



### Sistema alternativo para controle da podridão da uva madura

Projeto: *Glomerella*

Mariele Castellani, Fernando J. Scariot, Ana Paula Delamare, Sergio Echeverigarray

## INTRODUÇÃO / OBJETIVO

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são agentes causais de diversas doenças de plantas cultivadas, geralmente conhecidas como antracnose ou, no caso de videiras, podridão da uva madura. O controle deste patógeno é convencionalmente realizado pela aplicação de fungicidas sintéticos. Porém, mesmo eficientes, a sua utilização em fases finais de maturação e pós-colheita é limitada a produtos com períodos de carência muito curtos. Assim sendo, alternativas para o controle de *Colletotrichum* tornam-se relevantes. Uma, entre outras opções, é o uso de bactérias antagonistas e/ou produtoras de compostos antifúngicos. Algumas espécies de *Bacillus* são conhecidas produtoras de lipopeptídeos com atividade antifúngica como surfactina, irudina e fengicinas<sup>5</sup>. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi: identificar e selecionar a bactéria da Serra Gaúcha com potencial para o controle de *Colletotrichum*, avaliar a produção de lipopeptídeos com atividade antifúngica, concentra-los e caracteriza-los, e determinar o modo de ação deste compostos sobre a germinação e viabilidade de conídios "in vitro".

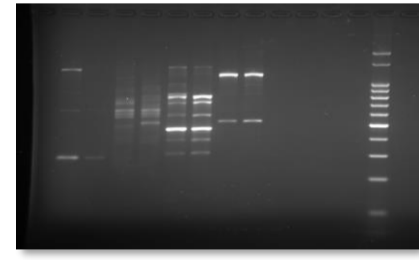
## MATERIAL E MÉTODOS

### Identificação bacteriana

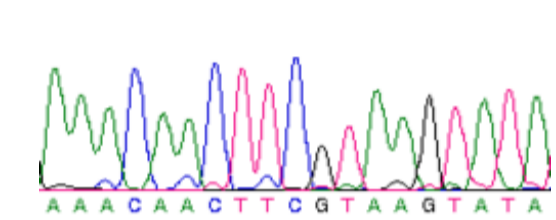
A identificação dos isolados bacterianos foi realizada através de PCR seguido de sequenciamento das regiões 16S rDNA<sup>3</sup> e rpoB, e comparação com o banco de dados do GeneBank.



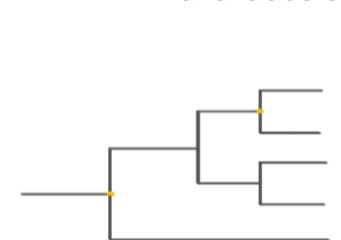
O material foi amplificado em termociclador.



A presença e quantificação dos fragmentos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2,5%, corados com GelRed (Uniscience) e avaliados em luz UV.



Os produtos do PCR foram tratados com exonuclease e shrimp alkaline phosphatase antes do sequenciamento.



A árvore filogenética foi gerada com as sequências de 16S e RPOB concatenadas e as distâncias geradas por maximum-likelihood.



As amostras foram comparadas com sequências depositadas no GenBank.

### Avaliação de atividade sobre conídios

A inibição de germinação de conídios de *Colletotrichum* pelo sobrenadante de culturas bacterianas (7 dias em LB com agitação a 27°C). A avaliação foi realizada em placas de 96 poços usando diluição seriada de base 2. As placas foram incubada por 24h à 27°C e a germinação avaliada em microscópio invertido.

### Concentração de lipopeptídeos

As bactérias com maior desempenho antifúngico foram selecionadas para o processo de concentração proteica dos seus sobrenadantes.

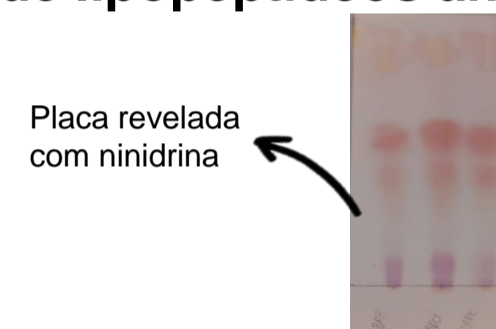


As bactérias foram cultivadas por 7 dias em meio LB. O sobrenadante foi coletado e adicionado butanol.

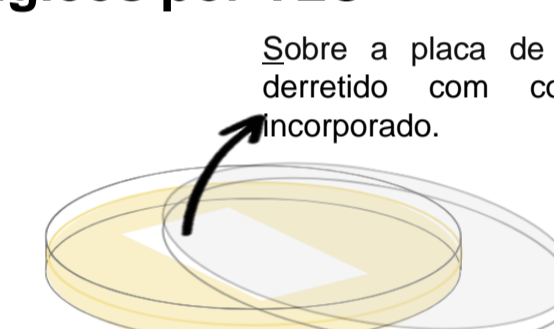


A primeira fase foi recuperada, seca e ressuspendida em uma solução de metanol 10%.

### Avaliação de lipopeptídeos antifúngicos por TLC



Placa revelada com ninidrina



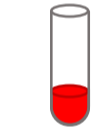
Sobre a placa de sílica, foi adicionado BDA derretido com conídios de *C. acutatum* incorporado.

As bactérias foram crescidas em meio líquido sintético<sup>4</sup>

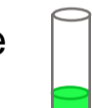
As amostras foram separadas por cromatografia de camada delgada em duas placas idênticas, uma foi revelada com ninidrina e a segunda foi centralizada em uma placa de petri com BDA. A placa foi incubada por 3 dias à 27°C ± 1 °C.

### Determinação do modo de ação dos lipopeptídeos bacterianos

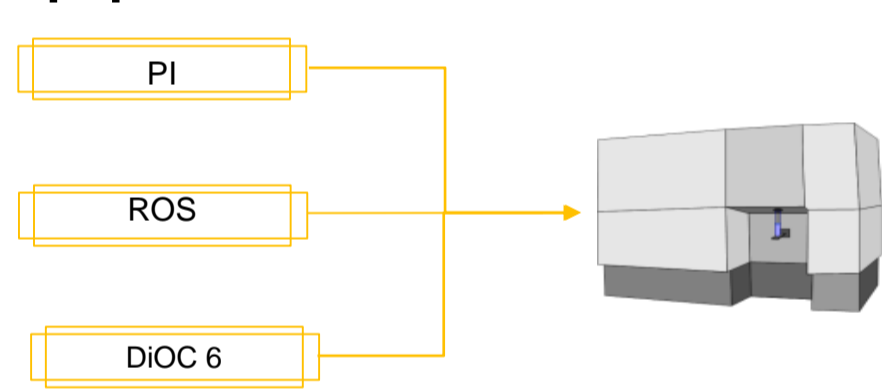
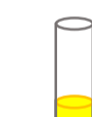
A integridade da membrana celular dos conídios fúngicos vou avaliada com o corante PI.



A presença de espécies reativas de oxigênio foi avaliada com o corante ROS.



O potencial da membrana mitocondrial foi avaliada como corante DiOC6



## RESULTADOS

### Classificação molecular dos isolados bacterianos

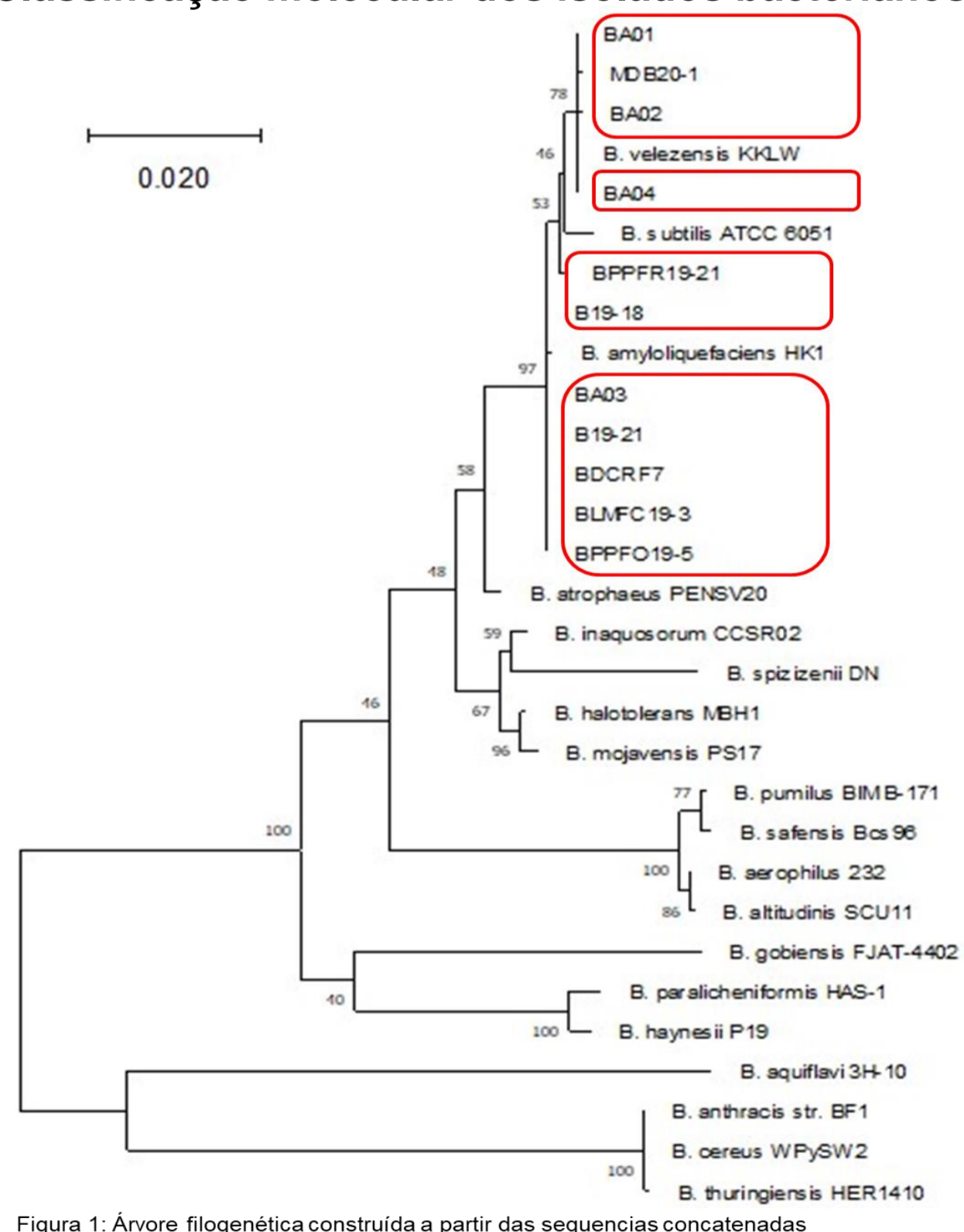


Figura 1: Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas

### Seleção de isolados bacterianos

Os extratos brutos dos isolados BPPFO19.5 e BDCFR7, ambos *B. amyloliquefaciens*, mostraram maior atividade sobre conídios de *Colletotrichum*, dentre os isolados testados.

### Avaliação de lipopeptídeos antifúngicos por TLC

Apenas um spots apresentou caráter fungicida para as três amostras testadas, BPPFO19.5, BDCFR7 e Serenade (Figura 2), o local de inibição foi uma região com pouca concentração proteica na placa revelada com ninidrina.

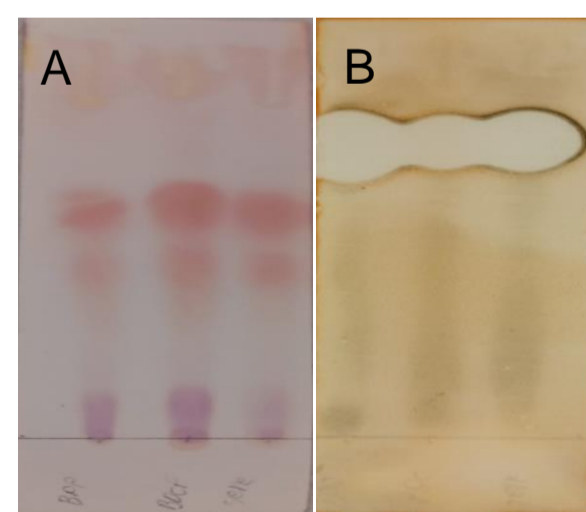


Figura 2: Placa de sílica gel duplicata, revelada com ninidrina (A), placa de sílica gel mostrando halo de inibição de germinação e crescimento fúngico (B). Respectivamente BPPFO19.5, BDCFR7 e Serenade.

### Determinação do modo de ação dos lipopeptídeos bacterianos

Os conídios tratados com extrato lipopeptídico apresentaram leve perda da integridade da membrana celular, esse evento está associado a morte celular<sup>2</sup>.

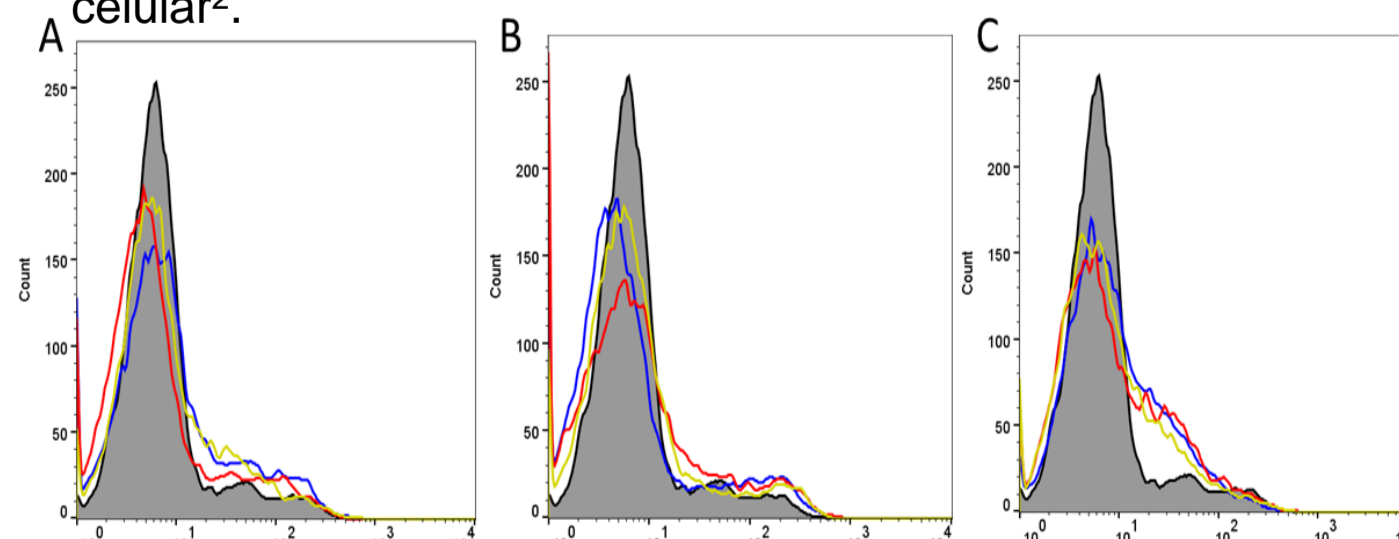


Figura 3: Integridade da membrana celular avaliada pela fluorescência de iodo de propídeo. Serenade (A), BDCFR7 (B) e BPPFO19.5. As cores das curvas indicam as diferentes concentrações dos extratos, controle (cinza); 7,6 µL/mL (amarelo); 15,6 µL/mL (vermelho); 31,2 µL/mL (azul).

Foi detectado um aumento da concentração intracelular de ROS nos conídios fúngicos após tratamento com os extratos lipopeptídicos, seu excesso possui potencial de causar danos celulares e consequente indução de morte celular<sup>1</sup>.

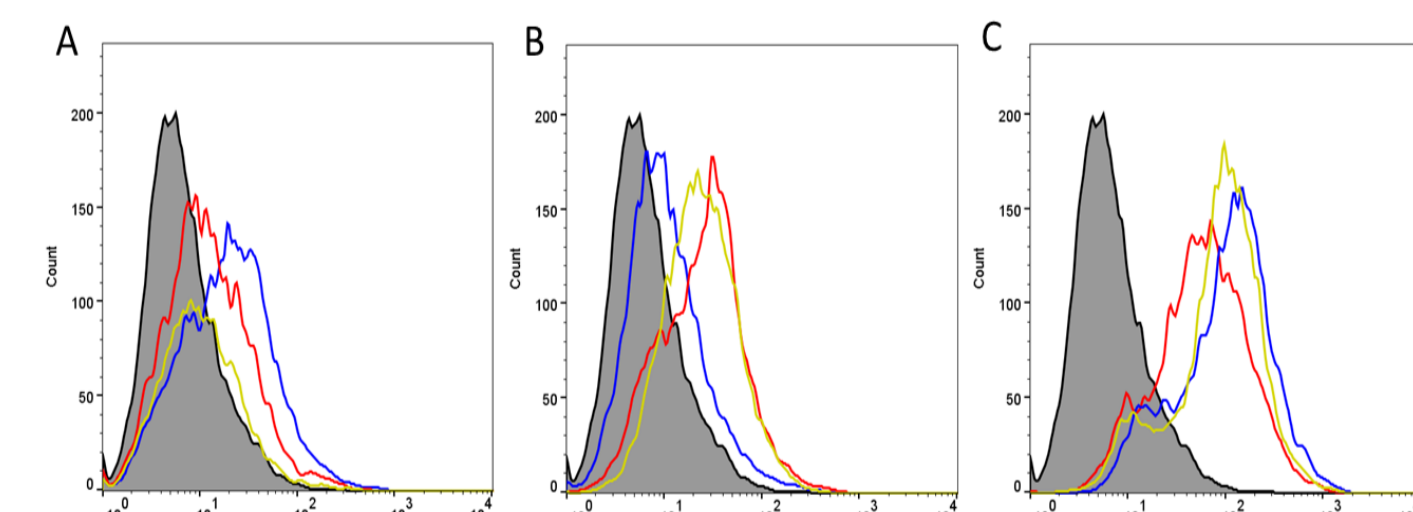


Figura 4: Concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio detectadas pela fluorescência de DCFH. Serenade (A), BDCFR7 (B) e BPPFO19.5. As cores das curvas indicam as diferentes concentrações dos extratos, controle (cinza); 7,6 µL/mL (amarelo); 15,6 µL/mL (vermelho); 31,2 µL/mL (azul).

Além da elevada concentração de ROS nos conídios, observou-se uma clara redução no potencial da membrana mitocondrial.

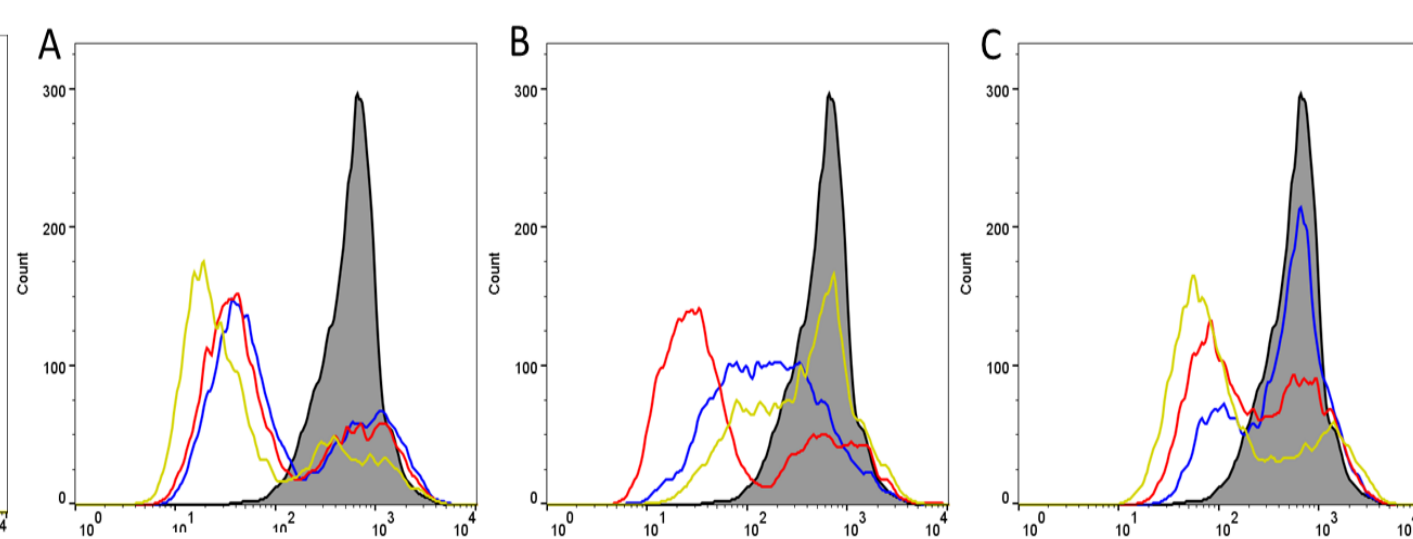


Figura 4: Potencial da membrana mitocondrial dos conídios, após tratamento com os extratos lipopeptídicos dos isolados. Serenade (A), BDCFR7 (B) e BPPFO19.5. As cores das curvas indicam as diferentes concentrações dos extratos, controle (cinza); 7,6 µL/mL (amarelo); 15,6 µL/mL (vermelho); 31,2 µL/mL (azul).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que o concentrado lipopeptídico avaliado inibe a germinação e crescimento dos conídios de *Colletotrichum*, atuando no potencial de membrana mitocondrial e aumentando a concentração de espécie reativa de oxigênio, parâmetros esses associados a morte celular. Dessa forma, conclui-se que é possível o controle de *Colletotrichum* utilizando esse concentrado lipopeptídico de *Bacillus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1Aguirre, J. et al. *Trends in microbiology*. 2005. 13(3), 111-118.
- 2 Eisenberg, T. et al. *Necrosis in yeast. Apoptosis*. 2010. 15:257-268
- 3Turner S, et al. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999. 46(4), 327-338.
- 4Zhao P, et al. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013. Mar;29(3):401-9
- 5Zhao H, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017. 101, 5951-5960