



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

EFICÁCIA DE *Bacillus velezensis mandacaium*, ISOLADO DO ALIMENTO LARVAL
DE ABELHAS SEM FERRÃO, NO CONTROLE DA PÚSTULA BACTERIANA
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) NA CULTURA DA SOJA

Aluno: Joberth Lee Corrêa

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira / IBTEC-UFU

Co-Orientadora: Profa. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA - MG

2024



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**EFICÁCIA DE *Bacillus velezensis mandacaium*, ISOLADO DO ALIMENTO LARVAL
DE ABELHAS SEM FERRÃO, NO CONTROLE DA PÚSTULA BACTERIANA
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) NA CULTURA DA SOJA**

Aluno: Joberth Lee Corrêa

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira / IBTEC-UFU

Co-Orientadora: Profa. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Mestre
em Genética e Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA - MG

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C824e
2024 Corrêa, Joberth Lee, 1989-
 Eficácia de *Bacillus velezensis mandacaium*, isolado do alimento larval de abelhas sem ferrão, no controle da pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) na cultura da soja [recurso eletrônico] / Joberth Lee Corrêa. - 2024.

Orientador: Carlos Ueira-Vieira.

Coorientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5173>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Ueira-Vieira, Carlos, 1981-, (Orient.). II. Tebaldi, Nilvanira Donizete (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Quatro de julho de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	09:00h
Matrícula do Discente:	12222GBI006				
Nome do Discente:	Jobberth Lee Corrêa				
Título do Trabalho:	Eficácia de <i>Bacillus velezensis mandacaium</i> , isolado do alimento larval de abelhas sem ferrão, no controle da pústula bacteriana (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Glycines</i>) na cultura da soja.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular e Celular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Potencial Biotecnológico Do Microbioma De Abelhas Brasileiras.				

Aos quatro dias do mês de julho de dois mil e vinte e quatro, às 08:30h, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Google Meet*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Carlos Ueira Vieira (Orientador), Adriana Figueiredo e Ana Carolina Silva Siquieroli. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Carlos Ueira Vieira apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após

cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/07/2024, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Silva Siquieroli, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/07/2024, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Figueiredo, Usuário Externo**, em 04/07/2024, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5463556** e o código CRC **BBF34C2F**.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

EFICÁCIA DE *Bacillus velezensis mandacaium*, ISOLADO DO ALIMENTO LARVAL
DE ABELHAS SEM FERRÃO, NO CONTROLE DA PÚSTULA BACTERIANA
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) NA CULTURA DA SOJA

ALUNO: Joberth Lee Corrêa

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira / IBTEC-UFU

Examinadores:

Data da Defesa: ___04___ / ___07___ / ___2024___

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira / IBTEC-UFU

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais André Luiz Corrêa e Maria Aparecida Corrêa, a minha esposa Ana Carolina Costa Santos e ao meu filho Artur Costa Corrêa, pelo apoio, confiança e amor! Com vocês ao meu lado tudo fica mais fácil.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por oferecer infraestrutura para a realização desse trabalho. Agradecer a Deus, meu pai André e minha mãe Maria Aparecida, que sempre me deram total apoio para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos.

A minha esposa Ana Carolina, em especial, que sempre me incentivou a enfrentar meus desafios e ter me ajudado a conquista-los ao longo da vida. Aos meus amigos que caminharam junto comigo nessa longa e difícil jornada.

Quero deixar aqui meus sinceros agradecimentos aos professores que durante esses 2 anos se prontificaram em dar o seu melhor sempre a fim de nos capacitar para que possamos ser bons pesquisadores e nos preparar para alcançar novos desafios, agradeço a todos aqueles que de algum modo, independente da distância, fizeram ou fazem parte da minha vida e torcem pela minha evolução e felicidade.

Às Agências de Fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro na categoria APQ concedido ao Orientador e Co-orientadora dessa Pesquisa. À todos que colaboraram conosco e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho!

Muito obrigado!

Sumário

APRESENTAÇÃO:	1
CAPÍTULO 1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
1 A CULTURA DA SOJA.....	3
1.1 Origem e introdução no ocidente.....	3
1.2 Expansão da Cultura no Brasil	4
1.3 Avanços Tecnológicos.....	4
1.4 Impacto Econômico e Produção Atual	4
1.5 Perspectivas e Desafios.....	5
1.6 Utilização e Benefícios	5
2 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA SOJA	6
3 DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA.....	7
3.1 Principais doenças da Soja.....	7
4 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS COM PRODUTOS BIOLÓGICOS. 9	
4.1 Agentes de controle biológico de doenças de plantas e seus principais alvos	10
4.2 Bacillus no controle de fitopatógenos	11
5 ABELHAS SEM FERRÃO	12
5.1 Características gerais	12
5.2 O Alimento Larval.....	13
5.3 Microbiota associado ao alimento larval	14
6 TECNOLOGIAS “ÔMICAS”	15
6.1 Sequenciamento de DNA de Nova Geração (NGS).....	15
REFERÊNCIAS:	17
CAPÍTULO 2-ARTIGO CIENTIFICO	25

Apresentação:

A soja é uma cultura de fundamental importância econômica e nutricional, devido ao seu alto teor de proteína e à sua versatilidade na indústria alimentícia e na produção de biocombustíveis. No entanto, a produtividade da soja é severamente afetada por doenças como a pústula bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. A resistência crescente dessas doenças aos tratamentos convencionais tem aumentado a dependência de produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. A busca por alternativas biológicas é essencial para um manejo mais sustentável das pragas e doenças da soja. O uso de biopesticidas e agentes biocontroladores, como *Bacillus velezensis*, oferece uma solução promissora para reduzir a dependência de agroquímicos, minimizar impactos ambientais negativos e promover uma agricultura mais equilibrada e segura.

No capítulo I, é fornecida uma revisão teórica abrangente que aborda os principais temas essenciais para a compreensão deste trabalho. Inicialmente, discorre-se sobre a cultura da soja, detalhando sua origem, expansão no Brasil, avanços tecnológicos, impacto econômico e produção atual. Em seguida, são discutidos os principais desafios e doenças que afetam a soja, destacando a necessidade de controle de fitopatógenos com produtos biológicos. São apresentados os agentes de controle biológico de doenças de plantas, com destaque para o uso de *Bacillus* no combate a fitopatógenos. O capítulo também explora as características gerais das abelhas sem ferrão, focando no alimento larval e na microbiota associada. Por último, são abordadas as tecnologias “ômicas”, com ênfase no sequenciamento de DNA de nova geração (NGS), que proporcionam avanços significativos na pesquisa e desenvolvimento de soluções biotecnológicas para a agricultura.

Já no capítulo II, apresenta um artigo científico sobre o uso de agentes biológicos para o controle sustentável de doenças de plantas. Destacam-se os resultados promissores do *Bacillus velezensis* na inibição do crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. O sequenciamento genômico revelou genes codificadores de proteínas com propriedades antimicrobianas, destacando o potencial desses agentes biológicos no manejo eficaz de doenças de plantas e a importância das abordagens biológicas na agricultura sustentável.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1 A CULTURA DA SOJA

1.1 Origem e introdução no Ocidente

A *Glycine max*, comumente conhecida como soja, é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, originária do nordeste da China. A história de seu cultivo remonta a aproximadamente 3000 anos A.C. A soja se espalhou do Oriente para o Ocidente, facilitada pelas explorações marítimas (EMBRAPA, 2019; MANDARINO, 2017). A espécie resultou do cruzamento de variedades selvagens que foram domesticadas na antiga China, destacando-se como uma fonte alimentar acessível e rica em óleo e proteínas de alta qualidade tanto para humanos quanto para animais, superando outras leguminosas e proteínas animais (MACEDO *et al.*, 2003).

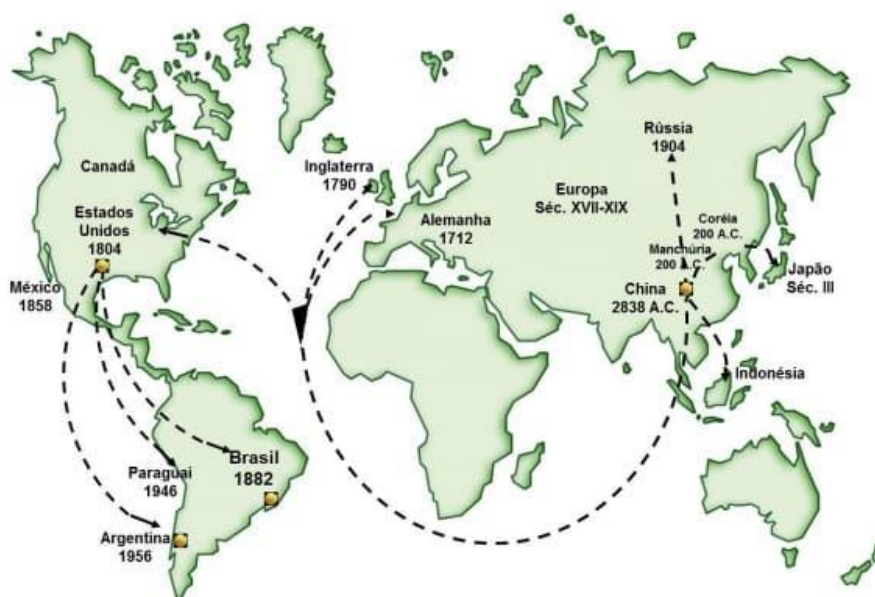


Figura 1: Origem e difusão geográfica da soja pelo mundo - Fonte: Bonetti, 1970

A introdução da soja na Europa ocorreu por volta de 1730, inicialmente com propósitos ornamentais. Em 1880, a cultura chegou ao continente americano, sendo introduzida nos Estados Unidos. No Brasil, os primeiros experimentos com soja datam de 1882, realizados na Bahia por Gustavo D'utra (CÂMARA, 1998). No entanto, as variedades importadas dos EUA mostraram melhor desempenho em termos de solo e clima no Sul do Brasil (BONATO & BONATO, 1987; MANDARINO, 2017; ZANON, 2018).

No continente americano, a introdução em 1917, os americanos inovaram ao adotar processos industrializados na extração de farelo de soja para a alimentação animal. Na década de 1970, os Estados Unidos consolidaram sua posição como os principais produtores, contribuindo com dois terços da produção global de soja (HARTMAN *et al.*, 2011).

1.2 Expansão da Cultura no Brasil

A evolução da cultura da soja no Brasil pode ser dividida em quatro fases distintas (GAZZONI & DALL'AGNOL, 2018): 1- Fase Inicial de Expansão no Sul (1960-1970): A produção atingiu 8,9 milhões de toneladas em 1979. 2- Expansão no Centro-Oeste (1980-1990): A produção alcançou 13,36 milhões de toneladas em 1999. 3- Incorporação da Região MATOPIBA (2000-2010): Produção de 4,3 milhões de toneladas em 2011. 4- Expansão Recente (2011-presente): Expansão para novas áreas como Pará, Rondônia, Roraima e regiões do Nordeste e Sudeste do Mato Grosso.

1.3 Avanços Tecnológicos

A expansão da soja no Brasil foi impulsionada por avanços tecnológicos, especialmente no aprimoramento genético das cultivares para melhor adaptação às condições regionais, particularmente em áreas de baixa latitude com clima tropical (ZANON, 2015).

A implementação de programas de aprimoramento genético da soja no Brasil propiciou a expansão da cultura para regiões de baixas latitudes. Isso foi alcançado por meio do desenvolvimento de cultivares mais adaptadas, incorporando genes que retardam o florescimento, mesmo em condições de fotoperíodo indutor, conferindo à planta a característica de apresentar um período juvenil prolongado (KIIHL & GARCIA, 1989).

1.4 Impacto Econômico e Produção Atual

Conforme a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a soja é uma das principais commodities agrícolas globais. No ciclo agrícola 2022/23, o Brasil produziu mais de 150 milhões de toneladas, consolidando-se como o maior produtor mundial, à frente dos Estados Unidos e Argentina, conforme indicado pelo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab).

Entre 1973 e 2023, a produção aumentou mais de 1000%, e a área cultivada cresceu mais de 400%, com grande parte destinada à exportação, principalmente para a China (CONTINI *et al.*, 2018; BARBOSA *et al.*, 2021).

1.5 Perspectivas e Desafios

Para a safra 2023/24, a produção de grãos no Brasil é prevista em 316,7 milhões de toneladas, uma redução de 1,5% em relação à safra anterior devido a condições climáticas adversas. A produção de soja está projetada para alcançar 162,4 milhões de toneladas, com um aumento de 2,8% na área cultivada, reforçando a liderança do Brasil na produção global de soja segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB).

1.6 Utilização e Benefícios

A soja é utilizada em diversos produtos alimentares, substituindo carne, leite e ovos. Oferece benefícios à saúde humana, como redução do risco de câncer de próstata e mama, alívio dos sintomas da menopausa e melhora da saúde óssea (XIAO, 2008). Produtos derivados da soja incluem leite de soja, molho de soja, tofu, iogurte de soja, farinha de soja e brotos de soja (BEHRENS, 2004).

A soja desempenha um papel vital na agricultura e economia global, com o Brasil sendo um dos principais produtores e exportadores. A evolução da cultura da soja no país demonstra avanços tecnológicos e estratégias de adaptação podem impulsionar a agricultura, contribuindo significativamente para a segurança alimentar global (HOLT, 1997).



Figura 2: O que pode ser produzido a partir da soja. Fontes: EMBRAPA e APROSOJA.

2 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA SOJA

A soja cultivada *Glycine max* é uma planta herbácea anual, autógama, originária da costa leste da Ásia, na região da Manchúria, localizada no nordeste da China. Esta planta adota um mecanismo de fixação de carbono do tipo C3. Classificada na classe Dicotyledoneae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae e subtribo glycininae (JUDD *et al.*, 2008). A ocorrência de polinização cruzada em uma população é bastante limitada, não ultrapassando 1% (BORÉM *et al.*, 1999).

O ciclo da soja, que compreende desde a germinação até a maturação fisiológica, apresenta uma variação temporal que se estende de 75 a 200 dias. A trajetória da planta é distintamente dividida em duas fases, a vegetativa e a reprodutiva, representadas pelas letras V e R, respectivamente. Ambas as fases são subdivididas em índices numéricos que identificam estágios específicos do desenvolvimento da planta (FARIAS *et al.*, 2007).

A plântula emerge entre quatro e dez dias após o plantio, variando de acordo com as condições de umidade, temperatura e profundidade de plantio. O período vegetativo se estende até o início da floração, abrangendo um intervalo de 40 a 70 dias. A fase de floração tem duração variável, compreendendo de 7 a 15 dias, marcando o início do crescimento do fruto. A maturação fisiológica dos grãos ocorre em um período de 40 a 70 dias após o término da fase de floração (MARTINS *et al.*, 2016).

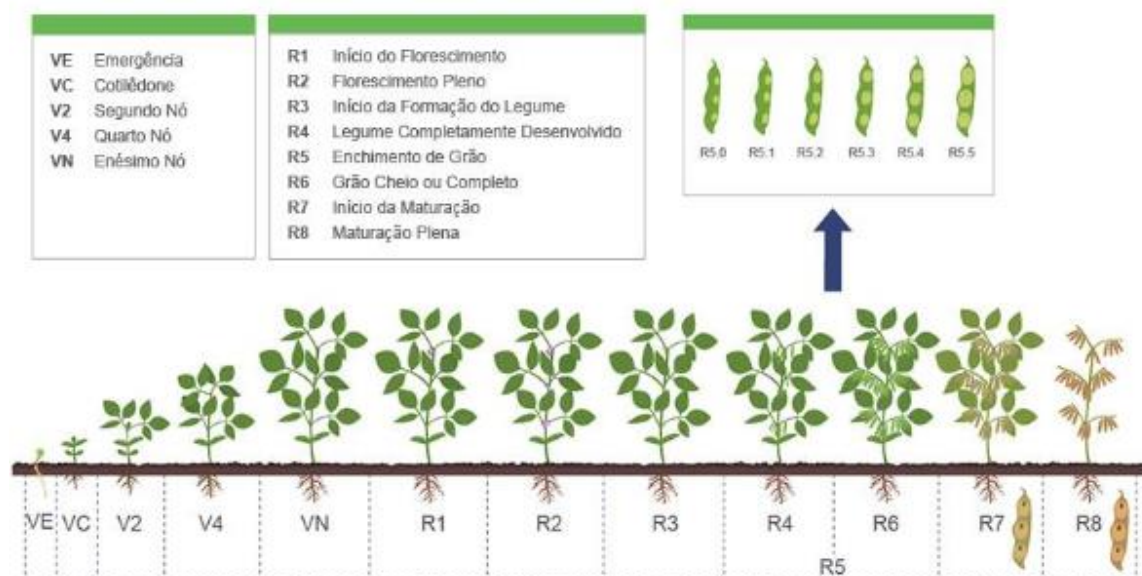


Figura 3: Mostra o ciclo da cultura da soja Fonte: FEHR, CAVINESS (1977)

A janela de plantio recomendada para a cultura da soja, abrangendo a maioria dos estados produtores do Brasil, estende-se de meados de outubro a meados de dezembro, com ênfase especial no mês de novembro (FIETZ & RANGEL, 2008). Em linhas gerais, a escolha da época de plantio deve propiciar condições térmicas situadas entre 20°C e 30°C, com ênfase nas proximidades de 30°C. Além disso, é desejável viabilizar uma precipitação na faixa de 400 a 800 mm por ciclo (FARIAS *et al.*, 2007).

Contudo, alguns elementos ainda podem restringir o potencial produtivo máximo das variedades, como é o caso das pragas e doenças que afetam a cultura. As doenças representam um dos principais obstáculos que impedem a soja de atingir seu potencial máximo de produção, destacando-se aquelas provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (SILVA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2007).

3 DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA

3.1 Principais doenças da Soja

As enfermidades que afetam a soja representam um desafio significativo para os agricultores, com destaque para a Ferrugem Asiática, provocada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, que é reconhecida como a mais devastadora, podendo resultar em perdas de produção que variam de 10% a 90%. A disseminação desse fungo ocorre por meio de uredósporos transportados pelo vento, sendo crucial a implementação de estratégias de controle, como o manejo integrado com vazios sanitários, o uso de fungicidas específicos e práticas agrícolas adequadas para redução do inóculo do patógeno (JULIATTI *et al.*, 2004; YORINORI *et al.*, 2002; YORINORI *et al.*, 2005).

Além disso, a Antracnose, ocasionada pelo fungo *Colletotrichum dematium var. truncata*, e o oídio, causado pelo fungo *Microsphaera diffusa*, também representam desafios significativos para os produtores, demandando estratégias de controle como rotação de culturas, tratamento de sementes e utilização de variedades resistentes (GALLI *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2014; REIS & BRESOLIN, 2007).

Outra doença de relevância que impacta a cultura da soja é o crestamento bacteriano, causado pela bactéria *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*, cuja propagação ocorre por sementes infectadas e resíduos de cultivos, prosperando em condições de alta umidade e temperaturas moderadas. O controle eficaz dessa doença envolve a adoção de cultivares resistentes, sementes de qualidade e práticas culturais adequadas, incluindo a rotação de culturas (HENNING *et al.*, 2014; ITO, 2013; LANNA FILHO, 2015). Além disso, os

nematoides causadores de galhas, especialmente *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, representam um desafio adicional para os agricultores de soja, com métodos de controle eficazes incluindo a rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes, considerando a temperatura ótima para o ciclo de vida desses nematoides (FERRAZ *et al.*, 2010; HENNING *et al.*, 2014; SEIXAS *et al.*, 2020).

O vírus do mosaico comum da soja (SMV) também é uma preocupação significativa, sendo transmitido por pulgões e acarretando prejuízos expressivos na produção de soja. Estratégias de controle eficazes incluem o emprego de cultivares resistentes, fundamentais para mitigar os danos provocados por esse vírus e preservar a produtividade das lavouras (BARROS & SILVA, 1992; HENNING *et al.*, 2014; SEIXAS *et al.*, 2020).

Por último temos a pústula bacteriana, provocada pela fitobactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* *pv. glycines*, é uma enfermidade recorrente que afeta variedades de soja (GORADIA *et al.*, 2009). A severidade desta doença, que pode atingir até 70%, é observada sob condições ambientais específicas, tais como elevadas temperaturas e umidade, que propiciam a colonização e desenvolvimento dos patógenos (ZINSOU *et al.*, 2015).

É uma das doenças foliares amplamente difundidas em países produtores de soja, incluindo o Brasil, China, Argentina e Estados Unidos (GORADIA *et al.*, 2009). Sua incidência é maior em regiões caracterizadas por clima quente, úmido e com elevado volume de precipitação. As condições ideais para seu desenvolvimento são marcadas por alta umidade e temperaturas entre 28° C e 30° C (ITO, 2013). A bactéria, inicialmente, permanece na superfície das plantas saudáveis antes de penetrar no apoplasto por meio de aberturas naturais, como estômatos e ferimentos (CHATNAPARAT *et al.*, 2016).

Os sintomas são notados principalmente nas folhas, mas a doença também pode afetar hastes, pecíolos e vagens. As lesões são arredondadas e de coloração parda, nunca angulares. Na face inferior da folha, no centro da lesão, pode-se observar uma pequena elevação de cor esbranquiçada, que é característica da doença e dá origem ao seu nome comum, pústula bacteriana. Além dessa elevação, a pústula bacteriana se distingue do crestamento bacteriano pela ausência de brilho na face inferior da folha (SILVA *et al.*, 2019).

Para o controle da doença pústula bacteriana, têm-se utilizado cloromicetina, estreptomicina e fitolan (MEW, 1993), além de estreptomicina e oxicloreto de cobre (BORAH *et al.*, 2023). Adicionalmente, estratégias como o cultivo de variedades resistentes, alterações no calendário de semeadura e a aplicação de agentes biológicos, como as rizobactérias, têm sido apontadas como alternativas promissoras à utilização exclusiva de

compostos químicos no controle da pústula bacteriana (HONG *et al.*, 2012; HONG *et al.*, 2014; KHAERUNI. *et al.*, 2018). Diante da complexidade e do impacto dessas doenças na cultura da soja, é crucial que os agricultores adotem práticas de manejo integrado e medidas preventivas para assegurar a sustentabilidade e eficiência de suas plantações.



Figura 04: Pústula bacteriana, típica de folha, mas também infecta haste, pecíolo e vagem. As manchas são arredondadas, nunca angulares, e de coloração parda. Na face inferior da folha, no centro da lesão, ocorre pequena elevação de cor esbranquiçada, parecendo um vulcãozinho. Fonte: Rafael M. Soares

4 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS COM PRODUTOS BIOLÓGICOS

O controle biológico de doenças de plantas implica na redução do inóculo ou das atividades que causam a doença por parte de um patógeno, através da ação de um ou mais organismos não humanos (CONSTANTIN *et al.*, 2016). Assim, qualquer efeito prejudicial de um microrganismo sobre o desenvolvimento do patógeno resulta no controle biológico da doença.

Os microrganismos que agem contra os patógenos são denominados agentes de controle biológico ou antagonistas. A pesquisa e aplicação do controle biológico de doenças de plantas estão crescendo anualmente, especialmente para fitonematoides (*Meloidogyne spp.* e *Pratylenchus spp.*) e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na cultura da soja (MEDEIROS *et al.*, 2018).

No Brasil, o primeiro produto biológico para controle de doenças de plantas foi registrado em 2008 e o número de registros tem aumentado anualmente (BETTIOL *et al.*, 2019). Atualmente, diversas empresas de biocontrole com produtos eficazes estão estabelecidas no Brasil. Algumas oferecem agentes de alta qualidade a preços acessíveis, enquanto outras estão em processo de regularização junto ao Ministério da Agricultura (MAPA).

Além disso, as mudanças na pesquisa e na legislação do controle biológico de doenças no Brasil estão progredindo para uma melhor integração da pesquisa com a aplicação no campo e garantia de qualidade (HERRMANN *et al.*, 2014). A busca por produtos registrados no MAPA como biodefensivos e a confirmação de sua eficácia por meio de pesquisa são aspectos cruciais na decisão de compra. Atualmente, o mercado de controle biológico tem enfrentado o problema do "desvio de uso", onde produtos registrados como fertilizantes são comercializados/divulgados como biodefensivos. Os registros são distintos e essa questão merece atenção.

4.1 Agentes de controle biológico de doenças de plantas e seus principais alvos

No cenário atual, a estratégia de controle biológico através de microrganismos emerge como uma solução inteligente para mitigar ou mesmo erradicar a necessidade de agroquímicos no manejo de fitopatógenos. A ampla diversidade de microrganismos, acompanhada de suas interações antagônicas, assume um papel crucial no contexto do controle biológico. Notavelmente, no caso das bactérias, há uma considerável quantidade de pesquisas dedicadas à compreensão das interações entre antagonistas, patógenos e hospedeiros (ROMEIRO *et al.*, 2005; HALFELD *et al.*, 2006; RYAN *et al.*, 2008).

O aumento da busca por novos agentes de biocontrole nos últimos anos tem sido impulsionado pelos avanços na pesquisa genética combinados com trabalhos práticos (CHENTHAMARA & DRUZHININA, 2016). Embora diversos grupos demonstrem atividades antagônicas, como vírus, protozoários e nematoides de vida livre, a maioria dos estudos ainda se concentra em poucos grupos de microrganismos como antagonistas de patógenos de plantas (Medeiros *et al.*, 2018). A maioria dos produtos comerciais registrados globalmente são compostos por fungos e bactérias como agentes de controle de doenças de plantas.

Ademais, alguns desses agentes também são utilizados como agentes biológicos de controle de pragas nas lavouras, devido ao sucesso obtido ao longo dos anos na aplicação de gêneros como *Trichoderma* e *Bacillus* contra diversos patógenos e pragas em importantes culturas ao redor do mundo. Entretanto, outros fungos e bactérias demonstram atividade significativa contra importantes patógenos de plantas, despertando o interesse de empresas e pesquisadores. (MEDEIROS *et al.*, 2010; POMELLA & RIBERO, 2009).

O gênero *Trichoderma spp.* destaca-se como um dos casos de sucesso tanto na pesquisa quanto na aplicação em campo e lidera em número de produtos registrados. Este gênero atua principalmente contra fungos do solo e nematoides. As principais espécies estudadas para o controle de doenças de plantas são *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens* e *T. atroviride* (MEDEIROS *et al.*, 2010). No Brasil, o uso de produtos registrados à base de *Trichoderma* tem levado a uma redução no número de aplicações de fungicidas químicos em muitas culturas. A incidência de mofo branco em cultivos de soja, feijão e algodão pode ser reduzida com a aplicação de *Trichoderma*. No plantio direto, os restos culturais oferecem condições ideais para a colonização dos escleródios pelo agente de controle (POMELLA & RIBERO, 2009).

4.2 *Bacillus* no controle de fitopatógenos

Especificamente, o gênero *Bacillus spp.* destaca-se por sua capacidade de formar endósporos e apresentar uma diversidade de mecanismos antagônicos. Essa característica confere-lhe uma notável capacidade de adaptação e sobrevivência em ambientes específicos, além de uma versatilidade significativa nos mecanismos de ação utilizados para contornar as defesas dos fitopatógenos (LIU *et al.*, 2004).

O gênero *Bacillus* tem sido extensivamente estudado e aplicado no controle biológico, tanto na parte aérea quanto no solo. No Brasil, a maioria dos produtos bacterianos registrados para o controle de doenças de plantas é baseada em *Bacillus*. Sua diversidade de mecanismos de ação contra fungos, bactérias e nematoides, juntamente com a formação de estruturas de resistência, como os endósporos, fazem deste gênero uma escolha preferencial na formulação de produtos biológicos (MARIANO *et al.*, 2005; MEDICE, 2011).

O tratamento de sementes com produtos à base de *Bacillus* possibilita a colonização das raízes e a proteção contra infecções transmitidas pelo solo, além de algumas cepas promoverem o crescimento das plantas. Vários isolados de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* têm sido estudados em várias culturas, demonstrando eficácia na proteção contra patógenos no solo, em frutos após a colheita e na parte aérea (LIU *et al.*, 2013; MORA *et al.*, 2015).

Dentre as espécies consideradas importantes como PGPR, destaca-se o gênero *Bacillus*, que é capaz de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes, os quais têm potencial para inibir o crescimento de patógenos de plantas e microrganismos prejudiciais na rizosfera (ONGENA & JACQUES,

2008). *Bacillus spp.* são particularmente vantajosos em sistemas agrícolas devido à sua capacidade de formar esporos, que conferem resistência ao calor e à dessecação, e à sua capacidade de serem formulados em pós secos estáveis, com longa vida útil (CHOWDHURY *et al.*, 2013).

Em destaque está o *Bacillus velezensis* é uma bactéria do gênero *Bacillus* conhecida por suas propriedades de promoção do crescimento vegetal e controle biológico de fitopatógenos. Possui características como a produção de substâncias antimicrobianas, enzimas que degradam a parede celular de patógenos e a capacidade de colonizar as raízes das plantas, formando uma relação simbiótica benéfica. Essas características fazem do *Bacillus velezensis* um agente eficaz na supressão de doenças de plantas causadas por uma variedade de patógenos, incluindo fungos, bactérias e nematoides (BUTKHOT *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2018).

A ação do *Bacillus velezensis* contra fitopatógenos é atribuída à produção de uma variedade de metabólitos secundários, como antibióticos, surfactantes, enzimas hidrolíticas e peptídeos antimicrobianos. Esses compostos atuam de várias maneiras, como inibição do crescimento patogênico, competição por nutrientes e indução de resistência nas plantas hospedeiras. Estudos têm demonstrado a eficácia do *Bacillus velezensis* no controle de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Pseudomonas syringae*, oferecendo uma alternativa sustentável e ecologicamente amigável aos métodos convencionais de controle de doenças de plantas (LEE *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2023; WEI *et al.*, 2023;).

5 ABELHAS SEM FERRÃO

5.1 Características gerais

A biodiversidade das abelhas sem ferrão é uma área de interesse crescente na comunidade científica, com aproximadamente 500 espécies identificadas, predominantemente distribuídas na América Latina, Austrália, África e Ásia (JOHNSON & HUBBELL, 1974; SILVEIRA *et al.*, 2002; SANTOS, 2022). Uma das características primordiais desse conjunto de abelhas é a inexistência de um ferrão funcional (MELO *et al.*, 2020).

Esta peculiaridade distingue as abelhas sem ferrão de outras espécies de abelhas, influenciando seus comportamentos sociais, estratégias de defesa e interações com o

ambiente. Pertencentes à ordem Hymenoptera e à tribo Meliponini, essas abelhas podem ser agrupadas em dois gêneros principais: *Melipona* e *Trigona* (MICHENER, 2013). Esta diversidade taxonômica e geográfica desses insetos polinizadores destaca sua importância ecológica e econômica em diferentes ecossistemas ao redor do mundo.

As abelhas sem ferrão desempenham um papel crucial na polinização das árvores nativas, acredita-se que sejam responsáveis por uma ampla faixa, de 40 a 90%, deste processo (KERR *et al.*, 1996). Além disso, essas abelhas são reconhecidas como polinizadores eficientes em culturas economicamente relevantes, como morango, tomate, urucum, pimentão e guaraná (HEARD, 1999; ROSELINO *et al.*, 2010; SLAA *et al.*, 2006).

No entanto, apesar de sua importância, aproximadamente 100 espécies de meliponíneos no Brasil enfrentam o risco iminente de extinção, atribuído principalmente à perda de habitat e ao desmatamento das florestas nativas (LOPES *et al.*, 2005; PALAZUELOS, 2008). Esta situação ressalta a urgência de medidas de conservação para proteger esses polinizadores e os ecossistemas dos quais dependem.

5.2 O Alimento Larval

As abelhas sociais possuem um regime alimentar fundamentado na coleta de néctar e pólen. O néctar, uma substância açucarada, é coletado pelas abelhas e armazenado em seus papos de mel ou intestinos anteriores até ser entregue à colmeia. Lá, o néctar é submetido a processos de desidratação e fermentação (KERR *et al.*, 1996; NOGUEIRA, 1997; VIT *et al.*, 2013). Estes processos bioquímicos transformam o néctar em mel, que se torna a principal fonte de carboidratos para essas abelhas. Enquanto isso, o pólen coletado é transportado para a colônia, onde é processado pelas abelhas em um ciclo de maturação (NOGUEIRA, 1997).

O pólen maturado constitui a principal fonte de proteínas, lipídeos, e uma variedade de macro e micronutrientes essenciais para o desenvolvimento e a saúde da colônia (REBELO *et al.*, 2016; ROULSTON, 2000). Este complexo sistema de coleta e processamento de alimentos é crucial para a sobrevivência e o funcionamento das colmeias de abelhas sociais. O pólen maturado e o mel são essenciais para a confecção do alimento larval, substância responsável por nutrir a prole da colônia. Este alimento larval é uma composição complexa de pólen maturado, mel e secreções glandulares, e é depositado nas células de cria. Após a postura dos ovos pelas rainhas, essas células são seladas até que as

larvas se desenvolvam completamente (KERR *et al.*, 1996; NOGUEIRA, 1997; VIT *et al.*, 2013).

A composição do alimento larval varia, mas em média contém cerca de 40 a 60% de água, 5 a 12% de açúcares, 1,1 a 19,4% de proteínas e 0,2 a 1,3% de aminoácidos (HARTFELDER, 1989). Este complexo nutriente é fundamental para o desenvolvimento saudável das larvas e, conseqüentemente, para o crescimento e a viabilidade da colônia como um todo.

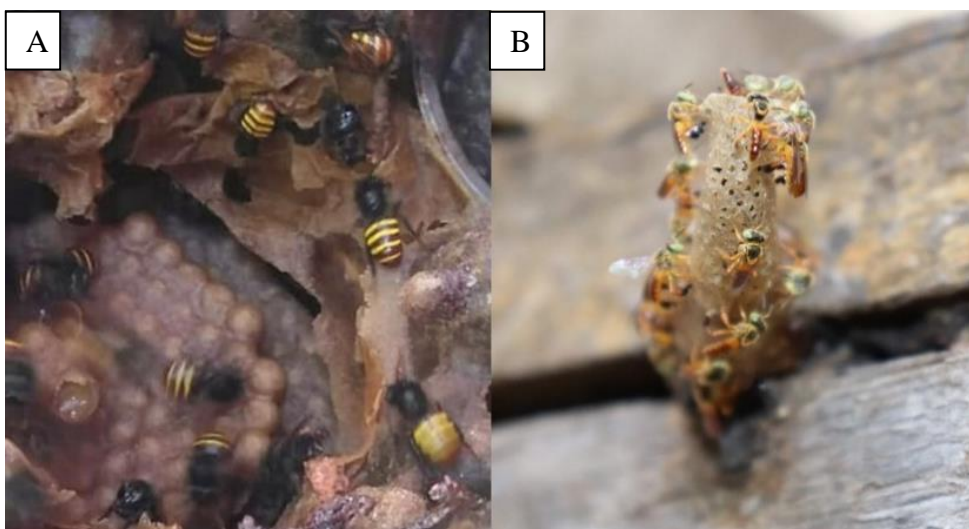


Figura 05: A - Disco de cria *Melipona quadrifasciata*, B - Disco de cria de *Tetragonisca angustula* Fonte: Ana Santos.

5.3 Microbiota associado ao alimento larval

Os microrganismos associados ao alimento larval das abelhas sem ferrão possuem um potencial significativo na área da biotecnologia, sendo recursos valiosos para diversas aplicações devido às suas propriedades únicas e capacidade de fermentação dos alimentos (HAMZAH *et al.* 2020). Enzimas produzidas por esses microrganismos podem ser exploradas na indústria alimentícia para melhorar processos de fermentação e produção de alimentos, assim como na produção de biocombustíveis a partir de matéria orgânica (MORAIS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2023; TEJERINA *et al.*, 2023).

Além disso, os metabólitos secundários produzidos por esses microrganismos podem ser de interesse médico, podendo ser utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos e tratamentos farmacêuticos (CAMPOS *et al.*, 2022; ENGEL *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2022). O estudo e a caracterização desses microrganismos oferecem oportunidades para a descoberta de novas aplicações biotecnológicas. A investigação de suas características

bioquímicas e fisiológicas pode levar à identificação de compostos bioativos com potencial terapêutico ou industrial (SARTON *et al.*, 2023, SANTOS *et al.*, 2022).

Além disso, a compreensão mais aprofundada de suas interações com o ambiente e com as abelhas sem ferrão pode abrir caminho para o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentável desses insetos e de seus habitats (BARBOSA *et al.*, 2021). O estudo desses microrganismos não apenas expande nosso conhecimento sobre a biodiversidade microbiana, mas também oferece perspectivas promissoras para a inovação biotecnológica e a conservação da natureza.

6 TECNOLOGIAS “ÔMICAS”

6.1 Sequenciamento de DNA de Nova Geração (NGS)

O uso de metodologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) tem se destacado no estudo da composição e estrutura de comunidades microbianas (SHENDURE & JI, 2008). Além de apresentarem custos reduzidos e serem mais rápidas, essas técnicas proporcionam novas perspectivas em comparação com abordagens baseadas em cultivo, especialmente considerando que cerca de 90% da diversidade microbiana é composta por organismos não-cultiváveis (YU *et al.*, 2017; RAPPÉ & GIOVANNONI, 2003; HANDELSMAN, 2004).

Entre as tecnologias de NGS, o sequenciamento shotgun utilizando Nanoball Sequencing (DNseq) tem ganhado destaque. Essa técnica baseia-se na preparação de bibliotecas de DNA, permitindo a análise de milhares de fragmentos de DNA simultaneamente. O sequenciamento shotgun DNseq oferece uma abordagem abrangente para a caracterização de genomas completos e metagenomas, proporcionando uma visão detalhada da diversidade genética e funcional de comunidades microbianas. (GOODWIN *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2024; RAJESH & JAYA, 2017).

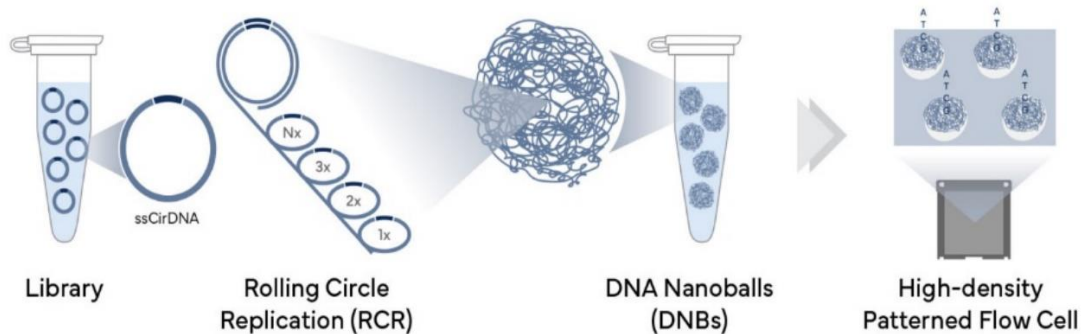


Figura 06: Esquema de NGS de DNA utilizando Nanoesferas de DNA. Fonte: <https://www.completegenomics.com/technology/>

A caracterização detalhada de genomas bacterianos através da DNseq possibilita a identificação de genes e suas funções, revelando processos metabólicos e mecanismos de resistência a antibióticos. Análises comparativas entre diferentes genomas ajudam a elucidar a evolução e as relações filogenéticas entre bactérias, além de identificar aglomerados de genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas (DRMANAC *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2015).

Essas descobertas têm implicações significativas para a biotecnologia e a medicina, incluindo o desenvolvimento de novos probióticos, agentes de biocontrole para a agricultura sustentável, e terapias antibacterianas inovadoras (YU *et al.*, 2017).

REFERÊNCIAS:

- ADAMI, Paulo et al. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose (*Colletotrichum dematium* var. *truncata*) da soja (*Glicine max*). **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 1, n. 1, p. 22-28, 2006.
- BALLIVIÁN, J. M. P. P. et al. Abelhas nativas sem ferrão. **São Leopoldo: Oikos**, p. 128, 2008.
- BARBOSA, Renata Rikelly Silva et al. Percepção dos alunos do 9º ano sobre a importância das abelhas sem ferrão no ecossistema. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 78084-78090, 2021.
- BARBOSA, Wemerson Saulo da Silva et al. Crescimento, desenvolvimento e produtividade de cultivares de soja em Alagoas. 2021. Crescimento, desenvolvimento e produtividade de cultivares de soja em Alagoas. 2021.
- BARROS, AS do R.; DA SILVA, W. R. Transmissibilidade do vírus do mosaico comum da soja (VMCS) por intermédio das sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Scientia Agricola*, v. 49, p. 155-158, 1992.
- BEHRENS, Jorge Herman; SILVA, Maria Aparecida Azevedo Pereira da. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Food Science and Technology**, v. 24, p. 431-439, 2004.
- BETTIOL, Wagner et al. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. **MEYER, MC; MAZARO, SM; SILVA, JC Trichoderma: uso na agricultura. Brasília: Embrapa**, p. 21-43, 2019.
- BONATO, Emidio Rizzo; BONATO, Ana Lidia Variani. A soja no Brasil: história e estatística. 1987.
- BORAH, Munmi et al. Fungal Biocontrol Agents: A Sustainable Management Option for Soybean Diseases. In: *Fungal Resources for Sustainable Economy: Current Status and Future Perspectives*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 347-372.; NATURAL, M. P. Management of *Xanthomonas* diseases. In: **Xanthomonas**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 341-362.
- BOREM, Aluizio et al. Hibridação artificial de plantas. 1999.
- BUTKHOT, N. et al. Characterisation and biosafety evaluation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus velezensis* BUU004. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 5, 2019.

CÂMARA, Gil Miguel de Sousa. Origem, difusão geográfica e importância da soja. Soja: tecnologia da produção, 1998.

CAMPOS, Jaqueline Ferreira et al. Antimicrobial Activity of Propolis from the Brazilian Stingless Bees *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 68, 2022.

CHATNAPARAT, Tiyaikhon; PRATHUANGWONG, Sutruedee; LINDOW, Steven E. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 6, p. 508-522, 2016.

CHENTHAMARA, Komal; DRUZHININA, Irina S. 12 Ecological Genomics of Mycotrophic Fungi. **Environmental and microbial relationships**, p. 215-246, 2016.

CHOWDHURY, Soumitra Paul et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. **Plos one**, v. 8, n. 7, p. e68818, 2013.

CONSTANTIN, Jamil et al. Prevention of yield losses caused by glyphosate in soybeans with biostimulant. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 18, p. 1601-1607, 2016.

DE FITOPATOLOGIA, Manual. doenças das plantas cultivadas. **Agrônômica Ceres**. 3º, 1997.

DRMANAC, Radoje et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 78-81, 2010.

EMBRAPA. História da soja. Disponível em: www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/historia. Acesso em: 05 abr. de 2019.

ENGEL, Philipp; BARTLETT, Kelsey D.; MORAN, Nancy A. The bacterium *Frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. **MBio**, v. 6, n. 3, p. 10.1128/mbio.00193-15, 2015.

FAN, Ben et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2491, 2018.

FARIAS, José Renato B.; NEPOMUCENO, Alexandre L.; NEUMAIER, Norman. Ecofisiologia da soja. 2007.

FERRAZ, S. et al. Manejo sustentável de fitonematoides. **Viçosa: UFV**, v. 245, 2010.

- FIETZ, Carlos R.; RANGEL, Marco AS. Época de semeadura da soja para a região de Dourados-MS, com base na deficiência hídrica e no fotoperíodo. **Engenharia Agrícola**, v. 28, p. 666-672, 2008.
- GALLI, J. A.; PANIZZI, R. de C.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 163-165, 2007.
- GAZZONI, Décio Luiz; DALL'AGNOL, Amélio. A saga da soja: de 1050 aC a 2050 dC. 2018.
- GOODWIN, Sara; MCPHERSON, John D.; MCCOMBIE, W. Richard. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature reviews genetics**, v. 17, n. 6, p. 333-351, 2016.
- GORADIA, Lopa; HARTMAN, Glen L.; DANIEL, Steven L. Evaluation of glyphosate-tolerant soybean cultivars for resistance to bacterial pustule. **European journal of plant pathology**, v. 124, p. 331-335, 2009.
- HALFELD-VIEIRA, Bernardo de Almeida et al. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1247-1252, 2006.
- HAMZAH, SYAHIR AMIR et al. A review on the association of bacteria with stingless bees. **Sains Malays**, v. 49, p. 1853-1863, 2020.
- HARTFELDER, K.; ENGELS, W. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insectes Sociaux**, v. 36, n. 1, p. 1-14, 1989.
- HARTMAN, Glen L.; WEST, Ellen D.; HERMAN, Theresa K. Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v. 3, p. 5-17, 2011.
- HEARD, Tim A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual review of entomology**, v. 44, n. 1, p. 183-206, 1999.
- HEATHER, J. M.; CHAIN, B. A sequência de sequenciadores: a história do DNA de sequenciamento. **Genômica**. v. 107, p. 1–8, 2016.
- HENNING, Ademir Assis et al. Manual de identificação de doenças de soja. 2014.
- HERRMANN, Gustavo Ranzani; FARIA, Pedro; POMELLA, Alan. A hora e a vez dos biológicos. **AgroANALYSIS**, v. 34, n. 09, p. 37-42, 2014.

HOLT, Stephen. Soya; The health food of the next millennium. *한국콩연구회지*, v. 14, n. 1, p. 77-90, 1997.. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1244S-1249S, 2008.

HONG, Jeum Kyu et al. Differential effect of delayed planting on soybean cultivars varying in susceptibility to bacterial pustule and wildfire in Korea. **Crop protection**, v. 42, p. 244-249, 2012.

HONG, Sung-Jun et al. Effect of cultivars, sowing date and cropping system on the development of soybean bacterial pustule in the field. **Korean Journal of Organic Agriculture**, v. 22, n. 4, p. 773-787, 2014.

IGARASHI, S. et al. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 245-250, 2020.

ITO, Margarida Fumiko. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83-101, 2013.

JOHNSON, Leslie K.; HUBBELL, Stephen P. Aggression and competition among stingless bees: field studies. **Ecology**, v. 55, n. 1, p. 120-127, 1974.

JUDD, Walter S. et al. **Sistemática Vegetal:- Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora, 2009.

JULIATTI, F. C. et al. Ferrugem da soja: epidemiologia e manejo para uma doença reemergente. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 13, n. 1, p. 351-395, 2005.

JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C. Manejo integrado de doenças na cultura da soja. 1ª. Ed. Uberlândia-MG. 2004. 327p.

KERR, Warwick Estevam; ZILSE, Gislene Almeida Carvalho; NASCIMENTO, Vania Alves. *Abelha urucu: biologia, manejo e conservação*. 1996.

KHAERUNI, A. et al. Induction of soybean resistance to bacterial pustule disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) by rhizobacteria and organic material treatment. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2018. p. 012052.

KIIHL, RA de S.; GARCIA, A. The use of the long-juvenile trait in breeding soybean cultivars. In: **World Soybean Research Conference**. 1989. p. 994-1000.

KUMAR, Kishore R.; COWLEY, Mark J.; DAVIS, Ryan L. Next-generation sequencing and emerging technologies. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Thieme Medical Publishers, 2024.

LANNA FILHO, R. Fitobactérias na cultura da soja. **Lemes, E.; Castro, L.; Assis, R. Doenças da soja: melhoramento genético e técnicas de manejo. Campinas: Millennium,** p. 81-92, 2015.

LEE, Gahee et al. Biocontrol of the causal brown patch pathogen *Rhizoctonia solani* by *Bacillus velezensis* GH1-13 and development of a bacterial strain specific detection method. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1091030, 2023.

LIU, Hongbin et al. Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 1, p. 164-178, 2004.

LIU, Long et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6113-6127, 2013.

LOPES, Marcio; FERREIRA, João Batista; DOS SANTOS, Gilberto. Abelhas sem-ferrão. **APA Agriculturas**, v. 2, n. 4, 2005.

MACEDO, Luiz Gonzaga Pego de et al. Substituição do farelo de soja pela farinha de glúten de milho na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 992-1001, 2003.

MANDARINO, J. M. G. Origem ea história da soja no Brasil. **Blog da Embrapa Soja. A Soja no Contexto do Agronegócio Brasileiro**, p. 1, 2017.

MARIANO, Rosa LR; SILVEIRA, Elineide B.; GOMES, Andréa MA. Controle biológico de doenças radiculares. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**, v. 5, p. 303-310, 2005.

MARTINS, Cibele Chalita et al. Metodologia para seleção de linhagens de soja visando germinação, vigor e emergência em campo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 455-461, 2016.

MEDEIROS, F. H. V. et al. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. **Crop Protection**, v. 29, n. 7, p. 704-711, 2010.

MEDEIROS, Flávio Henrique Vasconcelos de; SILVA, Júlio Carlos Pereira da; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. Controle biológico de doenças de plantas. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 1, 2018.

MEDICE, Regiane. Efeito de produtos alternativos no controle de oídio e *Bacillus* spp. como promotores de crescimento da soja. 2011.

- MELO, Gabriel AR. Stingless bees (meliponini). **Starr CK. Encyclopedia of Social Insects. Cham: Springer, 2020.**
- MORA, Isabel; CABREFIGA, Jordi; MONTESINOS, Emilio. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0127738, 2015.
- MORAIS, Paula B.; CALAÇA, Paula S. São Thiago; ROSA, Carlos Augusto. Microorganisms associated with stingless bees. In: **Pot-Honey: A legacy of stingless bees.** New York, NY: Springer New York, 2012. p. 173-186.
- NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. In: **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** 1997. p. 446-446.
- ONGENA, Marc; JACQUES, Philippe. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.
- PAIXÃO, Luiz Mário Tedesco. PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill). 2020.
- PEREIRA, Derval Gomes et al. Avaliação da severidade do oídio [*Erysiphe diffusa* (U. Braun & S. Takam)] em genótipos de soja, em condições de campo. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 25-30, 2012.
- POMELLA, Alan William Vilela; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas—uma visão empresarial. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 239-244, 2009.
- RAJESH, T.; JAYA, M. Next-generation sequencing methods. In: **Current developments in biotechnology and bioengineering.** Elsevier, 2017. p. 143-158.
- RAPPÉ, Michael S.; GIOVANNONI, Stephen J. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 369-394, 2003.
- REBELO, Kemilla Sarmento; FERREIRA, Antônio Gilberto; CARVALHO-ZILSE, Gislene Almeida. Características físico-químicas do pólen coletado por abelhas amazônicas sem ferrão. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 927-932, 2016.
- REIS, Erlei Melo; BRESOLIN, Andrea Camargo Reis. Fungicidas: aspectos gerais. **Revista Plantio Direto**, n. 97, 2007.
- RIESENFELD, Christian S.; SCHLOSS, Patrick D.; HANDELSMAN, Jo. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annu. Rev. Genet.**, v. 38, p. 525-552, 2004.

RODRIGUEZ, E. A.; MARQUES, A. S. A. Desenvolvimento de metodologia para diagnóstico do'fogo selvagem'do fumo, feijão e soja causado por *Pseudomonas syringas* pv. Tabaci. 2004.

ROMEIRO, R. S. et al. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 2, p. 120-123, 2005.

ROSELINO, Ana Carolina; DOS SANTOS, Solange Aparecida Bispo; BEGO, Luci Rolandi. Qualidade dos frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) a partir de flores polinizadas por abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepelletier 1836 e *Melipona scutellaris* Latreille 1811) sob cultivo protegido. **Revista brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, 2010.

ROULSTON, T.'Ai H.; CANE, James H. The effect of diet breadth and nesting ecology on body size variation in bees (Apiformes). **Journal of the Kansas Entomological Society**, p. 129-142, 2000.

RYAN, Robert P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

SANTOS, Ana Carolina Costa et al. Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. *BMC microbiology*, v. 22, n. 1, p. 127, 2022.

SANTOS, Ana Carolina Costa et al. Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of Brazilian native stingless bees. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 5147, 2023.

SANTOS, Ana Carolina Costa et al. Microbioma do alimento larval de abelhas sem ferrão: diversidade e potencial biotecnológico. 2022.

SARTON-LOHÉAC, Garance et al. Deep divergence and genomic diversification of gut symbionts of neotropical stingless bees. **MBio**, v. 14, n. 2, p. e03538-22, 2023.

SEIXAS, Claudine Dinali Santos et al. Manejo de doenças. 2020. Manual de identificação de doenças de soja. 2014.

SHENDURE, Jay; JI, Hanlee. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SILVA, Marcus Sidrônio Lima et al. PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill). 2019.. PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill). 2019.

SILVEIRA, Fernando A.; MELO, Gabriel AR; ALMEIDA, Eduardo AB. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Guilherme Carnevale Carmona, 2002.

SINGH, Baljit et al. Controlled release of the fungicide thiram from starch–alginate–clay based formulation. **Applied Clay Science**, v. 45, n. 1-2, p. 76-82, 2009.

SLAA, Ester Judith et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, v. 37, n. 2, p. 293-315, 2006.

SOUZA, J. F. et al. Fungos entomopatogênicos isolados a partir de culturas infectadas por nematóides das galhas no Distrito Federal. 2007.

TAN, BoonFei et al. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1027, 2015.

TEJERINA, Marcos Raúl et al. Fungal microbiota isolated from native stingless bee species inhibited pathogens of *Apis mellifera*. **Fungal Biology**, v. 127, n. 9, p. 1267-1275, 2023.

VIT, Patricia; PEDRO, Silvia RM; ROUBIK, David (Ed.). **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. Springer Science & Business Media, 2013.

WANG, Bingce et al. Assessment of the Biocontrol Potential of *Bacillus velezensis* WL–23 against Kiwifruit Canker Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11541, 2023.

WEI, Jinbin et al. Biocontrol mechanisms of *Bacillus velezensis* against *Fusarium oxysporum* from *Panax ginseng*. **Biological Control**, v. 182, p. 105222, 2023.

YU, Jun et al. Digital next-generation sequencing identifies low-abundance mutations in pancreatic juice samples collected from the duodenum of patients with pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms. **Gut**, v. 66, n. 9, p. 1677-1687, 2017.

ZANON, Alencar Junior et al. Desenvolvimento de cultivares de soja em função do grupo de maturação e tipo de crescimento em terras altas e terras baixas. **Bragantia**, v. 74, p. 400-411, 2015.

ZANON, Alencar Júnior et al. Ecofisiologia da soja: visando altas produtividades. **Santa Maria: Palloti**, 2018.

ZINSOU, V. A. et al. Occurrence and characterisation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, causing bacterial pustules on soybean in Guinea Savanna of Benin. **African Crop Science Journal**, v. 23, n. 3, p. 203-210, 2015.

Capítulo 2

Artigo Científicos

Bacillus velezensis mandacaium* strain isolated from *Melipona quadrifasciata* larval food in the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines

Joberth Lee Correa¹, Ana Carolina Costa Santos¹, Rafaela Cavalcante Cerqueira¹, Anderson Rodrigues dos Santos², Guilherme Nunes Moreira Costa¹, Nadla Soares Cassemiro³, Carlos Alexandre Carollo³, Tamiris Sabrina Rodrigues¹, Ana Maria Bonetti¹, Nilvanira Donizete Tebaldi⁴, Carlos Ueira-Vieira¹

¹ Laboratory of Genetics, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Brazil

² Faculty of Computer Science, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

³ Federal University of Mato Grosso do Sul, Center of Biological and Health Sciences, Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Campo Grande, MS, Brazil

⁴ Institute of Agricultural Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

Abstract

The use of biological agents for plant disease control is a sustainable alternative as it reduces the reliance on chemical agents and mitigates soil and water contamination. In this study, various bacteria isolated from the larval food of stingless bees were evaluated for their antimicrobial action against *Xanthomonas axonopodis*. *Bacillus velezensis* demonstrated a high ability to produce compounds that inhibit the growth of *X. axonopodis*, with no toxicity observed when applied to soybean seeds. Moreover, complete genome sequencing revealed a genome size of 4,011 M bp and a GC content of 46,31 %. The analysis identified 4094 protein-coding genes, including at least 11 gene clusters with known antimicrobial properties. Thirteen genomic regions were predicted to contain putative gene clusters involved in metabolite biosynthesis. Additionally, metabolomic analysis identified 23 compounds, 8 previously unknown, with potential antimicrobial activity. These findings highlight the importance of *Bacillus velezensis* metabolites in controlling *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and their potential application in managing other plant diseases.

Background

The indiscriminate use of pesticides in agriculture has raised significant concerns globally[1, 2]. Farmers have traditionally relied on these substances to protect crops from various plant diseases and boost productivity. However, this practice has led to the emergence of pesticide-resistant pathogens, posing a severe threat to both plant and human health. Moreover, the environmental impact of excessive pesticide use is alarming, resulting in soil and water contamination and negatively affecting non-target organisms[1, 3, 4]. To address these critical issues, there is an urgent need to shift towards more sustainable agricultural practices.

One promising alternative to the heavy reliance on pesticides is the use of biopesticides[5]. Biopesticides, derived from natural sources such as plants, bacteria, and minerals, provide an eco-friendly approach to managing pests and diseases in agriculture [6–9]. They are generally less toxic than conventional pesticides, reduce the risk of resistance development, and are often more specific in their action [10]. By integrating biopesticides into pest management strategies, farmers can maintain crop health and yield while minimizing environmental harm [11]. This approach aligns with the broader goal of reducing antibiotic use and promoting sustainable agriculture.

Among the various biopesticides, *Bacillus velezensis* stands out as a potent source of biomolecules. This bacterium produces a range of bioactive compounds, including antibiotics, antifungals, and enzymes, which can effectively combat plant pathogens [12–14]. Research has demonstrated the potential of *B. velezensis* in controlling a wide array of agricultural pests and diseases[15–19]. Its application not only helps in managing crop health but also supports sustainable farming practices by reducing the dependency on chemical pesticides [20]. This makes *B. velezensis* an important tool in the transition towards more sustainable agricultural systems.

The significance of sustainable agricultural practices is particularly evident in soybean cultivation, where bacterial pathogens like *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* pose serious challenges[21, 22]. Soybeans are a crucial crop due to their high protein content and versatile use in food and industry [23]. Effective control of *X. axonopodis* pv. *glycines* is essential to prevent significant yield losses and ensure the sustainability of soybean production[24]. Leveraging biopesticides, such as those derived from *Bacillus velezensis*, offers a promising strategy to mitigate the impact of this pathogen, thereby safeguarding soybean crops and contributing to global food security [25–27]. By connecting these advancements in biopesticide use to the broader context of sustainable agriculture, we can better address the intertwined issues of crop health, environmental impact, and food production [9, 28, 29].

The significance of a *Bacillus* strain isolated from the larval food of stingless bees lies in its potential as a robust and effective source of biocontrol agents. Isolating strains from specific environments, such as larval food, can uncover microorganisms adapted to unique conditions, exhibiting beneficial traits such as the production of antimicrobial compounds or secondary metabolites effective against agricultural pathogens. This study presents a new perspective on the use of *Bacillus velezensis mandacaium* and its metabolites for the control of soybean diseases caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and suggests its potential application in managing diseases in other important crops.

Methods

Strains

The bacteria in this study were isolated from the larval food of the *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees, a member of the Collection of Isolated Microorganisms of Stingless Bees (CoMISBee)[30]. For the experiments,

the microorganism was reactivated in Brain Heart Infusion (BHI) and incubated at 37°C for 48 hours [30]. Table 1 shows the coding of the ten bacteria selected from the committee collection.

Table 1. Coding of bacteria of the CoMISBee

Stingless Bees	Bacteria code					
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mq-ISP-1A	Mq-ISP-1B	Mq-MCK-7	Mq-MRS-9	Mq-OAT-27	Mq-NUT-54B
<i>Tetragonisca angustula</i>	Ta-TSA-11	Ta-BHI-19	Ta-BHI-29	Ta-TSA-55		

Supernatant production

To produce supernatant, a bacterial suspension was prepared in 5mL of BHI and incubated at 37°C for 24 hours. A 200µL rate of the suspension was inoculated in 200 mL of LB broth (Luria-Bertani) and incubated at 31°C±1 for 48h under shaker agitation at 200 rpm. The broth obtained was centrifuged at 10,000 g for 4 minutes for bacterial cell sedimentation, and the supernatant was separated from the precipitated and filtered at 0.45 µm [31]. The supernatants were stored in a -20°C freezer for later use in assays (Fig.1).

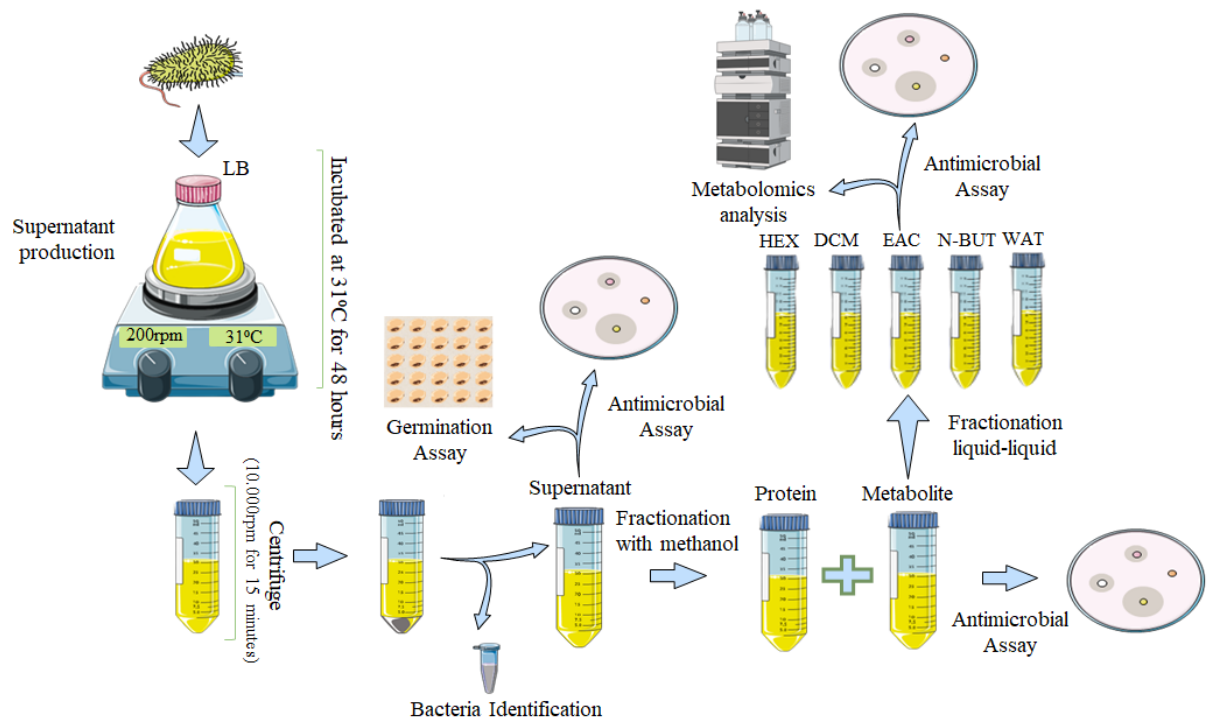


Figure 1: Methodology for producing supernatants from microorganisms isolated from stingless bees (CoMISBee) at the Laboratory of Genetics, UFU, including fractionation and antimicrobial assays. Images adapted from 'Smart Servier Medical Art' (<https://smart.servier.com/>).

Fractionation of the supernatant

To obtain protein and metabolic fraction, the supernatant with significant results in antimicrobial assay was lyophilized and resuspended in 3 mL of methanol, followed by incubation at four °C for 3 hours and centrifugation at 8000 g for 5 minutes [32]. The protein precipitate was separated from the metabolic, and the solvent evaporated in a speed vacuum. To evaluate antimicrobial activity, the protein and metabolic fractions were resuspended in 3 mL of distilled water, and the inhibitory assay was performed with both supernatant fractions (Fig. 5). After fractioning of the supernatants tested, we used the codes "P" (for protein) or "M" (for metabolic) for identify the samples.

Liquid-liquid fractionation

Given that the metabolic fraction demonstrated inhibitory effects against *X. axonopodis* pv. *Glycines* underwent liquid-liquid fractionation [33]. The process involved a sequential use of the following solvents: hexane, dichloromethane (DCM), ethyl acetate, and n-butanol. After drying the metabolic material under vacuum, it was resuspended in 1 mL of water and vortexed for 15 seconds or until fully homogenized. Subsequently, 10 mL of hexane was added to each tube and vortexed for 30 seconds to facilitate phase separation, resulting in a hexane phase and residual metabolic phase. The hexane phase was then extracted using a pipette, and this step was repeated. Each tube was subsequently washed twice in sequence with each solvent. Finally, the remaining phase that did not interact with any of the chemical reagents was identified as the aqueous phase.

Antimicrobial assay

The supernatants and their fractions were evaluated for their ability to inhibit *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, a pathogen of agricultural significance. The modified Kirby-Bauer disk diffusion test[34] was employed, where sterile 6 mm white discs were placed on plates in triplicate and inoculated with 20 μ L of each supernatant (Fig.1). The negative control used was water. The diameter of the inhibition zone around each disc was measured to assess the sensitivity of *X. axonopodis* pv. *glycines* to the supernatants. Additionally, after the initial tests, the minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed following the fractionation process and testing of the supernatants [35].

Toxicity assay

This assay enabled the investigation of how the supernatants with antimicrobial action influenced soybean seed germination and seedling development in a controlled experimental setup. In this study, soybean seeds were initially sanitized using a 2% sodium hypochlorite solution for 30 seconds, followed by thorough rinsing with distilled water. Subsequently, 200 sanitized soybean seeds were divided into two groups: one group was treated with 25 mL of supernatant with significant action against *X. axonopodis* pv *glycines*, and the other group (control) was treated with 25 mL of water. The experiment was conducted in germination boxes, with 25 seeds placed in each of four boxes. To maintain appropriate moisture levels, germination paper (Germintex) was used at a volume of water equivalent to three times the weight of the paper[36].

The treated seeds were placed in germination chambers maintained at 25°C for seven days with daily moisture maintenance. After the germination period, the seedlings were assessed for various characteristics, including the number of normal, abnormal, dormant, hard, and dead seedlings.

Chemical Characterization of Compounds by UFLC-DAD-MS

An equipment LC20AD ultra-fast liquid chromatograph (UFLC)(Shimadzu) coupled to a diode array detector (DAD) and a mass spectrometer micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) with electrospray ionization source (ESI) and quadrupole, and time-of-flight analyzers was used to analyze the chemical profile from the *Bacillus velezensis* extracts. For the MS analysis, nitrogen was applied as a nebulizer (4 Bar), drying (9 mL/min), and collision gas. The capillary voltage was 4500 kV. The samples were analyzed in both negative and positive ion modes (m/z 120–1300). The chromatographic analyzes were performed using a Kinetex C18 column (2.6 μ m, 150 \times 2.1 mm, Phenomenex) on 50° C, and a flow rate of 0.3 mL/min. The mobile phase consisted of

deionized water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid, and the following elution gradient profile was applied: 0–2 min-3% B; 2–25 min-3–25% B; 25–40 min-25–80% B; and 40–43 min-80% B, followed by a 5 min column washing and reconditioning. The sample were prepared at 1 mg/mL in methanol and deionized water (7:3, v/v), and 1 μ L was injected into the chromatographic system via autosampler. The annotation of the compounds was performed using mass spectra data and fragmentation profile, and spectral UV compared to the literature[37].

Bacterial Identification

DNA extraction and Sequencing

The bacteria were cultured in Brain Heart Infusion (BHI) medium and incubated for 48 hours at 37°C with agitation at 200 rpm. Following incubation, the bacterial culture was centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes at 25°C, and the supernatant was discarded. Next, 1 mL of extraction buffer (0.1 M Tris-HCl or 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, and 0.4% SDS) was added to the bacterial pellet and vortexed for 15 seconds. Subsequently, 50 μ L of proteinase K was added, and the samples were incubated at 56°C for 30 minutes. After incubation, the samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes at room temperature[38].

The resulting supernatant was transferred to a new microtube containing 330 μ L of isopropanol. The tubes were gently inverted 30 times and then centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes at room temperature. The supernatant was discarded, and 500 μ L of 70% ethanol was added to the pellet. After a brief centrifugation (30 seconds), the supernatant was discarded, and this step was repeated twice to ensure thorough DNA purification. Subsequently, 250 μ L of absolute ethanol was added to the pellet, followed by centrifugation at 14,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded, and the

DNA pellet was air-dried for 15 minutes.[38, 39]. Finally, the pellet was resuspended in 50 μ L of ultrapure water, and the quality of the extracted DNA was assessed using a Nanodrop 2000 Spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. After, 1000 ng of DNA was used to construct the whole genome library with fragment sizes of \leq 800bp (BGI Americas in-house protocol). Library quality was assessed using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and paired end (150bp) sequencing was performed using the DNBseq™ sequencing strategy.

Genomic Assembly and Bioinformatic Analysis

The raw data underwent pre-analysis using SOAPnuke software, developed by BGI, to filter out adapter or low-quality sequences and remove contamination. Scaffold assemblies were using SPADES version 3.14.0, with default k-mer values (21, 33, 55, and 77 bp). RAGTAG software was used for scaffold assembly and alignment to a reference genome. The reference genome was selected by comparing the similarity and sizes of scaffolds with all nucleotide sequences from the offline NT database at the NCBI database. For functional annotation, we employed the genome annotation pipeline PANNOTATOR [40]. PANNOTATOR assigns color tags according to three similarity levels of alignment size and protein identity: green to for sure (\geq 95%), yellow to high similarity ($<$ 95% and \geq 70%), and red ($<$ 70%) assigned as hypothetical proteins.

The genome was analyzed by ABRicate on Galaxy Platform to screen genes for antimicrobial resistance or virulence genes. The gene cluster responsible for the biosynthesis of secondary metabolites was identified through the analysis of the strain *B. velezensis mandacaium* V2.1 using antiSMASH 7.1.0 software[41], which facilitated the identification, annotation, and analysis of these gene clusters.

To assess pangenome conservation, we used the GENPPI software [42]. GENPPI was initially designed to predict protein interactions and generate core and

accessory pangenomes for subsequent interaction analyses. We demanded that the GENPPI software use a machine learning model to predict the pangenome, the former step before investigating the Conserved Neighborhood (CN) and Phylogenetic Profile (PP) in prominent similar proteins.

Statistical Analyses

The data obtained from the inhibitory assay test tests with total supernatant and fractions were expressed as arithmetic means \pm standard error of the mean. They were analyzed according to the variance for one-way (ANOVA), followed by Dunnet's post-test, using the GraphPad Prism software version 8.0.2. For the germination test was used qui-square test. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

Antimicrobial Assay

Among the ten supernatants tested against *X. axonopodis* pv. *Glycines*, only supernatant 27, showed a significant inhibitory effect, suggesting that this bacterium produces substances capable of inhibiting the growth of this soybean pathogen (Fig. 2).

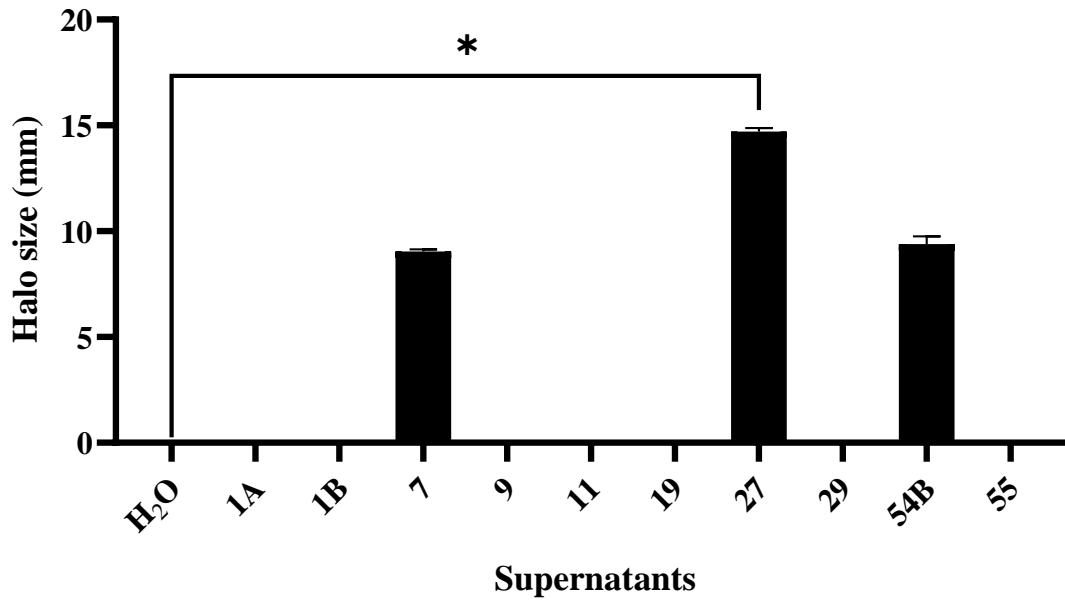


Figure 2: Antimicrobial Activity of supernatant the bacteria isolated from larval food stingless bees against *Xanthomonas axonopodis*.

Consequently, the supernatant 27 was fractionated to determine which fraction contains the molecules with inhibitory action against phytopathogens. The metabolic fraction showed the formation of an inhibition halo. In contrast, the protein fraction did not exhibit any halo formation, indicating that the antimicrobial substances are present in the metabolic fraction (Fig. 3A). The metabolic fraction underwent liquid-liquid fractionation to isolate and identify the compounds responsible for the antimicrobial action. The fraction containing molecules with affinity for ethyl acetate was the only one that formed an inhibition halo, indicating that the antimicrobial biomolecules are contained within this fraction (Fig. 3B).

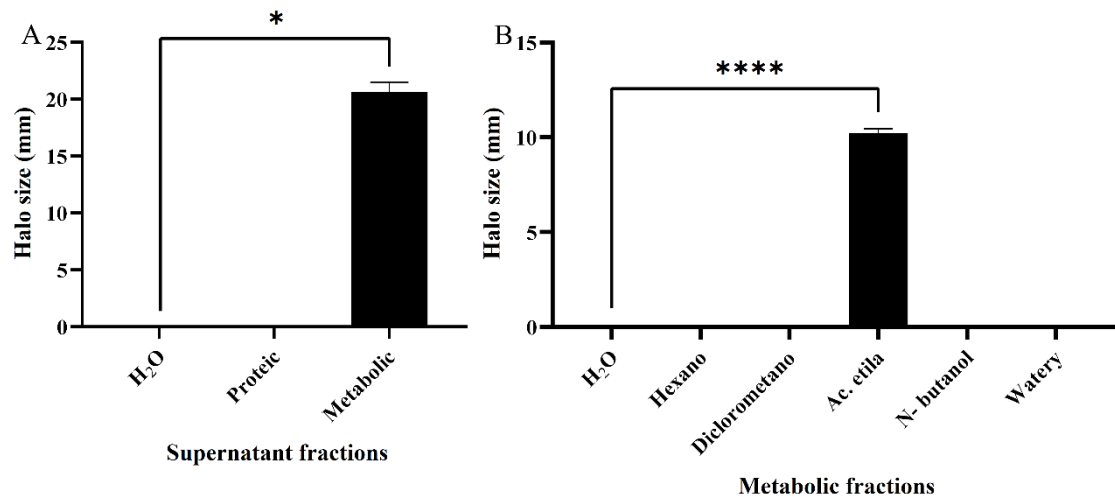


Figure 3:A Antimicrobial Activity of Protein and Metabolic Fractions from *B. velezensis* against *Xanthomonas axonopodis*. B Antimicrobial Activity of Hexane, DCM, Ethyl Acetate, n-Butanol, and Aqueous Extracts from *B. velezensis* against *X. axonopodis*. Data show the SEM mean of three independent replicates. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

The ethyl acetate fraction was diluted nine times, resulting in various concentration levels being tested. Among these, the minimum inhibitory concentration (MIC) that effectively inhibited the growth of *Xanthomonas axonopodis* was determined to be 0.015 mg/mL (Fig. 4). This indicates that, even at a low concentration, the compounds contained in this fraction exhibited significant antimicrobial activity against this bacterium highlighting its potential as a potent antibacterial agent.

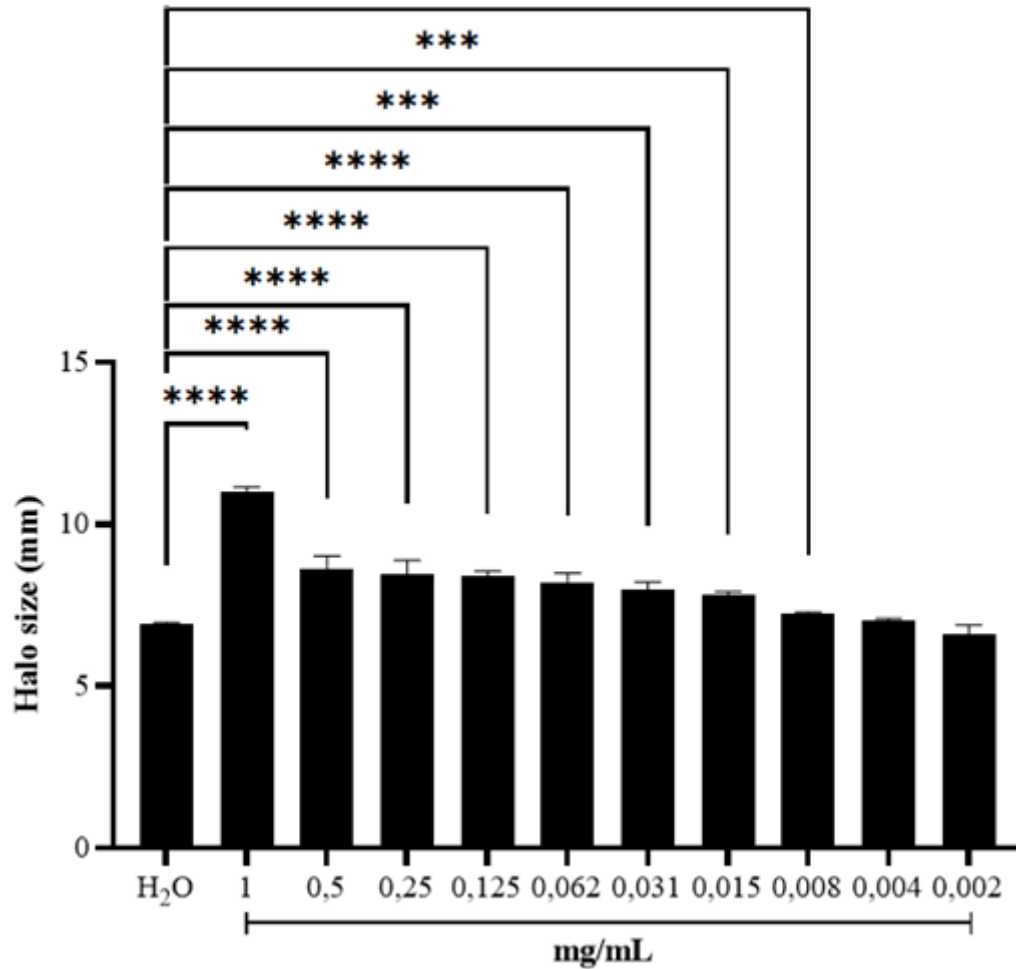


Figure 4: Minimum inhibitory concentration assay of the ethyl acetate fraction against *Xanthomonas axonopodis*. Data show the SEM mean of three independent replicates. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Germination assay

The supernatant produced by bacteria 27, identified as *B. velezensis*, was analyzed for its toxicity regarding the germination capacity of soybean seeds (Fig. 5). It was found that this supernatant does not contain substances that inhibit the germination of soybean seeds, showing no significant difference compared to the water control for Chi-square test (Table 2). This experimental approach provided insights into the impact

of the supernatants on soybean seed germination and early seedling growth under controlled conditions.

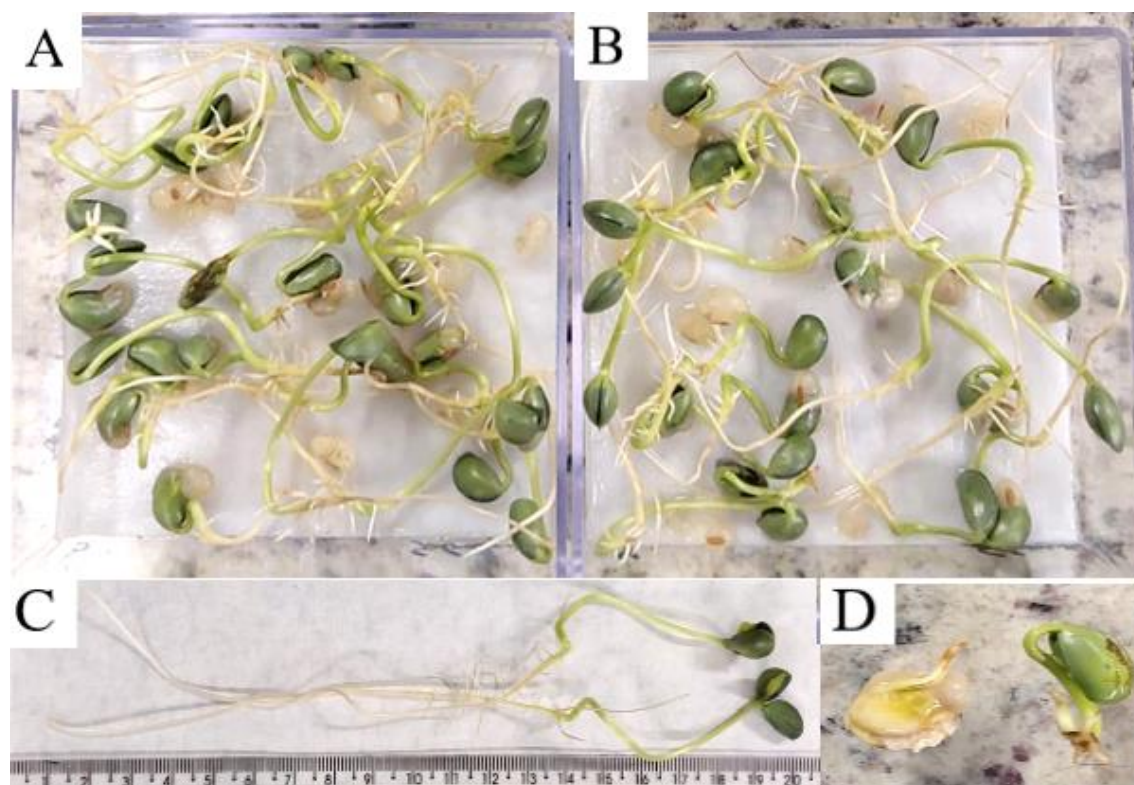


Figure 5: Toxicity assay to evaluate the toxicity of supernatant 27 in soybean seeds. A - Soybean seeds treated with water; B - Soybean seeds treated with supernatant; C - Normal soybean seeds; D - Abnormal soybean seeds.

Table 2: Results the toxicity assay

	Normal	Abnormal	Dead	Dormant
H ₂ O	97	2	1	-
Supernatant 27	99	1	-	-

Metabolites Identification

The chemical profiling of *Bacillus velezensis* HPLC-DAD-MS/MS reveals a complex array of metabolites, predominantly comprising diketopiperazines (DKPs),

cyclic dipeptides known for their diverse biological activities, including antimicrobial and pharmacological properties (Figure 7).

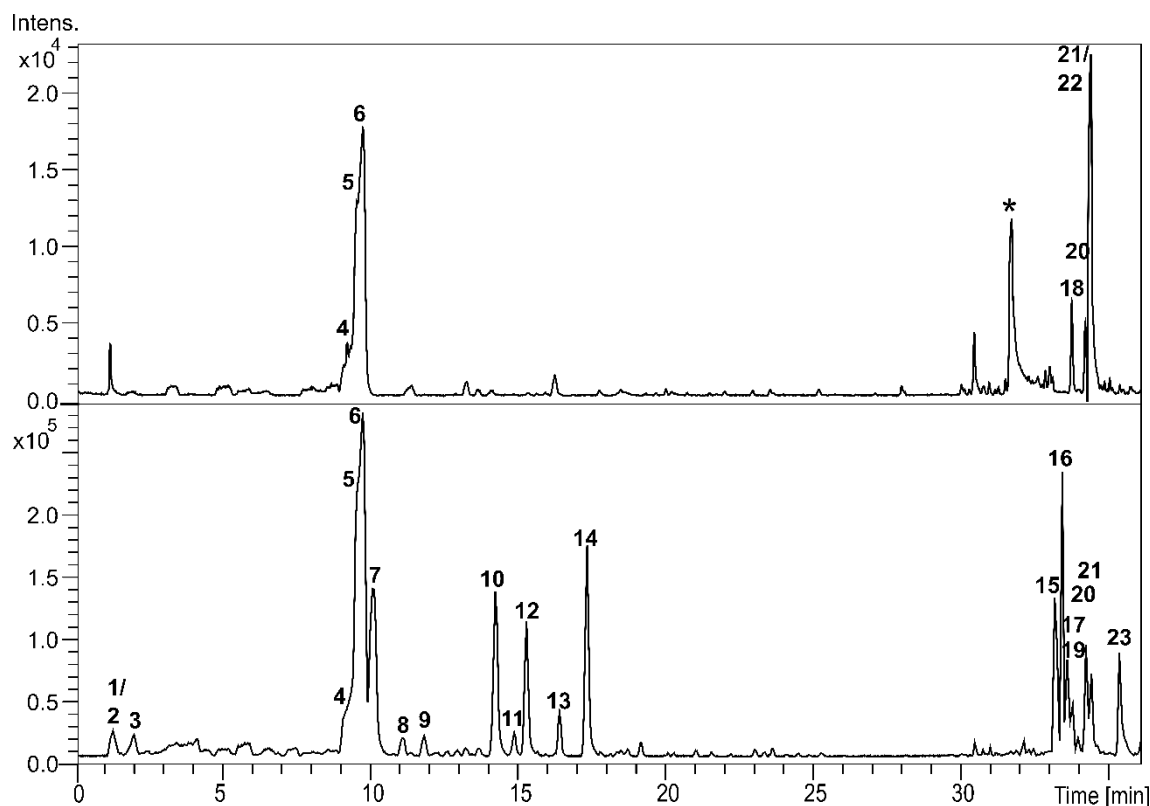


Figure 7: Base peak chromatogram obtained in negative (above) and positive (below) ion mode from *Bacillus velezensis* extract.

Early eluting compounds such as Cyclo-(histidyl-proline) and its isomer, detected at retention times (RT) of 1.2 and 2 minutes, respectively, exhibit relatively high polarity (Peaks 2 and 3). The presence of multiple forms of Cyclo-(prolyl-tyrosine) or Cyclo-(Hydroxy-Pro-Phe) and its isomers around 9 minutes (Peaks 4, 5, and 6) with a consistent molecular formula ($C_{14}H_{16}N_2O_3$) indicates structural or conformational variations which could influence their biological activity and stability (Table 3). However, due to the non-fragmentation of ions in the mass spectrometry analysis, it was not possible to conclusively determine the specific identities of these compounds. This limitation underscores the need for further analytical techniques to resolve these ambiguities and fully characterize the molecular structures present.

Table 3. Compounds annotated from *Bacillus velezensis* extract by LC-DAD-MS.

Peak	RT (min)	UV	MF	Negative mode		Positive mode		Compound
		(λ_{max})		(m/z)	(m/z)			
			MS [M-H] ⁻	MS/MS	MS	MS/MS		
				[M+H] ⁺				
1	1.1		C ₅ H ₁₀ N ₄ O ₄			191.0143		NI
2	1.2	257	C ₁₁ H ₁₄ N ₄ O ₂			235.1174	71	Cyclo-(histidyl-proline)[43] Diketopiperazine
3	2	265	C ₁₁ H ₁₄ N ₄ O ₂			235.1180	222	Cyclo-(histidyl-proline) Diketopiperazine - Isomer
4	9.1	277	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	259.1093		261.1211	129	Cyclo-(prolyl-tyrosine) [44–47]or Cyclo- (Hydroxy-Pro-Phe)
5	9.5	277	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	259.1095		261.1218	138	Cyclo-(prolyl-tyrosine) or Cyclo-(Hydroxy-Pro- Phe) - isomer
6	9.7	277	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	259.1091		261.1219	130- 146, 138; 129, 105, 77, 53	Cyclo-(prolyl-tyrosine) or Cyclo(Hydroxy-Pro- Phe) - isomer
7	10.1		C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂			197.1281	166, 134	Cyclo(Pro-Val)- Diketopiperazine[48, 49]
8	11		C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₂			185.1299	143	Cyclo(Ala-Leu/Ile) - Diketopiperazine[50]
9	11.7		C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₂			185.1293	64	Cyclo(Ala-Leu/Ile) – Diketopiperazine isomer

10	14.1		$C_{11}H_{18}N_2O_2$		211.1434	168	Cyclo-(Pro-Leu/Ile) Diketopiperazine [51– 54]
11	14.7		$C_{11}H_{18}N_2O_2$		211.1431		Cyclo-(Pro-Leu/Ile) Diketopiperazine isomer
12	15.2		$C_{11}H_{18}N_2O_2$		211.1435		Cyclo-(Pro-Leu/Ile) Diketopiperazine isomer
13	16.3		$C_{14}H_{16}N_2O_2$		245.1268	135	Cyclo(Phe-Pro) Diketopiperazine[51, 55]
14	17.3		$C_{14}H_{16}N_2O_2$		245.1272	70	Cyclo(Phe-Pro) Diketopiperazine isomer
15	33.1		$C_{16}H_{35}NO_2$		274.2746		Hexadecasphinganine[5 6]
16	33.3		$C_{18}H_{39}NO_3$		318.2993		Hydroxysphinganine[56 , 57]
17	33.5	277	$C_{20}H_{43}NO_4$		362.3265		NI
18	33.6	268	$C_{25}H_{36}O_7$	447.2385			NI
19	33.7	272	$C_{24}H_{30}O_3$		367.2268		NI
20	34.1	267	$C_{24}H_{30}O_3$	365.2116	367.2287		NI
21	34.3	272	$C_{24}H_{30}O_3$	365.2111	367.2270		NI
22	34.3	269	$C_{28}H_{38}O_8$	501.2489		437, 383, 339, 311, 261, 200.	NI
23	35.3		$C_{33}H_{38}O_6$		531.2760		NI

RT: retention time; MF: molecular formula; NI: non-identified; All the MF was determined from the errors and mSigma below five ppm and 30, respectively.

Further along the chromatogram, compounds such as Cyclo-(Pro-Val) and Cyclo-(Ala-Leu/Ile) appear around 10 to 11 minutes (Peaks 7 and 8). These DKPs, featuring aliphatic side chains, could potentially affect their stability and biological interactions. Notably, Cyclo-(Pro-Leu/Ile) presents in several isomeric forms (Peaks 10, 11, and 12) between 14 and 15 minutes, suggesting subtle variations that could modulate biological activity. Additionally, aromatic structures such as Cyclo-(Phe-Pro) detected at 16.3 minutes, and its isomer (Peaks 13 and 14) offer distinct biological interactions due to the phenyl ring, possibly influencing binding and activity against microbial targets (Table 3).

Towards the latter part of the chromatogram, compounds detected around 33 minutes, such as Hexadecasphinganine and Hydroxysphinganine (Peaks 15 and 16), alongside a series of unidentified higher molecular weight compounds (Peaks 17 to 23), suggest the presence of more complex lipid-related or secondary metabolites (Table 3). These compounds with more extensive molecular structures could play crucial roles in the physiological adaptations or defensive mechanisms of *B. velezensis*.

Genomic Assembly and Bioinformatic Analysis

Genome characteristics of strain Bacillus velezensis mandacaium

Whole genome sequencing analysis was performed on *Bacillus velezensis mandacaium*. After trimming the sample data and removing adapter, the genomic sequencing depth was 1,203,462,600 bases and 4,011,542 clean reads with a GC content of 46.31% and Q20 96.58 % indicating a high level of data quality. The SPADES software assembled 1357 scaffolds with a median size of 257 base pairs. The three largest scaffolds have sizes of 963 thousand, 591 thousand, and 580 thousand base pairs. These scaffolds were then aligned to reference genomes using the RAGTAG software.

A query to our standalone NCBI genome database using the assembled scaffolds returned that *Bacillus velezensis* strain JS25R, CP009679 in GenBank, is the most probable organism in our scaffolds. Only 1.7% of our scaffolds aligned with the genome (GenBank number: CP009679); the sum of nucleotides from our aligned scaffolds amounted to approximately four million base pairs. Our genome, constructed using the reference genome CP009679, consists of 4,040,490 pairs of bases and no plasmids. Moreover, our genome has 2500 Ns distributed along 68 gaps.

We named our novel DNA strand *Bacillus velezensis* strain *mandacaium* as a remembrance of the local indigen nomenclature of this organism. The *Bacillus velezensis* strain *mandacaium* genome has a GC content of approximately 46%, with a gene density of 0.899 genes per kilo-base and 84% of coding bases. Within this genome, there are 3707 protein-coding sequences (CDS) and 74 false genes. Among these total CDSs, 3161 (85%) show greater than 95% size and protein identity to the reference genome CP009679. Another 238 (6%) fall within the 95% to 70% range, while the remaining 308 (8%) CDS exhibit below 70% of the identity and alignment size of the proteins present in the reference genome CP009679 (Fi. 6).

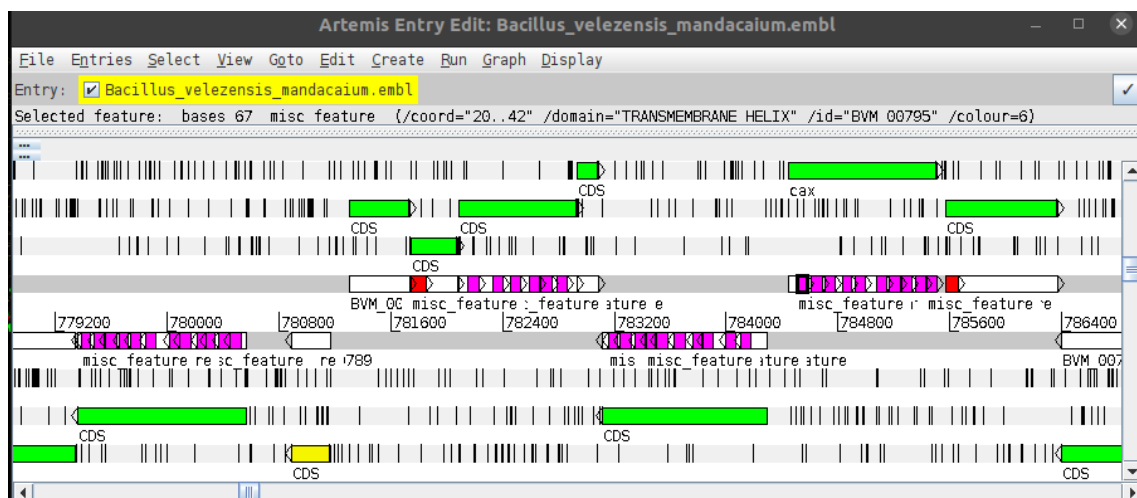


Figure 6: A region of the *Bacillus velezensis* strain *mandacaium* genome displaying coding sequences in green to for sure ($\geq 95\%$), yellow to high similarity ($< 95\%$ and

$\geq 70\%$), and red ($< 70\%$) assigned as hypothetical proteins with the reference genome of *B. velezensis* strain JS25R (CP009679).

Antimicrobial resistance gene prediction

The ABRicate analysis showed that our strain of *Bacillus velezensis* has two antimicrobial resistance genes: *cfr(B)*, which encodes a protein of the Cfr family 23S rRNA (adenine(2503)-C(8))-methyltransferase located in the forward strain region from 512386 to 513435, and *tet(L)* gene, which encodes a protein of the Tet(L)/Tet(K)/Tet(45) family tetracycline efflux MFS transporter located in the reverse strain region from 2540494 to 2541870.

Prediction gene cluster responsible for the biosynthesis of metabolites

Thirteen genomic regions were predicted to contain putative gene clusters involved in metabolite biosynthesis. An analysis of the interaction network among the 13 gene clusters, predicted in silico as secondary metabolite synthesizers, was conducted to observe the interaction among the 531 genes that comprise the 13 clusters. The gene clusters are composed of 41 genes in Cluster 1, 8 genes in Cluster 2, 41 genes in Cluster 3, 22 genes in Cluster 4, 42 genes in Cluster 5, 53 genes in Cluster 6, 67 genes in Cluster 7, 22 genes in Cluster 8, 49 genes in Cluster 9, 58 genes in Cluster 10, 45 genes in Cluster 11, 40 genes in Cluster 12, and 43 genes in Cluster 13 (Table 4).

Table 4. Genomic mapping of gene cluster related to metabolites biosynthesis predicted by antiSMASH.

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Biosynthetic class	Similarity
Region 1	NRPS	286,002	351,412	surfactin	NRP: Lipopeptide	82%
Region 2	phosphonate	616,222	628,363			

Region 3	PKS-like	917	958,244	butirosin A/butirosin B	Saccharide	7%
Region 4	terpene	1,040,974	1,061,714			
Region 5	transAT-PKS	1,370,062	1,458,292	macrolactin H	Polyketide	100%
Region 6	transAT-PKS,T3PKS,NRPS	1,680,598	1,790,706	bacillaene	Polyketide+NRP	100%
Region 7	NRPS,transAT-PKS,betalactone	1,855,724	1,993,552	fengycin	NRP	100%
Region 8	terpene	2,016,976	2,038,859			
Region 9	T3PKS	2,119,030	2,160,130			
Region 10	transAT-PKS	2,275,094	2,379,191	difficidin	Polyketide	100%
Region 11	NRP-metallophore, NRPS, RiPP-like	3,079,604	3,131,400	bacillibactin	NRP	100%
Region 12	NRPS	3,425,826	3,493,707			
Region 13	other	3,697,991	3,739,409	bacilysin	Other	100%

Regions designated by antiSMASH as 5, 6, and 10 are associated with Polyketide biosynthesis, while regions 1 and 12 are linked to non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) synthesis (Fig. 8).

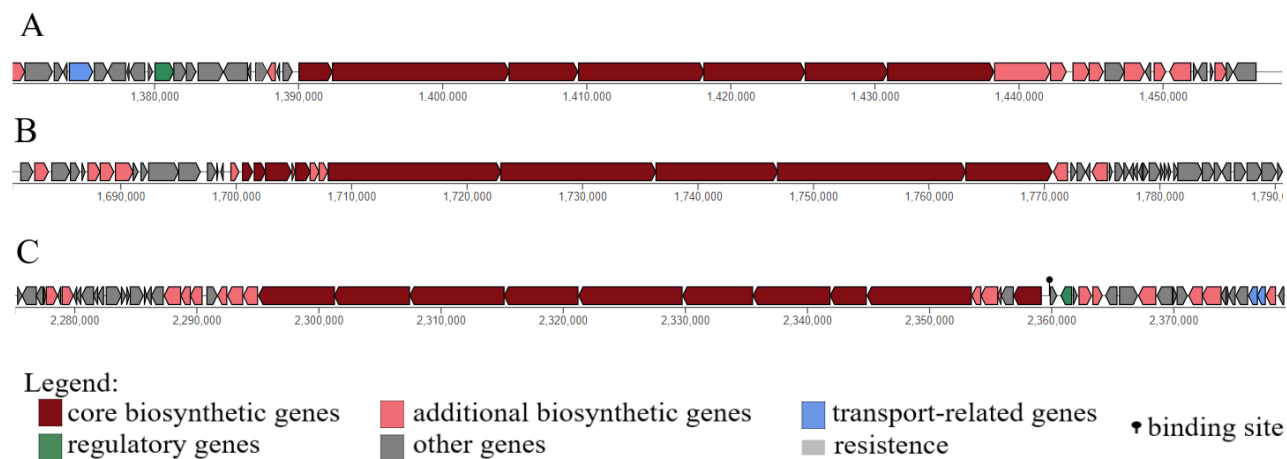


Figure 8: Genomic mapping of the gene cluster associated with metabolite biosynthesis as predicted by antiSMASH, emphasizing the regions involved in polypeptide production. A- Region 5; B- Region 6; C- Region 10.

Pangenome and Genome Functional Annotation

The number of genomes used in crafting the pangenome was seventy, and our genome assembled in this work was accompanied by sixty-nine other genomes of the same species downloaded from the NCBI. At the time of this experiment, there were 169 genomes of the *B. velezensis* available for download. However, hardware limitations obligated us to select only sixty-nine out of 169 to create the pangenome and predict Conserved Neighborhoods (CN) and Phylogenetic Profiles (PP) for all genomes. The accompanying genomes had a mean of 3941 genes, while our genome has 3778 genes. So, the filtering criteria were based on the number of predicted proteins per genome.

Afterward, the GenPPI software predicted CN and PP using default parameters, plus the -ml parameter to use a machine learning algorithm predicting pairs of homolog proteins, an initial step before running CN and PP algorithms. A protein figures in the interaction network of a genome only if there were CN and PP compared to the accompanying genomes. All the proteins composed the interaction network of our *B. velezensis mandacaium*, a network containing 82622 edges. The mean nodes and edges for all seventy genomes are 3948 and 94203, respectively. These are pieces of evidence that most proteins obtained from our crafted genome proceed compared to sixty-nine genomes of the same species deposited at the NCBI.

Additionally, seventy proteins absent from the interaction network of our genome may be unique to the *B. velezensis* we analyzed. The interaction network analysis reveals how proteins interact with each other, considering their different subcellular localizations: cytoplasmic, membrane-bound, secreted, and putative surface-exposed (PSE). All the produced proteins were localized in the cytoplasm, except for those encoded by the tetA1 and tetA2 genes, which showed membrane association. This pattern is consistent with the interaction network analysis, as visualized in Gephi, further

highlighting the distinct localization and potential functional roles of these membrane-associated proteins.

From the three predicted gene clusters associated with metabolite production, 39 genes related to protein synthesis were identified. Of these, 35 were found in our genome, allowing us to construct a protein interaction network to examine how these proteins contribute to metabolite production (Fig. 7). Additionally, based on three genes predicted by AntiSMASH, a protein interaction network revealed six genes involved in encoding proteins linked to antimicrobial resistance. It was observed that the *difM* gene, responsible for metabolite production, interacts with the antimicrobial resistance network, while the *cfr* and *tetA1* genes, part of the resistance network, connects with metabolite-producing genes (Fig. 7).

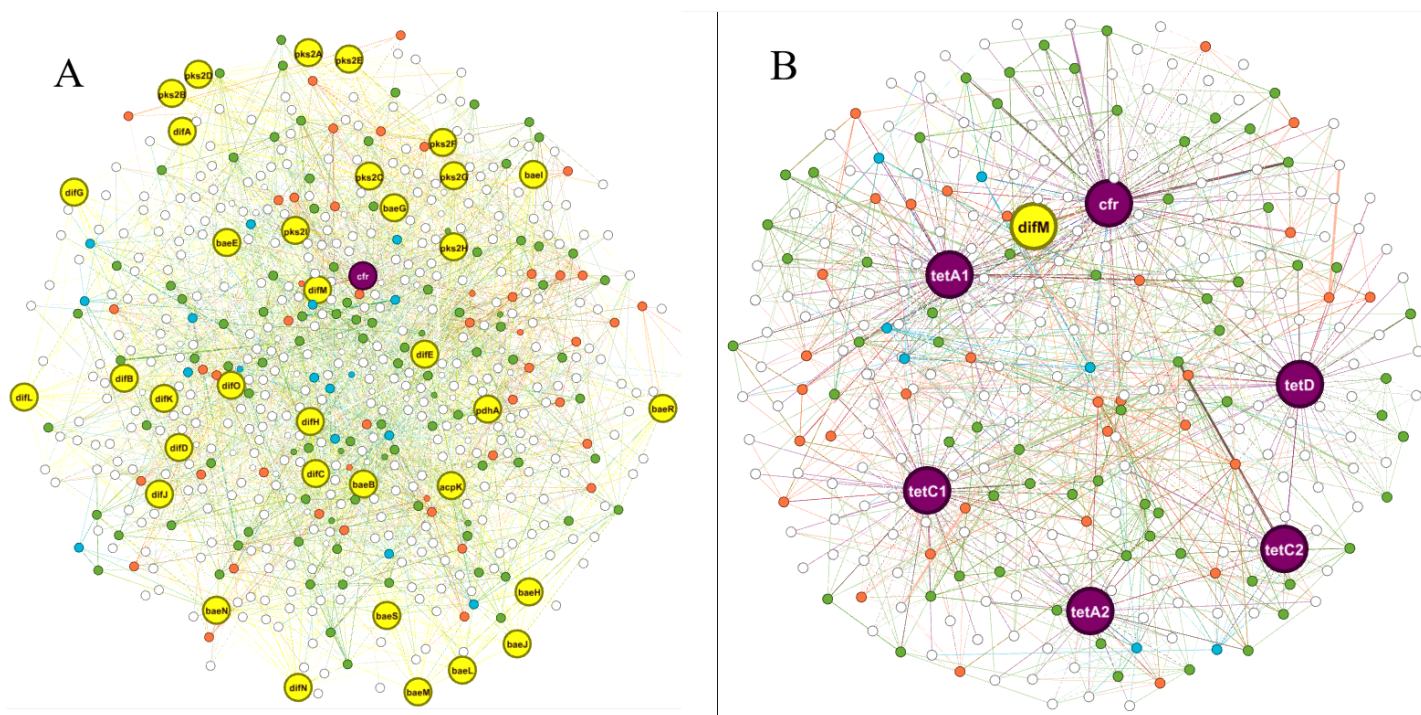


Figure 7: Interaction network of *Bacillus velezensis* highlighting gene clusters related to metabolite production and resistance profiles. The colors represent different protein localizations: white (cytoplasmic), green (membrane-bound), red (surface-

exposed), and blue (secreted). In panel A, yellow indicates genes involved in metabolite production, while in panel B, purple represents genes associated with resistance traits.

Discussion

Bacteria of the genus *Bacillus* have been widely explored for use as biocontrol agents against fungi, nematodes, and as biostimulants [12, 13, 15, 18–20, 58]. These bacteria are known for their ability to produce a variety of antimicrobial compounds, cell wall-degrading enzymes, and other secondary metabolites that contribute to pathogen suppression and plant growth promotion [14, 15, 20, 55]. In this study, we identified a novel *Bacillus velezensis* strain *mandacaium* from the larval food of *Melipona quadrifasciata* opens new possibilities for the use of this specific strain in sustainable agricultural practices. The association with a native and important pollinator bee suggests that this strain of *Bacillus velezensis mandacaium* can have favorable ecological attributes that could be utilized in agricultural environments. Additionally, studying these bacteria can reveal important symbiotic interactions and pathogen resistance mechanisms that can be exploited to improve plant health [59].

In this study, we found that the supernatant produced by *B. velezensis mandacaium* demonstrates inhibitory effects on the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, suggesting the production of metabolites with activity against this microorganism. The *B. velezensis* is known for its plant growth-promoting properties, including the production of antimicrobial compounds and enzymes that can enhance nutrient availability and stress tolerance in plants [15, 59–63]. This bacteria is a soil bacteria known for its ability to produce a variety of secondary metabolites, including non-ribosomal lipopeptides, cyclic peptides, and other antimicrobial compounds [59, 64, 65]. Our identification of antimicrobial molecule production in the supernatant from *B.*

velezensis mandacaium isolated from stingless bees, without exhibiting toxicity towards soybean seed germination, aligns with previous research emphasizing the advantageous role of this bacteria in agriculture [15, 18, 20].

In our study, we found that the antimicrobial activity compounds present in the supernatants were in the metabolic fraction rather than the protein fraction. The subsequent liquid-liquid fractionation of the metabolic fraction provided valuable insights about the compounds produced by *B. velezensis mandacaium*. The formation of an inhibition halo, specifically in the ethyl acetate fraction, suggests that the antimicrobial molecules are likely non-polar or semi-polar, as these compounds are partitioned preferentially into the organic phase during liquid-liquid extraction. The diversity of identified compounds and their structural patterns underscore the rich metabolic repertoire of *B. velezensis mandacaium mandacaium*, which is pertinent for biotechnological applications. The HPLC-MS/MS analysis provides crucial insights into these compounds, facilitating a deeper understanding of the chemical and potential biological landscape of this species. This comprehensive profile not only supports ongoing research but also opens avenues for further studies into the specific roles and applications of these metabolites in industrial and pharmaceutical contexts.

In our studies, we primarily identified that compounds from diketopiperazine (DKP) groups, which exhibit a wide variety of structural variations and are abundant in nature, demonstrate numerous biological functions. The conventional understanding attributed the formation of the two peptide bonds of DKPs solely to non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs)[66] until cyclodipeptide synthases (CDPSs) were functionally characterized, revealing an alternative biosynthetic route[67, 68]. The Antismash analysis to find the gene cluster responsible for metabolite biosynthesis showed 3 clusters related to the synthesis of the DKP group and two clusters for NRPSs. These

genomic regions encode proteins involved in DKP biosynthesis; the main metabolites identified in our analysis of the *B. velezensis mandacaium* extract using LC-DAD-MS analysis.

Genomic studies have revealed that different strains of this bacteria possess gene clusters responsible for the biosynthesis of the metabolites. These compounds have proven effective in controlling various phytopathogens, such as *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* [15, 65, 69–72]. The *B. velezensis* has been widely utilized in agriculture as a biocontrol agent, protecting crops and wheat against fungal diseases [73–77]. Compounds such as difficidin, bacillomycin D, and fengycins have shown efficacy as antifungal agents, interfering with the pathogenicity and cell wall formation [78–81]. Furthermore, other compounds such as plantazolicin and amylocyclicin have demonstrated activity against phytopathogenic bacteria [78, 82].

The results from the pangenome and interaction network analyses highlight the robustness of protein interactions and the preservation of key phylogenetic characteristics in *Bacillus velezensis*. Furthermore, the discovery of genes responsible for metabolite production interacting with those associated with the resistance profile underscores the functional importance of these interactions. Research suggests the existence of a coordinated regulatory network in which metabolic processes and resistance mechanisms are interconnected [83]. Secondary metabolites may induce efflux pumps, leading to increased antibiotic resistance and enhancing microbial survival across diverse environments [84]. These findings provide valuable insights into the genetic architecture supporting metabolic versatility and antimicrobial resistance in *Bacillus velezensis*.

Using metabolites instead of microorganisms can maximize the benefits of biocontrol while minimizing ecological risks and promoting more sustainable

agricultural practices. Although strains of *Bacillus velezensis* exhibit various positive effects, the negative impacts of using sporulated microorganisms on soil microbiota have not yet been fully elucidated [85]. The introduction of non-native microorganisms into soil ecosystems can significantly alter the natural composition of the microbiota, suppressing native beneficial microorganisms and destabilizing crucial ecological processes such as nutrient cycling. Such disruptions can lead to reduced soil fertility and plant growth issues. For instance, high-throughput sequencing studies have shown that introducing specific microbial strains for environmental remediation can impact the balance of soil microbial communities, affecting nutrient availability and organic matter decomposition [86, 87]. Furthermore, manipulating soil microbiota for biocontrol purposes can also lead to shifts in microbial populations, potentially suppressing beneficial native species and disrupting important ecological functions[88].

This approach also reduces the risk of developing microbial resistance, as it enables the use of compound combinations or rotations. Furthermore, these metabolites can be formulated into stable products, ensuring consistent efficacy under various environmental conditions and providing a sustainable alternative to chemical pesticides [82]. This approach also reduces the risk of developing microbial resistance, as it enables the use of compound combinations or rotations. Furthermore, these metabolites can be formulated into stable products, ensuring consistent efficacy under various environmental conditions and providing a sustainable alternative to chemical pesticides[8, 11, 28, 85]. Therefore, focusing on the application of *B. velezensis* metabolites maximizes the benefits of biocontrol while minimizing ecological risks and promoting more sustainable agricultural practices.

This work demonstrates that *Bacillus velezensis mandacaium* shows significant potential in biocontrol against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* due to its diverse

antimicrobial metabolites. Our study highlighted that the metabolites present in the metabolic fraction, especially in the ethyl acetate fraction, exhibited inhibitory activity against this bacterium. Genetic analysis revealed the synthesis of compounds such as diketopiperazines (DKPs) and other essential metabolites. Additionally, the isolation of this microorganism from the stingless bee *Melipona quadrifasciata* suggests favorable ecological attributes and a beneficial symbiotic relationship, which can be leveraged to enhance agricultural practices. The direct application of these metabolites offers a sustainable and effective approach, minimizing ecological impact and promoting specific biocontrol against pathogens in agricultural environments.

Author Contributions

JLC, ACCS, RCC, and CUV were responsible for the conception and design of the study, data collection and analysis, as well as manuscript writing. NSC, CAC, and ARS contributed to data analysis, critical revision of intellectual content, and approval of the final version of the manuscript. NDT, CUV, AMB, and TSR provided study supervision, conducted critical revision of intellectual content, and approved the final version of the manuscript.

Funding

This project was funded by the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG APQ-02766-17, APQ-00269-22) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant number: 403193/2022-2), as well as FAPEMIG (grant number: CBB-APQ-03613-17) for INCT-TeraNano.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Data availability

All data supporting the findings of this study are available within the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our deep appreciation for the assistance provided by Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, who tragically became one of the millions of victims of COVID-19. And the UFU, FAPEMIG and CNPQ for making this project possible.

References

1. Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18:1112.
2. Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*. 2009;2:1–12.
3. Sabarwal A, Kumar K, Singh RP. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;63:103–14.
4. Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N, Singh S, Grewal AS, et al. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J Clean Prod*. 2021;283:124657.
5. Agboola AR, Okonkwo CO, Agwupuye EI, Mbeh G. Biopesticides and Conventional Pesticides: Comparative Review of Mechanism of Action and Future Perspectives. *AROC in Agriculture*. 2022;1:14–32.
6. KLIEBENSTEIN DJ. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ*. 2004;27:675–84.
7. Khursheed A, Rather MA, Jain V, Wani AR, Rasool S, Nazir R, et al. Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microb Pathog*. 2022;173:105854.
8. Kumar S, Singh A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. *J Biofertil Biopestic*. 2015;06.
9. Thakur N, Kaur S, Tomar P, Thakur S, Yadav AN. Microbial biopesticides: Current status and advancement for sustainable agriculture and environment. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier; 2020. p. 243–82.
10. Essiedu JA, Adepoju FO, Ivantsova MN. Benefits and limitations in using biopesticides: A review. 2020. p. 080002.

11. Fenibo EO, Ijoma GN, Matambo T. Biopesticides in Sustainable Agriculture: Current Status and Future Prospects. In: *New and Future Development in Biopesticide Research: Biotechnological Exploration*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. p. 1–53.
12. Baharudin MMAA, Ngalimat MS, Shariff FM, Yusof ZNB, Karim M, Baharum SN, et al. Antimicrobial activities of *Bacillus velezensis* strains isolated from stingless bee products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2021;16:e0251514.
13. Liang X, Ishfaq S, Liu Y, Jijakli MH, Zhou X, Yang X, et al. Identification and genomic insights into a strain of *Bacillus velezensis* with phytopathogen-inhibiting and plant growth-promoting properties. *Microbiol Res*. 2024;285:127745.
14. Grady EN, MacDonald J, Ho MT, Weselowski B, McDowell T, Solomon O, et al. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiol*. 2019;19:5.
15. Rabbee MF, Hwang B-S, Baek K-H. *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy*. 2023;13:840.
16. Jia S, Song C, Dong H, Yang X, Li X, Ji M, et al. Evaluation of efficacy and mechanism of *Bacillus velezensis* CB13 for controlling peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Front Microbiol*. 2023;14.
17. Jang S, Choi S-K, Zhang H, Zhang S, Ryu C-M, Kloepper JW. History of a model plant growth-promoting rhizobacterium, *Bacillus velezensis* GB03: from isolation to commercialization. *Front Plant Sci*. 2023;14.
18. Tang T, Wang F, Huang H, Guo J, Guo X, Duan Y, et al. *Bacillus velezensis* LT1: a potential biocontrol agent for southern blight on *Coptis chinensis*. *Front Microbiol*. 2024;15.
19. Wang S, Sun L, Zhang W, Chi F, Hao X, Bian J, et al. *Bacillus velezensis* BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. *Egypt J Biol Pest Control*. 2020;30:9.
20. Fan B, Wang C, Song X, Ding X, Wu L, Wu H, et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Front Microbiol*. 2018;9.
21. Violatti MR, Tebaldi ND. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. *Summa Phytopathol*. 2016;42:268–70.
22. Hong S-J, Kim Y-K, Jee H-J, Shim C-K, Kim M-J, Park J-H, et al. Influence of Disease Severity of Bacterial Pustule Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* on Soybean Yield. *Research in Plant Disease*. 2011;17:317–25.
23. Leite JC, Olias C, Reschke Lajús C, Neves Paduan F, Ferreira Miyashiro C, Dos Reis Duarte E, et al. Cadeia Produtiva da Soja: Armazenamento e Logística. *UNICIÊNCIAS*. 2022;26:31–6.
24. Zhao R, Kang I-J, Lee S. Current Status and Future Prospects in Genomic Research and Breeding for Resistance to *Xanthomonas citri* pv. *glycines* in Soybean. *Agronomy*. 2023;13:490.

25. Chen Z, Zhao L, Dong Y, Chen W, Li C, Gao X, et al. The antagonistic mechanism of *Bacillus velezensis* ZW10 against rice blast disease: Evaluation of ZW10 as a potential biopesticide. *PLoS One*. 2021;16:e0256807.
26. Wang C, Ye X, Ng TB, Zhang W. Study on the Biocontrol Potential of Antifungal Peptides Produced by *Bacillus velezensis* against *Fusarium solani* That Infects the Passion Fruit *Passiflora edulis*. *J Agric Food Chem*. 2021;69:2051–61.
27. Chen M, Wang J, Liu B, Zhu Y, Xiao R, Yang W, et al. Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC Microbiol*. 2020;20:160.
28. Dhakal R. Biopesticides: A Key to Sustainable Agriculture. *Int J Pure Appl Biosci*. 2019;7:391–6.
29. Tomar P, Thakur N, Jhamta S, Chowdhury S, Kapoor M, Singh S, et al. Bacterial biopesticides: Biodiversity, role in pest management and beneficial impact on agricultural and environmental sustainability. *Heliyon*. 2024;10:e31550.
30. Santos ACC, Borges LDF, Rocha NDC, de Carvalho Azevedo VA, Bonetti AM, dos Santos AR, et al. Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of Brazilian native stingless bees. *Sci Rep*. 2023;13:5147.
31. Santos ACC, Malta SM, Dantas RCC, Coelho Rocha ND, Ariston de Carvalho Azevedo V, Ueira-Vieira C. Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. *BMC Microbiol*. 2022;22:127.
32. Junior S, Gonçalves dos A, Eugênio Araújo R, Casquero R, Quintana L, Pereira Leivas F. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES. 2017.
33. Bittar VP, Silva Borges AL, Justino AB, Carrillo MSP, Mateus Duarte RF, Silva NBS, et al. Bioactive compounds from the leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek: Inhibition of LDL oxidation, glycation, lipid peroxidation, target enzymes, and microbial growth. *J Ethnopharmacol*. 2024;319:117315.
34. HUDZICKI J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*. 2009;15:55–63.
35. Ahameethunisa AR, Hopper W. Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:6.
36. Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol*. 2009;45:28–35.
37. Moser JC, da Silva R de CV, Costa P, da Silva LM, Cassemiro NS, Gasparotto Junior A, et al. Role of K⁺ and Ca²⁺ Channels in the Vasodilator Effects of *Plectranthus barbatus* (Brazilian Boldo) in Hypertensive Rats. *Cardiovasc Ther*. 2023;2023:1–11.
38. Brandão LTD, Côrtes MV de CB, Filippi MCC de, Silva-Lobo VL. Protocolo de Extração de DNA Genômico para os Principais Fungos Fitopatogênicos do Arroz. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. 2019;:15.

39. Silva R, Nechet KL, Moriya LM, Carvalho VN, Biafora MR, de Souza DEH, et al. Etiology and prevalence of macadamia diseases in Brazil. *Australasian Plant Pathology*. 2024;53:159–74.
40. Santos AR, Barbosa E, Fiaux K, Zurita-Turk M, Chaitankar V, Kamapantula B, et al. PANNOTATOR: an automated tool for annotation of pan-genomes. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12:2982–9.
41. Blin K, Shaw S, Augustijn HE, Reitz ZL, Biermann F, Alanjary M, et al. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Res*. 2023;51:W46–50.
42. Anjos WF, Lanes GC, Azevedo VA, Santos AR. GENPPI: standalone software for creating protein interaction networks from genomes. *BMC Bioinformatics*. 2021;22:596.
43. Zink KE, Ludvik DA, Lazzara PR, Moore TW, Mandel MJ, Sanchez LM. A Small Molecule Coordinates Symbiotic Behaviors in a Host Organ. *mBio*. 2021;12.
44. Yonezawa K, Yamada K, Kouno I. New Diketopiperazine Derivatives Isolated from Sea Urchin-Derived *Bacillus* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;59:106–8.
45. Wang J-H, Yang C-Y, Fang S-T, Lu J, Quan C-S. Inhibition of biofilm in *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 by diketopiperazines. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32:143.
46. De Rosa S, Mitova M, Tommonaro G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Biomol Eng*. 2003;20:311–6.
47. Chen Y-H, Liou S-E, Chen C-C. Two-step mass spectrometric approach for the identification of diketopiperazines in chicken essence. *European Food Research and Technology*. 2004;218:589–97.
48. Nishanth SK, Nambisan B, Dileep C. Three bioactive cyclic dipeptides from the *Bacillus* sp. N strain associated with entomopathogenic nematode. *Peptides (NY)*. 2014;53:59–69.
49. Yonezawa K, Yamada K, Kouno I. New Diketopiperazine Derivatives Isolated from Sea Urchin-Derived *Bacillus* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;59:106–8.
50. Liu R, Zhang D, Li Y, Tao L, Tian L. A New Antifungal Cyclic Lipopeptide from *Bacillus marinus* B-9987. *Helv Chim Acta*. 2010;93:2419–25.
51. Brack C, Mikolasch A, Schauer F. 2,5-Diketopiperazines Produced by *Bacillus pumilus* During Bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Marine Biotechnology*. 2014;16:385–95.
52. Adibi A, Rees E, McCarley S, P. Sica V, H. Oberlies N. CHARACTERIZATION AND ISOLATION OF PEPTIDE METABOLITES OF AN ANTIFUNGAL BACTERIAL ISOLATE IDENTIFIED AS *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSPECIES *PLANTARUM* STRAIN FZB42. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2017;6:1309–13.
53. Kumar SN, Siji J V., Nambisan B, Mohandas C. Activity and Synergistic Antimicrobial Activity Between Diketopiperazines Against Bacteria In Vitro. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168:2285–96.

54. Nishanth Kumar S, Mohandas C, Siji JV, Rajasekharan KN, Nambisan B. Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi. *J Appl Microbiol.* 2012;113:914–24.
55. Li X, Munir S, Xu Y, Wang Y, He Y. Combined mass spectrometry-guided genome mining and virtual screening for acaricidal activity in secondary metabolites of *Bacillus velezensis* W1. *RSC Adv.* 2021;11:25441–9.
56. Choudhary A, Naughton LM, Dobson ADW, Rai DK. High-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometric characterisation of metabolites produced by *Pseudovibrio* sp. W64, a marine sponge derived bacterium isolated from Irish waters. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2018;32:1737–45.
57. Weber SS, de Souza ACS, Soares DCL, Lima CC, de Moraes ACR, Gkionis SV, et al. Chemical profile, antimicrobial potential, and antiaggregant activity of supercritical fluid extract from *Agaricus bisporus*. *Chemical Papers.* 2022;76:6205–14.
58. Feliatra F, Batubara UM, Nurulita Y, Lukistyowati I, Setiaji J. The potentials of secondary metabolites from *Bacillus cereus* SN7 and *Vagococcus fluvialis* CT21 against fish pathogenic bacteria. *Microb Pathog.* 2021;158:105062.
59. Rabbee M, Ali Md, Choi J, Hwang B, Jeong S, Baek K. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules.* 2019;24:1046.
60. Soave JM. *Bacillus* spp. e a promoção de crescimento vegetal: um enfoque na solubilização e mineralização de fosfato durante interação com cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo; 2023.
61. Torres M, Llamas I, Torres B, Toral L, Sampedro I, Béjar V. Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology.* 2020;150:103453.
62. Wang J, Qu F, Liang J, Yang M, Hu X. *Bacillus velezensis* SX13 promoted cucumber growth and production by accelerating the absorption of nutrients and increasing plant photosynthetic metabolism. *Sci Hortic.* 2022;301:111151.
63. Borriss R, Wu H, Gao X. Secondary Metabolites of the Plant Growth Promoting Model Rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 Are Involved in Direct Suppression of Plant Pathogens and in Stimulation of Plant-Induced Systemic Resistance. In: *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms.* Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 147–68.
64. Rabbee MF, Hwang B-S, Baek K-H. *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy.* 2023;13:840.
65. Fazle Rabbee M, Baek K-H. Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. *Molecules.* 2020;25:4973.
66. Borthwick AD. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem Rev.* 2012;112:3641–716.

67. Deletti G, Green SD, Weber C, Patterson KN, Joshi SS, Khopade TM, et al. Unveiling an indole alkaloid diketopiperazine biosynthetic pathway that features a unique stereoisomerase and multifunctional methyltransferase. *Nat Commun.* 2023;14:2558.
68. Canu N, Moutiez M, Belin P, Gondry M. Cyclodipeptide synthases: a promising biotechnological tool for the synthesis of diverse 2,5-diketopiperazines. *Nat Prod Rep.* 2020;37:312–21.
69. Sirtori LR, Cladera-Olivera F, Lorenzini DM, Tsai S-M, Brandelli A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *J Gen Appl Microbiol.* 2006;52:357–63.
70. Wang B, Liu C, Yang X, Wang Y, Zhang F, Cheng H, et al. Genomics-guided isolation and identification of active secondary metabolites of *Bacillus velezensis* BA-26. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2021;35:895–904.
71. Cao Y, Pi H, Chandransu P, Li Y, Wang Y, Zhou H, et al. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci Rep.* 2018;8:4360.
72. Dong H, Gao R, Dong Y, Yao Q, Zhu H. *Bacillus velezensis* RC116 Inhibits the Pathogens of Bacterial Wilt and *Fusarium* Wilt in Tomato with Multiple Biocontrol Traits. *Int J Mol Sci.* 2023;24:8527.
73. Dutilloy E, Arias AA, Richet N, Guise J-F, Duban M, Leclere V, et al. *Bacillus velezensis* BE2 controls wheat and barley diseases by direct antagonism and induced systemic resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2024;108:64.
74. Lima DS. D. Identificação e caracterização dos metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria <i>Bacillus velezensis</i> que causam inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos. Universidade de São Paulo; 2019.
75. Lim SM, Yoon M-Y, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Shin TS, et al. Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. *Plant Pathol J.* 2017;33:488–98.
76. Myo EM, Liu B, Ma J, Shi L, Jiang M, Zhang K, et al. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control.* 2019;134:23–31.
77. Kim J-A, Song J-S, Kim P Il, Kim D-H, Kim Y. *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a Promising Agent for Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Fungi.* 2022;8:1053.
78. Han X, Shen D, Xiong Q, Bao B, Zhang W, Dai T, et al. The Plant-Beneficial Rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 Controls the Soybean Pathogen *Phytophthora sojae* Due to Bacilysin Production. *Appl Environ Microbiol.* 2021;87.
79. Chen XH, Scholz R, Borriss M, Junge H, Mögel G, Kunz S, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol.* 2009;140:38–44.
80. Koumoutsi A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, et al. Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal

- Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *J Bacteriol.* 2004;186:1084–96.
81. Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R, Gao X. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci Rep.* 2015;5:12975.
82. Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Front Microbiol.* 2015;6.
83. Martínez JL, Rojo F. Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35:768–89.
84. Perry EK, Meirelles LA, Newman DK. From the soil to the clinic: the impact of microbial secondary metabolites on antibiotic tolerance and resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20:129–42.
85. Yu C, Chen H, zhu L, Song Y, Jiang Q, Zhang Y, et al. Profiling of Antimicrobial Metabolites Synthesized by the Endophytic and Genetically Amenable Biocontrol Strain *Bacillus velezensis* DMW1. *Microbiol Spectr.* 2023;11.
86. Wang X, Chi Y, Song S. Important soil microbiota's effects on plants and soils: a comprehensive 30-year systematic literature review. *Front Microbiol.* 2024;15.
87. Vincze É-B, Becze A, Laslo É, Mara G. Beneficial Soil Microbiomes and Their Potential Role in Plant Growth and Soil Fertility. *Agriculture.* 2024;14:152.
88. De Corato U. Soil microbiota manipulation and its role in suppressing soil-borne plant pathogens in organic farming systems under the light of microbiome-assisted strategies. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 2020;7:17.