

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE
TOXINA *killer* PRODUZIDA POR *Saccharomyces
cerevisiae***

Vanessa Santos Moura

Engenheira Agrônoma

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE
TOXINA *killer* PRODUZIDA POR *Saccharomyces
cerevisiae***

Vanessa Santos Moura

Orientadora: Prof. Dra. Katia Cristina Kupper

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Takita

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária

2017

M929c Moura, Vanessa Santos
Caracterização bioquímica e funcional de toxina *killer* produzida por *Saccharomyces cerevisiae* / Vanessa Santos Moura. -- Jaboticabal, 2017
vi, 34 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Katia Cristina Kupper
Banca examinadora: Hélia Harumi Sato, Eliana Gertrudes de Macedo lemos
Bibliografia

1. Fator *killer*. 2. dsRNA. 3. Levedura. 4. *Penicillium digitatum*. 5. Citros. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:634.3

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE
TOXINA *Killer* PRODUZIDA POR *Saccharomyces cerevisiae*

AUTORA: VANESSA SANTOS MOURA

ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

COORIENTADOR: MARCO AURÉLIO TAKITA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agrônomo de Campinas - Cordeirópolis/SP



Profa. Dra. HELIA HARUMI SATO
Ciência de Alimentos / UNICAMP / Campinas/SP



Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de julho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VANESSA SANTOS MOURA – Nascida em 16 de janeiro de 1991 em Manaus, AM. Iniciou sua graduação em Agronomia em Março de 2010 na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, na cidade de Manaus, AM, concluindo seu bacharelado em Maio de 2015. Durante a graduação, foi bolsista no programa de educação tutorial - PET Agronomia, durante quase toda sua formação acadêmica, sob orientação do Prof. Dr. Ari de Freitas Hidalgo, foi bolsista de iniciação científica do CNPq-PIBIC, no Instituto de Pesquisa do Amazonas – INPA, sob a orientação do Prof. Dr. Hugo Iriarte Martel e bolsista de iniciação científica da FAPEAM-PIBIC, na Universidade Federal do Amazonas atuando na área de Fitopatologia e Controle Biológico, sob a orientação da Profa. Dra. Solange de Mello Vêras. Em agosto de 2015 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Katia Cristina Kupper, como bolsista CNPq, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP.

Dedico

A minha mãe **Maria do Rosário Santos Moura** e aos meus irmãos **Wagner Santos Moura** e **Silvia Santos Moura**, por todo o incentivo, dedicação e confiança.

Ofereço

A minha mãe **Maria do Rosário**, por toda sua dedicação e seu amor incondicional. Por me apoiar sempre e me dar forças para conseguir ir mais longe, lhe amo infinitamente.

Aos meus irmãos **Wagner** e **Silvia**, pelo incentivo, auxílio, paciência e por toda força para chegar até aqui, não existem palavras para agradecer. Sou mais feliz por ter vocês em minha vida.

Ao meu pai **Mario Silvo dos Santos Moura**, pelo incentivo e por ter me ensinado os valores da vida.

A todos os meus **amigos** que me ajudaram nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **DEUS**, pela sua presença constante em minha vida.

A minha mãe **Maria do Rosário**, aos meus irmãos **Silvia Moura** e **Wagner Moura**, que nunca mediram esforços para que meus sonhos fossem alcançados. Vocês fazem parte de cada conquista, sem vocês nada disso teria valor. Ao meu pai **Mario Silvio**, pelo carinho, apoio e por todas as palavras de incentivo.

Aos meus familiares, principalmente a minha avó **Zenaide Socorro de Miranda Santos** por fazerem toda a diferença em minha vida. Com carinho todo especial aos meus sobrinhos **Elvio Neto** e **Heitor**, por tornarem essa etapa ainda mais especial. Ao **Matheus Ferreira** pelo carinho, apoio e por estar sempre ao meu lado.

Ao programa de **Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP/Jaboticabal**, pela oportunidade de realizar o sonho de desenvolver meu mestrado. Ao coordenador do curso **Roberto Alves de Oliveira**.

A minha Orientadora **Katia Cristina Kupper** por dividir comigo seu conhecimento, por todo o incentivo, dedicação, por acreditar no meu potencial, por todo carinho compartilhado e por me ensinar a ser mais independente nas minhas escolhas.

Ao meu co-orientador **Marco Aurélio Takita**, pela paciência e por todo o conhecimento compartilhado. Ao professor **Maurício Ventura Mazzi** por ter compartilhado seu tempo para me ensinar, obrigada pelo carinho e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora **Solange de Mello Vêras** e ao professor **Pedro Queiroz da Costa Neto**, por terem despertado em mim o gosto pela Fitopatologia e a pesquisa, por acreditarem em mim e estarem sempre presente. Muito obrigada pelo afeto.

Aos meus amigos de Laboratório, **Luriany**, **Andreia**, **Aline**, **Flávia**, **Bianca**, **Tatiane**, **Mariana**, **Wesley** e **Ariane** por toda ajuda concedida para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, apoio e afeto que nunca me

deixaram faltar. À **João, Vitor, Paulo, Amanda, Mariane e Mariana** pelo companheirismo.

A minha amiga **Nátalia Sarmanho**, a grande responsável por esta etapa na minha vida, por estar sempre presente em todos os momentos alegres e difíceis. Você foi como uma irmã, me apoiando todo esse tempo que estive longe dos meus familiares. Obrigada por cada palavra e gesto de carinho. A **Larissa Holanda** por acreditar e vibrar comigo a cada conquista, por ser essa amiga incrível.

A todos meus colegas de curso, em especial a **Laiana Lana** (irmã de coração), **Roberta, Luan, Stéfane Carolina, Paola, Tatiane, Caren** e a **Daniele**, que me ajudaram a concluir essa etapa da minha vida. Aos meus amigos **Jéssica, Ana, Carla, Rodolfo, Daniel, Fábio, Heider, Sanderson, Rayanner, Renata, Marco Aurélio, Ednei** e a todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, meu obrigada!

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira por disponibilizar o laboratório para que eu pudesse realizar meus experimentos. Aos demais funcionários do Centro de Citricultura, em especial a **Maria, Lordes, Isabel, Nadji, Vivian, Nidelce e Valéria**, pelo carinho, simpatia e gentileza.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudo e **FAPESP** pelo financiamento do projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância do Citros	3
2.2. Bolor verde	3
2.3. Podridão azeda	4
2.4. Controle biológico.....	5
2.4.1. Atividade <i>killer</i>	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Microrganismos	9
3.2. Meios de Cultura	9
3.3. Atividade <i>killer</i>	9
3.4. Produção da toxina <i>killer</i> bruta de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1	10
3.4.1. Condições ótimas para determinação da atividade <i>killer</i>	10
3.4.2. Efeito do pH na estabilidade da toxina <i>killer</i>	11
3.5. Métodos de precipitação de proteína <i>killer</i> da levedura <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1	11
3.5.1. Precipitação da proteína <i>killer</i> com etanol ou acetona	11
3.5.2. Precipitação da proteína <i>killer</i> com sulfato de amônio	12
3.5.3. Caracterização do perfil de proteínas das preparações de toxina <i>killer</i> por SDS-PAGE	12
3.6. Teste da cura do fenótipo <i>killer</i>	12
3.7. Extração e detecção de elementos de RNA fita dupla (dsRNA) da levedura <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1.....	13
3.8. Purificação de proteínas a partir do extrato bruto proteico de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1.....	14
3.8.1. Obtenção da proteína <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1	14
3.8.2. Purificação parcial da proteína <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1	14
3.8.3. Avaliação das frações quanto à atividade <i>killer</i>	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Atividade <i>killer</i>	15
4.2. Produção da toxina <i>killer</i> bruta <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1.....	15
4.2.1. Condições ótimas para determinação da toxina <i>killer</i>	16
4.2.2. Efeito do pH na estabilidade da toxina <i>killer</i>	18
4.3. Métodos de concentração da proteína de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1	18
4.4. Teste de cura do fenótipo <i>killer</i>	20
4.5. Extração e detecção de elementos de RNA fita dupla (dsRNA) da levedura <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1	20
4.6. Purificação parcial da proteína <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1	21
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	27
7. REFERÊNCIAS.....	28

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE TOXINA *killer* PRODUZIDA POR *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO - O bolor verde e a podridão azeda destacam-se entre as doenças de pós-colheita em frutos cítricos, causados por *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*, diminuindo a qualidade e a quantidade dos frutos e, conseqüentemente, resultando em significativas perdas econômicas. Uma alternativa para controle destes fungos é através da toxinas *killer* produzidas por algumas espécies de levedura, capazes de matar fungos filamentosos. *Saccharomyces cerevisiae* produz toxinas *killer* proteicas que são letais para células sensíveis de levedura. Estas toxinas foram agrupadas em quatro tipos, K1, K2, K28 e Klus, codificado por elementos extra cromossomais associados a partículas virais na forma de dsRNA. Este trabalho tem como objetivo caracterizar a toxina *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1 e testar sua atividade antagônica em patógenos pós-colheita de citros. O isolado ACB-K1 apresentou atividade *killer*, sobre levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006) além do fitopatógeno *P. digitatum*, não apresentando porém inibição contra o patógeno *G. citri-aurantii*. A toxina apresentou máxima atividade em pH 4,1 a 22 °C, tanto para a levedura sensível quanto para o fitopatógeno *P. digitatum*. A toxina apresentou estabilidade em diferentes pH de 4,1 a 6,0, após a incubação de 24h a 22 °C sobre o fungo. O isolado ACB-K1 apresentou dsRNA, sendo detectadas duas formas (LA e M-dsRNA), sugerindo que a base genética para a produção da toxina é extra cromossomal, dado confirmado pela cura do fenótipo *killer* a 40 °C. As frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G75 demonstraram características de biocontrole contra o fitopatógeno *P. digitatum*.

Palavras-chave: fator *killer*, dsRNA, leveduras, fitopatógenos, *Penicillium digitatum*, citros

BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF TOXIN KILLER PRODUCED BY *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT - Green mold and sour rot are among post-harvest diseases in citrus fruits, caused by *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*, reducing a quality and quantity of fruits and, consequently, resulting in significant economic losses. An alternative for the control of fungi is using *killer* toxins produced by some species of yeasts, capable of killing filamentous fungi. *Saccharomyces cerevisiae* produces protein killer toxins that are lethal to yeast sensitive cells. These toxins were grouped into four types, K1, K2, K28 and Klus, encoded by extrachromosomal elements associated with viral particles in the form of dsRNA. This work aims to characterize a killer toxin of *S. cerevisiae* ACB-K1 and to test its antagonistic activity in post-harvest citrus pathogens. The isolate ACB-K1 showed activity *killer* on sensitive yeast (*S. cerevisiae* NCYC 1006) besides the phytopathogenic *P. digitatum*, but did not present inhibition against the pathogen *G. citri-aurantii*. The *killer* toxin showed maximum activity at pH 4.1 at 22 ° C for both a sensitive yeast and the phytopathogenic *P. digitatum*. The toxin presented stability at pH range from 4.1 to 6.0, after a 24h incubation at 22 ° C on the fungus. The ACB-K1 isolate showed dsRNA and two forms were detected (LA and M-dsRNA), suggesting that a genetic basis for a toxin production is extrachromosomal, confirmed by curing the killer phenotype at 40 ° C. The fractions obtained by exclusion chromatography Sephadex G75 gel, demonstrated biocontrol characteristics against the phytopathogen *P. digitatum*.

Key words: factor *killer*, dsRNA, yeasts, phytopathogens, *Penicillium digitatum*, citrus

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Atividade <i>killer</i> da levedura <i>S. crevisiae</i> ACB-K1 em relação à levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 e os fitopatógenos <i>Penicillium digitatum</i> e <i>Geotrichum citri-aurantii</i> em meio YEPD-azul de metileno, em diferentes pH e temperatura.....	16
Tabela 2. Teor de proteínas nas preparações de toxina <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1 concentradas por precipitação com sulfato de amônio, etanol e acetona.	19

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Atividade <i>killer</i>. A: Atividade <i>killer</i> da levedura <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1 contra a levedura sensível (<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006); B: Atividade <i>killer</i> da levedura <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1 contra <i>Penicillium digitatum</i>; C: Atividade <i>killer</i> da levedura <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1 contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i>.....</p>	15
<p>Figura 2. Atividade <i>killer</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ACB-K1) apresentando halo de inibição da levedura sensível <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC 1006) em meio de cultura YEPD+ azul de metileno A: (pH 4,1) a 22 °C; B: (pH 5,4) a 25 °C.</p>	17
<p>Figura 3. Atividade <i>killer</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ACB-K1) apresentando halo de inibição contra <i>Penicillium digitatum</i> em meio de cultura YEPD+ azul de metileno em pH 4,1 a 22 °C.</p>	17
<p>Figura 4. Efeito do pH na estabilidade da toxina <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1 contra <i>P. digitatum</i>. A: pH 2,0; B: pH 3,0; C: pH 3,5; D: pH 3,8; E: pH 4,1; F: pH 4,6; G: pH 4,9; H: pH 5,4; I: pH 6,0; J: pH 7,0; K: pH 8,0.....</p>	18
<p>Figura 5. Eletroforese (SDS-PAGE) das preparações de toxina <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1 concentradas por precipitação com etanol, sulfato de amônio e acetona.</p>	19
<p>Figura 6. Teste de cura do fenótipo <i>killer</i>. (A) atividade <i>killer</i> positiva do isolado <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ACB-K1, sem tratamento de cura (22 °C), contra <i>Penicillium digitatum</i>. (B) <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1, com tratamento de cura (cicloheximida, 1mg/mL) contra <i>P. digitatum</i>. (C) Crescimento do fitopatógeno <i>P. digitatum</i> após a submissão da levedura ao tratamento de cura (40 °C). P= <i>Penicillium digitatum</i>, S= <i>S. cerevisiae</i> ACB-K1.</p>	20
<p>Figura 7. (A) Eletroforese em gel de agarose 1% da extração de dsRNA da levedura. P -Padrão de peso molecular λ Hindi III; 1 - KL-88: <i>S. cerevisiae</i> padrão <i>killer</i>, tipo K1; 2 - ACB-K1 curada: <i>S. cerevisi-</i></p>	

ae (40 °C); 3 - ACB-K1: *S. cerevisiae* (22 °C). (B) Eletroforese em gel de agarose 0,6%, tratada com: 1 - DNase I Amplification Grade e RNase A na presença de NaCl 1,6 M; 2 - DNase I Amplification Grade e RNase A na presença de NaCl 2,5 M..... 21

Figura 8. (A) Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 da preparação de toxina *killer* de *Saccharomyces cerevisiae*. (B) Eletroforese (SDS-PAGE) das frações 1, 2 e 3 obtidas da cromatografia em gel Sephadex G75..... 22

Figura 9. Avaliação da atividade *killer* das frações 1, 2 e 3, na concentração de 10µg/µl, obtidas da cromatografia em gel Sephadex G75, utilizando-se *Penicillium digitatum* como microrganismo sensível. Frações de toxina *killer* diluídas em H₂O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. *P. digitatum* (1,0x10⁵ células/mL) repicados e incubados com as amostras das frações (48h, 22°C). Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. 23

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças de pós-colheita que ocorrem na cultura dos citros, destacam-se o bolor verde, causado por *Penicillium digitatum* e, a podridão azeda, causada por *Geotrichum citri-aurantii*. Tais patógenos diminuem a qualidade e a quantidade dos frutos, bem como prejudicam os valores nutricionais e de mercado. Embora os fungicidas químicos sintéticos sejam ainda muito efetivos no controle do bolor, o uso indiscriminado pode deixar resíduos dos produtos nos frutos e causar danos ao meio ambiente, além de promover o surgimento de linhagens resistentes do fitopatógeno, o que leva à necessidade de se desenvolver métodos alternativos e eficazes para o controle de doenças.

Algumas espécies de leveduras apresentam a habilidade de produzir compostos antimicrobianos, como a toxina *killer*, que podem causar a morte de fungos. O fenômeno *killer* foi inicialmente descoberto por Bevan e Makower (1963) em *Saccharomyces cerevisiae*, isolado de indústria cervejeira, sendo caracterizado pela produção de proteínas ou glicoproteínas, de baixa massa molecular, letais às células microbianas sensíveis, porém, com imunidade das células produtoras ao efeito de sua própria toxina (SCHMITT; BREINIG, 2002).

Várias linhagens de *S. cerevisiae* apresentam o fenômeno *killer*, podendo ainda ser classificada como sensível ou neutro. A diferença entre os mecanismos de ação da toxina depende de sua base genética, cromossômica, plasmidial ou, codificado por elementos extra cromossômicos associados a partículas virais na forma de dsRNA (WICKNER, 1996; MAGLIANI et al., 1997), sendo esta última a mais comum em *S. cerevisiae*. Assim, existem dois elementos responsáveis pelo fenótipo *killer*, o M-dsRNA o qual carrega a informação genética tanto da formação da toxina quanto da resistência e o LA dsRNA que codifica a síntese do capsídeo proteico (GEORGOPOULOS; LEIBOWITZ, 1987; SCHMITT; BREINIG, 2006). O fenótipo *killer* só é ativo na levedura se a mesma apresentar as duas formas do dsRNA. De acordo com a literatura, as leveduras *killer* são classificadas em 11 grupos distintos (K1-K11), baseados nas reações do fator *killer* e de imunidade (KEPEKÇI, 2006). Para linhagens *killer* de *S. cerevisiae* são descritos quatro tipos de toxina, denominadas de K1, K2, K28 e Klus (RAMÍREZ et al., 2015). As toxinas K1 e K2 exibem modo de ação similar, agindo na parede

celular do fitopatógeno podendo levá-lo a morte (SCHMITT; BREINIG, 2006). A toxina K28 tem como ação o bloqueio da síntese de DNA (SCHMITT; TIPPER, 1995). O fenótipo Klus tem função desconhecida (RODRÍGUEZ-COUSIÑO et al., 2011).

Controle por leveduras *killer* tem sido demonstrado, onde resultados positivos foram obtidos por Weiler e Schmitt (2003) no controle do fungo *Fusarium oxysporum* com a levedura *Zygosaccharomyces bailii*. De acordo com Santos, Sanchez e Marquina (2004), a toxina *killer* produzida por *Pichia membranifaciens* é capaz de inibir o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*. Walker et al. (2005) observaram que leveduras *killer* mostraram capacidade em inibir fortemente o crescimento micelial de *Heterobasidium annosum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium equiseti*. Segundo Coelho (2005) o patógeno *Penicillium expansum* em maçã foi controlado em testes *in vitro* pela utilização de leveduras *Candida guilliermondii* e *Pichia ohmeri*, ambas *killer*. KEPEKÇI (2006) observou que a proteína *killer* tipo K5 produzida por *Pichia anomala* é uma exo β -1,3 glucanase que tem atividade antifúngica, sendo efetiva, principalmente, para os patógenos de pós-colheita, *B. cinerea*, *P. digitatum* e *P. italicum*. Dados semelhantes foram obtidos por Platania et al. (2002), que verificaram que *Wickerhamomyces anomalus*, quando cultivada sobre meio acidificado, demonstrou atividade *killer* contra *P. digitatum*, indicado pelo grande halo de inibição e danos sobre as hifas do fitopatógeno.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar a toxina *killer* da linhagem de *S. cerevisiae* ACB-K1 e avaliar sua atividade antagônica sobre os patógenos de pós-colheita de citros, *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância do Citros

A cadeia citrícola representa um importante segmento agroindustrial para a economia brasileira. O Brasil destaca-se como maior produtor de laranja do mundo, sendo o estado de São Paulo o maior exportador de suco de laranja concentrado congelado, onde o valor das exportações somado a outros derivados gera cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais (LOPES et al, 2009). A safra de 2016/2017 alcançou uma produção de 245,31 milhões de caixas de 40,8 kg cada. A estimativa para a safra de 2017/2018 almeja uma produção total de 364,47 milhões de caixas de laranja (FUNDECITRUS, 2017).

Além de gerar divisas econômicas, o setor tem grande impacto na geração de empregos de forma direta e indireta, contribuindo para a balança comercial nacional, tanto na geração de capital, quanto no desenvolvimento regional (LOPES et al, 2009; ZULLIAN; DÖRR; ALMEIDA, 2013).

O Brasil é um dos maiores produtores de citros, tanto para o consumo *in natura* como na forma industrializada em sucos concentrados. Foi estimado que a cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são provenientes de pomares brasileiros (NEVES, 2010). Dada a importância econômica e social da citricultura para o país, este setor enfrenta inúmeras pragas e doenças que limitam sua produção, dentre tais problemas, destacam-se as doenças de pós-colheita, e, dentre essas, o bolor verde e a podridão azeda.

2.2. Bolor verde

O bolor verde causado pelo fungo *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. é considerado a principal doença da pós-colheita dos citros, principalmente, em condições de climas quentes. A infecção pelo patógeno ocorre por meio de ferimentos onde os nutrientes estão disponíveis e estimulam a germinação dos conídios que se encontram depositados na superfície do fruto (LARANJEIRA et al., 2005).

Atualmente, o controle do bolor verde em *packing-house* baseia-se no tratamento de frutos com fungicidas, como imazalil (IMZ) e tiabendazol (TBZ). Estes fungicidas são utilizados sozinhos, em misturas, ou aplicados separadamente, em sequência, sendo os mesmos utilizados há mais de 25 anos, o que contribui para a proliferação de linhagens do patógeno resistentes aos princípios ativos utilizados (ISMAIL; ZHANG, 2004).

Embora os fungicidas químicos sintéticos sejam ainda muito efetivos no controle do bolor, o uso indiscriminado pode deixar resíduos no produto, sendo necessário desenvolver métodos alternativos e eficazes para o controle da doença.

2.3. Podridão azeda

A podridão azeda, causada pelo fungo leveduriforme *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) R. Cif. & F. Cif. (Sinônimo *Geotrichum candidum* Link) (PITT; HOCKING, 1997) é uma das doenças mais importantes para a pós-colheita de citros, sendo reportada em todos os países produtores, e em todas as espécies e cultivares de citros (TALIBI et al., 2011).

A infecção ocorre em frutos feridos e lesionados e a penetração do fungo ocorre pela casca e se estende até o albedo (LARANJEIRA et al., 2005), sendo a doença favorecida nas temperaturas de 25 a 30°C, principalmente, na fase de maturação do fruto (FERRAZ et al., 2016).

A presença de um filme de água sobre o fruto é essencial para a penetração de *Geotrichum*, sendo o fruto tomado completamente em quatro ou cinco dias por uma massa viscosa, frequentemente, associada ao bolor verde, e até mesmo estimulada por sua presença (SUPRAPTA; ARAI; IWAI, 1995; BROWN, 2003; TOURNAS, 2005; LIU et al., 2009; PALOU; SMILANICK; CRISOSTO, 2009).

No Brasil, em particular, dentre as medidas que são utilizadas durante o beneficiamento de frutos cítricos para o controle das podridões, a utilização de produtos químicos não é eficaz para o controle do *G. citri-aurantii*, uma vez que, não há fungicida registrado para o controle da podridão azeda. Ortofenilfenato de sódio (OPP) é o único agroquímico capaz de reduzir parcialmente essa doença (FENG et al., 2011; LIU et al., 2009), no entanto, em relatos prévios, tal

composto pode ser cancerígeno (KITAGAWA; KAWADA, 1984), podendo, trazer problemas à saúde pública. O produto químico Guazatine é comumente aplicado para reduzir a incidência da podridão azeda em pós colheita de citros, no entanto, não existe registro no Brasil. De acordo com Hao et al. 2010, a falta de fungicida registrado está se tornando um problema sério e um desafio na busca de estratégias efetivas e seguras no controle da doença.

2.4. Controle biológico

Segundo Machado et al. (2012) a aplicação de métodos de biocontrole ainda não é a primeira opção para os produtores brasileiros, e entre os aspectos que justificam a baixa aplicabilidade desta forma de controle, está a limitada disponibilidade de produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Outra justificativa é a difusão de conceitos, princípios e vantagens envolvidos no uso de bioprodutos que é deficiente e a limitação do conhecimento dos consumidores sobre as consequências para a saúde pública e ambiental do uso intensivo de agrotóxicos. Para o desenvolvimento de produtos de biocontrole, há necessidade de vários passos, como: coleta, isolamento, identificação e caracterização dos micro-organismos; desenvolvimento da produção dos mesmos em meios de cultivo; otimização do processo fermentativo e escalonamento dos processos; estudos de formulação e aplicação em campo; obtenção do Registro Especial Temporário (RET); registro e comercialização do produto (SILVA; MELLO, 2007).

A dependência de agrotóxicos no combate as doenças se torna um desafio para os pesquisadores e produtores, que apesar de ainda serem eficazes no controle, apresentam inúmeras consequências indesejáveis como: o aumento de resíduos químicos nos frutos (LOPES, 2009); o surgimento de linhagens de patógenos resistentes aos princípios ativos; a diminuição de microrganismos benéficos; o efeito dos produtos sobre plantas não alvo; o surgimento de doenças secundárias, além dos possíveis danos à saúde humana e ao meio ambiente (GRIGOLETTI JR et al., 2000).

O controle biológico se baseia nas interações antagônicas entre microrganismos antagonistas e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de ação (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991). Tendo como

premissa básica manter a densidade populacional das espécies de pragas, associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis (LIMA; MARCO; FELIX, 2000).

Desta forma, o controle biológico vem de encontro a essa demanda, pois visa manter, através de práticas específicas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não-patogênicos do sistema (GRIGOLETTI JR et al., 2000).

A utilização de microrganismos no biocontrole de patógenos de plantas tem sido considerada uma alternativa natural em substituição parcial ou total ao tratamento químico (MORETTO et al., 2014). Além disso, não contamina os alimentos e nem o ambiente, participando naturalmente da ciclagem dos nutrientes (FERRAZ et al., 2016). Dentre os mecanismos de ação utilizados pelos agentes de controle biológico, são mais conhecidos a antibiose, competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo, produção de enzimas líticas e indução de resistência no hospedeiro (CHAUR TSUEN, 1998).

As leveduras são potencialmente mais efetivas no controle de doenças de pós-colheita, pois são fenotipicamente mais adaptadas a esses nichos e são hábeis na colonização e competição por espaço e nutrientes (FILONOW, 1998; COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003). Possuem baixa mico-toxicidade, visando a segurança alimentar no consumo de frutos *in natura*, podendo ser tolerantes aos fungicidas frequentemente utilizados na pós-colheita (LAHLALI et al., 2011).

Existem produtos encontrados no mercado a base de leveduras, como é caso de *Candida oleophila* e *Cryptococcus albidus* registradas como Aspire® (Ecogen Inc., Langhorn, PA) e YieldPlus® (Anchor Yeast, Cape Town, South Africa), respectivamente (DROBY et al., 2002).

2.4.1. Atividade *killer*

O fenômeno *killer* foi relatado pela primeira vez em isolados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua associação fenotípica com a presença de vírus de RNA de cadeia dupla (dsRNA) marcou o início da pesquisa em virologia de levedura no início da década de 1970 (BEVAN; MAKOWER, 1963; SHIMITT;

BREINIG, 2006). Shimitt e Breinig (2006) relataram que as leveduras que segregavam toxinas proteicas eram letais para cepas sensíveis, sendo designadas Leveduras *killer*.

Foi evidenciado que as cepas *killer* apresentavam atividade antimicótica notável e não estão restritas à *S. cerevisiae*, mas são frequentemente encontradas em outras espécies de leveduras e fungos (MAGLIANI et al., 1997; SCHMITT et al., 2002), incluindo *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum* e *Ustilago maydis* (SCHMITT et al., 2002).

O fenótipo *killer* não está exclusivamente associado aos vírus de dsRNA e também é codificado por plasmídeos dsDNA lineares em *Kluyveromyces lactis* e *Pichia acacia* (SCHAFFRATH; MEINHARDT, 2005) e codificados cromossomicamente em *Williopsis californica* e *Pichia farinosa* (THEINSEN et al., 2000; SUZUKI, 2005).

As estirpes de *S. cerevisiae killer* foram agrupadas até agora em quatro tipos (K1, K2, K28 e Klus) com base em seus perfis *killer* e falta de imunidade cruzada (RAMÍREZ et al., 2015). Os membros de cada grupo podem matar leveduras sensíveis ao fator *killer*, sendo também letais para outras espécies de leveduras (RODRIGUEZ-COUSIÑO et al., 2011). Cada levedura *killer* é imune a sua própria toxina ou toxinas produzidas por estirpes do mesmo tipo *killer* (SCHMITT; BREINIG, 2006). *S. cerevisiae* tipo K1, K2, K28, e Klus são codificados pela cadeia positiva de tamanho médio (1,6-2,4 kb) dsRNA de vírus de levedura M1, M2, M28, e Mlus (RAMÍREZ et al., 2015).

Os quatro M de dsRNA codificador da toxina não mostram nenhuma identidade de sequência umas com as outras (SCHMITT; TIPPER, 1995; RODRIGUEZ-COUSIÑO et al., 2011). Estes vírus M dependem de um segundo vírus auxiliar de dsRNA de grande dimensão (4,6 kb), LA, para manutenção e replicação. LA fornece os capsídeos e polimerase em que ambos LA e M dsRNAs são encapsidadas e replicados separadamente (SCHMITT; BREINIG, 2006). O fenômeno *killer* associado ao dsRNA é transmitido verticalmente de mãe para levedura filha, e horizontalmente por acasalamento (SCHMITT; BREINIG, 2002), um procedimento pelo qual uma nova cepa poderia surgir (MAQUEDA et al., 2010).

O fenótipo *killer* pode sofrer um processo de cura e inativação da toxina quando submetido ao tratamento com cicloheximida (CARROLL; WICKNER,

1995; MAQUEDA et al., 2010), ou através de altas temperaturas (SCHAFFRATH; BREUNIG, 2000; SOARES; SATO, 1999).

Trabalhos de pesquisa sobre caracterização das toxinas *killer* têm demonstrado a existência de diferenças significativas em relação à massa molecular estimada em 20KDa para um isolado de *S. cerevisiae* (GOTO et al., 1990), 100KDa para *Kluyveromyces lactis* (SUGISAKI et al., 1984), 18KDa para *Hanseniaspora uvarum* (RADLER; SCHMITT; MEYER, 1990), 300KDa para *Hansenula anomala* (KAGIYAMA et al., 1988), 47KDa para *Pichia anomala* NCYC 432 (IZGU; ALTINBAY; ACUN, 2006), 11KDa para *Williopsis saturnus* WC91-2 (WANG et al., 2012).

As toxinas de leveduras *killer* podem apresentar potencial de aplicação em mecanismos de processamento e secreção de proteínas (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002); no controle biológico de doenças na agricultura (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995); na tecnologia de preservação de alimentos (LOWES et al., 2000); em processos de fermentação alcoólica (YOUNG; YORGIU, 1978); vinhos (SANGORRÍN et al., 2001; LOPES et al., 2005; SANGORRÍN et al., 2007; LOPES et al., 2007); pão (BORTOL et al., 1986); na biotipagem de espécies patogênicas como *Candida albicans*, *Cryptococcus* spp. e *Staphylococcus epidermidis* (YOUNG; YORGIU, 1978; POLONELLI et al., 1985; FUENTEFRÍA et al., 2008); além do seu potencial terapêutico e preventivo em micoses superficiais e sistêmicas em humanos e animais (MAGLIANI et al., 2004; MAGLIANI et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Foram utilizados no presente estudo a levedura *killer Saccharomyces cerevisiae* ACB-K1, a levedura sensível ao fator *killer* (*S. cerevisiae* NCYC 1006) e os fitopatógenos *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*, todos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil. A cepa padrão *killer* tipo K1 (*Saccharomyces cerevisiae* KL88) foi cedida pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

3.2. Meios de cultura

O meio BDA (Batata-dextrose-ágar) foi utilizado para o crescimento dos fitopatógenos. Os meios YEPD (Extrato de levedura 1%; Peptona 2% e Glicose 2%) e YM (Extrato de levedura 0,3%; Extrato de Malte 0,3%; Peptona 0,5% e Glicose 1%) foram utilizados para manutenção da cultura da levedura. O meio ágar YEPD-azul de metileno (Extrato de levedura 1%; Glicose 2%; Peptona 2%, Ágar 2% e Azul de metileno 0,002%) tamponado com citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1 ou 4,6, foi utilizado para determinar a atividade *killer*.

3.3. Atividade *killer*

Para avaliar o fator *killer* da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 utilizou-se a metodologia descrita por Woods e Bevan (1968) e modificada por Ferraz et al. (2016). Foi avaliada a produção de toxina *killer* produzida por *S. cerevisiae* ACB-K1 contra a levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006) e contra os fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*.

S. cerevisiae ACB-K1 foi cultivada em meio líquido YM, a 27°C, sob agitação constante a 150 rpm por 12, 24 e 48 horas, com o objetivo de se verificar

o melhor tempo de incubação da cultura de levedura para a produção e atividade da toxina *killer*.

Uma alíquota de 400µL de uma suspensão de células de *P. digitatum*, *G. citri-aurantii* (10^5 esporos/mL) ou da levedura sensível (10^5 células/mL) foi transferida e espalhada na superfície de placas de meio ágar YEPD-azul de metileno pH 4,6. Após a secagem das culturas, discos de papel de filtro estéreis foram colocados sobre as culturas e, em seguida, uma alíquota de 20µL de suspensão (1×10^5 células/mL) de *S. cerevisiae* ACB-K1, de acordo com os diferentes tempos de incubação da levedura, foi adicionado sobre os mesmos. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 25°C e a atividade *killer* foi avaliada após 48 horas.

3.4. Produção da toxina *killer* bruta de *S. cerevisiae* ACB-K1

A levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 foi crescida em meio líquido YEPD por 24 horas a 150 rpm em temperatura ambiente, em seguida foi centrifugada a 3xg por 10 min e o sobrenadante foi esterilizado utilizando membranas Millipore® (0,22 µM), para utilização dos testes posteriores seguindo a metodologia adaptada de Soares e Sato (2000).

3.4.1. Condições ótimas para determinação da atividade *killer*

Um importante parâmetro para a detecção da atividade *killer* é o pH do meio de cultura e a temperatura de incubação escolhido, geralmente, expressa em condições ácidas entre temperatura de 22 e 28°C (SCHMITT; BREINIG, 2002). Assim, alíquotas de 20µL do sobrenadante da cultura, obtido conforme o item 3.4, foram avaliados quanto sua atividade *killer*, como descrito no item 3.1, em meio de cultura ágar YEPD-azul de metileno ajustado ao pH 3,5; 3,8; 4,1; 4,6; 4,9 e 5,4, e incubadas a 4, 22, 25 e 30 °C e avaliadas quanto ausência ou presença do halo de inibição após 48 horas, seguindo a metodologia de Polonelli et al., 1983.

3.4.2. Efeito do pH na estabilidade da toxina *killer*

Aferiu-se o pH do sobrenadante filtrado, obtido conforme o item 3.4, com NaOH ou HCl até atingir o pH 2,0; 3,0; 3,5; 3,8; 4,1; 4,6; 4,9; 5,4; 6,0; 7,0 e 8,0. As amostras foram incubadas por 24 horas à -25 °C, 4 °C e 25°C, em seguida alíquotas de 20µL do sobrenadante foi avaliado quanto sua atividade *killer* contra o *P. digitatum*. As culturas foram incubadas em BOD a 22 °C e avaliadas quanto ausência ou presença do halo de inibição após 48 horas.

3.5. Métodos de precipitação da proteína *killer* da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1

A levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 foi cultivada em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido YEPD. Após 24 horas de crescimento, 2 mL foram transferidos para outros frascos contendo o mesmo meio de cultura, para manter o padrão de crescimento uniforme, mantidos a 150 rpm em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10xg por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para obtenção da proteína *killer* como descrito a seguir.

3.5.1. Precipitação da proteína *killer* com etanol ou acetona

A proteína *killer* do sobrenadante do meio de cultura foi precipitada com etanol ou acetona numa proporção 1:2 (v/v). O solvente previamente resfriado a 4°C (667 mL) foi adicionado em 333 mL do sobrenadante da cultura, deixado durante a noite a 4 °C, centrifugando-se em seguida a 10xg por 15 min e ressuspendendo-se em 1 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1. O precipitado obtido foi armazenado em freezer a -80 °C e concentrado em liofilizador por 24 h, em seguida diluído em H₂O MiliQ, sendo posteriormente realizado a dosagem de proteína pelo Método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949).

3.5.2. Precipitação da proteína *killer* com sulfato de amônio

A proteína *killer* do sobrenadante do meio de cultura foi precipitada com sulfato de amônio com 80 % de saturação. Uma quantidade de 176g de sulfato de amônio foi dissolvido em 314 mL de sobrenadante com auxílio de um agitador magnético e a solução foi mantida durante a noite a 4 °C. A amostra foi centrifugada a 10xg por 15 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1. O precipitado foi dialisado em membrana de celulose de retenção de proteínas acima de 12 kDa, por 48 horas a 4 °C, utilizando 1 L de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1, com duas trocas diárias. O precipitado dialisado foi armazenado em freezer a -80 °C e concentrado em liofilizador por 24 h, em seguida diluído em H₂O MiliQ, sendo posteriormente realizado a dosagem de proteína pelo Método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949).

3.5.3. Caracterização do perfil de proteínas das preparações de toxina *killer* por SDS-PAGE

Para caracterizar o perfil proteico das preparações de toxina *killer*, utilizou-se SDS-PAGE 13% em Tris-glicina (pH 8.3) com eletroforese a 20mA por 2h30min. As amostras foram preparadas em condições redutoras com tampão contendo Tris-HCl (0,188 M, pH 6,8), glicerol (35,9%), SDS (6%), β-mercaptoetanol (15%) e azul de bromofenol (0,01%), na proporção 1:1 (v/v) e aquecidas (100 °C, 5 min), previamente à aplicação no gel. Este foi corado com solução de Azul de Comassie R-350 e descorado com ácido acético e álcool etílico (10% v/v). Foram aplicados 10 µg/µL das amostras no gel.

3.6. Teste da cura do fenótipo *killer*

A levedura *killer S. cerevisiae* ACB-K1 foi cultivada por 12 horas a 27 °C em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido YM. Posteriormente, 100 µL da suspensão da levedura (10⁶ células/mL) foi plaqueada em: 1) meio ágar YM (com incubação das culturas a 40°C e a 26°C), 2) meio ágar YM contendo cicloheximida (1mg/mL) e incubada a 26°C. O tempo

de incubação foi de 72 horas, de acordo com os respectivos tratamentos. Posteriormente, as culturas foram repicadas para meio líquido YM, incubadas por 12 horas, sob agitação constante (150 rpm) a 27 °C e submetidas ao teste de atividade *killer*, como descrito no item 3.3. As avaliações do fator *killer* foram realizadas 48 horas após o teste de atividade.

3.7. Extração e detecção de elementos de RNA fita dupla (dsRNA) da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1

A extração de dsRNA foi realizada de acordo com o método descrito por Maqueda et al. (2010). As culturas foram crescidas em meio de cultura YEPD, durante a noite a 150 rpm, centrifugadas a 3xg por 6 min. A massa celular foi lavada com Na₂EDTA 50 mM (pH 7,5), centrifugada novamente, e incubada em 1 mL de Tris-H₂SO₄ 50 mM, pH 9,3 contendo 1% de 2-mercaptoetanol durante 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram centrifugadas à 4xg por 10 min e ressuspensas em 1 mL de NaCl 0,1 M / Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 / Na₂EDTA 10 mM / 0,2% (SDS). Em seguida, adicionou-se 0,7 mL de fenol saturado e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 min com agitação. A fase aquosa contendo os ácidos nucleicos foi recuperada (800 µL). Os ácidos nucleicos foram precipitados com adição de 1/10 volume (80 µL) de acetato de sódio 3 M e 1mL de isopropanol a 4°C, incubando-se durante 5 min em temperatura ambiente e centrifugando-se a 10xg por 10 min a 4 °C. O material genético precipitado foi lavado com etanol 70%, seco por 2 min e dissolvido em 50 µL de TE pH 8,0. A amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 6µL de brometo de etídio, a 90 Volts por 2 horas. A digestão de DNA foi feita com o kit DNase I Amplification Grade (isenta de RNase) da Sigma-Aldrich, de acordo com as especificações do fabricante. A digestão de RNA foi realizada com RNase A (Sigma-Aldrich) seguindo as indicações do fabricante. Para a degradação seletiva do RNA de cadeia simples, as amostras foram incubadas com RNase A (10 µg/ml) a 37°C durante 30 min na presença de NaCl 1,6 e 2,5 M. Em seguida, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,6%, contendo 3µL de brometo de etídio, a 80 Volts por 1 hora.

3.8 Purificação parcial da toxina *killer* a partir do extrato bruto de *Saccharomyces cerevisiae* ACB-K1

3.8.1. Obtenção da proteína *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1

Para a obtenção da toxina *killer*, a cultura de *S. cerevisiae* cultivada em meio líquido YEPD foi centrifugada a 10xg por 15 min a 4 °C para a remoção de células e o sobrenadante submetido à precipitação com sulfato de amônio a uma saturação de 80% e mantido a 4 °C, por uma noite. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado a 10xg, a 4 °C por 15 min, e ressuspenso em 1 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1. O precipitado foi dialisado em membrana de celulose de retenção de proteínas acima de 12 kDa, por 48 horas a 4 °C, utilizando 1 L de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1, com duas trocas diárias. A amostra dialisada foi armazenada em freezer a -80 °C e concentrada em liofilizador por 24 h.

3.8.2. Purificação parcial da proteína *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1

A amostra dialisada de proteína *killer* (5 mL) em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 4,1) foi aplicada em uma coluna de cromatografia de exclusão molecular contendo gel de Sephadex G75 (1,6 cm x 100 cm) eluída em tampão formiato de amônio (0,05M, pH 4,1) em fluxo contínuo (0,6 mL/min; 6mL/tubo). As frações dos tubos 10 e 11; 18 a 25 e 28 a 30 foram reunidas e denominadas frações F1, F2 e F3 respectivamente e concentradas por liofilização por 24 h.

3.8.3. Avaliação das frações quanto à atividade *killer*

As frações F1; F2 e F3 foram diluídas em H₂O MiliQ e submetidas a análise por eletroforese em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) como descrito anteriormente. Em seguida, as frações foram avaliadas quanto à sua atividade *killer* contra o fungo *Penicillium digitatum* como descrito no item 3.3, utilizando 20 µL de cada fração, sendo as culturas incubadas por 48h. A atividade *killer* foi determinada pela presença ou ausência do halo de inibição.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade *killer*

Este ensaio teve por objetivo detectar o melhor tempo de cultivo da levedura *killer* *S. cerevisiae* ACB-K1 para a produção da toxina *killer*, avaliando-se a atividade antagônica contra a levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006) e contra os fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*. Observou-se que, o isolado ACB-K1 mostrou maior atividade *killer* quando cultivado a 27 °C durante 12 horas, comparado com 24 ou 48h. Na Figura 1 foi possível observar o halo de inibição tanto para o fitopatógeno *P. digitatum* quanto para a levedura sensível. Porém, não houve inibição para o patógeno *G. citri-aurantii*.

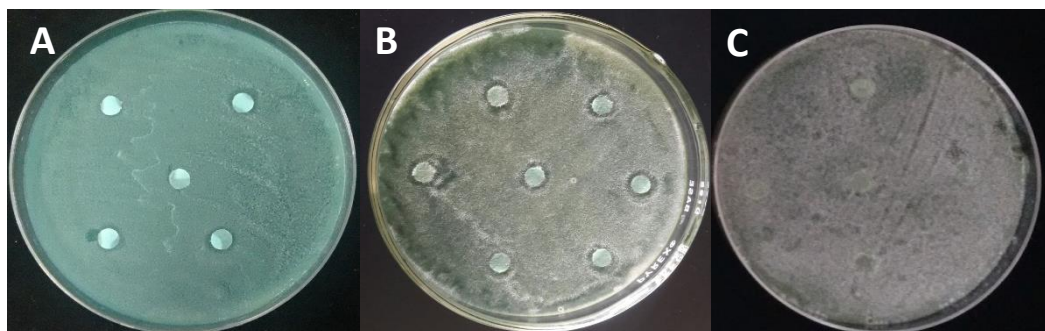


Figura 1: Atividade *killer*. A: Atividade *killer* da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 contra a levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006); B: Atividade *killer* da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 contra *Penicillium digitatum*; C: Atividade *killer* da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 contra *Geotrichum citri-aurantii*.

4.2. Produção da toxina *killer* bruta de *S. cerevisiae* ACB-K1

4.2.1. Condições ótimas para determinação da atividade *killer*

A tabela 1 ilustra o efeito do pH e da temperatura na atividade da toxina *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1 contra a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006 e os fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri aurantii*. Os resultados mostraram máxima atividade em pH 4,1 a 22°C e baixa atividade em pH 5,4 a 25°C, com a

levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006), como ilustrado na Figura 2. Observou-se que na temperatura de 4 °C houve atividade nos valores de pHs 3,5, 4,1 e 4,9. A temperatura de 30°C não foi adequada para se avaliar a atividade da toxina, não apresentando zona de inibição. Para o fitopatógeno *P. digitatum*, a atividade *killer* foi observada apenas em pH 4,1 a 22°C (Figura 3), não sendo detectado nos outros tratamentos.

Tabela 1. Atividade *killer* da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 em relação à levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006 e os fitopatógenos *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii* em meio YEPD-azul de metileno, em diferentes pH e temperatura.

<i>(S. cerevisiae</i> NCYC 1006)		pH				
Temperatura	3,5	3,8	4,1	4,6	4,9	5,4
4 °C	+(¹)	-(²)	+	-	+	-
22 °C	-	-	++(³)	-	-	-
25 °C	-	-	-	-	-	+
30 °C	-	-	-	-	-	-
<i>P. digitatum</i>		pH				
Temperatura	3,5	3,8	4,1	4,6	4,9	5,4
4 °C	-	-	-	-	-	-
22 °C	-	-	++	-	-	-
25 °C	-	-	-	-	-	-
30 °C	-	-	-	-	-	-
<i>G. citri-aurantii</i>		pH				
Temperatura	3,5	3,8	4,1	4,6	4,9	5,4
4 °C	-	-	-	-	-	-
22 °C	-	-	-	-	-	-
25 °C	-	-	-	-	-	-
30 °C	-	-	-	-	-	-

(¹) +: atividade *killer* \geq 1mm; (²) ++: atividade *killer* >1mm; (³) -: ausência de atividade *killer*.

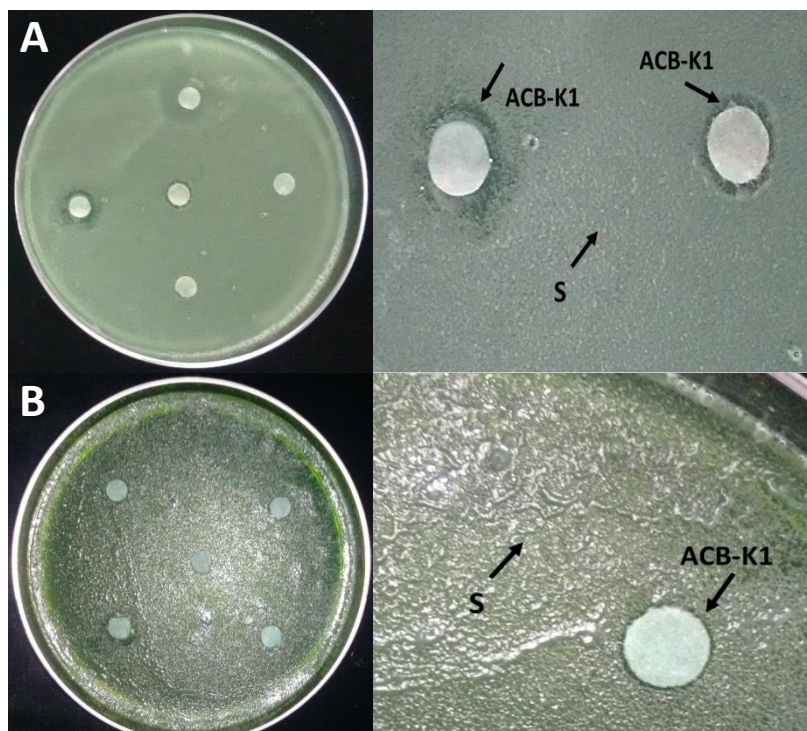


Figura 2. Atividade *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* (ACB-K1) apresentando halo de inibição da levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) em meio de cultura YEPD+ azul de metileno A: (pH 4,1) a 22 °C; B: (pH 5,4) a 25 °C.

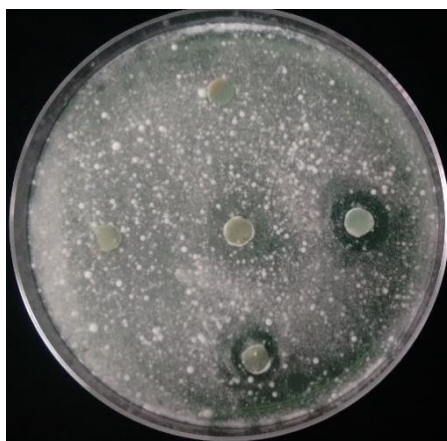


Figura 3. Atividade *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* (ACB-K1) apresentando halo de inibição contra *Penicillium digitatum* em meio de cultura YEPD+ azul de metileno em pH 4,1 a 22 °C.

4.2.2. Efeito do pH na estabilidade da toxina *killer*

A Figura 4 ilustra o efeito do pH na estabilidade da toxina *killer*. A toxina mostrou estabilidade em pH 3,5, apresentando estabilidade numa gama de pH de 4,1 a 6,0, após a incubação de 24h a 25°C, quando testada contra o patógeno *P. digitatum*. A atividade *killer* foi inativada após incubação de 24h nas temperaturas de 4 °C e -25 °C.

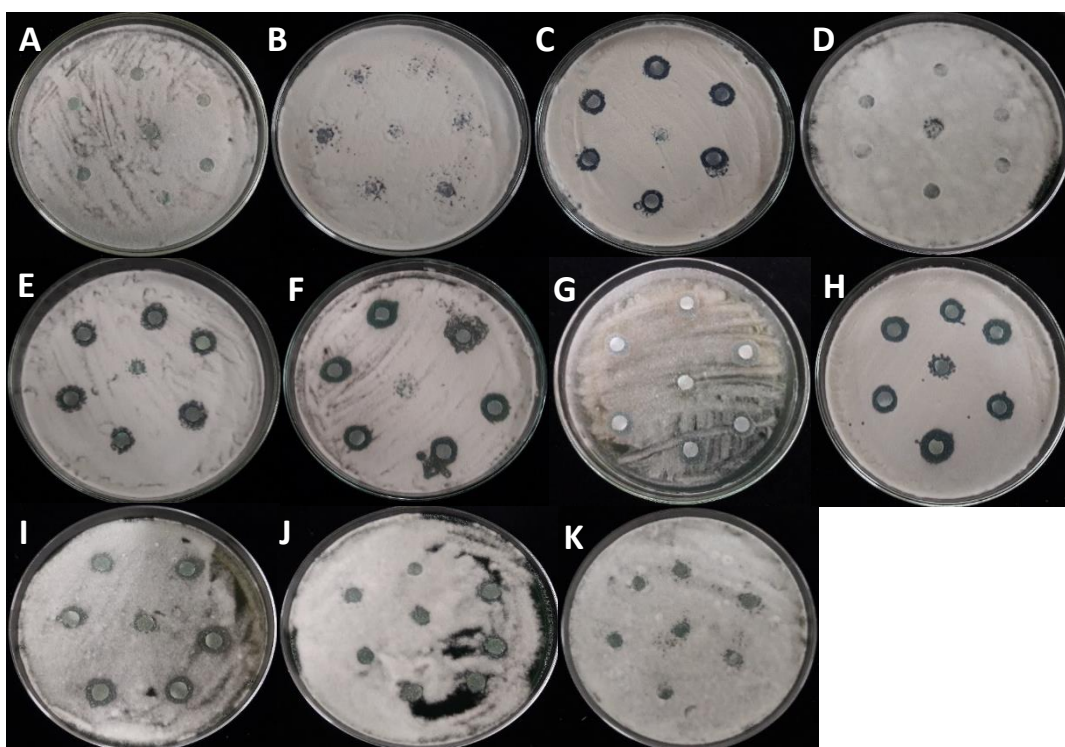


Figura 4. Efeito do pH na estabilidade da toxina *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1 contra *P. digitatum*. A: pH 2,0; B: pH 3,0; C: pH 3,5; D: pH 3,8; E: pH 4,1; F: pH 4,6; G: pH 4,9; H: pH 5,4; I: pH 6,0; J: pH 7,0; K: pH 8,0.

4.3. Métodos de concentração da proteína *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1

As diferentes formas de concentração da toxina *killer*, sulfato de amônio, etanol e acetona, determinou diferenças na quantidade de proteínas obtidas (Tabela 2). A precipitação com sulfato de amônio a 80% proporcionou maior rendimento de proteína, quando comparado com as outras precipitações. A Figura 5 ilustra as proteínas presentes nas preparações de proteína *killer*

precipitados com etanol, sulfato de amônio e acetona, analisados por SDS-PAGE.

Tabela 2: Teor de proteínas nas preparações de toxina *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1 concentradas por precipitação com sulfato de amônio, etanol e acetona.

Tratamentos	Proteínas (mg/mL)	Proteínas Totais
Precipitado de Sulfato de amônio	3,88	7,77
Precipitado de Etanol	1,6	3,2
Precipitado de Acetona	1,02	2,04

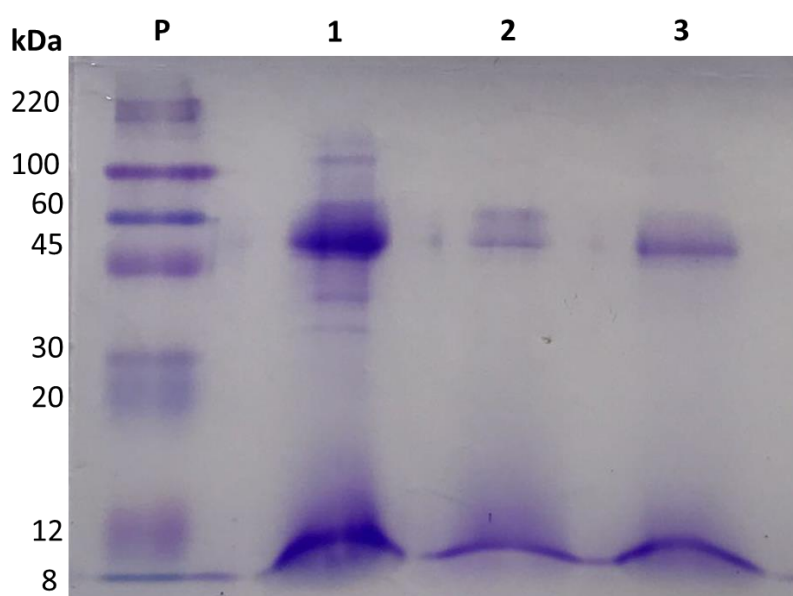


Figura 5: Eletroforese (SDS-PAGE) das preparações de toxina *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1 concentradas por precipitação com etanol, sulfato de amônio e acetona.

P – padrão de massa molecular 4-20% Tris-Glycine Sigma -C1992 (220 kDa, 100 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 12 kDa e 8 kDa); 1 – Preparação de toxina *killer* concentrada por precipitação com etanol; 2 – Preparação de toxina *killer* concentrada por precipitação com sulfato de amônio; 3 – Preparação de toxina *killer* concentrada por precipitação com acetona. Gel de poliacrilamida (acrilamida 13%), tampão Tris-glicina 0,1M, pH=8,3, SDS (0,1%). Condições

eletroforéticas: 2h, 20mA, 100V. Gel corado com Azul de Coomassie R-350, por 20 min e descorado com ácido acético (10% v/v).

4.4. Teste de cura do fenótipo *killer*

A Figura 6 ilustra o efeito do tratamento térmico da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1, a 40 °C e com cicloheximida na cura do fenótipo *killer* e correlação com elementos extra-cromossomais. O tratamento térmico a 40°C resultou em 100% de cura do fenótipo, levando à perda da capacidade de matar células do fitopatógeno (*P. digitatum*). O tratamento com cicloheximida não foi eficiente para cura do fenótipo *killer*.

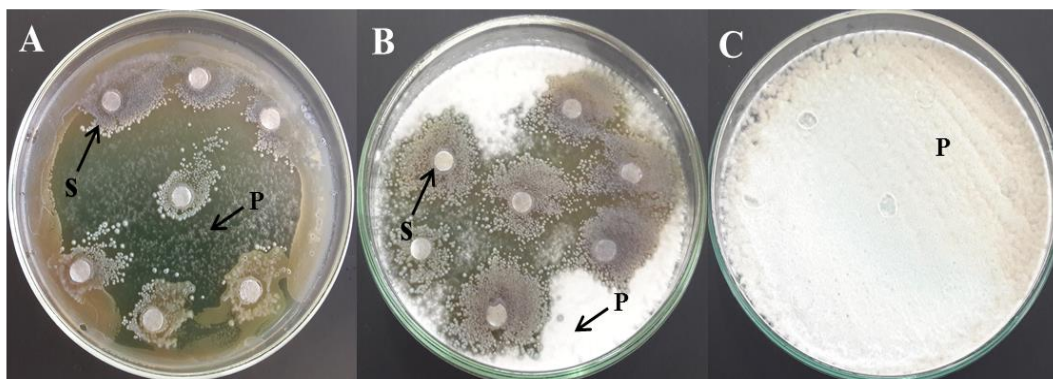


Figura 6: Teste de cura do fenótipo *killer*. **(A)** atividade *killer* positiva do isolado *Saccharomyces cerevisiae*-ACB-K1, sem tratamento de cura (22 °C), contra *Penicillium digitatum*. **(B)** *S. cerevisiae* ACB-K1, com tratamento de cura (cicloheximida, 1mg/mL) contra *P. digitatum*. **(C)** Crescimento do fitopatógeno *P. digitatum* após a submissão da levedura ao tratamento de cura (40 °C). P= *Penicillium digitatum*, S= *S. cerevisiae* ACB-K1.

4.5. Extração e detecção de elementos de RNA fita dupla (dsRNA) da levedura *S. cerevisiae* ACB-K1

A extração e detecção de dsRNA do isolado ACB-K1 foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e comparada com a cepa padrão *killer* *S. cerevisiae* (KL88), tipo K1 (Figura 7A). Neste experimento foi observada a presença das duas espécies de elementos dsRNA (LA e M-dsRNA) necessárias

para produção da toxina *killer*. Observou-se, também, a ausência das bandas de dsRNA no isolado que passou pelo processo de cura do fenótipo a 40 °C, comprovando a sua perda de atividade do item 3.4.

As moléculas de RNA são resistentes a digestão de RNase A na presença de concentração de NaCl, como esperado para dsRNA, mas não para RNA de cadeia simples (Figura 7B)

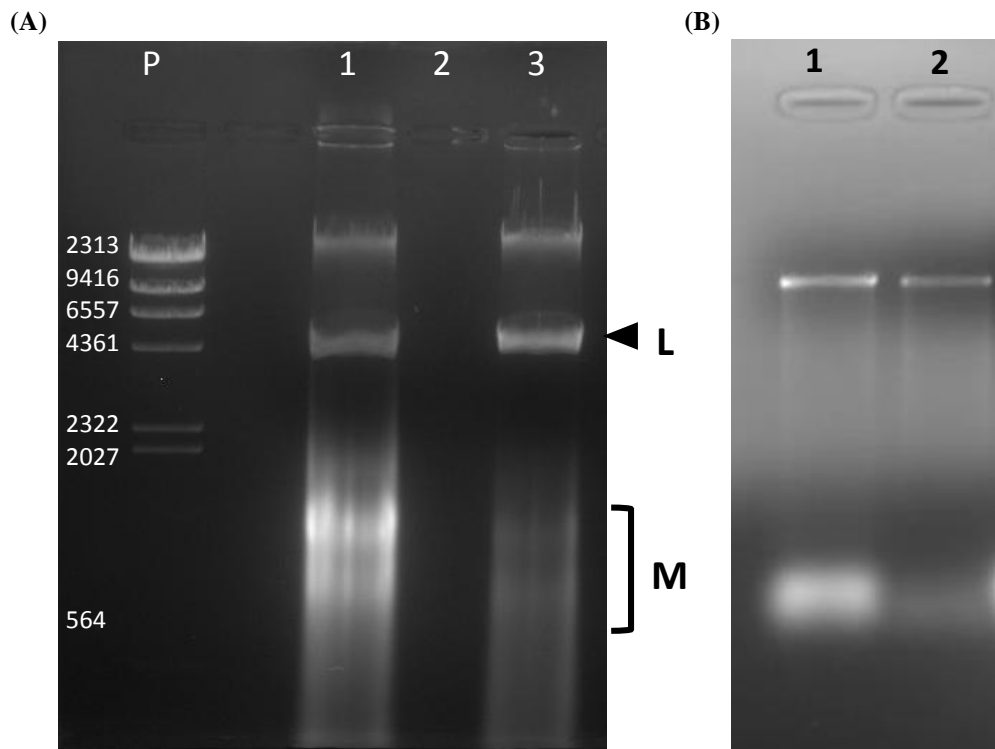


Figura 7: (A) Eletroforese em gel de agarose 1% da extração de dsRNA da levedura. P -Padrão de peso molecular λ HindI III; 1 - KL-88: *S. cerevisiae* padrão *killer*, tipo K1; 2 - ACB-K1 curada: *S. cerevisiae* (40 °C); 3 - ACB-K1: *S. cerevisiae* (22 °C). (B) Eletroforese em gel de agarose 0,6%, tratada com: 1 - DNase I Amplification Grade e RNase A na presença de NaCl 1,6 M; 2 - DNase I Amplification Grade e RNase A na presença de NaCl 2,5 M.

4.6. Purificação parcial da proteína *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1

A etapa de purificação parcial das proteínas consistiu na aplicação de preparação de toxina *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1 em uma coluna de cromatografia de exclusão molecular, de gel Sephadex G75. A Figura 8A ilustra a separação de proteínas, divididas em três frações denominadas F1, F2 e F3.

A Figura 8B ilustra a eletroforese SDS-PAGE das frações F1, F2 e F3. Devido ao baixo rendimento do processo de purificação, não foi possível visualizar separação das bandas proteicas, dificultando determinar as diferenças quanto ao peso molecular (Figura 8B). Entretanto, os resultados preliminares mostraram que as frações (F1, F2 e F3), demonstraram características de biocontrole contra o fitopatógeno *P. digitatum* (Figura 9).

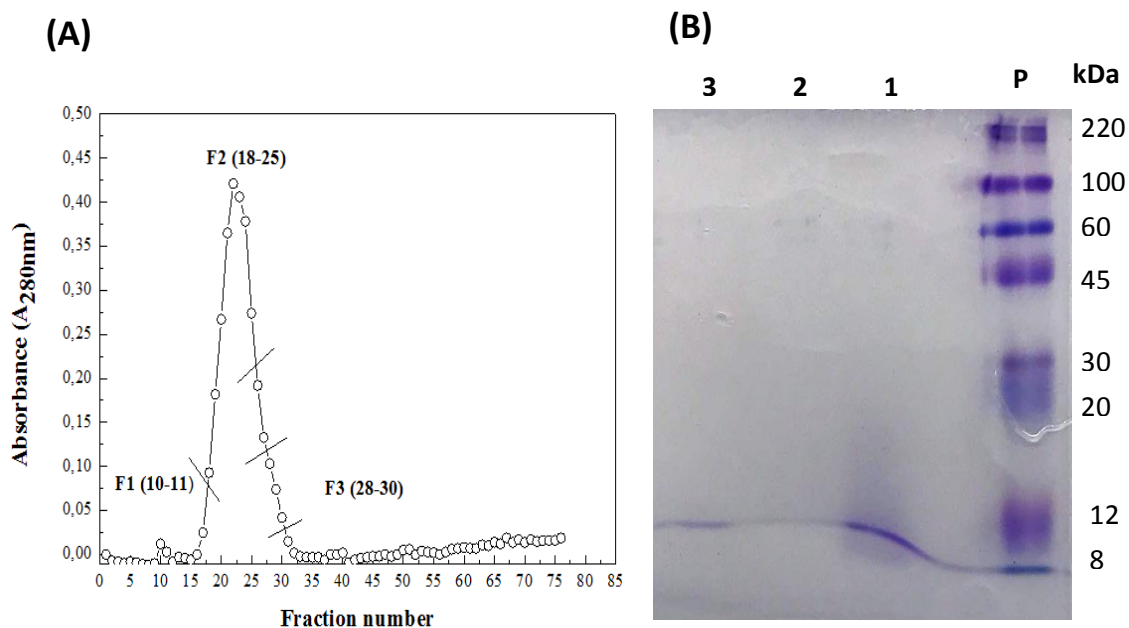


Figura 8. (A) Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 da preparação de toxina *killer* de *Saccharomyces cerevisiae*. **(B)** Eletroforese (SDS-PAGE) das frações 1, 2 e 3 obtidas da cromatografia em gel Sephadex G75.

P – Padrão de peso molecular 4-20% Tris-Glycine Sigma - C1992 (220 kDa, 100 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 12 kDa e 8 kDa); 1 – Fração1; 2 – Fração 2; 3 – Fração 3. Gel de poliacrilamida (acrilamida 13%), tampão Tris-glicina 0,1M, pH=8,3, SDS (0,1%). Condições eletroforéticas: 2h, 20mA, 100V. Gel corado com Azul de Coomassie R-350, por 20 min e descorado com ácido acético (10% v/v).

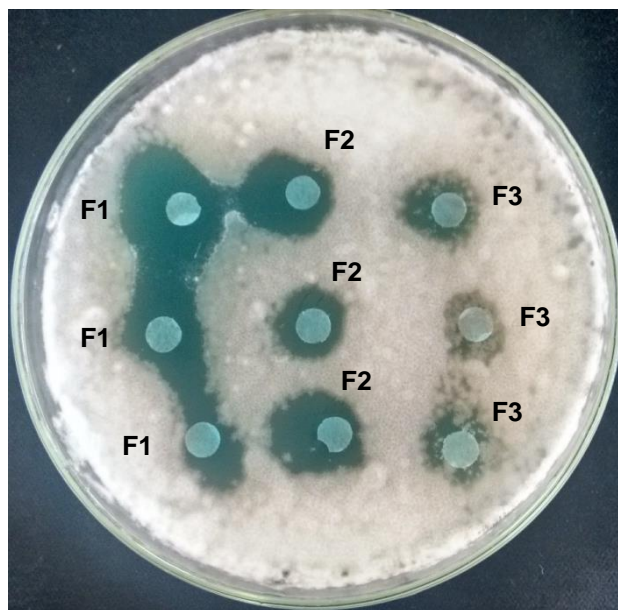


Figura 9. Avaliação da atividade *killer* das frações 1, 2 e 3, na concentração de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$, obtidas da cromatografia em gel Sephadex G75, utilizando-se *Penicillium digitatum* como microrganismo sensível. Frações de toxina *killer* diluídas em H_2O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. *P. digitatum* ($1,0 \times 10^5$ células/mL) repicados e incubados com as amostras das frações (48h, 22°C). Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição.

5. DISCUSSÃO

Muitos trabalhos na literatura têm comprovado a ação da toxina *killer* por leveduras no combate a fungos filamentos. Leal (2013) trabalhando com leveduras, relatou que as mesmas apresentaram atividade *killer* e antagonismo frente a alguns fungos, incluindo cepas do gênero *Penicillium*. De acordo com Wang et al. (2012) a produção de toxina *killer* produzida por *Williopsis saturnus* WC91-2 foi capaz de matar muitas estirpes de leveduras sensíveis, inclusive, de leveduras patogênicas. Em estudos anteriores, foi verificado que oito isolados de leveduras apresentavam atividade *killer* (FERRAZ et al., 2016). Aloui et al. (2015) ao estudar filmes bioativos contendo uma levedura *killer* *Wickerhamomyces anomalus*, mostrou que a mesma foi eficaz não apenas para reduzir a perda de peso e manter a firmeza das laranjas “Valencia” durante o armazenamento,

como também no controle do bolor verde nas frutas inoculadas em mais de 73% após 13 dias, demonstrando o potencial de aplicação deste revestimento bioativos como uma alternativa efetiva e promissoras. Com base nestes trabalhos, testou-se a atividade *killer* do isolado de *S. cerevisiae* ACB-K1 em fitopatógenos pós-colheita de citros, *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*, causadores do bolor verde e a podridão azeda, respectivamente. Os experimentos mostraram atividade contra *S. cerevisiae* NCYC 1006 e *P. digitatum* mas não contra *G. citri-aurantii*.

No presente trabalho, os efeitos do pH e temperatura foram analisados para a toxina *killer* de *S. cerevisiae* ACB-K1, sendo observado maior atividade em pH 4,1 e 22°C, e baixa atividade em pH 5,4 a 25 °C. Dados de literatura relatam que a atividade *killer* apresenta maior atividade sob condições ácidas (pH 3 a 6) com melhores resultados entre pH 4 a 5 (WOODS; BEVAN, 1968; SOARES; SATO, 2000), e temperatura numa faixa de 22 a 25°C (SOARES; SATO, 2000). Os resultados da avaliação do efeitos dos pH e da temperatura na atividade *killer* de *T. globosa* (1S112), dentre os valores de pH estudados por Rosa (2009), demonstraram que o pH 4,5 com temperatura de 25 °C foi o que apresentou melhor resultado, indicando ser a condição mais favorável para a atividade *killer*.

No estudo de Marquina et al., (2001), a toxina *killer* da levedura *Debaryomyces hansenii* mostrou-se estável durante uma semana a 15°C ou abaixo. Neste estudo a toxina foi filtrada com membrana Millipore® (0,45 µM) e incubada durante mais de 5 dias a 20°C, apresentando perda significativa de (25%) da atividade *killer* em condições padrão (pH 4,0, 20°C). Quando mantido a 30°C por 24 h em pH 4,0, mais de 50% atividade foi nula e, a 25°C, cerca de 45% foi perdida dentro de 7 dias. A toxina *killer* mostrou-se estável em pH 4,5 ou inferior quando mantida a 20°C durante 1 h. A toxina *killer* de *D. hansenii* mostrou-se estável em valores de pH ácidos e, acima de pH 4,8, a inativação aumentou significativamente (90%), sendo completamente destruída em pH 5,1. Izgü, Altinbay e Sertkaya (2005) ao estudar a levedura *killer Pichia anomala* do tipo K5, observou a estabilidade da toxina a pH entre 3 a 5,5 em temperaturas até 37°C, com amplo espectro de ação indicando seu potencial biotecnológico como agente antifúngico.

As metodologias de precipitação de proteínas antimicrobianas são usualmente empregadas no isolamento de glicoproteínas (SANTOS et al., 2004), apresentando ampla atividade no sobrenadante da cultura (POLI, 2009), resultados estes, que corroboram os obtidos neste trabalho, onde os testes de atividade foram realizados com o sobrenadante da cultura. De acordo com as dosagens das diferentes precipitações analisadas neste trabalho, o sulfato de amônio 80% foi o que apresentou maior eficiência no rendimento de proteínas precipitadas do ACB-K1, seguido pela precipitação de acetona e etanol (duas vezes o volume). A precipitação com sulfato de amônio é uma das técnicas mais usadas em purificação de proteínas (SCOPES, 1994), está se baseia no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas proteicas se agregam e precipitam (BORZANI et al., 2001).

A perda do fenótipo *killer* é comprovada após submeter a levedura a tratamentos com temperaturas altas ou, com cicloheximida, produzindo células filhas sem capacidade antagônica (SOARES; SATO, 1999), possuindo assim, um efeito inibitório na síntese proteica (HARTWELL, 1970).

Segundo Soares e Sato (1999), ao analisar a cura da característica *killer* em cepas de *S. cerevisiae* 40% das células tiveram seu fenótipo inativado a 40°C. Por outro lado, a linhagem apresentou resistência a cicloheximida, considerada, portanto, ineficiente para o tratamento de cura do fenótipo, dados que estão de acordo com o presente estudo, o qual demonstrou a cura de 100% do fator *killer*, quando submetido a temperatura elevada de 40°C e a ineficiência do cicloheximida. Reafirmado por Rosa (2009) que verificou que temperaturas superiores a 30°C podem inativar a ação das toxinas *killer*.

A levedura *S. cerevisiae* produz toxinas proteicas letais K1, K2, K28 e Klus, codificadas geneticamente por vírus de RNA de cadeia dupla (dsRNA) agrupados em três tipos M1, M2, M28 e Mlus, o qual codifica a toxina. Dependente de um segundo vírus dsRNA (LA), responsável pela manutenção e replicação (RAMÍREZ et al., 2015). O isolado de levedura *S. cerevisiae* ACB-K1 apresentou as duas espécies de plasmídeo (LA e M-dsRNA), sugerindo que a base genética para a produção da toxina é extra-cromossomal, o que explica sua atividade antagônica contra a levedura sensível e *P. digitatum*. Já o isolado ACB-K1 curada ao perder as bandas do dsRNA não apresentou atividade *killer*. Dado similar ao obtido por Golubev, Pfeiffer e Golubeva (2002) que, ao curar o fenótipo

killer da estirpe *Cystofilobasidium infirmominiatum*, resultou em perda de atividade e imunidade à toxina da estirpe original. Isso mostra claramente que os dsRNAs determinam o fenótipo *killer*. Rosa (2009) demonstrou que as linhagens de levedura *Torulaspota globosa* (1S112) e *Kluyveromyces marxianus* não apresenta o elemento viral de dsRNA, indicando que o gene *killer* presente pode ser cromossômico. Segundo Maqueda et al. (2010), todas as bandas de dsRNA podem desaparecer após o tratamento das amostras com RNase A, mas permaneceram após o tratamento com DNAase (sem RNase).

A purificação parcial mostrou que as frações (F1, F2 e F3) na concentração utilizada, demonstraram características de biocontrole contra o fitopatógeno *P. digitatum*. Muitos trabalhos vêm evidenciando resultados positivos da toxina *killer* no controle de fitopatógenos. De acordo com Weiler e Schmitt (2003) o fungo *Fusarium oxysporum* foi controlado através da levedura *killer Zygosaccharomyces bailii*. O controle de *Botrytis cinerea* em maçã foi obtido pela ação da toxina *killer* produzida por *Pichia membranifaciens* (SANTOS; SANCHEZ; MARQUINA, 2004). Walker et al. (2005) observaram que leveduras *killer* mostraram capacidade em inibir fortemente o crescimento micelial de *Heterobasidium annosum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, entre outros. Coelho (2005), em seu estudo de controle de *Penicillium expansum* em maçã, observou que as leveduras *Candida guilliermondii* e *Pichia ohmeri*, ambas *killer*, foram capazes de controlar o fungo em testes *in vitro*.

6. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

a) *Saccharomyces cerevisiae*-ACB-K1 apresenta atividade *killer* contra o fitopatógeno *Penicillium digitatum*;

b) As condições ótimas para a atividade *killer* correspondem a pH 4,1 e temperatura de 22°C;

c) Foi possível identificar dois elementos dsRNA (LA e M-dsRNA), sugerindo que a base genética para a produção da toxina é extra cromossomal, dado esse confirmado pela cura do fenótipo *killer* a 40°C;

d) As frações (F1, F2 e F3) obtidas pela purificação parcial demonstraram características de biocontrole contra o fitopatógeno *P. digitatum*;

e) A produção de toxina *killer* pelo isolado *S. cerevisiae* ACB-K1 precisa ser explorada quanto à produção de um bioproduto visando o controle do fungo *P. digitatum* causador do bolor verde em frutos cítricos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOUI, H.; LICCIARDELLO, F.; KHWALDIA, K.; HAMDI, M.; RESTUCCIA, C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus killer* yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest greenmold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal Food Microbiology**, v. 200, p. 22–30, 2015.

BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the *killer* character in yeast. **International Conference on Genetics**, v.1, p. 202-212, 1963.

BORTOL, A.; NUDEL, C.; FRAILLE, E.; DE TORRES, R.; GIULETTI, A.; SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 414-416, 1986.

BROWN, G. E. Sour rot. Causal organism and disease cycle. University of Florida. Institute of Food and Agricultural. **Science Extension Service Fact Sheet**, p. 137, 2003.

CARROLL, K.; WICKNER, R. B. Translation and M1 double-stranded RNA propagation: Mak18= rp141b and cycloheximide curing. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 10, p. 2887-2891, 1995.

CHAUR - TSUEN, L. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. **Plant Pathology Bulletin**, Oxford, v. 7 p. 155-166, 1998.

COELHO, A.R., **Controle de *Penicillium expansum*/Biodegradação de Patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita**. 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil, 2005.

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar: **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 37-358, 2003.

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; PORAT, R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 92, n. 4, p. 393-399, 2002.

FENG, L.; WU, F.; LI, J.; JIANG, Y.; DUAN, X. Antifungal activities of *Polyhexamethylene biguanide* and *Polyhexamethylene guanide* against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 61, n. 2-3, p. 160–164, 2011.

FERRAZ, L. P.; CUNHA, T.; SILVA, A. C. DA.; KUPPER, K. C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeast against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v.188, p. 72-79, 2016.

FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 8, n. 2, p. 243-256, 1998.

FUENTEFRÍA, A.M.; PEREZ, L.R.R.; AZEVEDO, P.A.; PAZZINI, F.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.; VALENTE, P. Typing of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains by a selected panel of Brazilian *killer* yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 25-30, 2008.

FUNDECITRUS. Sumário Executivo estimativa da safra de laranja 2017/18 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. **Fundo de defesa da Citricultura**. p. 1-5., maio. 2017. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2017_10_05_Sumario-Executivo-da-Estimativa-da-Safra-de-Laranja-2017-2018.pdf>. Acesso em: 05 abril de 2017.

GEORGOPOULOS, D. E.; LEIBOWITZ, M. J. Nucleotide phosphotransferase, nucleotide kinase and inorganic pyrophosphatase activities of *killer* virions of yeast. **Yeast**. v. 3, p. 117-129, 1987.

GOLUBEV, W. I.; PFEIFFER, I.; GOLUBEVA, E. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. **Fems Microbiology Ecology**, v. 40, p. 151-157, 2002.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GOTO, K.; IWASE, T.; KICHISE, K.; KITANO, K.; TOTSUKA, A.; OBATA, T.; HARA, S. Isolation and properties of a chromosome dependent KHR *killer* toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 505-509, 1990.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á. F. dos; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais, Curitiba, v. 30, n. 12, 2000.

HAO, W.; ZHONG, G.; HU, M.; LUO, J.; WENG, Q.; RIZWANUL-HAQ, M. Control of *citrus* postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology Technology**, v. 56, p. 39-43, 2010.

HARTWELL, L.H. The effect of cycloheximide upon polyribosome stability in two yeast mutants defective respectively in the initiation of polypeptide chain and in messenger RNA synthesis. **Molecular Genomics and Genetics**. v. 106, p. 347-361, 1970.

ISMAIL, M.; ZHANG, J. Post-harvest citrus diseases and their control outlooks. **Pest Manage**. v. 15, p. 29-35, 2004.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; SERTKAYA, A. Enzymic activity of the K5-Type yeast *killer* toxin and its characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 2200-2206, 2005.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; ACUN, T. *Killer* toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its β -1,3,-glucanase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 669-676, 2006.

KAGIYAMA, S.; AIBA, T.; KADOWAKI, K.; MOGI, K. New *killer* toxins of halophilic *Hansenula anomala*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 1-7, 1988.

KEPEKÇI, R.A. **Antifungal spectrum determination of the K5 type yeast *killer* protein of fungi causing spoilage in citrus fruits**. Thesis of Master. Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University (METU), Ankara, Turkey, 2006.

KITAGAWA, H.; KAWADA, K. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. Proceedings of the **Florida State Horticultural Society**, v. 97, p. 133-135, 1984.

LAHLALI, R.; HAMADI, Y. E. L.; GUILLI, M.; JIJAKLI, M. H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 56, n. 3, p. 217–224, 2011.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLLETA FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doença abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. cap. 18, p. 509-566.

LEAL, E. R. R. **Efecto *killer* en levaduras del género *Candida* de aislamientos clínicos y ambientales**. 2013.89f. Tese de doutorado - Universidad Autónoma de Nuevo León, 2013.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Controle biológico**. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000. v. 2, p. 263-304.

LIU, X.; WANG, L.P.; LI, Y.C.; LI, H.Y.; YU, T.; ZHENG, X.D. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Journal Applied of Microbiology**, v.107, p.1450–1456, 2009.

LOPES, C. A.; LAVALLE, T. L.; QUEROL, A.; CABALLERO, A. C. Combined use of *killer* biotype and mtDNA RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 147–156, 2005.

LOPES, C. A.; RODRÍGUEZ, M. E.; SANGORRÍN, M.; QUEROL, A.; CABALLERO, A. C. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 139–149, 2007.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. *In: Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas.* (BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.) 1ª ed. Jaquariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. Capítulo 2. P. 15-28.

LOWES, K.F. SHEARMAN, C. A.; PAYNE, J.; MACKENZIE, D.; ARCHER, D. B.; MERRY, R. J.; GASSON, M. J. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the mycocin HMK. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1066-1076, 2000.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. da, ANTONELLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p.274-288, 2012.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; FRAZZI, R.; RAVANETTI, L.; MAFFEI, D. L.; POLONELLI, L. Protective antifungal yeast *killer* toxin like antibodies. **Current Molecular Medicine**, v. 5, p. 443- 452, 2005.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast *killer* systems. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 10, n. 3, p. 39-400, 1997.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; SALATI, A.; VACCARI, S.; RAVANETTI, L.; MAFFEI, D.L.; POLONELLI, L. Therapeutic potential of yeast *killer* toxin like antibodies and mimotopes. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 11-18, 2004.

MAQUEDA, M.; ZAMORA, E.; RODRÍGUEZ-COUSIÑO, N.; RAMÍREZ, M. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. **Food Microbiology**, v. 27, p. 205–209, 2010.

MARQUINA, D.; BARROS, J.; SANTOS, A.; PEINADO, J.M. Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* *killer* toxin. **Microbiological Research**, v. 156, p. 387-391, 2001.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J.M. Biology of *killer* yeasts. **International Microbiology**, v. 5, p. 6571, 2002.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Multiplicação de agentes de controle biológico. *In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas*, Jaguariuna: **EMBRAPA-CNPDA**, 1991. p. 7-23.

MORETTO, C. ; CERVANTES, A. L. L.; BATISTA FILHO, A.; KUPPER, K. C. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, n. 22, p. 433–438, 2014.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Editora Marcos Fava Neves, 2010. 137 p.

PALOU, L.; SMILANICK, J. L.; CRISOSTO, C. H. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 5, p. 1037-1046, 2009.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. **Blackie Academic and Professional**, London, 2 ed., 1997.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G. Efficacy of *killer* yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**, v. 30, p. 219-225, 2002.

POLI, J. S., **Condições de detecção e expressão do fator *killer* produzido por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***. 2009, 113f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RG, Brasil, 2009.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, p. 774– 780, 1983.

POLONELLI, L.; CASTAGNOLA, M.; ROSSETTI, D. V.; MORACE, G. Use of *killer* toxins for computeraided differentiation of *Candida albicans* strains. **Mycopathologia**, v. 91, p. 175–179, 1985.

RADLER, F.; SCHMITT, M.J.; MEYER, B. *Killer* toxin of *Hanseniaspora uvarum*. **Archives of Microbiology**, v. 154, p. 175-178, 1990.

RAMÍREZ, M.; VELÁZQUEZ, R.; MAQUEDA, M.; LÓPEZ-PIÑEIRO, A.; RIBAS, J.C. A new wine *Torulasporea delbrueckii* *killer* strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded dRNA virus. **Frontiers Microbiology**, v. 6, p. 983, 2015. Disponível em: <doi:10.3389/fmicb.2015.00983>.

RODRÍGUEZ-COUSIÑO, N.; MAQUEDA, M.; AMBRONA, J.; ZAMORA, E. R. E.; RAMÍREZ, M. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* *killer* toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 1822-1832, 2011.

SANGORRÍN, M. P.; LOPES A. C.; GIRAUDO M. R.; CABALLERO A. C. Diversity and *killer* behaviour of indigenous yeasts isolates from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. **International Journal Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 351-357, 2007.

SANGORRÍN, M.; ZAJONSKOVSKY I.; LOPES C. A.; RODRÍGUEZ M. E.; VAN BROOCK M. R. G. de; CABALLERO A. C. *Killer* behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, p. 105–113, 2001.

SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, v. 159, p. 331-338, 2004.

SCHAFFRATH, R.; BREUNIG, K. D. Genetics and molecular physiology of the east *Kluyveromyces lactis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 173-190, 2000.

SCHAFFRATH, R.; MEINHARDT, F. *Kluyveromyces lactis* zymocin and related plasmid-encoded yeast *killer* toxins. in **Topics in Current Genetics: Microbial Protein Toxins** (eds Schmitt, M. J. & Schaffrath, R.) 133–155 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005).

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral *killer* system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 257-276, 2002.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Yeast viral *killer* toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**. v. 4, p. 212-221, 2006.

SCHMITT, M. J.; TIPPER, D.J. Sequence of the M28 dsRNA: Preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. **Virology**, v. 213, p. 341-351, 1995.

SCOPES, R. K., **Protein Purification – Principles and Practice**. 3. ed. New York: Springer – Velog, 1994, p.282.

SILVA, J. B. T. da; MELLO, S. C. M. de. Utilização de Trichoderma no Controle de Fungos Fitopatogênicos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 241, p.1-17, dez. 2007. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2023605/doc241.pdf>>. Acesso em: 20 maio de 2017.

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y-500-4L *killer* toxin. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 31, p. 291-297, 2000.

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. *Killer* toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischmann and Itaiquara commercial brands of yeast. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 253-257, 1999.

SUGISAKI, Y; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMASAKI, M.; TAMURA, G. Characterization of a novel *killer* toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of *Kluyveromyces lactis*. **European Journal Biochemistry**, v. 141, p. 241-245, 1984

SUPRAPTA, D. N.; ARAI, K.; IWAI, H. Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. **Mycoscience**, v. 36, p. 277-282, 1995.

SUZUKI, C. Acidiphilic structure and killing mechanism of the *Pichia farinosa* *killer* toxin SMTK. in **Topics in Current Genetics: Microbial Protein Toxins** (eds Schmitt, M. J. & Schaffrath, R.) 189–214 (Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 2005).

TALIBI, I.; ASKARNE, L.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E. H.; AOUMAR, A. A. B. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of organic and inorganic salts against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. **Plant Pathology Journal**, v. 10, p. 138-145, 2011.

TOURNAS, V. H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 31, n. 1, p. 33–44, 2005.

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between *killer* yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 127, p. 213–222, 1995.

WALKER, G.; HOUTHOOFD, K.; VANFLETEREN, J. R.; GEMS, D. Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. **Mechanisms of Ageing and Development**. p. 126, 2005.

WANG, X. X.; CHI, Z.; PENG, Y.; WANG, X. H.; RU, S. G.; CHI, Z. M. Purification, characterization and gene cloning of the *killer* toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. **Microbiological Research**, v. 167, p. 558- 563, 2012.

WEILER, F., SCHMITT, M.J. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 69-76, 2003.

WICKNER, R.B. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Reviews**, v. 60, p. 250–265, 1996.

WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the *killer* factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 51, p. 115-126, 1968.

YOUNG, T. W; YORGIU, M. A. comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.44, p.5977,1978.

ZULLIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnológica Ambiental**. V. 11, p. 2290-2306, 2013.