, 2007.
- STUDHOLME, D. J.; WICKER, E.; ABRARE, S. M.; ASPIN, A.; A BOGDANOVE, A.; BRODERS, K.; DUBROW, Z.; GRANT, M.; JONES, J. B.; KARAMURA, G.; LANG, J.; LEACH, J.; MAHUKU, G.; NAKATO, G. V.; COUTINHO, T.; SMITH, J.; BULL, C. T. Transfer of *Xanthomonas campestris* pv. *arecae*, and *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* to *Xanthomonas vasicola* (Vauterin) as *Xanthomonas vasicola* pv. *arecae* comb. nov., and *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* comb. nov. and

description of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* pv. nov. **Phytopathology**, Saint Paul, v.110, n. 6, p. 1153-1160, 2020.

STULBERG, M.; SANTILLANA, G.; STUDHOLME, D. J.; KASIBORSKI, B.; ORTIZ-CASTRO, M.; BRODERS, K.; ARIAS, S. L.; BLOCK, C. C.; MUNKVOLD, G. P.; RASCOE, J. Genomics- informed molecular detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains causing severe bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1174. 2020.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Londres, v. 10, p. 512-526, 1993.

TEIXEIRA, G. M.; MOSELA, M.; NICOLETTO, M. L. A.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M.; YOUSSEF, K.; HIGASHI, A. Y.; MIAN, S.; FERREIRA, A. S.; GONÇALVES, L. S. A.; PEREIRA, U. P.; DE OLIVEIRA, A. G. Genomic insights into the antifungal activity and plant growth-promoting ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, p. 618415, 2021.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology**, Nova York, v. 2, p. 194–208, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive bayes classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WICK, R. R.; JUDD, L. M.; GORRIE, C. L.; HOLT, K. E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computacional Biology**, São Francisco, v. 13, n. 6, p. e1005595, 2017.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n 2, p. 697-703, 1991.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 47, p. 138–145, 2011.

ZHANG, L.; BIRCH, R. G. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 448-54, 1997.

ZWICK, M. E.; JOSEPH, S. J.; DIDELOT, X.; CHEN, P. E.; BISHOP-LILLY, K. A.; STEWART, A. C.; WILLNER, K.; NOLAN, N.; LENTZ, S.; THOMASON, M. K.; SOZHAMANNAN, S.; MATECZUN, A. J.; DU, L.; READ, T. D. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. **Genome Research**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 1512-24, 2012.

SUPPLEMENTARY

Figure S1. Probability of growth inhibition of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* RL1 strain by the isolates LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03 of *Bacillus* sp. grown in two culture media, LB and ISP2, according to the nonparametric Kaplan-Meier analysis (log-rank test).

