



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO NUNES FARIAS

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXTRACELULARES DE  
*Burkholderia pyrrocinia* RV7S3 NO CONTROLE DE  
*Rhizoctonia solani* EM *Nicotiana tabacum***

---

Londrina  
2018

TIAGO NUNES FARIAS

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXTRACELULARES DE  
*Burkholderia pyrrocinia* RV7S3 NO CONTROLE DE  
*Rhizoctonia solani* EM *Nicotiana tabacum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) como requisito para obtenção de título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: 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

Farias, Tiago.

AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXTRACELULARES DE *Burkholderia pyrrocinia* RV7S3 NO CONTROLE DE *Rhizoctonia solani* EM *Nicotiana tabacum* / Tiago Farias. - Londrina, 2018.  
41 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Tese. 2. Atividade fungicida - Tese. 3. Fungos fitopatogênicos - Tese. 4. Controle de *Rhizoctonia* - Tese. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

TIAGO NUNES FARIAS

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXTRACELULARES DE  
*Burkholderia pyrrocinia* RV7S3 NO CONTROLE DE *Rhizoctonia  
solani* EM *Nicotiana tabacum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) como requisito para obtenção de título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Dra. Bárbara Gionco  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Miguel Octavio Pérez Navarro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 12 de Março de 2018.

À minha amada mãe, Rita Cássia Nunes Farias, que,  
ainda com toda a dificuldade que enfrentou na criação dos  
filhos, nunca desacreditou de nossa capacidade, me  
apoiando e incentivando em cada conquista ao longo da  
minha formação, eu dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, pelos ensinamentos prestados até aqui, pelas correções e incentivos, pela confiança, compreensão e paciência em mim depositadas.

Ao Prof. Dr. Luciano Panagio, pelas correções, sabedoria e grande auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis, pelas correções e sugestões realizadas no projeto deste trabalho e dicas para o desenvolvimento desta dissertação.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), especialmente o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade e possibilidade de me tornar um profissional mais qualificado e altamente competitivo para o mercado de trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), pela força, ensinamentos e parceria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Mestrado cedida.

À minha linda namorada, companheira em todos os momentos, Elaine Cristina, pela paciência, pela força e pela confiança e por não ter descreditado da concretização deste trabalho.

Aos meus sogros, pela confiança, amizade e incentivo à minha formação.

Aos meus pais, por todo apoio, dedicação incondicional e grande incentivo, por não soltarem da minha mão e me trazerem até aqui, evidenciando sempre a minha capacidade, resultado da ótima criação a qual me foi dada. Por tudo, simplesmente tudo que fizeram por mim até agora. Meus pais, sobretudo Amigos.

Aos meus familiares, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

E todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*“Eu acredito! E você, “cê” acredita?!”*

*Kevinho*



FARIAS, Tiago Nunes. **Avaliação de substâncias extracelulares de *Burkholderia pyrrocinia* RV7S3 no controle de *Rhizoctonia solani* em *Nicotiana tabacum*.** 2018. 36f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*, possui inúmeros hospedeiros e distribuição geográfica, sendo comumente encontrado no solo, onde pode infectar diversas culturas de interesse econômico, tais como soja, milho, algodão e tabaco, causando perdas consideráveis na agricultura ao redor do mundo. Atualmente, o controle de *R. solani* na agricultura é realizado pelo tratamento das sementes com fungicidas de origem sintética. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de substâncias naturais, produzidas pelo metabolismo secundário da cepa RV7S3 de *Burkholderia pyrrocinia*, extraídas e semipurificadas, contra *R. solani*. A bactéria foi cultivada em caldo nutriente (CN), centrifugada e o sobrenadante submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila (FA). A fase orgânica obtida foi testada *in vitro* através de teste de disco-difusão, onde foi verificada a formação de um halo de inibição com raio de 21 mm, mostrando ser esta uma fração altamente ativa contra *R. solani*. Em seguida, fez-se a purificação de FA por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV) onde foram obtidas quatro novas frações, das quais apenas F1 mostrou atividade *in vitro* contra *R. solani*, com um halo de inibição de 17,5 mm. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para F1 frente à *R. solani* foi de 25 µg.mL<sup>-1</sup>. Avaliou-se ainda a atividade de F1 em casa de vegetação frente a infecções experimentais pelo fitopatógeno em tabaco. Dois regimes de tratamento foram utilizados, pré e pós. Os resultados indicaram inibição significativa dos níveis de podridão caulinar quando comparados com os controles dos tratamentos. O pré-tratamento apresentou redução de 69,2% e o pós-tratamento 76,9%. Não houve diferença de inibição entre os regimes de tratamento avaliados a 5% de probabilidade. Estes resultados sugerem que *B. pyrrocinia* RV7S3 produz compostos antifúngicos que inibem o crescimento de *R. solani*, reduzindo também a incidência de podridão caulinar causada por este fitopatógeno em culturas de tabaco. Por se tratar de substâncias naturais, estes compostos mostram-se promissores para o manejo sustentável da doença, tornando-se uma alternativa ao uso de agrotóxicos.

**Palavras-chave:** Produtos naturais, Atividade fungicida, Fungos fitopatogênicos, Controle de *Rhizoctonia*.

FARIAS, Tiago Nunes. **Evaluation of extracellular substances of *Burkholderia pyrrocinia* RV7S3 in the control of *Rhizoctonia solani* in *Nicotiana tabacum*.** 2018. 36p. Thesis (Master's Degree in Microbiology) - State University of Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, has numerous hosts and geographical distribution, and is commonly found in the soil, where it can infect several crops of economic interest, such as soybean, corn, cotton and tobacco, causing considerable losses in agriculture around the world. Currently, control of *R. solani* in agriculture is carried out by treating the seeds with synthetic origin fungicides. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of natural substances produced by the secondary metabolism of the RV7S3 *Burkholderia pyrrocinia* strain, extracted and semi-purified, against *R. solani*. The bacteria were cultured in nutrient broth (CN), centrifuged and the supernatant submitted to a liquid-liquid partition with ethyl acetate (FA). The organic phase obtained was tested *in vitro* by disc diffusion test, where it was verified the formation of an inhibition halo with a radius of 21 mm, showing that this is a highly active fraction against *R. solani*. After purification of FA by Vacuum Liquid Chromatography (VLC), four new fractions were obtained, of which only F1 showed *in vitro* activity against *R. solani*, with an inhibition halo of 17,5 mm. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for F1 against *R. solani* was 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . It was also evaluated the F1 activity in greenhouse against experimental infections caused by the phytopathogen in tobacco. Two treatment regimens were used, pre and post. The results indicated significant inhibition of stem rot levels when compared to controls of the treatments. The pre-treatment presented reduction of 69,2% and the post-treatment 76,9%. There was no difference in inhibition between treatment regimens evaluated at 5% probability. These results suggest that *B. pyrrocinia* RV7S3 produces antifungal compounds that inhibit the growth of *R. solani*, also reducing the incidence of stem rot caused by this phytopathogen in tobacco crops. Because they are natural substances, these compounds are promising for the sustainable management of the disease, becoming an alternative to the use of pesticides.

**Key words:** Natural products, Fungicidal activity, Phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia* control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO

- Figura 1** Ilustração da forma como os plugues de *R. solani* (círculos em cinza) foram alocados dentro das covas para a infecção do tipo "A" ..... 31
- Figura 2** Ilustração da forma como o plugue (círculo cinza) de *R. solani* foi alocado na região do colo da planta de tabaco para infecção do tipo "B" ..... 31
- Figura 3** Atividade antifúngica da fração bruta (FA) determinada por meio do teste de disco-difusão em ágar. FA= Fração Acetato de Etila; B= Branco. O plugue de *R. solani* encontra-se no centro da placa ..... 33
- Figura 4** Bioautografia de FA. O sistema eluente utilizado para separação das bandas (esquerda) foi: 40:40:20 (ciclohexano:clorofórmio:metanol, v:v:v). Não houve corrida para a aplicação controle (direita). ..... 34
- Figura 5** Teste de disco-difusão (100 µg.disco-1) para as frações obtidas por cromatografia líquida à vácuo (F1, F2, F3 e F4). Na placa da direita encontram-se as frações: F1 – disco superior à direita; F2 – disco superior à esquerda; Branco (controle) – disco inferior. Na placa da esquerda encontram-se as frações: F3 – disco superior à esquerda; F4 – disco superior à direita; e, Controle – disco inferior..... 35
- Figura 6** Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial de *R. solani* 17576 in vitro pela fração diclorometano (F1) do composto antifúngico. Os raios das colônias foram medidos após 3 dias de cultivo a 28 °C ..... 36

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

- Tabela 1** Rendimento geral das frações obtidas por Cromatografia Líquida à Vácuo. .... 34
- Tabela 2** Severidade das infecções causadas por *R. solani*, Kühn, em *N. tabacum* em casa de vegetação nos dois regimes de tratamento para as metodologias de infecção dos tipos A e B. .... 37

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	Geral.....	15
2.2	Específicos .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1	<i>R. solani</i> e a patogenicidade em plantas .....	16
3.2	Antifúngicos na agricultura .....	17
3.3	Bactérias no desenvolvimento de antimicrobianos naturais .....	18
3.3.1	Burkholderia .....	19
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	20
	<b>ARTIGO</b> .....	24

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças de plantas causadas por fungos são de grande importância na agricultura. Espécies fitopatogênicas como *Rhizoctonia solani* Kühn, fase assexuada de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, tem ganhado atenção especial nos últimos anos, principalmente pela característica cosmopolita e capacidade de infectar uma ampla variedade de cultivares tais como batata, milho, pepino, alface, tabaco entre outros, ocasionando sérios danos às lavouras ao redor do mundo (ANDERSON, 1982; YULIAR, 2014).

A eficiência de *R. solani* na colonização de ambientes diversos, bem como no desenvolvimento de patogenicidade se deve sobretudo à alta taxa de sobrevivência dos escleródios no solo, somadas a características ecológicas como a extensa gama de hospedeiros e a distribuição geográfica global, que são fatores que contribuem para o sucesso da espécie, dificultando, assim, o controle da doença (YOUSSEF et al., 2016).

Dentre as principais estratégias para o combate de fungos fitopatogênicos, a utilização de fungicidas sintéticos ainda é predominante no mercado. Entretanto, segundo Goudjal et al. (2014), o uso intensivo de tais produtos cria problemas sérios relacionados ao surgimento de organismos resistentes a fungicidas e à contaminação do solo, por serem tóxicos às comunidades microbianas e degradarem a camada de ozônio. Além disso, não é comprovada a total eficácia dos tratamentos químicos utilizados atualmente contra infecções causadas por *R. solani* (HUANG et al., 2011; GOUDJAL et al., 2014).

Nesse contexto, é necessária a busca por medidas de controle eficientes que não agridam o meio ambiente. Uma alternativa promissora é a utilização de compostos antifúngicos de origem microbiana que, além de possuírem baixa toxicidade às comunidades microbianas, são extracelulares, isto é, de fácil obtenção, uma vez que são liberados no meio de cultura como mecanismo natural de defesa e competição (HUANG et al., 2011).

Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas envolvendo biomoléculas para o controle de *R. solani* na agricultura tem despertado o interesse dos pesquisadores. Gêneros de bactérias tais como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* são conhecidos como bons produtores de compostos bioativos, podendo ser utilizados

como agentes de biocontrole. Aliados à capacidade de produção de compostos bioativos por parte dos microrganismos, os recentes avanços no campo dos produtos naturais têm permitido o isolamento e a purificação dessas biomoléculas (OLIVEIRA et al., 2015).

Tendo em vista a necessidade por biocompostos efetivos contra *R. solani*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as substâncias extracelulares produzidas por *B. pyrrocinia* cepa RV7S3 com relação à atividade antifúngica contra o fitopatógeno, buscando a redução dos índices de infecção em cultivo de tabaco em condições experimentais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de substâncias extracelulares produzidos por *B. pyrrocinia* cepa RV7S3, visando o controle de *R. solani* em plantas de *N. tabacum*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Obter substâncias extracelulares bacterianas com ação antifúngica através do cultivo *in vitro* de *B. pyrrocinia*. RV7S3 e extração dos compostos bioativos;
- Avaliar a ação antifúngica do sobrenadante e frações obtidas contra *R. solani*, através das técnicas de poço difusão, disco-difusão e/ou bioautografia;
- Obter frações da fase orgânica com atividade antifúngica por meio de cromatografia líquida à vácuo (CLV);
- Determinar a concentração inibitória mínima das frações obtidas por CLV;
- Avaliar a ação antifúngica das frações obtidas por CLV contra infecções causadas por *R. solani* em *N. tabacum*, em casa de vegetação.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *R. solani* E A PATOGENICIDADE EM PLANTAS

*Rhizoctonia solani* Kühn é o nome dado à fase assexuada do fungo filamentoso *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. Este é um fungo proveniente do solo e pertencente à classe Ceratobasidiaceae (Basidiomycota), característico pelo aspecto branco-amarronzado do micélio, hifas cenocíticas/multinucleadas e, pela produção de escleródios como estruturas de reprodução (PARMETER-JUNIOR e WHITNEY, 1970). O gênero compreende, ainda, diversos organismos morfológica e ecologicamente distintos, sendo necessária a abordagem de outras características para a identificação das espécies.

A espécie *R. solani* foi primeiramente descrita em 1858 pelo agrônomo alemão Julius Gotthelf Kühn (1825 – 1910), a partir de observações de lesões em tubérculos de batatas. Desde então, tornou-se mundialmente conhecida devido a fatores relacionados não só à ampla distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros, mas principalmente pela importância econômica, dada a patogenicidade deste microrganismo em plantas de interesse agrônômico (YULIAR, 2014).

Quanto à classificação, o complexo *R. solani* é dividido em 14 grupos de anastomoses (do inglês *anastomosis group* – AG), subdivisão baseada na compatibilidade somática entre as hifas dos isolados. Fungos que apresentam o mesmo AG possuem a capacidade de fusão de suas hifas, um mecanismo de reprodução que não é observado entre grupos de anastomoses distintos (OLIVEIRA, 2009).

Sabe-se, ainda, que peculiaridades comportamentais e ecológicas, bem como fatores epidemiológicos de *Rhizoctonia*, são frequentemente utilizadas para caracterização dos subgrupos dentro do gênero. Essas características, quando associadas à alta taxa de sobrevivência dos escleródios no solo, à distribuição geográfica global e diversidade de hospedeiros e, ainda, à alta patogenicidade, fazem com que *R. solani* seja considerada um dos principais fitopatógenos na agricultura e horticultura, sendo necessária uma grande quantidade de antifúngicos para o controle das infecções (OGOSHI, 1987; YOUSSEF et al., 2016).



Dentre as doenças causadas por *R. solani* em cultivos de interesse agrônômico, destacam-se: tombamento, em diversos cultivares tais como plantas de tabaco, pepino e tomate; podridão inferior em alface; podridão da raiz em trigo; ferrugem da bainha em arroz; manchas escuras em batata; doença da raiz e hipocótilo em feijão; feridas e manchas em folhas de tabaco; entre outras (YULIAR, 2014). O ciclo infeccioso inicia-se a partir do momento em que as estruturas reprodutivas do patógeno presente no solo (escleródios e/ou hifas) são atraídas pela planta jovem em crescimento, por meio de estímulos químicos. Em seguida ocorre a penetração da hifa no hospedeiro, que pode ser tanto por meio de penetração direta, através da produção e liberação de enzimas digestivas, como por aberturas naturais na planta (PARMETER-JUNIOR e WHITNEY, 1970; ANDERSON, 1982).

Portanto, a deficiência no controle dessas doenças pode condicionar à um aumento da área infectada pelo fitopatógeno e, conseqüentemente, perdas econômicas consideráveis na agricultura.

### 3.2 ANTIFÚNGICOS NA AGRICULTURA

O crescimento da população mundial leva a um aumento na necessidade por alimentos e sua produção. A intensificação da produção tem por consequência o aumento na utilização de agrotóxicos, e com isso a preocupação acerca do efeito desses químicos à saúde e ao meio ambiente, especialmente sobre as comunidades microbianas do solo.

Dados da Associação Brasileira de Saúde Coletiva – ABRASCO (2016), mostram que a partir de 2008 o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, ultrapassando o posto que pertencia aos Estados Unidos até então. Enquanto que no período de 2002 à 2012 o mercado mundial de agrotóxicos tinha crescido 93%, o brasileiro cresceu 190%, equivalentes à venda de 936 mil toneladas de produtos.

Dentre as categorias de agrotóxicos, os antifúngicos correspondem a cerca de 14% do mercado nacional, ficando atrás apenas dos herbicidas, que representam 45% do total comercializado no Brasil (CARNEIRO, 2015). Deste montante, a soja foi responsável por utilizar quase metade do volume total, sendo esta a principal

cultura de consumo de agrotóxicos no país. Com relação aos antifúngicos, o cultivo de hortaliças consome por ano uma quantidade potencial equivalente a uma área de aproximadamente 800 mil hectares. Levando em conta a quantidade de área plantada em hortaliças no Brasil, nota-se que o consumo de fungicidas por hectare para esta cultura deve ser de oito a 16 vezes maior do que o da soja para o mesmo pesticida, a qual possui cerca de 21 milhões de hectares plantados. Dessa forma, o cultivo de hortaliças é considerado a principal cultura de consumo deste pesticida no país (TAKAHASHI e MELHEM, 2014).

Atualmente, doenças causadas por fungos são responsáveis por grandes perdas na agricultura. Contudo, a principal estratégia utilizada para o controle desses fitopatógenos até o momento, é a pulverização das lavouras com antifúngicos de origem sintética, sendo esta, ainda, a única medida eficiente e economicamente viável para a garantia de altas produtividades e qualidade dos produtos (KIMATI, 1995; BUENO e FISCHER, 2006; YULIAR, 2014).

Por esse motivo, nos últimos anos os cientistas têm apostado na bioprospecção como uma ferramenta na busca por alternativas ao uso dos antifúngicos sintéticos. Características de produtos de origem natural, tais como baixa toxicidade e custo de extração, os tornam uma fonte promissora de compostos bioativos (HUANG, 2011; YULIAR, 2014).

### 3.3 BACTÉRIAS NO DESENVOLVIMENTO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Entende-se por antimicrobianos naturais, os compostos bioativos capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos que são obtidos de organismos vivos, através da atividade metabólica de plantas, fungos, bactérias, algas e animais. Entretanto, na indústria farmacêutica predominam os fármacos desenvolvidos a partir de biomoléculas produzidos por microrganismos procariotos, principalmente porque esses seres possuem a capacidade de sintetizar milhares destes compostos durante o seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2015).

Os primeiros estudos envolvendo a produção de antimicrobianos naturais por microrganismos datam do século XIX, quando Louis Pasteur (1822 – 1895) utilizou cepas bacterianas para inibir a proliferação de *Bacillus anthracis* na urina de um

paciente, mostrando assim o antagonismo existente entre as bactérias (OLIVEIRA et al., 2015). Deste então diversos outros trabalhos foram desenvolvidos, contudo, foi só a partir da década de 1920 com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (1881 – 1955), que os pesquisadores voltaram os olhos com mais atenção para os antimicrobianos naturais (CRAGG e NEWMAN, 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Muitas bactérias produzem compostos bioativos como forma de reduzir a competição por nutrientes no ambiente natural. A natureza complexa dessas biomoléculas muitas vezes impossibilita o crescimento de espécies competidoras, condicionando uma vantagem adaptativa aos microrganismos que as produzem. Esses metabólitos secundários, como são chamados, não são essenciais para o desenvolvimento do microrganismo produtor, e sua síntese *in vitro* depende em grande parte das condições de cultivo em laboratório (MADIGAN et al., 2010).

De acordo com Xie et al. (2015), as características das biomoléculas produzidas por bactérias, tais como atividade biológica, possibilidade de produção *in vitro*, grande diversidade de moléculas, entre outras, fazem com que este tipo de produto seja considerado de elevado potencial terapêutico e, conseqüentemente, de interesse ao mercado farmacêutico. Dentre os principais organismos produtores de antimicrobianos com atividade antifúngica, destacam-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*. As moléculas mais conhecidas são: pirrolnitrina, cefafunginas, cepacinas, altericidinas, cepaciamidas, fenazinas, derivados de quinolina e xilocandinas (DEPOORTER et al., 2016).

### 3.3.1 *Burkholderia*

*Burkholderia* (Proteobacteria) é um gênero de bacilos Gram-negativos aeróbicos, no qual os membros podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes, possuindo assim uma distribuição ubíqua. Algumas espécies como *B. pseudomallei* e *B. cepaciai*, agentes causadores de melioidose e fibrose cística respectivamente, são patógenos de grande importância à saúde humana. Contudo, a grande maioria das espécies deste gênero são organismos de vida livre, sendo os organismos provenientes do solo capazes de uma incrível capacidade de produção de metabólitos secundários, amplamente utilizados na bioprospecção (DEPOORTER et al., 2016).

Entretanto, nem sempre foi assim. Segundo Eberl e Vandamme (2016), quando o gênero *Burkholderia* foi definido na década de 90, com o intuito de agrupar espécies de *Pseudomonas* formadoras de rRNA do grupo II, o gênero continha apenas sete espécies (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. caryophylli*, *B. gladioli*, *B. solanacearum*, *B. pickettii* (atualmente classificada como *Ralstonia pickettii*) e *B. cepacia*), patogênicas em sua maioria. Até 2016 este número aumentou consideravelmente, chegando a quase 100 espécies descritas, das quais muitas são produtoras de diversas enzimas hidrolíticas e substâncias bioativas comercialmente importantes, demonstrando ser um gênero com enorme potencial biotecnológico (EBERL e VANDAMME, 2016).

Espécies de *Burkholderia* são comumente cultiváveis em laboratório e, dependendo das condições de cultivo, podem sintetizar e liberar diversas classes de compostos bioativos no meio, dentre os quais muitos possuem propriedades antifúngica, antibacteriana, herbicida e inseticida, revelando-se ser uma fonte promissora de antimicrobianos naturais (CIMERMANCIC et al., 2014; DEPOORTER et al., 2016).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, N. A. The Genetics and Pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 20, p. 329-347, 1982.

ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. 2016. Disponível em: <<https://www.abrasco.org.br/site/publicacoes/24127/24127/>>. Acesso em: 27/02/2018.

BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo de Fungos Fitopatogênicos Habitantes do Solo. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2006.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. DA SILVA.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CIMERMANCIC, P.; MEDEMA, M. H.; CLAESEN, J.; KURITA, K.; BROWN, L. C. W.; MAVROMMATIS K.; PATI, A.; GODFREY, P. A.; KOEHRSEN, M.; CLARDY, J.; BIRREN, B. W.; TAKANO, E.; SALI, A.; LININGTON, R. G.; FISCHBACH, M. A.; Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. **Cell**, v. 158, p. 412-421, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drugs leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CSINOS, A. S.; STEPHENSON, M. G. Evaluation of fungicides and tobacco cultivar resistance to *Rhizoctonia solani* incited target spot, damping off and sore shin. **Crop Protection**, v. 18, p. 373-377, 1999.

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, p. 5215-5229, 2016.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research**, v. 5, p. 1-10, 2016.

FAO. Pesticides (use). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/beta/en/#data/RP>>. Acesso em: 28/10/2016.

GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research**, v. 169, p. 59-65, 2014.

HUANG, X.; ZHANG, N.; YONG, X.; YANG, X.; SHEN, Q. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. **Microbiological Research**, v. 167, p. 135-143, 2011.

KIMATI, H. **Controle químico**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia Industrial**. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 734-760.

OGOSHI, A. Ecology and Pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n.1, p.125-143, 1987.

OLIVEIRA, A. C. C. Análise morfológica e genética de isolados de *Rhizoctonia solani* e estudos epidemiológicos de grupos de anastomoses (AGs) em algodão. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras (UFL), Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Lavras/MG, 2009.

OLIVEIRA, A. G.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; ANDRADE, G. **Antimicrobianos Naturais Produzidos por Microrganismos: da Busca à Identificação**. In: YAMADA-OGATTA, S. M.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A. Tópicos Especiais em Microbiologia. Londrina: UEL/Departamento de Microbiologia, 2015.

PARMETER-JUNIOR, J. R.; WHITNEY, H. S. **Biology and Pathology of *Rhizoctonia solani***. Berkeley: University of California, 1970.

TAKAHASHI, J. P.; MELHEM, M. S. P. Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 24, n. 1, p. 40-41, 2014.

XIE, T.; SONG, S.; LI, S.; OUYANG, L. XIA, L. HUANG, J. Review of natural product databases. **Cell Proliferation**, v. 48, p. 398-404, 2015.

YOUSSEF, S. A.; TAROURA, K. A.; ABDELRAOUF, G. A. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. **Biological Control**, v. 100, p. 79-86, 2016.

YULIAR, M. E. Diverse options on recent trend of different control methods against plants diseases caused by *Rhizoctonia solani*: A review paper. **Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences**, v. 3, n. 4, p. 163-170, 2014.

## ARTIGO

### Susceptibilidade de *Rhizoctonia solani* a substâncias antifúngicas produzidas por *Burkholderia pyrrocinia*, cepa RV7S3.

Tiago Nunes Farias<sup>1</sup>, Flávio Modolon da Silva<sup>1</sup>, Carolina Santos<sup>1</sup>, Ane Estéfano Simionato<sup>1</sup>, Miguel Perez Navarro<sup>1</sup>, Galdino Andrade<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Brasil

\*Corresponding author: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil Phone/Fax: +554333714791; E-mail: [andradeg@uel.br](mailto:andradeg@uel.br)

## RESUMO

O fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*, possui uma ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica, sendo comumente encontrado no solo onde pode infectar diversas culturas de interesse, tais como soja, milho, algodão e tabaco, causando grandes perdas na agricultura ao redor do mundo. Atualmente, o controle de *R. solani* na agricultura é realizado pelo tratamento das sementes com fungicidas de origem sintética. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de substâncias naturais, produzidas pelo metabolismo secundário da cepa RV7S3 de *Burkholderia pyrrocinia*, extraídas e semipurificadas contra *R. solani*. A bactéria foi cultivada em caldo nutriente (CN), centrifugada e o sobrenadante submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila (FA). A fase orgânica obtida foi testada *in vitro* através de teste de disco-difusão, onde a foi verificada a formação de um halo de inibição com raio de 21 mm, mostrando ser uma fração altamente ativa contra *R. solani*. Em seguida, fez-se a purificação de FA por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV) onde foram obtidas quatro novas frações, das quais apenas F1 mostrou atividade *in vitro* contra *R. solani*, com um halo de inibição de 17,5 mm de raio. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para F1 frente à *R. solani* foi de 25 µg.mL<sup>-1</sup>. Avaliou-se ainda a atividade de F1 em casa de vegetação frente a infecções causadas pelo fitopatógeno em tabaco por meio de dois regimes de tratamento: pré e pós-tratamento. Os resultados indicaram que houve inibição significativa dos níveis de podridão caulinar quando comparados com o controle para os dois tratamentos. O pré-tratamento apresentou redução de 69,2% e pós-tratamento 76,9%. Não houve diferença de inibição entre os regimes de tratamento



avaliados a 5% de probabilidade. Estes resultados sugerem que *B. pyrrocinia* RV7S3 produz compostos antifúngicos que inibem o crescimento de *R. solani*, reduzindo também a incidência de podridão caulinar causadas por este fitopatógeno em culturas de tabaco. Por se tratar de substâncias naturais, estes compostos mostram-se promissores para o manejo sustentável da doença, tornando-se uma alternativa ao uso de agrotóxicos.

Palavras-chave: Produtos naturais, Atividade fungicida, Fungos fitopatogênicos, Controle de *Rhizoctonia*.

## ABSTRACT

The phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, has a wide range of hosts and geographical distribution, and is commonly found in soil where it can infect various interest crops, such as soy, corn, cotton and tobacco, causing great losses in agriculture around the world. Currently, the control of *R. solani* in agriculture is carried out by treating the seeds with synthetic origin fungicides. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of natural substances produced by the secondary metabolism of the *Burkholderia pyrrocinia* RV7S3 strain, extracted and semi-purified against *R. solani*. The bacteria were cultured in nutrient broth (NB), centrifuged and the supernatant submitted to a liquid-liquid partition with ethyl acetate (FA). The organic phase obtained was tested *in vitro* by disc-diffusion test, where the formation of an inhibition halo with a 21 mm radius was found to be a highly active fraction against *R. solani*. After purification of FA by Vacuum Liquid Chromatography (VLC), four new fractions were obtained, from which only F1 showed *in vitro* activity against *R. solani*, with an inhibition halo of 17,5 mm radius. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for F1 against *R. solani* was 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . It was also evaluated the F1 activity in a greenhouse against infections caused by the phytopathogen in tobacco throughout two treatment regimens: pre- and post-treatment. The results indicated that there was significant inhibition of stem rot levels when compared to the control for both treatments. The pre-treatment showed reduction of 69,2% and post-treatment 76,9%. There was no difference in inhibition between treatment regimens evaluated at 5% probability. These results suggest that *B. pyrrocinia* RV7S3 produces antifungal compounds that inhibit the growth of *R. solani*, also reducing the incidence of stem rot caused by this phytopathogen in tobacco crops. Because they are natural substances, these compounds are promising for the sustainable management of the disease, becoming an alternative to the use of pesticides.

Key words: Natural products, Fungicidal activity, Phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia control*.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as principais estratégias para o combate de fungos fitopatogênicos, a utilização de fungicidas sintéticos ainda é a predominante no mercado. Em 2008 o Brasil se tornou o maior consumidor no mercado mundial de agrotóxicos ultrapassando o posto que pertencia aos Estados Unidos até então, chegando a consumir cerca de 190% a mais nos dois anos seguintes, dos quais os fungicidas corresponderam a aproximadamente 15% desse mercado. Segundo a Organização das Nações Unidas para Comida e Agricultura – FAO (2016), mais de 44 mil toneladas de fungicidas e bactericidas foram utilizados no país em 2013. o uso intensivo de tais produtos além de criarem problemas sérios relacionados à resistência a fungicidas e contaminação do solo, são tóxicos às comunidades microbianas e degradam a camada de ozônio (GOUDJAL et al., 2014).

Uma alternativa promissora é a utilização de compostos antifúngicos de origem microbiana que, além de possuírem baixa toxicidade às comunidades microbianas, são extracelulares, isto é, de fácil obtenção, uma vez que são liberados no meio de cultura como mecanismo natural de defesa e competição do microrganismo (HUANG et al., 2011).

Gêneros de bactérias tais como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* são conhecidos como bons produtores de compostos bioativos, dentre os quais muitos possuem propriedades antifúngica, antibacteriana, herbicida e/ou inseticida, podendo ser utilizados como agentes no biocontrole (OLIVEIRA et al., 2015). Cepas de *Burkholderia* podem produzir diversas substâncias de interesse, tais como fenazinas, cepafunginas/glidobactinas, pirrolnitrina, altericidinas, cepaciamidas, xilocandinas, cepacinas e derivados de quinolina (DEPOORTER et al., 2016).

Assim sendo, e tendo em vista a necessidade por novos compostos efetivos, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de substâncias extracelulares produzidos por *B. pyrrocinia*, cepa RV7S3, contra o fungo fitopatogênico *R. solani*, tanto *in vitro* quanto em casa de vegetação, em infecções causadas pelo fitopatógeno em *Nicotiana tabacum*, L.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos

O fitopatógeno utilizado neste trabalho foi a espécie *R. solani* 17576, linhagem gentilmente cedida por Souza Cruz S/A, e que atualmente encontra-se armazenada em solução de Castellani (SOLA et al., 2012), e criopreservada a -20°C. A cepa bacteriana RV7S3 é uma linhagem de *B. pyrrocinia*, microrganismo utilizado como agente produtor de biocompostos. Esta bactéria foi isolada a partir de amostras de solo da rizosfera de gramínea e, para preservação da cepa, os cultivos jovens (24h) foram armazenados tanto em nitrogênio líquido como criopreservados em uma solução de caldo nutriente contendo glicerol 40% a -20°C. Ambos os microrganismos estão atualmente estocados no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### 2.2 Produção e purificação do antifúngico

Para obtenção dos metabólitos, a cepa *B. pyrrocinia* RV7S3 foi inicialmente cultivada em placa de petri contendo meio ágar nutriente (AN) durante 24h. Após o tempo determinado, preparou-se uma suspensão de células da bactéria em solução salina 0,85% de modo que a concentração fosse de  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (escala 0,5 de McFarland). Em seguida, uma alíquota de 2,0 mL da suspensão celular foi adicionada em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo nutriente (CN) e incubada em shaker a 28°C, 120 rpm por 7 dias. Após o cultivo, as células foram submetidas à centrifugação a 9.000 rpm, 4 °C por 15 minutos para sedimentação celular (OLIVEIRA et al., 2011).

Com o auxílio de um rotavapor, o sobrenadante obtido da produção foi concentrado à 10% do volume inicial e em seguida foi submetido à cinco extrações com acetato de etila, razão 2:1 (v:v; solvente orgânico:sobrenadante), para obtenção do composto bioativo (fração acetato de etila – FA) (LASSIE, 2014). Tais extrações foram realizadas por meio de partição líquido-líquido em funil de separação de 2000 mL. A fração acetato de etila obtida foi concentrada em rotavapor a 40°C, 200 rpm e vácuo constante para retirada do solvente e, em seguida, congelada em nitrogênio

líquido, liofilizada e pesada para determinação da massa seca (OLIVEIRA et al., 2011).

Para a purificação das substâncias com atividade antifúngica, realizou-se uma Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV). Uma coluna de vidro de 15 mm de raio foi preenchida com sílica gel 60 (0,063-0,2 mm) até a altura de 10 cm. A amostra bruta, 400 mg do composto bruto obtido de extração com acetato de etila, foi preparada para a CLV por meio da adição de sílica gel 60 (0,063-0,2 mm) até a consistência de pó. Como fase móvel para a CLV utilizou-se os seguintes solventes orgânicos: 50 mL de Hexano [100%] (para montar a coluna); 400 mL de Diclorometano [100%] (**F1**); 400 mL de Clorofórmio:Acetato de Etila [50%:50%] (**F2**); 400 mL de Acetato de Etila [100%] (**F3**); 400 mL de Metanol [100%] (**F4**); e, 200 mL de H<sub>2</sub>O [100%] (**F5**), respectivamente. As 5 frações obtidas da CLV foram então submetidas ao teste de disco contra *R. solani*.

## **2.2.1 Testes de atividade antifúngica *in vitro***

### **2.2.1.1 Teste de disco-difusão**

A avaliação da atividade antifúngica dos metabólitos foi mediada através de teste de disco-difusão em ágar, onde discos de papel de 5,0 mm de diâmetro, estéreis, foram embebidos com 10 µL de FA na concentração de 100 µg.µL<sup>-1</sup>, e em seguida acondicionados na superfície da placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Para o branco, discos foram embebidos com 10 µL do solvente puro utilizado na diluição do composto. Os discos foram depositados equidistantes e adjacientemente ao plugue de 9 mm do fitopatógeno no meio de cultura. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C por tempo suficiente para que o micélio do fungo atingisse o disco branco (de 3 a 5 dias). Os diâmetros dos halos de inibição foram quantificados com o auxílio de um paquímetro após o período de cultivo (SPAGO et al., 2014).

### **2.2.1.2 Bioautografia**

Realizou-se ainda uma bioautografia da FA para avaliar o teor de pureza da fração bioativa. Para tal, alíquotas de 5 µL da fração acetato (100 µg.µL<sup>-1</sup>) foram adicionadas a placas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para separação das bandas do composto por capilaridade. O sistema eluente utilizado foi composto pelos seguintes solventes orgânicos: ciclohexano, clorofórmio e metanol, na proporção de 40:40:20 (v:v:v), respectivamente. Como controle, 5 µL de FA 100 µg.µL<sup>-1</sup> foram adicionados horizontalmente à distância de 5 mm da primeira amostra, contudo, não houve corrida com sistema eluente para esta repetição. Em seguida, as placas de CCD foram esterilizadas por 15 minutos em luz ultravioleta (UV), passadas por três vezes na chama do bico de Bunsen e adicionadas em placas de Petri contendo meio BDA. Uma camada fina de BDA foi adicionada sobre a placa de CCD para cobri-la, e, em seguida, um plugue de *R. solani* foi inserido na extremidade da placa, localizado na parte inferior da CCD (DEWANJEE et al., 2015).

### 2.2.1.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima foi realizada para determinar a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o crescimento de *R. solani in vitro*. Para isso adicionou-se 5 mL de BDA contendo as diferentes concentrações do composto bioativo (0,098 µg.mL<sup>-1</sup>; 0,195 µg.mL<sup>-1</sup>; 0,391 µg.mL<sup>-1</sup>; 0,781 µg.mL<sup>-1</sup>; 1,563 µg.mL<sup>-1</sup>; 3,125 µg.mL<sup>-1</sup>; 6,25 µg.mL<sup>-1</sup>; 12,5 µg.mL<sup>-1</sup>; 25 µg.mL<sup>-1</sup>; 50 µg.mL<sup>-1</sup>; e 100 µg.mL<sup>-1</sup>) em placas de petri de 49 mm. Em seguida, um plugue de 5 mm do fitopatógeno foi adicionado na superfície do meio de cultura contendo o antifúngico e, após um período de 60h de crescimento em BOD a 28°C, foi analisada a eficiência de inibição do composto, a qual foi determinada com base no raio da colônia de *R. solani* nos tratamentos utilizados com relação ao tratamento controle, de acordo com a fórmula:  $ICM_{( \% )} = [(C - T) / C] \times 100$ ; onde,  $ICM_{( \% )}$  = o índice de Inibição de Crescimento Microbiano expressado em porcentagem,  $C$  o raio da colônia controle crescida na ausência do antifúngico; e,  $T$  o raio da colônia de *R. solani* para cada concentração do antifúngico.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas (YAHYAZADEH et al., 2008). As doses efetivas de 50 e 80% foram determinadas por meio de análise de

regressão quando estas reduziram de 50 a 80% do crescimento micelial, respectivamente, em relação ao controle.

### 2.3 Condições de cultivo e infecção das plantas de tabaco

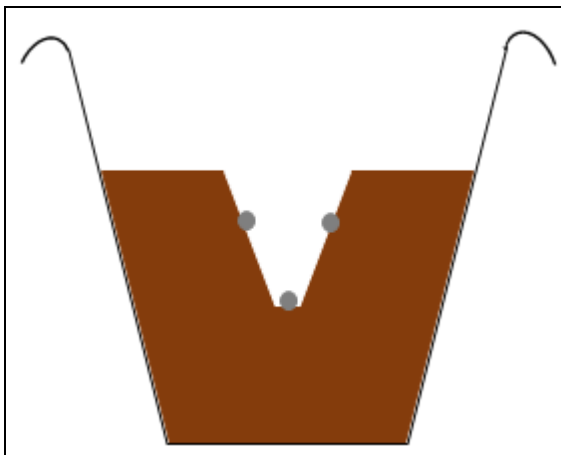
As sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.) foram semeadas em floating com 25 células, contendo substrato MecPlant não-estéril, onde permaneceram durante a germinação e estágio de plântula. Após 38 dias da germinação, as plantas jovens foram transplantadas para vasos de 0,5 L de capacidade contendo uma mistura de solo Rhodic Ferrasol (FAO, 1994) e areia (3:1, m;m) esterilizados por meio de autoclavagem por vapor fluente durante 60 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes com intervalos de 24 horas entre as repetições. A mistura foi, ainda, corrigida com calcário (0,18 g.vaso<sup>-1</sup>) e enriquecida com uréia (0,16 g.vaso<sup>-1</sup>).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação nas seguintes condições de cultivo: 28/22°C e 10/14 horas dia/noite, com umidade relativa em torno de 80%, sendo as plantas regadas conforme a necessidade, com água de torneira (OLIVEIRA et al., 2011).

A infecção das plantas recém transplantadas com *R. solani* foi realizada por meio de duas metodologias, *Infecção-A* e *Infecção-B*, adaptadas de Csino e Stephenson (1999), ambas com o intuito de induzir o adoecimento das plantas causando o sintoma conhecido como podridão caulinar (sore shin).

#### 2.3.1 Infecção-A

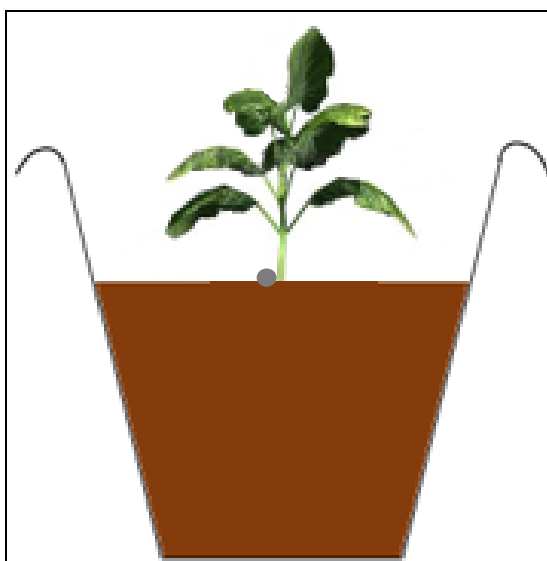
Antes do transplante das plantas jovens para os vasos de 0,5 L, três plugues de BDA de 9 mm de diâmetro cada, contendo cultura de *R. solani*, foram alocados no interior da cova de aproximadamente 8 cm de profundidade, com formato coanoide, de modo que os dois destes foram fixados nas paredes da cova, e o último no fundo, assim como ilustrado na Figura 1.



**Figura 1:** Ilustração da forma como os plugues de *R. solani* (círculos em cinza) foram alocados dentro das covas para a infecção do tipo "A".

### 2.3.2 Infecção-B

Nesse procedimento, um único plugue de BDA contendo *R. solani* de 9 mm de diâmetro foi alocado na região do colo da planta (Figura 2) e, em seguida, recoberto por uma fina camada de solo do próprio vaso.



**Figura 2:** Ilustração da forma como o plugue (círculo cinza) de *R. solani* foi alocado na região do colo da planta de tabaco para infecção do tipo "B".

Para ambos os processos de infecção todas as plantas foram mantidas em câmara úmida, de modo que proporcionassem infecções mais efetivas.

## 2.4 Delineamento Experimental

O experimento consistiu em um delineamento inteiramente casualizado, sendo realizados sete tratamentos com cinco repetições, através de dois regimes de tratamentos, um pré-tratamento e um pós-tratamento. Para o primeiro, 24 horas antes do transplante adicionou-se 2 mL de uma solução composta por F1 ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 0,5% de DMSO; 0,25% de óleo mineral; e, H<sub>2</sub>O destilada, em cada célula do floating, sendo as plantas mantidas em câmara úmida por 24h, até o momento do transplante. Para o pós-tratamento, 2 mL da mesma solução de F1 ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), foram aplicados diretamente no solo, na região do caule, após 24h da realização do transplante. Neste último caso, as plantas também foram mantidas em câmara úmida. Para os controles positivo e negativo, as plantas de tabaco foram cultivadas em casa de vegetação na presença de *R. solani*, seguindo as duas metodologias de infecção avaliadas, e ausência do antifúngico, e ausência de *R. solani*, respectivamente.

A severidade das infecções foi analisada em uma escala de 0 a 5, de modo que zero representou o menor índice de infecção, determinado pela ausência de sintomas da podridão caulinar causada pelo fitopatógeno, e 5 o valor máximo representado pelo estado avançado da infecção nas plantas, de acordo com o controle positivo para cada tipo de infecção, podendo resultar na morte das mesmas. Os valores intermediários da escala descreveram os níveis dos estragos causados pela doença, sendo avaliados com base nos dois extremos (CSINOS e STEPHENSON, 1999).

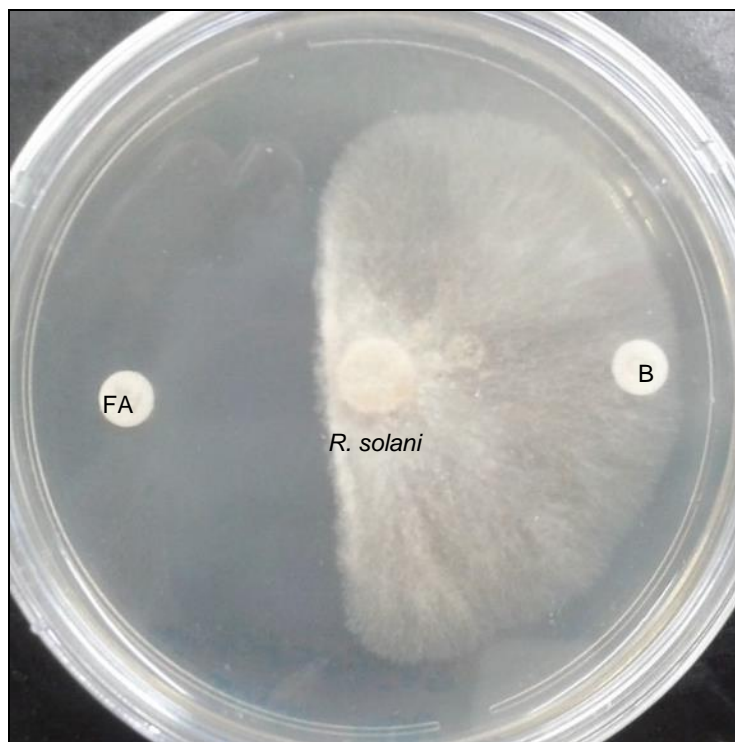
Os resultados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) com auxílio do Software de estatística RStudio®, versão para Desktop 1.1.423.

## 3 RESULTADOS

O rendimento médio de produção de substâncias extracelulares após o cultivo de *B. pyrrocinia* RV7S3 em meio líquido e agitação constante durante sete dias foi em torno de 156,7 mg de metabólitos (FA) por litro de sobrenadante extraído cinco



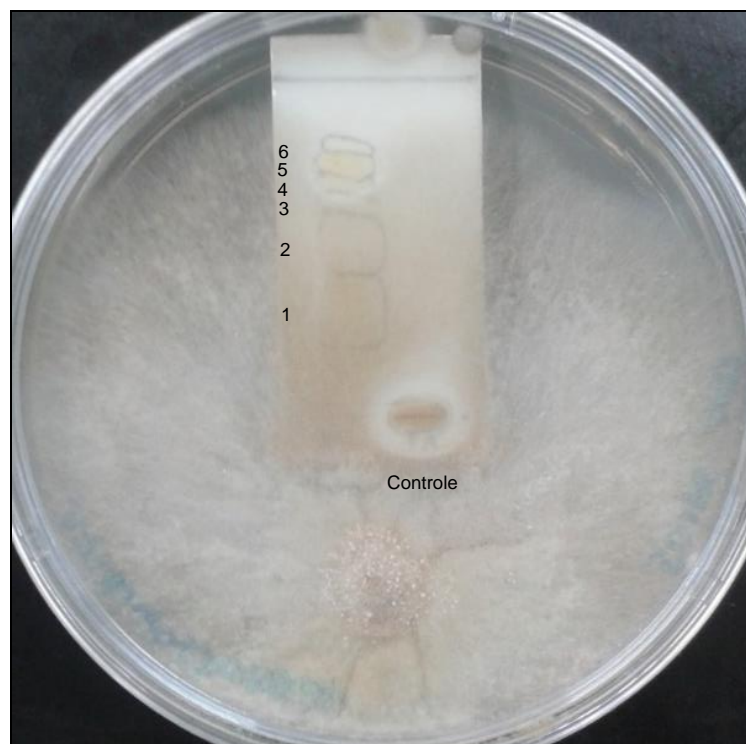
vezes com acetato de etila. Para testar a presença de atividade antifúngica das substâncias obtidas de tais extrações, a fração foi submetida ao teste de disco-difusão contra *R. solani* (Figura 3).



**Figura 3:** Atividade antifúngica da fração bruta (FA) determinada por meio do teste de disco difusão em ágar. FA= Fração Acetato de Etila; B= Branco. O plugue de *R. solani* encontra-se no centro da placa.

Em média, os discos impregnados com FA apresentaram halos de inibição de crescimento de *R. solani* com cerca de 21 mm de raio, mostrando claramente a presença de substâncias antifúngicas ativas na fração.

Esses resultados foram confirmados através da realização de uma bioautografia da fração bioativa, na qual observou-se a presença de um halo de inibição de crescimento do fitopatógeno com raio de 5,75 mm ao redor da aplicação controle (Figura 4).



**Figura 4:** Bioautografia de FA. O sistema eluente utilizado para separação das bandas (esquerda) foi: 40:40:20 (ciclohexano:clorofórmio:metanol, v:v:v). Não houve corrida para a aplicação controle (direita).

No mesmo experimento nota-se ainda a formação de seis bandas cromatográficas (1, 2, 3, 4, 5 e 6), das quais apenas a banda de número cinco apresentou atividade contra *R. solani*, com halo de inibição de 5,75 mm de raio. Além disso, através do padrão de separação de bandas observado na bioautografia, foi possível determinar as características adequadas para a purificação de FA por CLV.

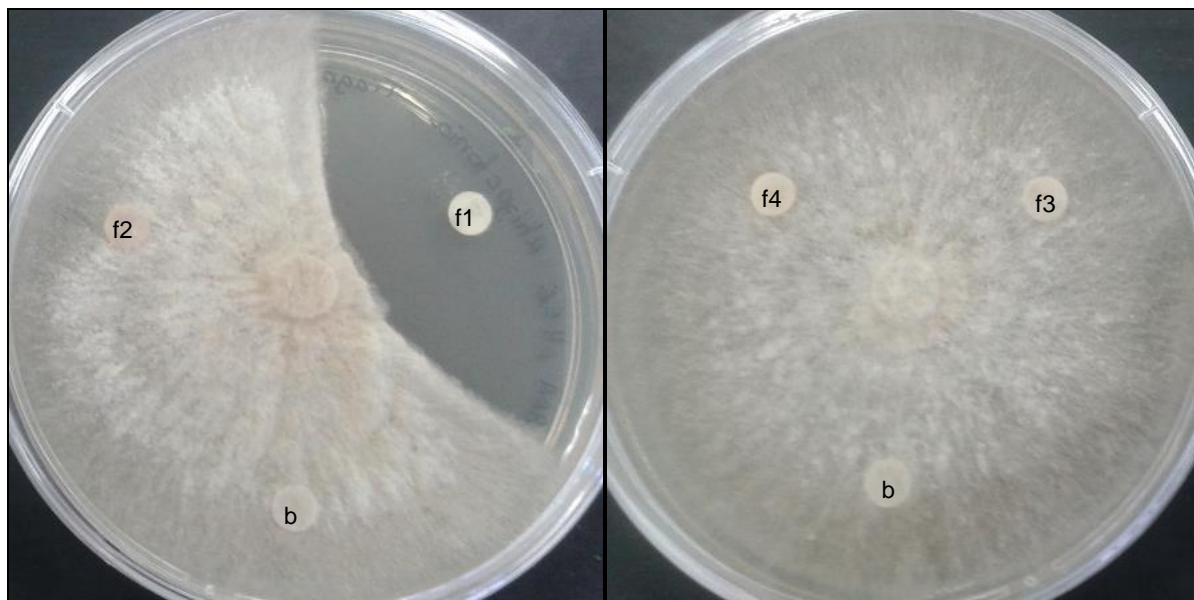
O particionamento de FA por meio da utilização do sistema eluente determinado para a CLV possibilitou a obtenção de quatro novas frações cromatográficas semipurificadas, as quais foram denominadas de F1, F2, F3 e F4, e cujo os rendimentos podem ser visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Rendimento geral das frações obtidas por Cromatografia Líquida à Vácuo.

Frações obtidas	Rendimento			
	Solvente orgânico	Proporção (%)	Volume (mL)	Rendimento (mg/L)
F1	Diclorometano	100	400	7,27
F2	Clorofórmio e Acetato de Etila	50:50	400	14,33
F3	Acetato de Etila	100	400	28,25
F4	Metanol	100	400	92,27

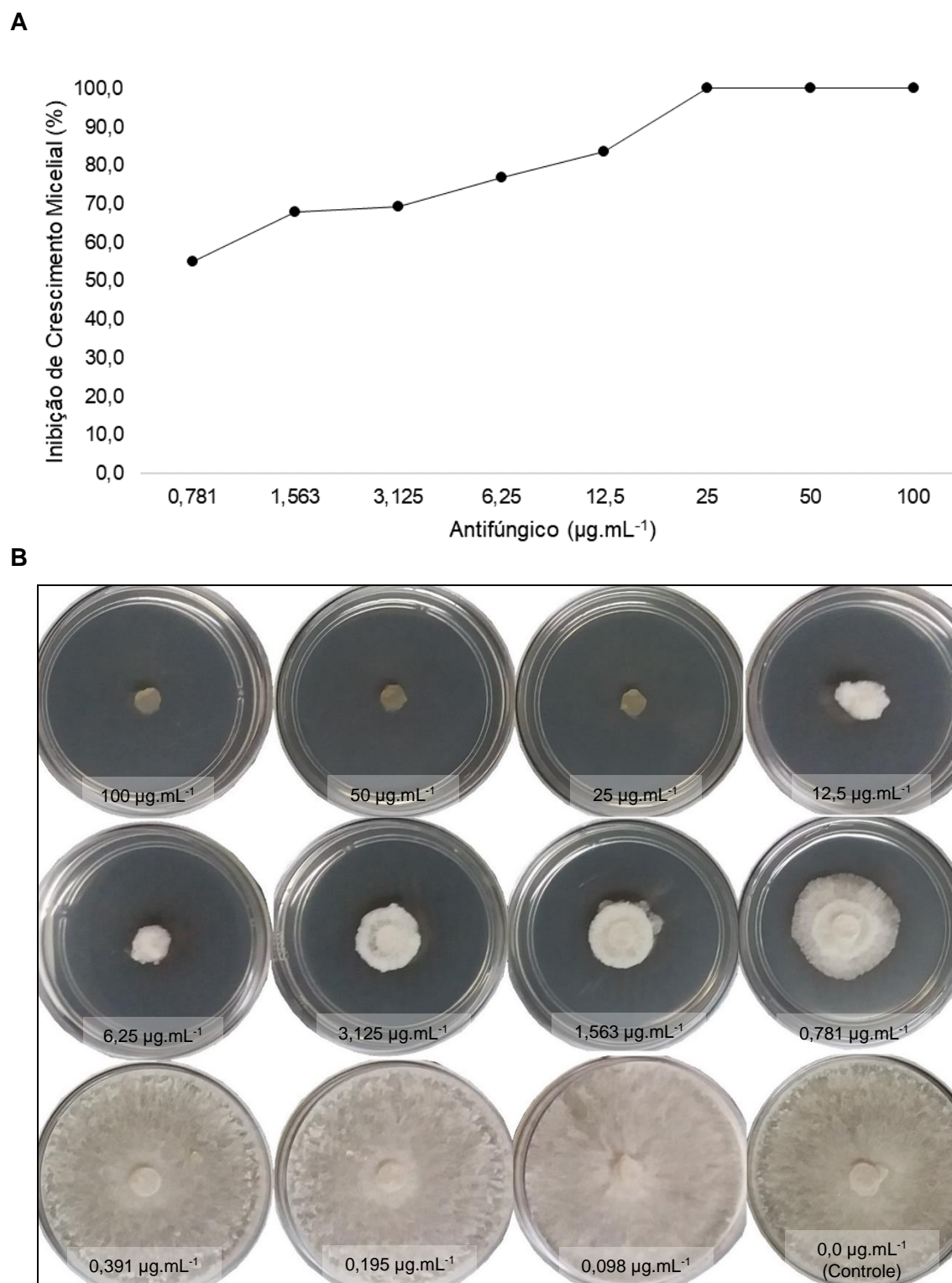
Nota-se que a fração polar extraída com 400 mL do solvente orgânico metanol (100%), foi a que apresentou o maior rendimento de todas com 92,27 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, destas 4 frações semipurificadas obtidas por CLV, a única que mostrou-se ativa contra *R. solani in vitro* foi a fração diclorometano (100%) (F1), cujo o rendimento foi o menor obtido da purificação, 7,27 mg.L<sup>-1</sup>.

A Figura 5 mostra os resultados do teste de disco referente à atividade antifúngica *in vitro* das frações obtidas da CLV, o qual foi realizado utilizando uma menor concentração dos compostos (100 µg.disco<sup>-1</sup>), uma vez que as frações se encontravam com um teor de pureza mais elevado. Apenas F1 apresentou halo de inibição contra o fitopatógeno, com média de 17,5 mm de raio ao redor do disco com a amostra. As demais frações não mostraram atividade antifúngica contra *R. solani* no teste *in vitro*.



**Figura 5:** Teste de disco-difusão (100 µg.disco<sup>-1</sup>) para as frações obtidas por cromatografia líquida à vácuo (F1, F2, F3 e F4). Na placa da direita encontram-se as frações: F1 – disco superior à direita; F2 – disco superior à esquerda; Branco (controle) – disco inferior. Na placa da esquerda encontram-se as frações: F3 – disco superior à esquerda; F4 – disco superior à direita; e, Controle – disco inferior.

A concentração inibitória mínima (CIM) para F1 frente à *R. solani* foi de 25 µg.mL<sup>-1</sup>, como mostra a Figura 6.



**Figura 6:** Inibição de Crescimento Micelial de *R. solani* 17576 *in vitro* pela fração diclorometano (F1) do composto antifúngico, mostrada em gráfico (A) e placas de petri (B). Os raios das colônias foram medidos após 3 dias de cultivo a 28 °C.

Os resultados referentes ao experimento em casa de vegetação mostraram que a metodologia de infecção do tipo “a” não foi uma metodologia eficiente para a indução da podridão caulinar em tabaco, de modo que apenas os controles positivos (Ca+) 2 e 3 apresentaram manifestações sintomáticas da doença. Entretanto, devido

à baixa gravidade dos sintomas, foram atribuídos grau de severidade zero para estas plantas como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2:** Severidade das infecções causadas por *R. solani*, Kühn, em *N. tabacum* em casa de vegetação nos dois regimes de tratamento para as metodologias de infecção dos tipos A e B.

Planta	Tratamentos*						
	C-	C <sub>a+</sub>	Pré <sub>a</sub>	Pós <sub>a</sub>	C <sub>b+</sub>	Pré <sub>b</sub>	Pós <sub>b</sub>
1	0	0	0	0	5	1	0
2	0	0	0	0	1	1	1
3	0	0	0	0	3	1	2
4	0	0	0	0	3	1	0
5	0	0	0	0	1	0	0

\*C-= controle negativo; C<sub>a+</sub>= controle positivo da infecção do tipo "a"; Pré<sub>a</sub>= pré-tratamento da infecção do tipo "a"; Pós<sub>a</sub>= pós-tratamento da infecção do tipo "a"; C<sub>b+</sub>= controle positivo da infecção do tipo "b"; Pré<sub>b</sub>= pré-tratamento da infecção do tipo "b"; Pós<sub>b</sub>= pós-tratamento da infecção do tipo "b".

Na segunda metodologia de infecção do tabaco, onde um único plugue de *R. solani* foi adicionado na região do colo da planta, todos os tratamentos manifestaram algum sintoma da doença, mostrando-se ser uma técnica eficiente para indução da podridão caulinar causada por este fitopatógeno.

Foram realizados dois regimes de tratamento das infecções com F1, um pré-tratamento e outro pós-tratamento. Para ambos os tratamentos houve uma redução significativa ( $p= 0,000292$ ) dos níveis de infecção por *R. solani* quando comparados com o controle, sendo o primeiro com uma redução de 69,2% e o último 76,9%. Não houve, entretanto, diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, entre os regimes de tratamento avaliados.

#### 4 DISCUSSÃO

Em condições de laboratório, o cultivo da cepa RV7S3 de *B. pyrrocinia* proporcionou uma produção média de 156,7 mg de metabólitos (FA) por litro de sobrenadante. Bactérias do gênero *Burkholderia* são conhecidas por sua capacidade de produzir uma grande quantidade de compostos bioativos, dos quais muitos são comprovadamente eficazes contra diversos fitopatógenos de interesse, sendo obtidos em maior ou menor quantidades dependendo das condições de cultivo (HWANG et al., 2002; LASSIE, 2014; DEPOORTER et al., 2016).

No caso de FA, por se tratar de amostra relativamente complexa a utilização de técnicas de cromatografia como Cromatografia em Camada Delgada (CCD), surgiu como uma excelente ferramenta para obtenção dos perfis bioautográficos da fração. Segundo Móricz et al. (2015), esta técnica além de permitir determinar o perfil de amostras complexas isoladamente, principalmente de extratos brutos onde não há componentes descartados, possibilita ainda a análise paralela de diversas outras amostras, o que agiliza o processo.

Nesse contexto, a análise da CCD de FA (Figura 4) mostrou, por exemplo, que não houve sinergismo entre as seis bandas cromatográficas obtidas para o sistema eluente utilizado (ciclohexano:clorofórmio:metanol, 40:40:20; v:v:v), uma vez que mesmo após o fracionamento da amostra o antifúngico manteve sua atividade, confirmada por meio da formação de um halo de inibição de *R. solani* na posição de número 5 na CCD. Esta banda cromatográfica foi, ainda, uma das primeiras a separar da amostra, indicando baixa afinidade com a sílica, adsorvente polar utilizado como fase estacionária (COLLINS, 2010).

Assim, das frações obtidas da partição de FA por CLV, a única que apresentou atividade antifúngica contra *R. solani* foi aquela em que se utilizou diclorometano 100% (F1) em sua extração. Inferimos assim que as substâncias antifúngicas produzidas por RV7S3, por serem solúveis em diclorometano, foram extraídas naquela fração e, assim, as demais frações não apresentaram ação antifúngica frente ao fitopatógeno (OLIVEIRA, 2011).

Estes resultados confirmam a hipótese de que a fração contendo o antifúngico possui polaridade que varia em uma escala de baixa (apolar) à média polaridade, solubilizando-se em solventes orgânicos que apresentem estas características, como é o caso do ciclohexano e do diclorometano, componentes das fases móveis para CCD e CLV, respectivamente.

Através do teste de concentração inibitória mínima foi possível determinar que com  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de F1 o fitopatógeno teve seu crescimento totalmente inibido pelo antifúngico. Vale ressaltar, que em concentrações superiores ao CIM,  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , bem como o próprio CIM, o efeito do composto foi fungicida. Em um experimento realizado por Asad-Uz-Zaman (2015), onde avaliou-se a utilização integrada de opções para o manejo da podridão da raiz causada por *R. solani* em morangos, foram testadas *in vitro* a eficiência de três fungicidas comerciais para a

formulação, Provax-200 (Carboxina), Bavistin 50 WP (Carbendazim) e Ridomil (Metalaxil), onde constataram que na concentração de 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  apenas o Provax-200 inibia em 100% o crescimento micelial de *R. solani*, em uma concentração 10 vezes maior do que o CIM determinado para F1.

As respostas relacionadas à inibição de *R. solani*, bem como o modo de ação observados nos testes *in vitro*, sugerem que o antifúngico produzido por *B. pyrrocinia* RV7S3 é proveniente de seu metabolismo secundário. Isso corrobora com diversos estudos previamente realizados, reforçando a hipótese de que o mecanismo de ação de bactérias antagonistas de fungos fitopatogênicos frequentemente envolve a produção de metabólitos secundários (JEONG et al., 2017).

Os resultados referentes ao experimento em casa de vegetação mostraram que houve uma redução significativa dos níveis de infecção por *R. solani* quando comparados com o controle. Resultados semelhantes foram relatados por Tarantino et al. (2007), utilizando uma mistura de um fungicida comercial (Iprodiona), em baixa concentração, com esporos resistentes de *Gliocladium roseum*, o que causou um efeito sinérgico no tratamento, aumentando assim a eficiência no controle de *R. solani*.

## 5 CONCLUSÃO

A bactéria *B. pyrrocinia* cepa RV7S3 produz compostos antifúngicos que inibem o crescimento de *R. solani*, reduzindo também a incidência de podridão caulinar causada por este fitopatógeno em culturas de tabaco. Assim, por se tratar de substâncias naturais, estes compostos mostram-se promissores para o manejo sustentável da doença, tornando-se uma alternativa ao uso de agrotóxicos sintéticos. Entretanto, novos estudos devem ser conduzidos visando a otimização do processo de produção especialmente aqueles relacionados à purificação e identificação do princípio ativo na amostra.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAD-UZ-ZAMAN, M.; BHUIYAN, M. R.; KHAN, M. A. I.; BHUIYAN, M. K. A.; LATIF, M, A. Integrated options for the management of black root rot of strawberry caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. **Comptes Rendus Biologies**, v. 338, n. 2, p. 112-120, 2015.

COLLINS, C. H. O Desenvolvimento da Cromatografia em Camada Delgada. **Scientia Chromatographica**, v. 2. n. 1, p. 5-12, 2010.

CSINOS, A. S.; STEPHENSON, M. G. Evaluation of fungicides and tobacco cultivar resistance to *Rhizoctonia solani* incited target spot, damping off and sore shin. **Crop Protection**, v. 18, p. 373-377, 1999.

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, p. 5215-5229, 2016.

DEWANJEE, S.; GANGOPADHYAY, M.; BHATTACHARYA, N.; KHANRA, R.; DUA, T. K. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 75-84, 2015.

FAO. Pesticides (use). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/beta/en/#data/RP>>. Acesso em: 28/10/2016.

FAO. Soil Map of the World. Revised legend with corrections. FAO-UNESCO ISRIC, Wageningen, Rome, 1994. p.140.

GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research**, v. 169, p. 59-65, 2014.



HUANG, X.; ZHANG, N.; YONG, X.; YANG, X.; SHEN, Q. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. **Microbiological Research**, v. 167, p. 135-143, 2011.

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, p. 56-63, 2002.

JEONG, M-H.; LEE, Y-S.; CHO, J-Y.; AHN, Y-S.; MOON, J-H.; HYUN, H-N.; CHA, G-S.; KIM, K-Y. Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 645-653, 2017.

LASSIE, F. S. Substâncias bioativas produzidas por *Burkholderia* sp. com a ação antifúngica em *Candida* spp. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina/PR, 2014.

MÓRICZ, A. M.; HÄBE, T. T.; BÖSZÖRMÉNYI, A.; OTT, P. G.; MORLOCK, G. E. Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by the combination of high-performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 310-317, 2015.

OLIVEIRA, A. G.; MURATE, L. S.; SPAGO, F. R.; LOPES, L. P.; BERANGER, J. P. O.; SAN MARTIN, J. A. B.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, C. G. T. J.; ANDRAGE, J. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, p. 125-131, 2011.

OLIVEIRA, A. G.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; ANDRADE, G. **Antimicrobianos Naturais Produzidos por Microrganismos: da Busca à Identificação**. In: YAMADA-OGATTA, S. M.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.;

NOGUEIRA, M. A. Tópicos Especiais em Microbiologia. Londrina: UEL/Departamento de Microbiologia, 2015.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. F. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SPAGO, F. R.; ISHII MAURO, C. S.; OLIVEIRA, A. G.; BERANGER, J. P. O.; CELY, M. V. T.; STANGANELY, M. M.; SIMIONATO, A. S.; SAN MARTIN, J. A. B.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**, v. 62, p. 46-54, 2014.

TARANTINO, P.; CAIAZZO, R.; CARELLA, A.; LAHOZ, E. Control of *Rhizoctonia solani* in a tobacco-float system using low rates of iprodione- and iprodione-resistant strains of *Gliocladium roseum*. **Crop Protection**, v. 26, n. 8, p. 1298-1302, 2007.

YAHYAZADEH, M.; OMIDBAIGI, R.; ZARE, R.; TAHERI, H. Effects of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1445-1450, 2008.