



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINE SANTOS DA SILVA

**METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *BURKHOLDERIA*
PYRROCINIA COM ATIVIDADE CONTRA FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Londrina
2018

CAROLINE SANTOS DA SILVA

**METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *BURKHOLDERIA*
PYRROCINIA COM ATIVIDADE CONTRA FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina
2018

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

Silva, Caroline Santos da .
Metabólitos produzidos por Burkholderia pyrocinia com atividade contra fitopatogênicos / Caroline Santos da Silva. - Londrina, 2018.
52 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.
Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Tese. 2. Antifúngico - Tese. 3. Fungos Fitopatogênicos - Tese. 4. Bactéria isolado ambiental - Tese. I. Andrade Filho, Galdino . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

CAROLINE SANTOS DA SILVA

**METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *BURKHOLDERIA PYRROCINIA*
COM ATIVIDADE CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Miguel Octavio Pérez Navarro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de março de 2018

SILVA, Caroline Santos da. Metabólitos produzidos por *Burkholderia pyrrocinia* com atividade contra fungos fitopatogênicos. 2018. 52 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Pesticidas utilizados na agricultura moderna auxiliaram no aumento da produtividade das culturas eliminando os agentes causadores de doenças. Entretanto, esses produtos apresentam ameaças a saúde humana e animal, e ao meio ambiente. Com a finalidade da manutenção da atividade agrícola através de práticas que reduzam danos ambientais estudar novos produtos que possuam efetividade no controle de pragas agrícolas com baixo impacto ambiental tornam-se essencial. Nessa perspectiva, metabólitos de origem microbiana oferece uma alternativa na busca de novos compostos, esses organismos possui uma alta diversidade metabólica que é ainda pouco conhecida. Inúmeros compostos foram identificados, são largamente utilizados na indústria farmacêutica e apresentam alta efetividade como no caso da penicilina. Entretanto, o número de microrganismos explorados ainda é baixo comparado a diversidade de microrganismo presentes no ambiente. Os gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* são conhecidos e estudados pelo potencial na produção de compostos antimicrobianos. Com objetivo de estudar os compostos microbianos com atividade antifúngica a cepa RV1R2 identificada como *Burkholderia pyrrocinia* foi utilizada para testar a bioatividade dos seus produtos contra fungos de importância agrícola, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A cepa RV1R2 isolada a partir de uma gramínea localizada próxima ao curso de água em testes anteriores demonstrou atividade antifúngica, neste trabalho estes compostos foram produzidos e submetidos a diferentes técnicas cromatográficas e sua atividade foi avaliada através de testes *in vitro* contra fungos fitopatogênicos afim de desenvolver alternativas aos compostos químicos utilizados hoje na agricultura.

Palavra-chave: Produtos naturais. antifúngico. fungos fitopatogênicos.

SILVA, Caroline Santos da. Metabolites produced by *Burkholderia pyrrocinia* with activity against phytopathogenic fungi. 2018. 52 p. Dissertation (MSc in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Pesticides used in modern agriculture have helped increase crop yields by eliminating disease-causing agents. However, these products pose threats to human and animal health, and the environment. With the purpose of maintaining agricultural activity through practices that reduce environmental damage, studying new products that have effectiveness in controlling agricultural pests with low environmental impact become essential. In this perspective, metabolites of microbial origin offer an alternative in the search for new compounds, these organisms have a high metabolic diversity that is still little known. Numerous compounds have been identified, are widely used in the pharmaceutical industry and present high effectiveness as in the case of penicillin. However, the number of microorganisms explored is still low compared to the diversity of microorganisms present in the environment. The genera *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Bacillus* are known and studied for the potential in the production of antimicrobial compounds. In order to study the microbial compounds with antifungal activity the RV1R2 strain identified as *Burkholderia pyrrocinia* was used to test the bioactivity of its products against fungi of agricultural importance, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The RV1R2 strain isolated from a grass located near the water course in previous tests demonstrated antifungal activity, in this work these compounds were produced and submitted to different chromatographic techniques and their activity was evaluated through in vitro tests against phytopathogenic fungi in order to develop alternatives to chemical compounds used today in agriculture.

Keyword: Natural products. antifungal. phytopathogenic fungi.

Ao Vanderlei e a Marlene. Sem eles nada disso seria possível.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Vanderlei e Marlene, e a minha irmã, Danielle, que me incentivam a seguir meus sonhos e por estarem sempre ao meu lado, mesmo distante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Galdino, pela oportunidade de poder fazer parte do LEM e pela elaboração deste projeto. E pelos diversos conselhos recebidos ao longo dos anos.

Aos meus amigos de graduação, Kenny, Laís e Beatriz, que me receberam em Londrina e possibilitaram momentos incríveis.

Aos meus colegas e amigos do LEM pelos momentos agradáveis que vivemos juntos e pelos diversos churrascos. Em especial a :Ane, André, Igor, Miguel, Janaina, Fluvio, Juan e Marta. E todos aqueles que passaram pelo LEM e deixaram sua marca.

As minhas amigas de mestrado, Karol e Carla, pela força, companhia e os vários almoços de domingo.

Ao laboratório de microscopia eletrônica e microanálise (LMEM) pela ajuda e realização dos experimentos em microscopia eletrônica de varredura

À coordenação e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos de Doutorado.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação, o meus mais sinceros agradecimentos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Halo de inibição em milímetros da atividade antifúngica das frações FAR, extraída da partição líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila, fração R2 cromatografia líquida a vácuo extraída com 100% clorofórmio. Atividade microbiológica testada a partir do disco difusão na concentração de 500 µg/disco.....	47
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Porcentagem da inibição fúngica avaliada através da técnica concentração inibitória mínima em meio solidificado da fração FAR, extraída a partir do sobrenadante com partição líquido-líquido com acetato de etila.....47
- Figura 2** - Porcentagem da inibição fúngica avaliada através da técnica concentração inibitória mínima em meio solidificado da fração R2, extraída através da cromatografia líquida a vácuo com 100% de clorofórmio48
- Figura 3** - Cromatograma das frações branca e reativa na detecção de luz UV 253 nm.....48
- Figura 4** - Microscopia eletrônica de varredura de *S. Sclerotiorum*.....49
- Figura 5** - Microscopia eletrônica de varredura de *R. solani* isolado 150
- Figura 6** - Microscopia eletrônica de varredura de *R. solani* isolado51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Grupo de anastomose
AHL	N-acetilhemoserina lactona
AN	Ágar nutriente
Bcc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
BDA	Ágar batata dextrose
CCD	Cromatografia em camada delgada
CF	Cromatografia flash
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia em camada delgada
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
CN	Caldo nutriente
DMSO	Dimetilsulfóxido
MLSA	Análise da sequência multilocus
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIC	Porcentagem da inibição de crescimento
PN	Produtos naturais
UV	Raios Ultravioletas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivo específico	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Fungos fitopatogênicos	12
3.1.1 <i>Rhizoctonia solani</i>	13
3.1.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
3.2 Controle de fitopatógenos	17
3.2 Produtos naturais	18
3.3 <i>Burkholderia</i>	20
4 REFERENCIAS	23
5 ARTIGO	30
TABELAS E FIGURAS	42

1 INTRODUÇÃO

O consumo de vegetais é crucial para a dieta humana, eles fornecem carboidratos essenciais, proteínas, fibras, vitaminas e minerais. O cultivo de lavouras começou a 10.500 anos, e tornou possível a manutenção de uma população crescente com recursos alimentares abundantes possibilitando a fixação dos indivíduos e a construção de vilas e cidades (AGRIOS, 2005; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

A medida que os seres humanos se estabeleceram e tornaram fazendeiros as práticas agrícolas tornaram-se cada vez mais especializadas, o resultado foi maior número de alimento disponível. Devido a sobra de alimento e a boa qualidade de vida houve o estabelecimento de vilas e cidade, e o crescimento populacional. Estima-se que a população humana constitui de 7,6 bilhões de pessoas em todo mundo, e este aumento da população humana somente foi possível pela produção de alimento em massa (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014; ONU, 2017).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de alimentos e fibras, aproximadamente 61,06 milhões de hectares foram utilizados na safra 2017/2018 para a produção de 226 milhões de toneladas de grão, distribuídos entre algodão, amendoim, arroz, feijão, milho, café e soja (CONAB, 2018). Há uma expectativa que nos próximos anos o Brasil torne um dos maiores produtores do mundo devido suas grandes áreas, recursos humanos e tecnológicos (SCOLARI, 2009). Entretanto, o aumento da incidência de doenças em plantas cresce cada vez mais entre os anos de cultivo, condição está associada a sucessão de culturas, aumento das áreas exploradas e a ausência de boas práticas de manejo nas áreas (HENNING, 2005).

Os fungos do solo são um dos principais causados de doenças em vegetais. Persistem por longos períodos no solo através de estrutura de resistência como micélio melanizado, clamidósporo, oósporo e escleródio. E podem sobreviver no ambiente de forma saprofítica ou como organismos livre. Os agentes patogênicos do solo são adaptados para crescer e sobreviver no solo em massa, mas a rizosfera é o campo de infecção onde o patógeno encontra a planta e estabelece uma relação parasitária. É também onde a complexa comunidade de rizosfera, tanto a microflora como a microfauna, podem interagir com o patógeno e influenciar o resultado da infecção por patógenos. A susceptibilidade de plantas hospedeiras, as condições climáticas e

ambientais fazem deste um dos maiores causadores de doenças (KOIKE ET AL., 2003; RAAIJMAKERS ET AL., 2009).

Diversas metodologias são utilizadas para controle de fungos na agricultura, como o uso de sementes saudáveis, rotação de culturas, controle biológico, controle químicos, e outras técnicas como o manejo integrado (BROOKER ET AL., 2016). Entretanto, o uso de produtos químicos é a técnica mais utilizada, apresenta alta eficácia no controle de pragas, porém, sua alta eficiência provoca danos como risco a saúde humana e animal, seleção de organismos resistentes, recalcitrância nos alimentos, morte de organismos não alvo, e a toxicidade ambiental (AKTAR; SENGUPTA; ASHIM, 2009).

Novas metodologias de controle de fungos fitopatogênicos devem ser elaborados para a substituição do uso de produtos químicos. O estudo de produtos naturais demonstra uma alternativa para substituição devido ao potencial inexplorável de compostos produzidos pelo metabolismo secundário de organismos (CRAGG; NEWMAN, 2013).

O Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, tem ampla experiência com produtos naturais produzidos por bactérias de isolados ambientais do gênero. A cepa LV, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*, produz metabólitos que possuem atividade contra bactérias do gênero *Klebsiella* de isolado ambiental (KERBAUY ET AL., 2016), patógenos de planta como *Botrytis cinerea* (SIMIONATO ET AL., 2017) e a *Xanthomonas citri* (DE OLIVEIRA ET AL., 2016). A cepa RV7S3 pertencente ao gênero *Burkholderia* possui atividade antifúngica contra fungos patogênicos humanos do gênero *Candida* (LASSIE, 2014), e a cepa RV1R2, identificada como *Burkholderia pyrrocinia* em trabalhos prévios exibiu atividade contra *S. sclerotiorum* (VIVAN, 2016).

O gênero *Burkholderia* possui espécies com uma diversidade e versatilidade genética, possibilitando que ocupem uma ampla gama de habitats como o solo, água, rizosfera e como patógenos de plantas, humanos e animais. Esta espécie desperta um grande interesse devido a suas propriedades convincentes para a agricultura, como a promoção do crescimento da planta, o aumento da resistência a doenças, a melhora da fixação de nitrogênio e a utilização de fósforo (TYC ET AL., 2017).

Portanto, com o objetivo de substituir os compostos químicos utilizados na agricultura, este trabalho foi desenvolvido a partir da temática produtos naturais de origem microbiana. E nele pode-se encontrar o isolamento, o cultivo, a fermentação, e os testes microbiológicos realizados contra fungos fitopatogênicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com o intuito de encontrar alternativas ao uso de produtos químicos na agricultura, o presente trabalho tem como objetivo estudar os metabólitos secundários produzidos pela *Burkholderia pyrrocinia* cepa RV1R2 com atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*.

2.2 Objetivo específico

2.1.1 Obter metabólitos ativos, por fermentação submersa da bactéria *B. pyrrocinia* cepa RV1R2;

2.1.2 Avaliar a atividade antifúngica dos compostos bioativos contra os fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum* e *R. solani* por meio de disco difusão, spot-on-lawn e da concentração inibitória mínima;

2.1.3 Extrair e purificar os compostos bioativos a partir de métodos químicos, como a partição líquido-líquido, cromatografia líquida a vácuo, cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia flash e cromatografia líquido de alta eficiência;

2.1.4 Observar os efeitos morfológicos dos bioativos sobre os fungos fitopatogênico a partir da microscopia eletrônica de varredura;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos fitopatogênicos

Os fungos são um grupo grande, diverso e amplamente disseminado no ambiente. A maioria dos fungos habitam o solo ou matéria vegetal morta, e desempenha um papel importante na decomposição e reciclagem de materiais orgânicos (MIDIGAN ET AL., 2016). As interações entre plantas e fungos podem combinar em diferentes estilos de vida, como saprofítica, patogênica ou simbiótica, seus limites não são bem definidos e cada interação resulta em diferentes alterações para ambas as partes (ZEILINGER ET AL, 2016).

Esta estreita interação é antiga, evidências fósseis encontraram interação simbiótica entre fungo e planta foram datados desde o período do estabelecimento das plantas na terra, e evolução de ambas as espécies permitiu o estabelecimento de uma relação benéfica, como a troca de nutrientes (RAI; AGARKAR, 2014). Plantas secretam substâncias que servem como sinalizadores para o recrutamento de fungos para rizosfera da planta, através de fatores bioquímicos, moleculares, genéticos e ambientais o resultado da interação planta-fungo é determinado (ZEILINGER ET AL, 2016; RAI; AGARKAR, 2014).

Fungos patogênicos de plantas são caracterizados pela alta complexidade e diversidade, sua versatilidade biológica possibilita o desenvolvimento em diferentes condições climáticas, desde climas secos até em regiões quentes. Fungos fitopatogênicos são de grande importância econômica e ecológica, podendo causar doenças destrutivas em muitas plantas cultivadas e silvestres (AGRIOS, 2005).

Quando algumas espécies de fungos quebram o equilíbrio mútuo entre as espécies e tornam-se patógenos eles podem ser classificados como biotrófos, hemibiotróficos e necrotróficos, cada um apresentando modos diferentes de interação com o hospedeiro baseado no modo de nutrição (LO PRESTI ET AL, 2015, ZEILINGER ET AL, 2016; RAI; AGARKAR, 2014).

Fungos patogênicos caracterizados como necrotróficos, matam o tecido hospedeiro com enzimas e toxinas, e não requerem de células vivas para obter nutrientes. A maioria dos fungos necrotróficos são generalistas com um amplo espectro de hospedeiros (RAAIJMAKERS ET AL., 2009; LALUK; MENGISTE, 2010). Podem ser divididos em dois grupos, fungos de

campo que infectam a planta durante o plantio e desenvolvimento, e fungo de armazenamento que infectam antes e durante o armazenamento de grãos (MÁRCIA; LÁZZARI, 1998).

Os principais gêneros de fungos necrotróficos são *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Colletotrichum*. A espécie *Sclerotinia sclerotiorum* agente causadora do mofo branco infecta mais de 400 espécies diferentes de abrigo a maioria da produção mundial de alimentos, incluindo cereais, leguminosas e muitas outras culturas vegetais. Nos Estados Unidos as perdas foram estipuladas por este patógeno foram em 200 milhões de dólares anuais. O gênero *Rhizoctonia* é um dos principais fungos necrotróficos do solo podendo causar doenças radiculares e vascular, esse agente patogênico causa tombamento pré / pós-emergência nas mudas e são responsáveis pelas doenças da podridão e da podridão radicular que infligem uma perda estimada de US \$ 4 bilhões anualmente para as culturas hortícolas dos EUA (LALUK; MENGOSTE, 2010).

3.1.1 *Rhizoctonia solani*

O gênero *Rhizoctonia*, descrito por DeCandolle em 1815, inclui espécies de fungos filamentosos habitantes do solo que não esporulam. Dentre elas, *Rhizoctonia solani* (Teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* é a espécie mais estudada deste gênero, e foi primeiramente descrito por Julius Kühn em 1858 por causar doença em batatas (OGOSHI, 1996; CUBETA; VILGALYS, 1997).

Pertencente ao filo *Basidiomycota*, ordem *Cantharellales* e família *Ceratobasidiaceae*, *R. solani* é formado por um complexo de espécies geneticamente distintos, com diferentes morfologias, ecologia e patologia. Distribuído por todo mundo é capaz de causar doenças em diversos cultiváveis de interesse econômico, provocando a podridão das sementes, raízes e frutos, tombamento da planta, cancro no caule e doenças nas folhas (MENZIES, 1970).

Apresenta características vegetativas que auxiliam na identificação desse táxon, como: hifas septadas multinucleadas, pigmentação com diferentes tons de castanho; ramificação em ângulo reto próximo ao septo distal, constrição da hifa e formação de septo próximo ao ponto de origem, septos do tipo doliporo, ausência de conídios, zigomorfos e grampos de conexão (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018; PAMETER; WHITNEY, 1970). Entretanto, a identificação do gênero *Rhizoctonia* não se restringe a identificação morfológica, necessitando

de outras análises, como informações sobre o teleomorfo, grupo de anastomose (AG) e sua biologia molecular (VILGALYS; CUBETA, 1994).

Anastomose é definido como a manifestação somática, ou vegetativa, da incompatibilidade entre hifas diferentes da mesma espécie (ANDERSON, 1982). Os grupos e subgrupos de anastomose representam linhagens evolutivas independentemente, e dentro de cada grupo e subgrupo há variações na morfologia, fisiologia, patogenicidade e hospedeiros (GONZALEZ ET AL., 2001).

Atualmente, 14 grupos de anastomose são conhecidos em *R. solani* (AGs1 a 13 e AG-BI), e alguns grupos de anastomose (AGs 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 9) possuem subgrupos denominados de grupo inespecífico (ISG) (AJAYA-OYTUNDE; BRADLEY, 2018). Reação de anastomose pertencentes aos mesmo AG inicia no pareamento entre diferentes isolados através do crescimento estimulado pela atração mútua das hifas, resultando na fusão da parede celular e da membrana plasmática, seguida de morte das células conectas e adjacentes a esta fusão (VILGALYS; CUBETA, 1994; CARLING, 1996; GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006). Para determinar grupos de anastomose de isolados ambientais é utilizado a técnica de confronto direto descrito em De Carling, 1996.

R. solani não produz esporos assexuais, existindo na forma de micélio ou escleródio livres solo ou em associação com plantas mortas e matéria orgânica. Os escleródios são produzidos a partir da aglomeração de hifas melanizadas sem diferenciação celular entre casa e medula. As células melanizadas auxiliam na resistência dos escleródios ao ataque de microrganismos e as condições desfavoráveis do ambiente (GONZALEZ ET AL., 2011; RITCHIE; BAIN; RUAIRIDH, 2013).

Os escleródios do solo germinam em micélios são capazes de infectar mudas ou plantas adultas, quando há a produção de hifas vegetativas. O processo de infecção inclui a adesão, a penetração, colonização e a reação do hospedeiro. Quando as hifas entram em contato com um hospedeiro compatível ocorre a ramificação de hifas de profusão e a formação de estruturas de infecção. O processo patogênico é caracterizado pela morte celular, antes e depois da penetração e colonização, características de fungos necrotróficos e hemibiotróficos. Após a morte da planta, os micélios e os escleródios retornam ao solo e vivem na decomposição da matéria orgânica (GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006).

Em plantas de tabaco, a infecção por *R. solani* torna-se mais susceptível nas primeiras semanas de desenvolvimento, à medida que a planta adquire defesas físicas e químicas tornam-

se mais resistentes a doenças. Em plantas recém transplantadas o tombamento e podridão são as principais doenças, sendo o tombamento o sintoma mais observado neste cultivável. A podridão do caule e da raiz é comumente associado a AG- 1, AG-2 e AG- 4. Sintomas nas folhas de tabaco também podem ser observados, causados por infecções com basidiósporos de *T. cucumeris*. As lesões nas folhas possuem características circulares com anéis concêntricos e gera perdas economicamente importantes na produção de tabaco (GONZALEZ ET AL., 2011).

3.1. 2 *Sclerotinia sclerotiorum*

O gênero *Sclerotinia* abriga fungos fitopatogênicos com ampla distribuição geográfica e com uma gama de hospedeiras, este gênero é responsável por grandes perdas econômicas principalmente em plantas cultiváveis (SAHARAN; MEHTA, 2008). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) pertencente à família *Sclerotiniaceae*, ordem *Helotiales*, filo *Ascomycota*, está espécie quando patogênica obtém nutriente da planta de forma necrotróficas. *S. sclerotiorum* é identificada facilmente no campo por possuir micélios de coloração branca com aspecto algodoso sobre o tecido da planta, e através da formação de escleródio que podem ser encontrados no solo incorporados aos restos culturais durante o preparo do solo para o plantio (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; HEFFER; JOHNSON, 2007).

S. sclerotiorum é a espécie mais bem estudada do gênero, contendo diversas informações sobre sua distribuição geográfica, sua biologia e seus hospedeiros. Esta espécie pode causar doenças em 408 espécies distribuídas em 73 famílias de plantas (BOLAND; HALL, 1994). Considerado um dos patógenos mais bem-sucedidos devido a gama de hospedeiros, este fungo atinge alguns dos principais cultiváveis, como: feijão, batata, alface, girassol, soja, amendoim, cenoura, tabaco, algodão e outras (BOLAND; HALL, 1994; SAHARAN; MEHTA, 2008).

No Brasil, é uma das doenças mais importantes da soja, podendo reduzir a produtividade até 70% em lavouras. Estima-se que 23% da área de produção de soja no país esteja infectada por *S. sclerotiorum*, e os estados mais afetados por este fitopatógeno são Goiás, Bahia, Mato Grosso, Paraná, Minas gerais (MAYER ET AL., 2016).

É encontrada principalmente em lugares frios e úmidos do planeta, podendo eventualmente ocorrer em regiões quentes e secas. Temperaturas próximas de 0 ° C, ou acima

de 32 ° C são temperaturas ideais para a sobrevivência e infecção deste fungo, sendo menos ativo e virulento nas temperaturas abaixo ou acima de 0° e 32 ° C (PURDY, 1979).

Devido ao grande número de hospedeiros não há um único sintoma que possa ser enquadrado para todas as plantas infectadas por este fungo. Os sintomas que podem ser observados em folhas e caules são manchas encharcadas que expandem para dentro do caule, formando lesões escuras ou lesões claras nos tecidos infectados. As lesões geralmente transformam-se em tecidos necrotróficos, que posteriormente podem ser identificados através do micélio algodinoso, traço evidente para a identificação de plantações acometidas por *S. sclerotiorum*. O micélio algodinoso desenvolve escleródios, que podem ser observados na superfície ou internamente ao tecido doente (PURDY, 1979; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; HEFFER).

Escleródio são estruturas de resistência que possibilita a sobrevivência de *S. sclerotiorum* no solo por longos períodos em condições adversas. Os escleródios também apresentam um papel fundamental no ciclo de vida e infeccioso deste organismo (ADAMS; AYERS, 1979; ORDÓÑEZ-VALENCIA ET AL., 2015). Esta estrutura é formada por um agregado de hifas consistentes, onde a camada externa apresenta coloração escura devido as células melanizadas, e a parte interna (medula) é composta de carboidratos e proteínas. O tamanho do escleródio depende do hospedeiro, variando entre 0.3 mm a 10.0 mm, sendo produzidos quando o crescimento micelial encontra esgotamento de nutrientes (PURDY, 1979; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

A capacidade reprodutiva desta espécie está juntamente relacionada à capacidade de sobrevivência dos escleródios. Esses podem realizar a germinação carpogênica ou miceliogênica dependendo das condições ambientais, resultando em duas doenças distintas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Os escleródios que germinam de forma miceliogênica produzem hifas que atacam diretamente os tecidos das plantas, como raízes, caules ou outros tecidos que estejam próximo ao solo (BARDIN; HUANG, 2001). A germinação carpogênica do escleródio produz apotécio, corpo de frutificação, e ascósporos que infectam tecidos acima do solo, ou pode ser disperso por longas distâncias através vento. A maioria das doenças causadas por *S. sclerotiorum* são originadas por ascósporos (SHARMA ET AL., 2016).

Em 1980, Huang e Dueck demonstraram que a germinação do escleródio pode resultar em duas doenças diferentes no girassol: a germinação miceliogênica, que afeta inicialmente o

caule e/ou as raízes, causando a podridão do caule e a murcha da planta; e a germinação carpogênica, que a forma e infecta a inflorescência do girassol, causando podridão nesta resultando em perda de rendimento.

3.2 Controle de fitopatógenos

O controle de patógenos do solo é um grande desafio. Esses organismos podem sobreviver por muito anos, e cada cultura está susceptível a um grande número de patógenos. Infecções simultâneas por diferentes patógenos podem resultar em doenças complexas e de difícil controle (KOIKE ET AL., 2003). A identificação do patógeno e o conhecimento sobre planta hospedeira, juntamente com fatores ambientais e as condições climáticas são essenciais para a escolha do método de prevenção e/ou controle da doença. Inúmeras técnicas podem ser utilizadas para exclusão, erradicação e proteção (MALOY, 2005).

Para exclusão de agente patogênicos são necessárias algumas práticas como: a produção de sementes ou cultivo de plantas livre de patógenos através de programas de certificação de sementes e materiais vegetais; isolamento de áreas de produção; inspeção de campo e remoção de plantas suspeitas de doenças. A erradicação ou redução dos patógenos é realizada através da destruição do patógenos, como: na remoção ou queima das plantas doentes; rotação de cultiváveis; saneamento; criação de condições desfavoráveis; controle biológico; controle químico. A proteção dos cultiváveis caracterizado pela criação de uma barreira entre o patógeno e a planta hospedaria, que pode ser realizada pela: indução de resistência em plantas; promoção do crescimento da planta; uso de plantas geneticamente modificadas (MALOY, 2005; AGRIOS, 2005).

A aplicação de produtos químicos é a técnica mais utilizada para a proteção da superfície da planta e a erradicação de um agente patogênico que iniciou o processo infeccioso (AGRIOS, 2005). Pesticidas associados aos fertilizantes e a variedades de sementes melhoradas, contribuíram para o aumento nos rendimentos das culturas nos últimos 80 anos (FERNANDEZ-CORNEJO ET AL., 2014).

O uso de substâncias químicas como forma de controle ou eliminação de fitopatógenos pode ser identificada em registros que remontam à Antiguidade Clássica. Um dos fungicidas mais conhecido foi a mistura de Bordeaux, anunciada em 1885 para o controle do *Plasmopara*

vitícola doença fúngica em uvas. Entre as décadas de 40 e 60 ocorreu avanços na indústria química e novos produtos químicos foram elaborados com diversos sítios de ação (RUSSEL, 2005).

Ao longo dos anos o consumo de produtos químicos no Brasil aumentou, tornando-se o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo. Os agrotóxicos possuem ampla cobertura legal no Brasil, com grande número de normas legais, como a Lei nº 7802/89 que rege o processo de registro de um produto agrotóxico. Com o objetivo do aumento da produtividade, o processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos (CASSAL ET AL., 2014; BRASIL, 2018).

A aplicação de produtos químicos causa impactos na qualidade da produção alimentar devido as altas concentrações de agrotóxicos presentes nos alimentos, causando danos na saúde humana, animal e ao meio ambiente, e também a seleção de organismos resistentes pelo uso contínuo e exacerbado de produtos químicos. Na saúde animal, o uso de pesticida ocasiona morte de organismos não alvo, toxicidade do solo e águas superficiais e subterrâneas, e pela contaminação do ar, solo e vegetação nativa (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; CARVALHO, 2017).

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi iniciado em 2001 pela Anvisa, e tem objetivo avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal. Dos 25 alimentos monitorados nos anos de 2013 a 2015, 13 alimentos apresentaram risco agudo sendo o abacaxi e a laranja os alimentos com maior com potencial de risco (ANVISA).

Os grupos de alto risco expostos a pesticidas incluem trabalhadores de produção, formuladores, pulverizadores e trabalhadores agrícolas. As principais consequências é toxicidade e a indecência ao desenvolvimento de câncer (ALAVANJA, 2009).

Devido aos problemas apresentados sobre o uso de produtos químicos novas alternativas devem ser utilizadas para o controle de agentes patogênicos, como as práticas de cultivo através como o manejo integrado, controle biológico e o uso de produtos naturais. (BROOKER ET AL., 2016; SUMIDA ET AL., 2018).

3.2 Produtos naturais

Fitopatógenos como *S. sclerotiorum* e *R. solani* organismos que apresentam dificuldade no controle devido a longa persistência dos escleródios no solo e a produção de ascósporos. Os fungicidas químicos apresentam alta eficiência no controle desses organismos quando aplicado na fase certa de desenvolvimento do fungo, entretanto, seu uso acarreta em dano ambiental e queda de produtividade (SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018).

Produtos naturais (PN) são definidos por pequenas moléculas produzidas naturalmente por qualquer organismo, incluindo metabólitos primários e secundários. São isolados em pequenas quantidades, têm atividade biológica e estrutura química interessante, e a síntese destes produtos representam um desafio na química orgânica (NATURE, 2018).

O metabolismo secundário, principal fonte de PN, é exclusivo de cada organismo, e geralmente a produção destes compostos não são essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo. São produzidos como resultado do desenvolvimento do organismo no meio ambiente, ou para atuar como um possível mecanismo de defesa contra predadores, auxiliando na sua sobrevivência (DIAS; URBAN; ROESSENER, 2012).

A maioria dos PN são derivados de plantas e microrganismos. As plantas são conhecidas e utilizadas para uso medicinais, suas propriedades etnofarmacológicas foram as primeiras fontes de medicamentos. A investigação de plantas medicinais levou o isolamento de muitos PN que se tornaram produtos farmacêuticos conhecidos, um deles é o paclitaxel, Taxol®, um fármaco utilizado no câncer de mama isolado da casca de *Taxus brevifolia* (DIAS; URBAN; ROESSENER, 2012).

Um dos primeiros produtos naturais produzidos por microrganismos a ser descoberto foi a penicilina, composto produzido por *Penicillium notatum* possui atividade contra *Staphylococcus aureus* descoberto por Fleming em 1929. A descoberta da penicilina iniciou a era dos antibióticos e estimulou a busca de novos compostos principalmente de origem microbiana (DEMAIN, 2006).

Os microrganismos são a fonte de bioativos estruturalmente diversos e são utilizados na produção de compostos com grande importância na indústria farmacêutica, incluindo agentes antibacterianos como, penicilina (*Penicillium*), cefalosporina (*Cephalosporium acremonium*) e tetraciclina (*Actinomycetales*), agentes imunossupressores, como a ciclosporina (*Trichoderma* e *Tolypocladium*) e rapamicina (*Streptomyces*), anti-helmínticos e

antiparasitários, como ivermectinas (*Streptomyces*), e agentes de redução de colesterol, como a mevastatina (*Penicillium*) e lovastatina (*Aspergillus*) (CRAGG; NEWMAN, 2013).

A dificuldade de cultivar a maioria dos microrganismos limitou muito o estudo dos ecossistemas microbianos naturais, estima-se, que menos de 1% dos microrganismos vistos microscopicamente possam ser cultivados em laboratório. O universo microbiano apresenta claramente um vasto recurso inexplorado para a descoberta de drogas com o desafio de como acessar essa diversidade química natural (DEMAIN, 2006; CRAGG; NEWMAN, 2013).

3.3 *Burkholderia*

Pertencente ao filo *Proteobacteria*, *Burkholderia* é um gênero que abriga bactérias Gram-negativas não fermentativas. O gênero foi criado em 1992 por Yabuuchi e colaboradores para incluir bactérias anteriormente classificadas como *Pseudomonas* rRNA grupo 2. Sete espécies foram inicialmente descritas a este gênero, e posteriormente duas espécies foram reclassificadas ao novo gênero *Ralstonia* (YABUUCHI ET AL, 1992; YABUUCHI ET AL, 1995). Devido à dificuldade de identificação, os membros deste gênero sofrem modificações constantes, devido à alta semelhança no gene 16s rRNA destas espécies. Segundo a revisão de 2016, o gênero consiste em 90 espécies e um vasto número de possíveis candidatos (DEPOORTER ET AL., 2016).

Espécies deste gênero podem ser encontradas em diversos locais como isolados no solo, rizosfera, água, planta, insetos, fungos, humanos e ambientes hospitalares. *B. cepacia* foi a primeira espécie descrita deste gênero por Burkholder, em 1950, como um patógeno de planta causando podridão na cebola (VIAL ET AL, 2007). O complexo *Burkholderia cepacia* abriga espécies que compartilham uma alta similaridade na sequência do gene 16S rRNA e valores moderados na hibridização DNA-DNA. A identificação ao nível de espécie através do gene 16S rRNA não é suficiente devido à alta similaridade, necessitando de outras técnicas como a análise de fragmentos do gene *recA* e a análise e da sequência multilocus (MLSA) (VANDAMME ET AL., 2014).

O termo genomovar foi introduzida por Ursing e colaboradores, 1995, para denotar cepas fenotipicamente similares, mas geneticamente distintas, que compartilham baixo nível de hibridização DNA-DNA. O complexo *Burkholderia cepacia* é constituído de nove genomovars,

incluindo isolados ambientais considerados benéficos pela capacidade de fixação de nitrogênio e degradação de compostos recalcitrantes, e bem como isolados clínicos encontrados em pacientes com fibrose cística ou imunocompetentes (VIAL ET AL., 2007; EBERL; VANDAMME, 2016; CHIARINI ET AL., 2006).

Este gênero é filogeneticamente diverso com múltiplas ramificações nas linhagens 16 rRNA. Segundo Depoorter e colaboradores a classificação do gênero *Burkholderia* apresenta três ramificações. O primeiro inclui espécies pertencentes ao complexo *Burkholderia cepacia*, e alguma espécies promotoras de crescimento e controle biológico em plantas, como *B. vietnamiensis* TVV74 e *B. ambifaria* AMMD^T. O segundo abriga espécies isoladas de solos poluídos com ação degradadoras dos compostos poluentes. Os membros deste ramo não são patogênicos de humanos ou animais. E o terceiro compreende espécies ambientais associadas a plantas, muitas delas diazotróficas e benéficas aos seus hospedeiros. (DEPOORTER ET AL., 2016).

Outros autores apresentam uma nova classificação, Sawana e colaboradores 2014 dividiu o gênero em duas linhagens utilizando evidências filogenéticas e marcador molecular para identificar inserções ou exclusões de sequências conservadas de proteínas. A primeira linhagem, *Burkholderia*, inclui patógenos humanos, animais e plantas, como *B. pseudomallei*, *B. mallei* e *B. glumae*, e todas as espécies do complexo *Burkholderia cepacia*. E a segunda linhagem filogenéticas, *Paraburkholderia*, espécies ambientais benéficas, como fixadores de nitrogênio, promotores do crescimento, e degradadores de compostos recalcitrantes (SAWANA; ADEOLU; GUPTA, 2014; EBERL; VANDAMME, 2016). Esta classificação pode ser encontrada em diversos artigos demonstrando a aceitação da comunidade científica na divisão do atual gênero *Burkholderia* em *Paraburkholderia* e *Burkholderia*.

Bactérias do gênero *Burkholderia* são ecologicamente versáteis devido ao seu grande genoma (7.5- 8.5 Mb) e a presença de múltiplas sequências de inserção possibilitando capacidades metabólicas incomuns (VANDAMME ET AL., 2014). Os produtos extracelulares apresentam diversidade e versatilidade na função, possuindo papel fundamental na interação com o hospedeiro. As espécies secretam enzimas com atividade proteolítica, lipolítica e homolítica, e secretam também toxinas, antibióticos e siderófagos (VIAL ET AL., 2007). E também possui interação benéfica com plantas no controle biológico (MAGALHÃES ET AL., 2017), biorremediação (CABALLERO-MELLADO ET AL., 2007) e na promoção de crescimento de plantas (PEIX ET AL., 2001; BERNABEU ET AL., 2015)

Este gênero produz compostos com ação fungicida como, o complexo xylocandin com atividade contra o gênero *Candida* (MEYERS ET AL. 1987), glidobactins com atividade contra *Thielaviopsis basicola* (SCHELLENBERG ET AL. 2007), altericidins (KIRINUKI; ICHIBA; KATAYAMA. 1984), cepacins (PARKER ET AL., 1984), cepaciamides (JIAO ET AL., 1996), fenazinas com atividade contra *R. solani* (CARTWRIGHT; CHILTON; BENSON, 1995), occidiofungin (WANG ET AL., 2016), Burkholdines (LIN ET AL., 2012).

A pirrolnitrina é um dos principais compostos produzidos por *Burkholderia*, e possui atividade contra fungos fitopatogênicos, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e *Candida albicans*. Este composto é um derivado do triptofano, e várias espécies tem a capacidade de produzir, como o gênero *Pseudomonas* e *Burkholderia*, e as espécies *Enterobacter agglomerans*, *Serratia plymuthia* e isolados *Myxococcus*. A pirrolnitrina inibe o crescimento fúngico através da cadeia respiratória transportadora de elétrons (VIAL ET AL., 2007).

A produção de pirrolnitrina é regulada por Quorum sensing através da molécula sinalizadora N-aceilhomoserina lactona (AHL). Esse sistema regula várias funções em uma densidade populacional, como virulência, superfície de colonização, simbiose e produção de compostos antimicrobianos (SCHMIDT ET AL., 2009). Trabalhos são encontrados sobre a ação antifúngica contra fungos fitopatogênicos (HWANG; CHILTON; BENSON, 2002; EL-BANNA; WINKELMANN, 1998).

Burkholderia pyrrocinia cepa 2327 foi a primeira bactéria a produzi o composto antifúngico pirrolnitrina. Está bactéria foi isolada no Japão a partir de uma amostra solo em 1963, e identificada como *Pseudomonas pyrrocinia* (KWAK; SHIN,2015). Outros trabalhos também apresentam cepas de isolados ambientais identificados como *B. pyrrocinia* com atividade antifúngica e promoção do crescimento em plantas. A cepa CH-67 apresentou atividade contra os fungos *Fulvia fulva*, doença do tomate, e *Rhizoctonia solani* doença do tomate e alface (LEE ET AL., 2011). A cepa JK-SH007E1 com promoção do crescimento em plantas e atividade antifúngica contra cancrios causadas pelos fungos, *C. chrysosperma*, *F. aesculi* and *P. macrospora* (HE ET AL., 2018). E cepa Lyc2, que produz um composto com atividade antifúngica denominado de Occidiofungin. Este composto possui atividade contra oito fungos fitopatogênicos sendo a maior atividade contra *C. heterostrophus* (WANG ET AL.2016).

4 REFERENCIAS

- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of Sclerotinia species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 896-899, 1979.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Prss, 2005
- AJAYI-OYETUNDE, O. O., BRADLEY, C. A. Rhizoctonia solani: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant pathology**, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2018.
- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.
- ALAVANJA, M. C.R. Introduction: Pesticides use and exposure, extensive worldwide. **Reviews on environmental health**, v. 24, n.4, p. 303-310,2009.
- ANDERSON, N. A. The genetics and pathology of Rhizoctonia solani. **Annual Review of Phytopathology**, v. 20, n. 1, p. 329-347, 1982.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), Apresentação dos resultados (2013-2015). Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. Acesso em: 14 de jan. 2018.
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada1. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 88-98, 2001.
- BERNABEU, P. R.; PISTORIO, M.; TORRES-TEJERIZO, G.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; GALAR, M. L., BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. Colonization and plant growth-promotion of tomato by Burkholderia tropica. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 113-120, 2015.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of Sclerotinia sclerotiorum. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P.H.J.; NELSON, B. D. Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular plant pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente, Agrotóxicos**. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 14 de jan. 2018
- BROOKER, R. W.; KARLEY, A. J.; NEWTON, A. C.; PAKEMAN, R. J.; SCHÖB, C. Facilitation and sustainable agriculture: a mechanistic approach to reconciling crop production and conservation. **Functional ecology**, v. 30, n.1, p. 98-107, 2016.
- CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing

Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5308-5319, 2007.

CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. M.; DIJST, G. **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 37-47.

CARTWRIGHT, D. K.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5 B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 211-216, 1995.

CASSAL, V. B.; DE AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; DA SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v.18, n.1, p. 437-445, 2014.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VISCA, P. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 6, p. 277-286, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira - Grãos. Observatório Agrícola**, v. 5, n.6, p. 1-140, 2017/18. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_03_13_14_15_33_grao_marco_2018.pdf>. Acesso em 20 de jan. 2018.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology**, v. 87, n. 4, p. 480-484, 1997.

DE OLIVEIRA, A.G.; SPAGO, F.R.; SIMIONATO A.S.; NAVARRO, M.O.P.; DA SILVA, C.S.; BARAZETTI, A.R.; CELY, M.V.T.; TISCHER, C.A.; SAN MARTIN, J.A.B.; DE JESUS ANDRADE, C.G.T.; NOVELLO, C.R.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, G. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p.113, 2016.

DEMAIN, A.L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 486-495, 2006.

DEPOORTER E.; BULL, M.J.; PEETERS, C.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5215-5229, 2016.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DOOHAN, F.; ZHOU, B. Fungal pathogens of plants. In: KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**, Chichester UK. John Wiley. p. 232-263, 2005.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research**, v. 5, 2016.

EL-BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 69-78, 1998.

FERNANDEZ-CORNEJO, J.; NEHRING, R. F.; OSTEEEN, C.; WECHSLER, S.; MARTIN, A.; VIALOU, A. Pesticide use in US agriculture: 21 selected crops, 1960-2008, 2014.

GARCÍA, V. G.; ONCO, M. P.; SUSAN, V. R. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 1, p. 55-79, 2006.

GONZALEZ, D.; CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, v. 92, n.6, p. 1138-1150, 2001.

GONZALEZ, M.; PUJOL, M., METRAUX, J.P, GONZALES-GARCIA, V., BOLTON, M.D, BORRÁS-HIDALGO. Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 3, p. 209-216, 2011.

HE, L.; YE, J.; WU, B.; HUANG, L.; REN, J.; WU, X. Effects of genetically modified *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007E1 on soil microbial community in poplar rhizosphere. **Forest Pathology**, p. e12430, 2018.

HEFFER LINK, V.; JOHNSON, K. B. White mold. **The plant health instructor**. 2007. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/WhiteMold.aspx>>. Acesso em: 21 jan. 2018.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, Á. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; DIAS, W. P. Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**. Londrina, V.1, n.256, p. 72, 2005.

HUANG, H. C.; DUECK, J. Wilt of sunflower from infection by mycelial-germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 2, n. 2, p. 47-52, 1980.

HWANG, J.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. **Biological control**, v. 25, n. 1, p. 56-63, 2002.

JIAO, Y.; YOSHIHARA, T.; ISHIKURI, S.; UCHINO, H.; ICHIHARA, A. Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 7, p. 1039–1042, 1996.

KERBAUY, G.; VIVAN, A. C.; SIMÕES, G. C.; SIMIONATO, A. S.; PELISSON, M.; VESPERO, E. C.; COSTA, S.F.; ANDRADE, C.G.T.J; BARBIERI, D.M; MELLO, J.C.P; MOREY; A.T.; YAMAUCHI, L.M.; YAMADA-OGATTA, S.; OLIVEIRA, A.G; ANDRADE, G. Effect of metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on

Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC) – producing *K. pneumoniae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 17, n. 4, p. 389–397, 2016.

KIRINUKI, T.; ICHIBA, T.; KATAYAMA, K. General survey of action site of altericidins on metabolism of *Alternaria kikuchiana* and *Ustilago maydis*. **Journal of Pesticide Science**, Japan, 1984.

KOIKE, S.; SUBBARAO, K.; DAVIS, R. M.; TURINI, T. Vegetable diseases caused by soilborne pathogens, Vegetable diseases caused by soilborne pathogens. **UCANR Publications University of California**. Oakland CA. 2003.

KWAK, Y.; SHIN, J.-H. Complete genome sequence of *Burkholderia pyrrocinia* 2327T, the first industrial bacterium which produced antifungal antibiotic pyrrolnitrin. **Journal of biotechnology**, v. 211, p. 3-4, 2015.

LALUK, K.; MENGISTE, T.. Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion?. The **Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, v. 8, 2010.

LASSIE, F.S. **Substâncias bioativas produzida por *Burkholderia* sp. com ação antifúngica em *Candida* spp.** 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina 2014.

LEE, K. Y.; KONG, H. G.; CHOI, K. H.; LEE, S. W.; MOON, B. J. Isolation and identification of *Burkholderia pyrrocinia* CH-67 to control tomato leaf mold and damping-off on crisphead lettuce and tomato. **The Plant Pathology Journal**, v. n. 27(1), p. 59-67, 2011.

LIN, Z.; FALKINHAM, J.O.; TAWFIK, K.A.; JEFFS, P.; BRAY, B.; DUBAY, G.; COX, J.E.; SCHMIDT, E.W. Burkholdines from *Burkholderia ambifaria*: antifungal agents and possible virulence factors. **Journal of natural products**, v. 75, n. 9, p. 1518-1523, 2012.

LO PRESTI, L.; LANVER, D.; SCHWEIZER, G.; TANAKA, S.; LIANG, L.; TOLLOT, M.; ZUCCARO, A.; REISSMANN, S.; KAHMANN, R. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n.1, p. 513–545, 2015.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J.M; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2016.

MAGALHÃES, M., DOHERTY, C., GOVAN, J. R. W., & VANDAMME, P. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 54, n. 2, p. 120-123, 2003.

MALOY, O. C. Plant disease management. **The plant health instructor**.2005. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Documents/PlantDiseaseManagement.aspx>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

MÁRCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitorament of fungi in corn, grits and corn meal. **Food Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

MENZIES, J. D. Introduction: The first century of *Rhizoctonia solani*. In: PARMETER, J.R. **Rhizoctonia solani, biology and pathology**, Univ of California Press, 1970.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; JULIATTI, F. C.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P. DA; SATO, L. N.; MADALOSSO, M.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; DEBORTOLI, M. P.; BALARDIN, R. S.; VENANCIO, W. S. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, Londrina, 2016.

MEYERS, E.; BISACCHI, G.S.; DEAN, L.; LIU, W.C.; MINASSIAN, B.; SLUSARCHYK, D.S.; SYKES, R.B.; TANAKA, S.K.; TREJO, W. Xylocandin: A new complex of antifungal peptides. I. Taxonomy, isolation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 11, p. 1515–1519, 1987.

NATURE. NATURAL PRODUCTS. Disponível em <<https://www.nature.com/subjects/natural-products>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

OGOSHI, A. Introduction—the genus *Rhizoctonia*. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S. M., & DIJST, G. **Rhizoctonia species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Springer, Dordrecht, p. 1-9, 1996.

ONU. População mundial atingiu 7,6 bilhões de habitantes. **ONU NEWS**. 2017 Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2017/06/1589091-populacao-mundial-atingiu-76-bilhoes-de-habitantes>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

ORDÓÑEZ-VALENCIA, C.; FERRERA-CERRATO, R.; QUINTANAR-ZÚÑIGA, R. E.; FLORES-ORTÍZ, C.M., GUZMÁN, G. J. M.; ALARCÓN, A.; LARSEN, J.; GARCÍA-BARRADAS, O. Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 2, p. 765-770, 2015.

PARAMETER, J. R.; WHITNEY, H. S. **Rhizoctonia solani: biology and pathology**. Univ. Calif. Press, Berkeley, p. 255, 1970.

PARKER, W.L.; RATHNUM, M.L.; SEINER, V.; TREJO, W.H.; PRINCIPE, P.A.; SYKES, R.B. Cepacin A and cepacin B, two antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 5, p. 431–440, 1984.

PEIX, A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, 2001.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, T. C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and soil**, v.1-2, n. 321, p.341-361, 2009.

RAI, M.; AGARKAR, G. Plant–fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles? **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 3, p. 428-438, 2016.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2014. 876 p.

RITCHIE, F.; BAIN, R.; MCQUILKEN, M. Survival of Sclerotia of *Rhizoctonia solani* AG 3 PT and Effect of Soil-Borne Inoculum Density on Disease Development on Potato. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 3, p. 180-189, 2013.

RUSSELL, P. E. A century of fungicide evolution. **The Journal of Agricultural Science**, v. 143, n. 1, p. 11-25, 2005.

SAHARAN, G.S.; MEHTA, N. **Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management**. Springer, 2008.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 429, 2014.

SCHELLENBERG, B.; BIGLER, L.; DUDLER, R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 1640–1650, 2007

SCHMIDT, S.; BLOM, J. F.; PERNTHALER, J.; BERG, G.; BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; EBERL, L. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1422-1437, 2009.

SCOLARI, D. D.G. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. **Área de Informação da Sede-Capítulo em livro científico (ALICE)**. Brasília. v.25., p. 9-86, 2009.

SHARMA, P.; MEENA, P. D.; VERMA, P. R.; SAHARAN, G. S.; MEHTA, N.; SINGH, D.; KUMAR, A. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary causing Sclerotinia rot in oilseed Brassicas: a review. **Journal of Oilseed Brassica**, v. 1, n. 2, p. 1-44, 2016.

SIMIONATO, A.S; NAVARRO, M.O.P.; DE JESUS, M.L.A.; BARAZETTI, A.R.; DA SILVA, C.S.; SIMÕES, G.C; BALBI-PEÑA, M.I.; DE MELLO, J.C.P.; PANAGIO, L.A.; DE ALMEIDA, R.S.C.; ANDRADE, G.; DE OLIVEIRA, A. G. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of botrytis cinerea produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Frontiers in microbiology**. v. 8, p.1102,2017.

SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*—a review. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2018.

SUMIDA, C. H.; DANIEL, J. F.; ARAUJOD, A. P. C.; PEITL, D. C.; ABREU, L. M.; DEKKER, R. F.; CANTERI, M. G. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology**, v.28, n.2, p.142-156, 2018.

TYC O.; JAGER, V.C.; BERG, M.; GERARDS, S.; JANSSENS, T.K.; ZAAGMAN, N.; KAI, M.; SVATOS, A.; ZWEERS, H.; HORDIJK, C.; BESSELINK, H. Exploring bacterial interspecific interactions for discovery of novel antimicrobial compounds. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 910-25, 2017.

VANDAMME, P.; VERHEYDE, B.; PEETERS, C.; DAWYNDT, P. Genomic taxonomy and biodiversity of the *Burkholderia cepacia* complex. In: COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E. **Burkholderia: From Genomes to Function**. Caister Academic Press. 2014, p. 15-29.

VIAL, L.; GROLEAU, M.C; DEKIIMPE, V.; DÉZIEL, E. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 1407-1429, 2007.

VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 135-155, 1994.

VIVAN, A.C.P. **Produção de bioativos antimicrobianos de *Burkholderia* sp. cepa RV1R2: avaliação da atividade contra patógenos de importância clínica e agrônômica**. 2014. 72f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014

WANG, X.Q.; LIU, A.X.; GUERRERO, A.; LIU, J.; YU, X.Q.; DENG, P.; MA, L.; BAIRD, S.M.; SMITH, L.; LI, X.D.; LU, S.E. Occidiofungin is an important component responsible for the antifungal activity of *Burkholderia pyrrocinia* strain Lyc2. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 3, p. 607-618, 2016.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of Two *Burkholderia* and An *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* Gen. Nov. Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. **Microbiology and immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

ZEILINGER, S.; GUPTA, V. K.; DAHMS, T. E. S.; SILVA, R. N.; SINGH, H. B; UPADHYAY, R. S.; GOMES, E. V.; TSUI, C.K.M.; NAYAK, CHANDRA S .Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 2, p. 182-207, 2015.

5 ARTIGO

Artigo

Metabólitos produzidos por *Burkholderia pyrrocinia* com atividade contra fitopatogênicos

Caroline Santos da Silva¹, Galdino Andrade^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brasil.

*Autor Correspondente: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Brasil. Fone/Fax: + 554333714791; E-mail: andrade@uel.br

Palavra-chave: produtos naturais; *Burkholderia*; isolado ambiental; antifúngico; metabólitos secundários; fungos fitopatogênicos.

Resumo

Sclerotinia sclerotiorum e *Rhizoctonia solani* são fitopatógenos, com amplo espectro de hospedeiros, distribuídos em todo globo com capacidade de resistir em ambientes adversos por meio da estrutura de resistência denominada escleródios. O controle desses é principalmente realizado através da aplicação de produtos químicos, esses demonstram efetividade no controle dos organismos patogênicos. Entretanto, a maioria dos produtos ocasionam danos ambientais, morte de organismos não-alvo, recalcitrância e seleção de patógenos resistentes. Devido aos problemas ambientais causados pelos produtos químicos e a capacidade adaptativa dos fitopatogênicos, torna-se necessário estudar novas alternativas com baixo impacto ambiental. O metabolismo microbiano oferece uma alternativa de estudo para novos produtos bioativos, os microrganismos ambientais apresentam uma ampla diversidade e ainda há pouco conhecimento sobre seus metabólitos. Metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Burkholderia* vem sendo estudados com ação antimicrobiana, com suporte da literatura e resultados prévios este trabalho tem como objetivo investigar os metabólitos produzidos pela *Burkholderia pyrrocinia* cepa RV1R2 contra os fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Na determinação da concentração inibitória mínima realizada com a fração semi-purificada denominada de R2 obteve-se concentrações de 3,9 µg/mL para *R. solani* e 15,62 µg/mL para *S. sclerotiorum*, e por meio da microscopia eletrônica de varredura foram observadas alterações morfológicas causadas pela ação antifúngica desta fração. Os resultados demonstram que a cepa RV1R2 produz compostos com ação antifúngica, e por se tratar de um composto semi-purificado espera-se que ocorra uma redução na concentração da ação antifúngica do composto purificado. Os resultados obtidos neste estudo são relevantes por tratar-se de uma cepa bactéria de isolado ambiental ainda pouco estudada quando comparados a outros compostos. Entretanto, mais estudos serão realizados para o desenvolvimento de um novo produto para o controle de fungos fitopatogênicos.

1 Introdução

Fungos estão entre os patógenos que afetam a produtividade agrícola, podendo atingir o cultivo, a colheita e o armazenamento. Fungos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* causam danos severos em plantas e limitam a produção e a qualidade dos produtos, estes possuem um amplo espectro de hospedeiros podendo causar doenças em culturas de importância econômica em todo o mundo (AGRIOS, 2005). Os fungos fitopatogênicos apresentam difícil controle, não somente pelo amplo espectro de hospedeiros, mas também pela sua capacidade de viver no solo através da decomposição de matéria orgânica ou através de estruturas de resistência. O controle químico é largamente utilizado na agricultura tradicional devido sua fácil aplicação e sua **forte** atividade contra os agentes fitopatogênicos (NAING et al., 2013; Mihajlović et al., 2017). Entretanto, seu uso é exacerbado e indiscriminado, provocando recalcitrância, contaminação e degradação de solos e águas superficiais e subterrâneas, morte de organismos não-alvo, problemas a saúde humana e animal e a seleção de organismos resistentes. Devido a esta problemática, desenvolver novos produtos que melhorem a produtividade agrícola sem causar impactos ambientais torna-se necessário (KEFI et al., 2015; Pii et al., 2015).

A produção de compostos antimicrobianos é uma estratégia importante para a sobrevivência de bactérias no solo, sendo este um ambiente heterogêneo, pobre em nutrientes e com uma alta diversidade de bactérias competidoras. A produção de metabólitos secundários como antibióticos, toxinas, biosurfactantes, podem suprimir ou matar microrganismos oponentes possibilitando sua sobrevivência no ambiente (TYC et al., 2014). Microrganismos ambientais podem ser uma ótima fonte para a descobertas de novos compostos, principalmente com ação antimicrobiana. Estes metabólitos não estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento ou reprodução destes organismos, porém desempenham um papel importante na interação com outros organismos. Diversas pesquisas foram realizadas direcionadas em extratos microbianos como óleos essenciais, metabólitos secundários e novos moléculas sintéticas como potencial agente antimicrobianos (TYC et al., 2017).

Bactérias gram-negativas do complexo *Burkholderia cepacia* são conhecidas por serem patógenos oportunistas de pacientes imunocomprometidos e são responsáveis por infecções nosocomiais. Entretanto, essas bactérias também habitam o meio ambiente como no solo e não são patógenas. Algumas espécies do complexo *B. cepacia* produzem compostos com ação antimicrobiana contra fungos e bactérias patogênicas, como as cepacinas, xiloxandinas, glidobactins occiofungina, e muitos outros (EBERL; VANDAMME, 2016; Lu et al., 2009; Rojas-Rojas et al., 2018). O composto bem mais conhecido e estudado deste gênero é a pirrolnitrina, que possui atividade contra fungos fitopatogênicos como, *R. solani* e *Fusarium* spp., além de inibir o crescimento de *Candida albicans* e algumas bactérias Gram-positivos e Gram-negativas, exceto *Proteus vulgaris*. (Depoorter et al., 2016).

Metabólitos secundários produzidos por bactérias ambientais podem ser uma fonte para a descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana para o controle de fungos fitopatogênicos. Em projeto realizado anteriormente, foi possível determinar o potencial de produção de compostos antifúngicos pela bactéria *Burkholderia pyrrocinia* cepa RV1R2 onde demonstrou atividade contra os patógenos de importância clínica contra *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*, e também demonstrou ação contra fitopatogênicos dos gêneros *Sclerotinia* e *Botrys*. (VIVAN, 2016). O presente trabalho teve como objetivo estudar os metabólitos produzidos pela cepa RV1R2 desde a produção dos metabólitos através da fermentação submersa, extração e isolamento de compostos extracelulares através das técnicas cromatográficas, e teste de atividade antimicrobiana *in vitro* contra fungos fitopatogênicos de importância econômica.

2 Metodologia

2.1 Fungos fitopatogênicos

Dois isolados de *Rhizoctonia solani* foram gentilmente cedidos pela Empresa Souza Cruz ambos isolados do cultivo de tabaco, *Nicotiana tabacum*. Os isolados foram cultivados em ágar batata dextrose (BDA) a 28°C na ausência de luz. O isolado 1, foi retirado de uma planta tombada devido a necrose do caule. Já o isolado 2, foi retirado a partir de folhas com manchas circulares.

O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizado neste trabalho foi gentilmente doado pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Cultivado em BDA a 21°C com fotoperíodo de 12 horas.

Os fungos foram armazenados em solução de Castellani (SOLA et al., 2012) e criopreservados a -20°C no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

2.2 Cepa bacteriana e condição de cultivo

A cepa bacteriana Gram-negativa denominada de RV1R2 foi identificada como *Burkholderia pyrocinia* pelo sistema automatizado VITEK® (BioMérieux), e através da reação de PCR com primers específicos. A bactéria foi isolada nas proximidades de um curso de água natural a partir de uma gramínea encharcada no município de Itararé, São Paulo, Brasil. (VIVAN, 2016). A cepa RV1R2 foi cultivada em ágar nutriente (AN) e incubada na temperatura de 28°C durante 24 horas, e então criopreservada em solução de glicerol 40 % (v:v) e armazenada a -20°C no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. O inóculo utilizado para a produção dos metabólitos a partir da cepa RV1R2 foi realizado por meio da turvação em solução salina (0.85%) correspondente a 0,5 na escala de Mcfarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). O cultivo foi realizado em Caldo Nutriente (CN) no volume de 1 L em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 2 L, e o volume do inóculo foi de 1% (v:v). O tempo de cultivo e produção dos metabólitos ocorreu durante 7 dias a 28°C à 170 rpm.

2.4 Extração e Purificação dos metabólitos com atividade antifúngica

Subsequente ao tempo de cultivo foi realizado a centrifugação (15 min., 4°C, 9000 rpm) e redução do pH para 4 com ácido clorídrico. O sobrenadante livre de células e proteínas foi então concentrado à 5 % do volume inicial em estufa de secagem. Em seguida submetido à três extrações com solvente orgânico acetato de etila na razão de 2:1 (v:v, solvente orgânico: sobrenadante). A fração acetato de etila (FAR) resultado da extração foi concentrada em rotaevaporador (Rotavapor R-114, Büchi) a 50°C com vácuo constante, até a amostra estar ausente de solvente orgânico.

A purificação da FAR foi realizada por meio da cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando coluna de vidro (20 mm diâmetro x 350 mm altura), com sílica gel 60 (0.063 – 0.2 mm, MN) acoplado a bomba de vácuo com pressão média 51kPa. Como fase móvel foram utilizados solventes orgânicos com polaridade crescente: ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água destilada. Foram utilizados os solventes orgânicos puros e a mistura destes (1:1), obtendo-se 8 frações. As frações foram denominadas de R e o número

cronológico que esta fração é extraída. As frações foram evaporadas para a realização de testes microbiológicos com atividade antifúngica.

A fração denominada R2 extraída com clorofórmio 100% apresentou atividade antifúngica, e foi submetida a outro método cromatográfico para purificação do composto de interesse, a cromatografia em camada delgada preparativa (CCD preparativa). A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60G (Merk) em placas de vidro (100 mm de altura x 10 mm de largura), e o sistema eluente utilizado foi ciclohexano:clorofórmio:metanol [75:20:05]. Fração R2 diluída em clorofórmio foi aplicada a 5 mm da base, e a fase móvel percorreu 8 mm. A CCD preparativa foi visualizada nos comprimentos de onda ultravioleta (UV) 312, 254 e 365 nm, e as bandas detectadas nos diferentes comprimentos de onda UV foram marcadas e retiradas, e então diluídas em metanol, homogeneizadas e centrifugadas (10 min., 25°C, 10000 rpm). O sobrenadante foi separado do pellet contendo sílica, filtrado em filtro de celulose regenerado de 0,20 µL e concentrado, este procedimento repetiu-se por 3 vezes. Os testes microbiológicos foram avaliados por meio da técnica de spot-on-lawn para monitorar a atividade antifúngica das frações.

Uma banda de coloração amarela denominada de R2-6 foi submetida a cromatografia flash (CF), coluna de vidro (5 mm de espessura x 15 mm de altura). A fase estacionária utilizou sílica gel 60 (0.04 – 0.063mm, MN) com solventes orgânicos de polaridade crescente como fase móvel: ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água. Obteve-se 30 frações a partir da CF e a atividade antifúngica das frações foi monitorada pela técnica de spot-on-lawn.

Somente uma fração apresentou atividade contra os fungos testados, esta fração denominada de R2-6a foi extraída com o sistema de solventes orgânicos: ciclohexano e clorofórmio [60:40]. Afim de purificar os compostos com atividade antifúngica, a fração R2-6a foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa em coluna de fase reversa C18 (10 mm, 250 mm, Agilent®). Dois compostos apresentaram atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos. A purificação dos compostos ocorreu a partir um gradiente de 3 etapas: 5 minutos de água milli-q e acetonitrila [98:2], 5 minutos de acetonitrila [100%], e 2 minutos de água mili-q e acetonitrila [98:2], com fluxo de 1mL/min e pressão de 400 bar. Foi utilizado o comprimento de onda UV 253 nm para observar os picos e assim extrair os compostos.

2.5 Ensaio microbiológicos

2.5.1 Disco difusão

As frações obtidas da partição líquido-líquido e da CLV foram avaliadas para os fungos *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Cada fração foi diluída no solvente orgânico com maior afinidade e impregnados em discos com 10 µL da fração na concentração de 500µg/disco. Como controle negativo foi adicionado somente solvente orgânico no disco. Os testes foram realizados em placa de Petri contendo BDA, ao centro da placa foi adicionado um plug fúngico de 6mm e nas extremidades adicionados os discos impregnados com a fração e o controle. Cada fungo foi incubado nas condições de cultivo descrito no tópico 2.1 Fungos fitopatogênicos. A avaliação do teste sucedeu quando o crescimento fúngico atingiu o disco controle impregnado somente com solvente orgânico e então foi mensurada, em milímetros, a distância do centro do disco até a borda do fungo.

2.5.2 Spot-on-lawn

Para monitorar a atividade antifúngica das frações obtidas através das técnicas CCD preparativa, CF e CLAE utilizou-se a técnica adaptada de Spot-on-lawn (LEWUS; MONTVILLE, 1991). As frações foram diluídas em 50 µL de solvente orgânico, 5 µL foi adicionado a 15 mm da borda da placa de Petri, e ao centro da placa foi adicionado o plug fúngico de 6 mm. Como controle negativo foi aplicado 5 µL de solvente orgânico na extremidade oposta a aplicação da fração. Os fungos foram incubados como descrito no tópico 2.1 Fungos Fitopatogênicos. A avaliação do teste sucedeu quando o crescimento fúngico atingiu o controle negativo, e então foi mensurada em milímetros a distância do centro da gota até a borda do fungo.

2.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pelo método de diluição em série em meio solidificado. As frações foram diluídas em 5 mL de BDA, e um plug fúngico de 6 mm foi adicionado ao centro da placa de Petri. As condições de cultivo de *R. solani* e *S. sclerotiorum* foram as mesmas descritas no tópico 2.1 Fungos fitopatogênicos.

Foi determinado a CIM das frações FAR e R2, com teste de nove concentrações de FAR (1000 – 3.9 µg/mL) e oito concentrações de R2 (125 – 0,5 µg/mL). As frações foram diluídas em dimetilsulfóxido (DSMO) 0,5%, e como controle negativo utilizou-se DMSO 0,5% diluído no meio BDA para avaliar o tempo do crescimento fúngico.

A avaliação foi realizada após 72 horas para *R. solani* e 96 horas para *S. sclerotiorum* após. Os tempos de avaliação foram determinados a partir do controle negativo, quando o fungo atingiu toda a placa. A CIM foi calculada pela porcentagem da inibição de crescimento (PIC) e foi calculado de acordo com Yahyazadeh et al (2008).

$$PIC = \frac{\text{crescimento do controle} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento do controle}} \times 100$$

2. 5 Microscopia eletrônica de varredura

Os resultados obtidos na CIM com as culturas fúngicas de *R. solani* e *S. sclerotiorum* foram crescidas com a fração R2 durante 48 horas, para avaliar as alterações morfológicas causadas pela atividade antifúngica desta fração. Os fungos foram cultivados em BDA, nas condições de cultivo descritas no tópico 2.1 Fungos Fitopatogênicos juntamente com as frações na concentração de 1,95 µg/mL da fração R2 para *R. solani* e 0,95 µg/mL para *S. sclerotiorum*. As concentrações utilizadas para MEV foram escolhidas devido a inibição fúngica em 50% após 48 horas de exposição aos compostos antifúngicos.

Cortes de 6 mm do meio solidificado na região onde havia crescimento fúngico foram realizados e fixados por 4 horas em solução de glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído 2% tamponado com 0.1 M de cacodilato de sódio (pH 7,2) a 4°C. Em seguida, três lavagens com tampão de cacodilato de sódio 0.1 M (pH 7,2), e as amostras foram pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão de cacodilato de sódio (pH 7,2) durante 30 minutos.

As amostras foram desidratadas em uma série de concentrações de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), e então secas em ponto crítico de dióxido de carbono (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). Após a secagem as lâminas foram revestidas com ouro (BALTEC SDS 050

Sputter Coater). Ao fim do preparo as amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200). Esta técnica foi realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

3 Resultado

3.1 Avaliação da atividade antifúngica das frações

A fração FAR demonstrou atividade antifúngica contra *R. solani* e *S. sclerotiorum* por meio da técnica de disco difusão (Tabela 1). Esta fração possui uma produção média de 99,5 mg/L. A purificação da fração FAR em CLV gerou oito frações que foram monitoradas em teste de disco. Somente uma fração, extraída com clorofórmio 100%, apresentou atividade antifúngica contra os fungos testados. Esta fração possui uma produção média é de 0,52 mg/ L e foi denominada de R2.

A técnica CCD preparativa pode-se obter oito frações visíveis em nos comprimentos de onda UV 312,254 e 365 nm derivadas da purificação da fração R2. Uma banda de coloração amarelada com Rf 0,275 foi isolada e monitorada pela técnica spot-on-lawn. Esta fração apresentou alta inibição no crescimento dos fungos testados. A fração denominada de R2-6 logo após a verificação da atividade foi submetida a CF. Nessa técnica cromatográfica foram obtidas treze frações e utilizou-se da técnica spot-on-lawn para verificar a atividade antifúngica das frações, resultando em uma fração extraída com ciclohexano:clorofórmio [60:40] com atividade antifúngica, esta denominada de R2-6a.

Afim de isolar os compostos com ação antifúngica, foi realizado a técnica de CLAE, que permitiu monitorar os diferentes compostos presentes na fração R2-6a e isolar os compostos para os futuros testes de análise química. O cromatograma apresentado na Figura 1, pode-se identificar os compostos ativos denominados de fração branca, extraída no tempo 2,868 minutos, e a fração reativa, extraída no tempo 8,799 minutos observadas no comprimento de onda UV de 253 nm. A fração reativa demonstra uma alta atividade antifúngica para fungos testados através da técnica de spot-on-lawn comparado à fração branca.

3.2 Avaliação da concentração inibitória mínima

A CIM em meio solidificado para a fração FAR foi de 500 µg/mL para *R. solani* isolado 2, 250 µg/mL para *S. sclerotiorum* e *R. solani* isolado 1 não apresentou inibição total para as concentrações testadas (Figura 1). A CIM em meio solidificado para a fração R2 foi de 15,62 µg/mL para *S. sclerotiorum*, 3,9 µg/mL para ambos os isolados de *R. solani* (Figura 2).

3.3 Alterações morfológicas observadas em Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar as alterações morfológicas causadas pelos compostos antifúngicos a fração utilizada foi a R2. Esta fração foi escolhida devido a maior atividade antifúngica comparado a fração FAR, isto se deve ao maior grau de purificação entre as frações.

A concentração utilizada neste experimento foi determinada a partir das observações sobre o crescimento fúngico no tempo de 48 horas de cultivo. Para *S. sclerotiorum* a concentração avaliada foi de 0,95 µg/mL da fração R2, e pode-se verificar que houve a redução na concentração de hifas, permanecendo somente hifas médias e grandes, e a ultraestrutura lisa

observada no controle foi substituída pela ultraestrutura rugosa com possível lise de hifas (Figura 4).

Para os isolados de *R. solani* a concentração utilizada foi de 1,95 µg/mL da fração R2. No isolado 1 pode-se observar (Figura 5) aumento na concentração de hifas quando comparado com o controle negativo, alterações na ultraestrutura dos micélios com aspecto rugoso, e com o aumento de torções nas extremidades das hifas. No isolado 2 pode-se notar hifas contorcidas com aspecto rugoso e, em algumas imagens hifas com alto grau de alteração morfológica, supondo lise micelial (Figura 6).

4. Discussão

Isolada a partir da rizosfera a cepa RV1R2 foi identificada como *Burkholderia pyrrocinia* e os resultados obtidos neste trabalho foi possível confirmar que esta cepa de isolado ambiental produz compostos com ação antifúngica contra fungos fitopatogênicos *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Microrganismos habitantes do solo, demandam de um sistema de defesa elaborado para sobreviver a alta competitividade deste habitat. Os metabólitos secundários apresentam função ecológica na interação com outros microrganismos e na produção de compostos que possibilite competir neste ambiente, como a produção de antimicrobianos (Tyc et al., 2017a; Tyc et al., 2017b; Mendes et al., 2013).

Na literatura encontra-se diversos trabalhos sobre compostos com ação fungicida produzidos pelo gênero *Burkholderia* contra fungos fitopatogênicos. Alguns compostos identificados como, occidiofungin (Lu et al., 2009), pirrolnitrina (Jung et al., 2018; Hwang et al., 2002), ácido fenilacético, ácido hidrocinnâmico, ácido 4-hidroxifenilacético e éster metil 4-hidroxipenilacetato (Mao et al., 2006), e outros não identificados, como cepa CF66I (Li et al., 2007) e cepa GT4028 (Lemtukei et al., 2017). Com objetivo de investigar os resultados obtidos em trabalhos anteriores e os dados obtidos na literatura sobre o potencial na produção de compostos antimicrobianos por bactérias do gênero *Burkholderia*, este trabalho estudou os compostos antifúngicos produzidos pela cepa RV1R2 com atividade contra fungos fitopatogênicos e confirmou que bactérias do gênero *Burkholderia* de isolado ambiental possui um potencial na produção de metabólitos secundários bioativos.

Os dados obtidos pela porcentagem de inibição fúngica a concentração necessária da fração FAR para inibir 100% do crescimento fúngico foi de 250 µg/mL para *S. sclerotiorum*, 500 µg/mL para *R. solani* isolado 2, e para o isolado 1 de *R. solani* não houve 100% inibição nas concentrações testadas. Os dados obtidos na porcentagem de inibição fúngica para fração R2 foi de 3,9 µg/mL para os isolados de *R. solani* e 15,62 µg/mL para *S. sclerotiorum*. Realizando uma comparação entre os dados das duas frações FAR e R2, pode-se verificar que o quanto maior o nível de purificação do composto maior sua atividade contra os fungos fitopatogênicos. Logo, espera-se que a atividade antifúngica do composto puro apresente uma redução da concentração necessária para inibição total do fungo.

Analisando os dados obtidos neste estudo e os comparando com Naik e colaboradores, 2017, observa-se uma maior atividade dos compostos produzidos pela cepa RV1R2 em relação as espécies *Cymbopogon distans* e *Cinnamomum tamala*. Os autores utilizaram o óleo essencial dessas plantas contra alguns fungos patogênicos e obteve resultados positivos com a CIM de 10 mg/mL para ambas as espécies de planta contra o fungo *R. solani*. Os óleos essenciais com atividade contra *R. solani* também foram testados contra outros fungos e para os fungos *Aspergillus favus* e *Pythium sp.* apresentou uma CIM de 0,625 mg/mL (Naik et al, 2017). No

trabalho de Ghahari e colaboradores, 2017, onde ele testa o óleo essencial produzido por plantas de soja, *Glycine max*, os resultados de CIM contra *S. sclerotiorum* foi de 25 µg/mL e para *R. solani* não apresentou inibição nas concentrações testadas.

Realizando um comparativo entre produtos naturais de plantas com atividade antifúngica citados anteriormente e os produtos naturais produzidos pela cepa RV1R2 obtidos neste trabalho, conclui-se que a concentração necessária para inibição total do crescimento fúngico dos produtos naturais de planta utilizados são superiores dos valores encontrados neste trabalho.

Nas imagens obtidas em MEV pode-se observar alterações morfológicas e na ultraestrutura das hifas. Para o fitopatógeno *S. sclerotiorum* inoculado juntamente com a fração R2 observou-se redução no número de micélios, alterações na ultraestrutura apresentando um aspecto rugoso e lise micelial quando comparado com o controle. Esses efeitos também foram encontrados no trabalho de Soyly et al., 2007, testando a atividade antifúngica do óleo de orégano. As mesmas alterações na ultraestrutura micelial foram observadas nos isolados de *R. solani*, e também pode-se observar as extremidades das hifas contorcidas e o aumento no número de hifas.

Embora os resultados demonstrem atividade antifúngica dos compostos produzidos pela cepa RV1R2, o mecanismo de ação não é conhecido. Avaliando a atividade antifúngica de alguns compostos, as alterações miceliais observadas neste trabalho podem estar relacionadas a síntese da parede. Nos trabalhos observados nota-se hifas estouradas, membranas onduladas e deformação na ponta das hifas, alteração também encontrados nos trabalhos de Nishiyama et al. (2005) e Nakai et al. (2005). Estes trabalhos apresentam alterações morfológicas parecidas as deste trabalho e a justificativa encontrada pelos autores para as alterações é que os compostos utilizados interferem na síntese do glucano, causando alterações morfológicas na formação da parede celular destes organismos. Com base nestes trabalhos pode-se sugerir que os compostos com ação antifúngica utilizado neste trabalho possa interferir na síntese do glucano, porém mais estudos devem ser realizados para conhecer os mecanismos de ação dos compostos produzidos pela cepa RVR2.

A cromatografia de alta eficiência (CLAE) apresentou dois picos, estes foram testados através da técnica spot-on-lown e verificou-se a atividade antifúngica destes picos. Um pico menor detectado em 2,868 minutos, denominado como fração branca, e outro pico em 8,799 minutos, denominado de fração reativa. O composto denominado de fração branca possui afinidade com água, enquanto a fração reativa possui afinidade com solventes orgânicos, como o clorofórmio. Este trabalho deu informações positivas para a continuação do estudo desta cepa bacteriana de isolado ambiental, entretanto, mais estudos devem ser realizados para a purificação e identificação destes compostos com ação antifúngica.

5 Conclusão

Os resultados obtidos no trabalho confirmam que *Burkholderia pyrrocinia* cepa RV1R2 possui atividade antifúngica. Em CLAE, verifica-se dois compostos com atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos testados. E por meio dos testes microbiológicos, notou-se que quanto maior o grau de purificação de um composto menor foi a concentração necessário para inibir o crescimento fúngico. Os compostos produzidos pela cepa RV1R2 é um grande candidato no desenvolvimento de novas drogas para o controle de fungos fitopatogênicos na agricultura.

Referências

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds. United States of America: Department of Plant Pathology. University of Florida.
- Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., and Mahenthiralingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5215-5229. doi: 10.1007/s00253-016-7520-x.
- Eberl, L., and Vandamme, P. (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research*, 5. doi: 10.12688/f1000research.8221.1
- Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G. A., Tajbakhsh, M., and Baharfar, R. (2017). Chemical composition, antioxidant and biological activities of the essential oil and extract of the seeds of *Glycine max* (Soybean) from North Iran. *Current microbiology*, 74(4), 522-531. doi: 10.1007/s00284-016-1188-4.
- Hwang, J., Chilton, W.S., and Benson, D.M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. *Biological control*, 25(1), 56-63. doi: 10.1016/S1049-9644(02)00044-0.
- Jung, B. K., Hong, S. J., Park, G. S., Kim, M. C., and Shin, J. H. (2018) Isolation of *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Applied Biological Chemistry*, 1-8. doi: 10.1007/s13765-018-0345-9.
- Kefi, A., Slimene, I. B., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaeiz, S., Bejaoui, M. Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T., and Limam, F. (2015). Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1967–1976. doi:10.1007/s11274-015-1943-x
- Lemtukei, D., Tamura, T., Nguyen, Q. T., and Ueno, M. (2017). Inhibitory Activity of *Burkholderia* sp. Isolated from Soil in Gotsu City, Shimane, against *Magnaporthe oryzae*. *Advances in Microbiology*, 7(2), 137-148. doi:10.4236/aim.2017.72011.
- Lewus, C. B., and Montville, T. J. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of microbiological methods*, 13(2), 145-150. doi: 10.1016/0167-7012(91)90014-H.
- Li, X., Quan, C.S., and Fan, S.D. (2007). Antifungal activity of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against plant pathogenic fungi. *Letters in applied microbiology*, 45(5), pp.508-514. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02221.x
- Lu, S. E., Novak, J., Austin, F. W., Gu, G., Ellis, D., Kirk, M., Wilson-Stanford, S., Tonelli, M., and Smith, L. (2009). Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*. *Biochemistry*, 48(35), 8312-8321. doi: 10.1021/bi900814c.

- Mao, S., Lee, S.J., Hwangbo, H., Kim, Y.W., Park, K.H., Cha, G.S., Park, R.D. and Kim, K.Y., (2006). Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. *Current microbiology*, 53(5), 358-364. doi: 10.1007/s00284-005-0333-2
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663. doi: 10.1111/1574-6976.12028.
- Mihajlović, M., Rekanović, E., Hrutić, J., Grahovac, M., and Tanović, B. (2017). Methods for management of soilborne plant pathogens. *Pestic.Phytomed.*, 32(1), 9-24. doi: 10.2298/PIF1701009M.
- Naik, G., Bhandari, U., Gwari, G., and Lohani, H. (2017). Evaluation of essential oil of *Cymbopogon distans* and *Cinnamomum tamala* against plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Agricultural Research*, 51(2), 191-193.
- Naing, K. W., Anees, M., Kim, S. J., Nam, Y., Kim, Y. C., and Kim, K. Y. (2013). Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Annals of Microbiology*, 64(1), 55–63. doi:10.1007/s13213-013-0632-y
- Nakai, T., Hatano, K., Ikeda, F., and Shibuya, K. (2005) Electron microscopic findings for micafungin-treated experimental pulmonary aspergillosis in mice. *Med. Mycol.* 43, 439–445. doi: 10.1080/13693780500057403.
- Nishiyama, Y., Hasumi, Y., Ueda, K., Uchida, K., and Yamaguchi, H. (2005) Effects of micafungin on the morphology of *Aspergillus fumigatus*. *J. Electron Microsc.* 54, 67–77. doi: 10.1093/jmicro/dfh100.
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., and Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4), 403–415. doi:10.1007/s00374-015-0996-1
- Rojas-Rojas, F. U., Salazar-Gómez, A., Vargas-Díaz, M. E., Vásquez-Murrieta, M. S., Hirsch, A. M., De Mot, R., Ghequire, M.G.K., Ibarra J.A., and Estrada-de los Santos, P. (2018). Broad-spectrum antimicrobial activity by *Burkholderia cenocepacia* TAtl-371, a strain isolated from the tomato rhizosphere. *Microbiology*, 164(9), 1072-1086. doi: 10.1099/mic.0.000675.
- Sola, M. C., Oliveira, A. P. D., Feistel, J. C., and Rezende, C. S. M. (2012). Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia biosfera*. 8(14), 1398.
- Soylu, S., Yigitbas, H., Soyly, E. M., and Kurt, Ş. (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of applied microbiology*, 103(4), 1021-1030. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03310.x.
- Tyc O, Jager VC, Berg M, Gerards S, Janssens TK, Zaagman N, Kai M, Svatos A, Zweers H, Hordijk C, Besselink H. (2017b). Exploring bacterial interspecific interactions for discovery of novel antimicrobial compounds. *Microbial biotechnology*, 10(4):910-25. doi: 10.1111/1751-7915.12735.

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., and Garbeva, P. (2017). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*, 25(4), 280–292. doi:10.1016/j.tim.2016.12.002

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., Garbeva, P. (2017a). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.002

Tyc, O., van den Berg, M., Gerards, S., van Veen, J. A., Raaijmakers, J. M., De Boer, W., and Garbeva, P. (2014). Impact of interspecific interactions on antimicrobial activity among soil bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 567. doi: 10.3389/fmicb.2014.00567.

VIVAN, A.C.P. (2014) Produção de bioativos antimicrobianos de *Burkholderia* sp. cepa RV1R2: avaliação da atividade contra patógenos de importância clínica e agrônômica. [Tese]. [Londrina]: Universidade Estadual de Londrina.

Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., and Taheri, H. (2008). Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1445-1450. doi: 10.1007/s11274-007-9636-8.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Halo de inibição em milímetros da atividade antifúngica das frações FAR, extraída da partição líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila, fração R2 cromatografia líquida a vácuo extraída com 100% clorofórmio. Atividade microbiológica testada a partir do disco difusão na concentração de 500 µg/disco.

Fração	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i> isolado 1	<i>R. solani</i> isolado 2
FAR	21	14	9
R2	22.5	Não realizado	26

Figura 1 - Porcentagem da inibição fúngica avaliada através da técnica concentração inibitória mínima em meio solidificado da fração FAR, extraída a partir do sobrenadante com partição líquido-líquido com acetato de etila. As concentrações testadas foram 3.9 – 1000 µg/mL, e a avaliação foi realizada com o cálculo da porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC).

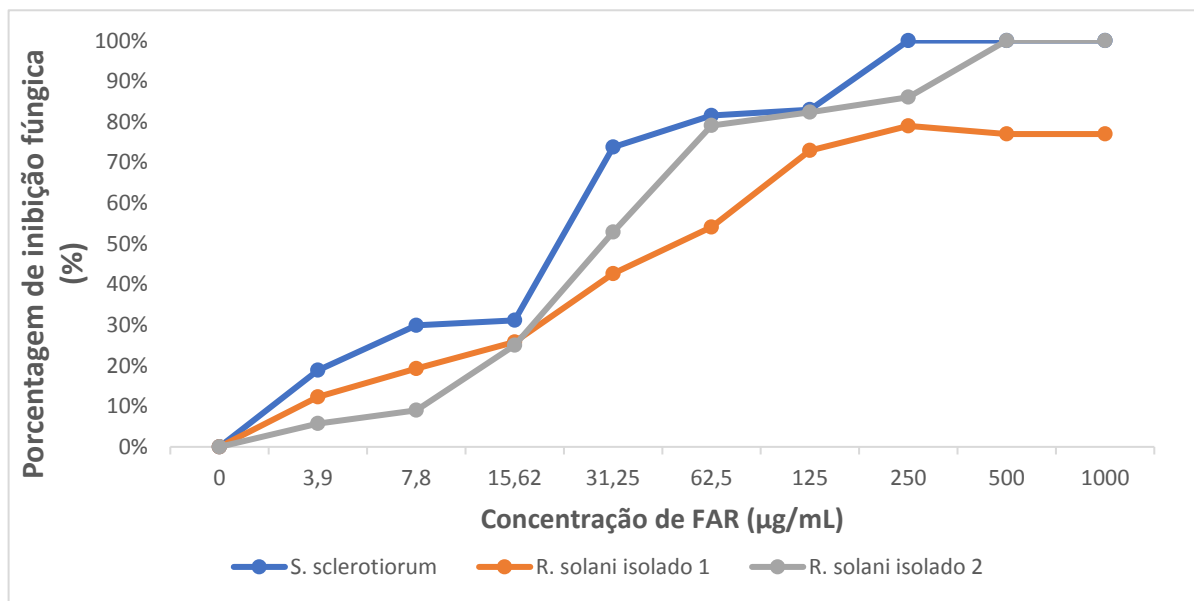


Figura 2 - Porcentagem da inibição fúngica avaliada através da técnica concentração inibitória mínima em meio solidificado da fração R2, extraída através da cromatografia líquida a vácuo com 100% de clorofórmio. As concentrações testadas foram 0,95 – 125 µg/mL, e a avaliação ocorreu através da porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC).

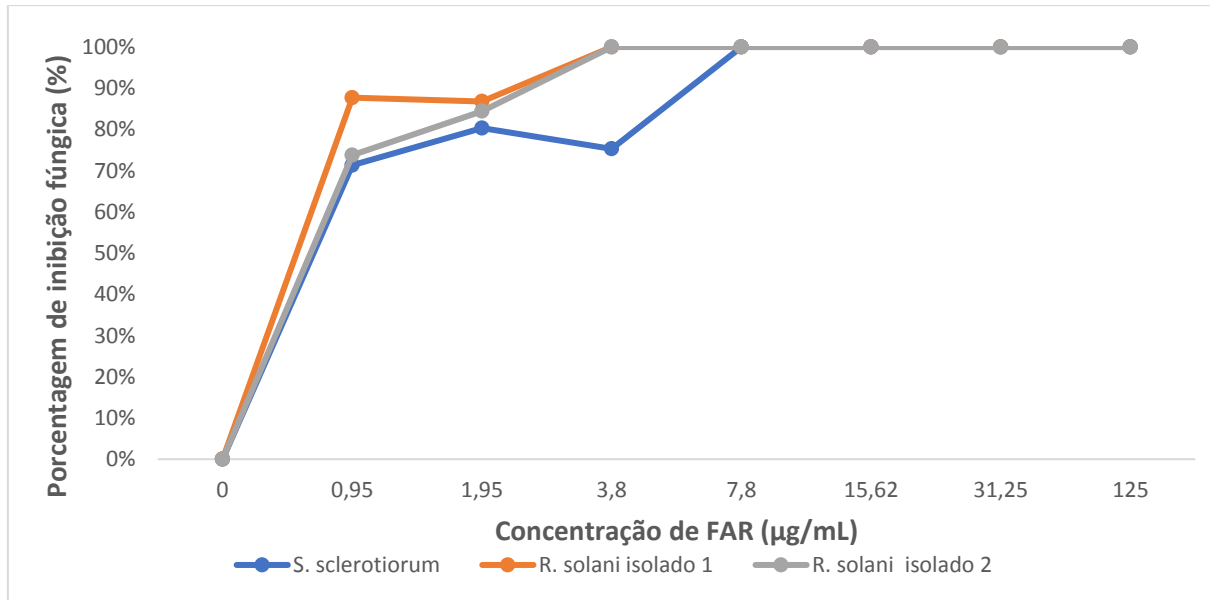


Figura 3 - Cromatograma das frações branca e reativa na detecção de luz UV 253 nm. Fração branca está localizada em 2,868 minutos com absorção de 2,91672 mUA, e a fração reativa é verificada pelo maior pico no tempo 8,799 minutos com absorção de 205,09293 mUA.

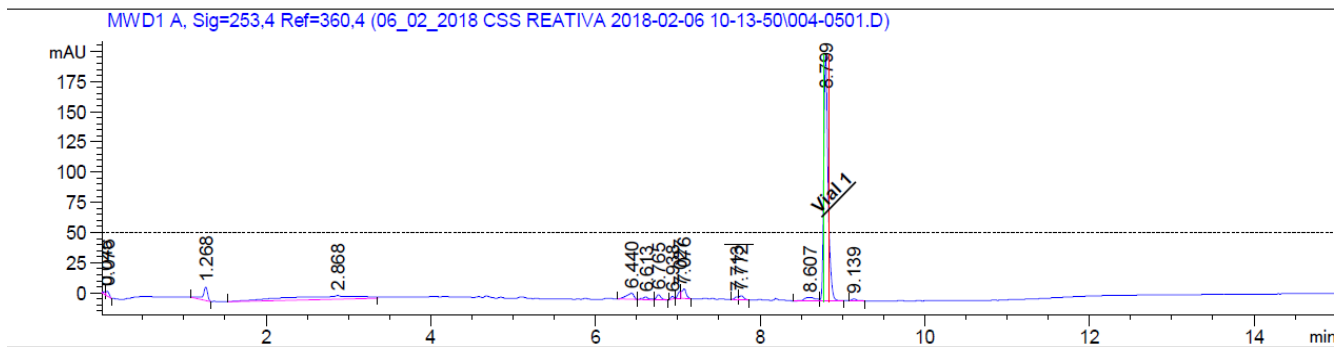


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de *S. sclerotiorum*. Figuras a direita (a, c, e) controle negativo. Figuras a esquerda (b, d, f) fungo tratado com 0.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da fração R2, após 48 horas de experimento.

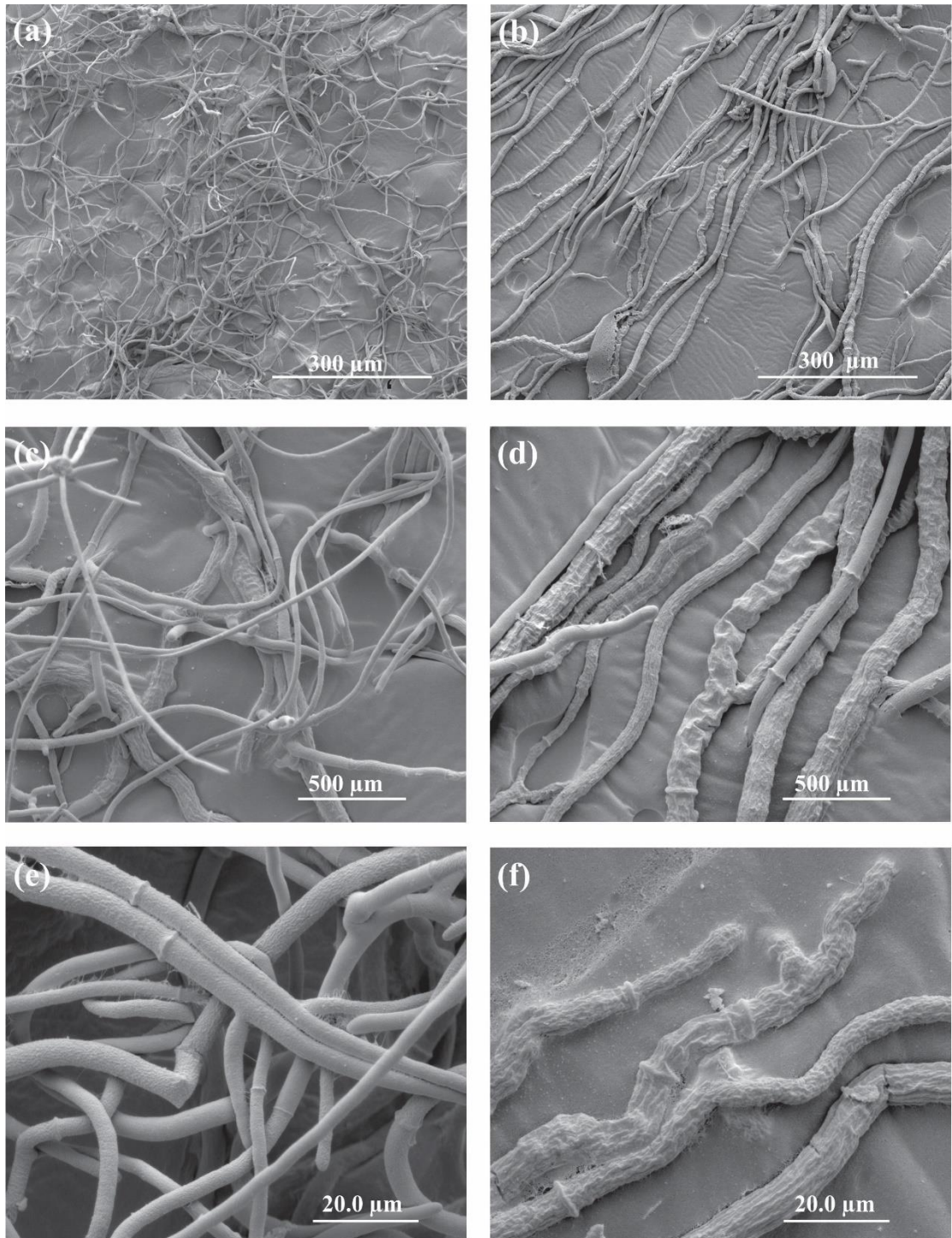


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura de *R. solani* isolado 1. Figuras a direita (a, c, e) controle negativo. Figuras a esquerda (b, d, f) fungo tratado com 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da fração R2, após 48 horas de experimento.

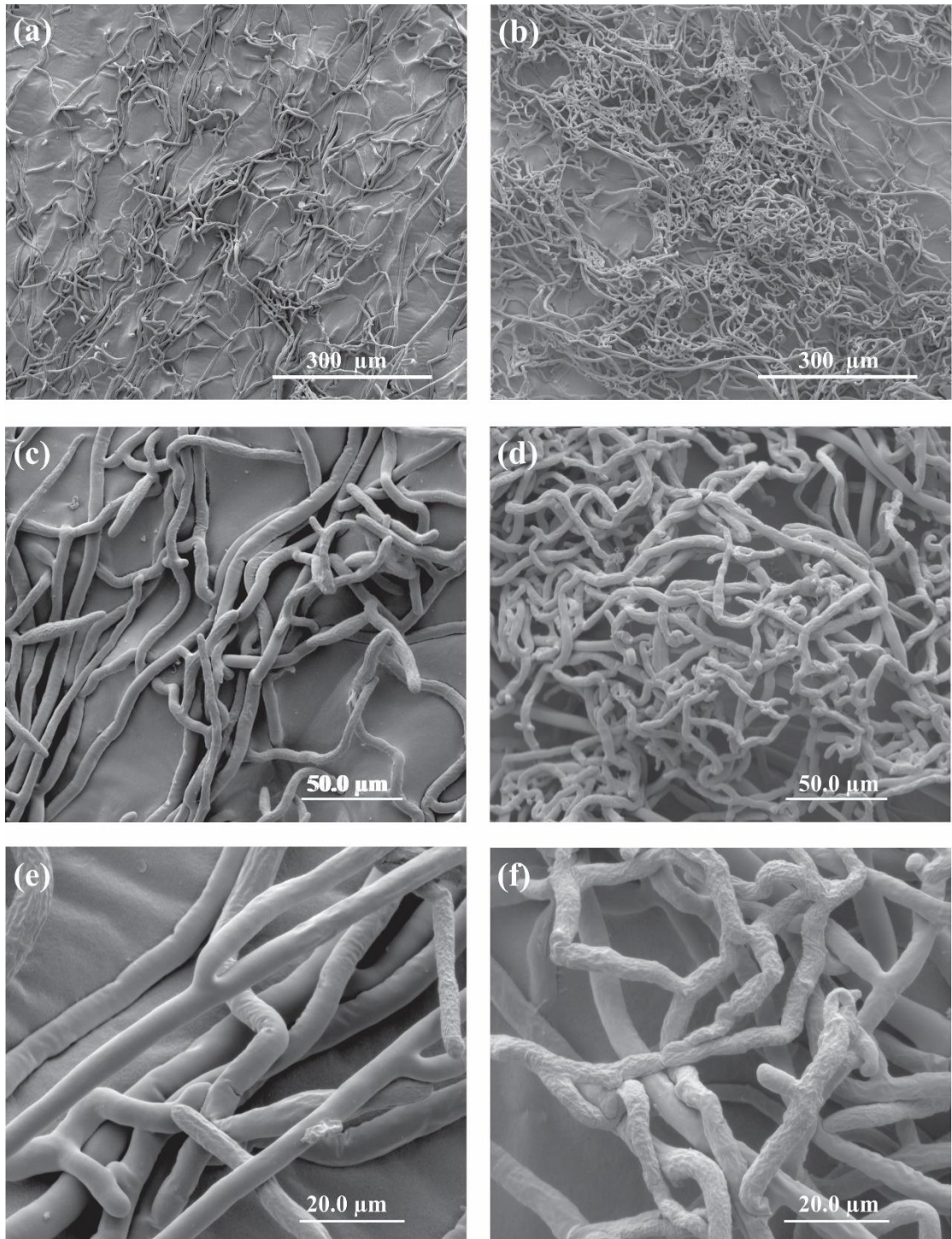


Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura de *R. solani* isolado 2. Figuras a direita (a, c, e) controle negativo. Figuras a esquerda (b, d, f) fungo tratado com 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da fração R2, após 48 horas de experimento.

