

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO
PARCIAL DE TOXINA *KILLER* PRODUZIDA POR
*Sporobolomyces koalae***

Luriany Pompeo Ferraz

Bióloga

Mestre em Microbiologia

Agropecuária

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO
PARCIAL DE TOXINA *KILLER* PRODUZIDA POR
*Sporobolomyces koalae***

Luriany Pompeo Ferraz

Orientadora: Dra. Katia Cristina Kupper

Co-orientador: Dr. Maurício Ventura Mazzi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2018

Ferraz, Luriany Pompeo
F381d Detecção, caracterização e purificação parcial de toxina *killer*
produzida por *Sporobolomyces koalae* / Luriany Pompeo Ferraz. --
Jaboticabal, 2018
xi, 62 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientadora: Katia Cristina Kupper
Coorientador: Maurício Ventura Mazzi
Banca examinadora: Taicia Pacheco Fill, Maria Fátima das
Graças Fernandes da Silva, João Martins Pizauro Junior, Eliana
Gertrudes de Macedo Lemos
Bibliografia

1. Enzimas hidrolíticas. 2. *Geotrichum citri-aurantii*. 3. Levedura.
4. *Penicillium digitatum*. 5. Proteína. 6. SDS- Page. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:632.9

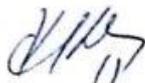
Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

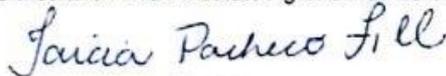
TÍTULO DA TESE: DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE TOXINA KILLER
PRODUZIDA POR *Sporobolomyces koalae*

AUTORA: LURIANY POMPEO FERRAZ
ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER
COORIENTADOR: MAURÍCIO VENTURA MAZZI

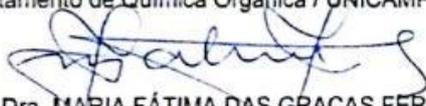
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



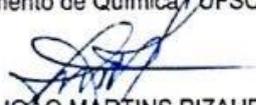
Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agronômico de Campinas - Cordeirópolis/SP



Profa. Dra. TAÍCIA PACHECO FILL
Departamento de Química Orgânica / UNICAMP - Campinas



Profa. Dra. MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA
Departamento de Química / UFSCAR - São Carlos



Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal



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

Jaboticabal, 10 de abril de 2018

LURIANY POMPEO FERRAZ– Nascida em 01 de maio de 1990 em Descalvado, SP. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em Fevereiro de 2008 no Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, na cidade de Araras, SP, concluindo seu bacharelado e licenciatura em dezembro de 2011. Durante a graduação, estagiou no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, SP, foi bolsista de iniciação científica do CNPq-PIBIC, atuando na área de Controle de Qualidade e Pós-Colheita de citros, sob a orientação da Profa. Dra. Lenice Magali do Nascimento. Em março de 2012 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 Capes, realizando seu projeto de pesquisa intitulado: “ Estudo dos mecanismos de ação de leveduras envolvidos no biocontrole de doenças de pós-colheita em citros”, no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP. Em março de 2014 ingressou no curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, como bolsista Capes, desenvolvendo seu projeto de doutorado no Centro de Citricultura.

“A felicidade é o amor de Deus, que sempre me acompanhou de forma tão misteriosa. Mesmo antes de conhecê-lo”.

Santa Josefina Bakhita

A grande mulher, minha mãe, Maria Lucia. Com toda certeza ela é meu maior exemplo de amor, fé, honestidade, força, garra e determinação.

A minha companheira de todas as horas, minha irmã, Lenita. Uma pela outra sempre!

DEDICO

Ao meu pai Daltayr, minha madrinha Nilza e minha prima Kayci. Vocês foram essenciais para que eu conseguisse terminar esse trabalho.

A minha orientadora Katia, que me acompanha na vida acadêmica e pessoal há 7 anos, me apoiando, incentivando e me dando forças a cada desafio.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Gratidão é o sentimento mais sublime que podemos ter. Ser grato nos torna cada vez mais completo e feliz. Sendo assim, meus sinceros agradecimentos:

A **Deus** e a **Santa Bakhita**, Eles me protegem e me iluminam todos os dias e em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. **Katia Cristina Kupper** por todos os ensinamentos pessoais e profissionais. Por confiar no meu potencial e compartilhar comigo, diversos projetos, experimentos, ideias e trabalhos. Eternamente grata pela amizade que cultivamos todos esses anos e que com toda certeza será levada ao longo de nossas vidas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Maurício Ventura Mazzi** pela paciência e empenho em me ajudar. Por todas as explicações teóricas e práticas e por disponibilizar seu laboratório para que eu trabalhasse, sempre que necessário, nos finais de semanas, feriados e madrugadas.

Aos professores, **membros da banca de defesa**, pelo aceite do convite da composição da banca. Tenho certeza que o profundo conhecimento de cada membro será fundamental para a melhoria do trabalho.

Aos professores da FCAV/UNESP, **Everlon Cid Rigobelo, Jackson Antonio Marcondes de Souza, Márcia Justino Rossini Mutton e Tiago Santana Balbuena**, pelas correções e sugestões no exame de qualificação, que foram importantes para o prosseguimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de doutorado concedida.

Ao **Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária** pela oportunidade do curso de mestrado e doutorado. Nós, alunos, reconhecemos o árduo trabalho dos coordenadores, professores, e secretaria para a manutenção e melhoria da qualidade do curso.

A **Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrárias – Campus de Jaboticabal**, e todos seus funcionários, que

sempre foram muito gentis e atenciosos, principalmente: **Assis, Diego (PPG), Edna, Marcia (PPG) e Prof. Roberto.**

Ao **Centro de Citricultura Sylvio Moreira** pela oportunidade desses 10 anos de estágio e aprendizado. A todos os pesquisadores e aos funcionários meu muito obrigado. Vocês são muito especiais para mim, cada um de vocês contribuiu para o meu crescimento ao longo desses anos, então, não irei citar nomes.

A **Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS**, onde realizei grande parte dos meus experimentos. Professores e funcionários, sempre solícitos em contribuir para a minha formação.

Aos amigos que já passaram (**Aline, Andreia, Tatiane, Mariana, Pitt, Gilmar, Willian, Vitor, João Ricardo, Wesley, Eleonore, Ana Vitória e Larissa**) e os que estão no laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico (**Vanessa, Bianca, Flavia, Deborah, Ariane, Lillian e Lorena**).

Um agradecimento especial às minhas amigas **Aline, Tatiane, Vanessa, Bianca, Flávia, Lilian, Lorena, Rosmeriana, Aline Ferreira e Nayara**. Vocês estiveram do meu lado no momento em que mais precisei. Ajudaram-me com os experimentos e com o carinho da amizade de vocês. Não esquecerei jamais!

A **Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill**, do Instituto de Química – UNICAMP, e, ao **Prof. Dr. João Martins Pizauro**, do departamento de Tecnologia da FCAV/ Unesp, pelas explicações, e contribuições com metodologias, e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

As minhas madrinhas, padrinho, tios, tias, primos e primas da família **Ferraz e Pompeo** que sempre torcem e se preocupam comigo. Obrigada pelas orações, pensamentos positivos e conselhos. Amo vocês!

E finalmente, aos grandes amores da minha vida, meus pais **Maria Lucia e Daltayr** e minha irmã **Lenita**. Só nós sabemos as dificuldades que enfrentamos nesses últimos anos, mas que só fizeram a nossa união e amor crescerem ainda mais. A vocês eu serei eternamente grata por TUDO. É inexplicável o amor que sinto e recebo de vocês.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. <i>Sporobolomyces</i> spp. e <i>Sporobolomyces koalae</i>	4
2.2. Toxina <i>killer</i> e Leveduras <i>killer</i>	5
2.3. Aplicação biotecnológica de toxina <i>killer</i>	7
2.4. <i>Killer</i> x fitopatógenos que ocorrem na pós-colheita em frutos cítrico	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Microrganismos	11
3.2. Identificação e caracterização fenotípica da levedura <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42)	12
3.2.1. Identificação molecular da espécie de levedura	12
3.2.2. Condições ótimas de crescimento da colônia de <i>S. koalae</i> e caracterização fenotípica.	14
3.2.3. Caracterização morfológica celular de <i>S. koalae</i>	15
3.3. Detecção de atividade <i>killer</i> no precipitado proteico da levedura.	15
3.4. Caracterização do perfil proteico de <i>S. koalae</i>	16
3.4.1. Análise proteômica em segunda dimensão	16
3.4.2. Determinação cinética de quitinases e β -1, 3-glucanases	17
3.4.3. Determinação de Atividade Proteolítica	17

3.5. Estudo do rendimento do precipitado proteico de <i>S. koalae</i>	18
3.5.1. Diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico	18
3.5.1.1. Precipitação de proteína com etanol	18
3.5.1.2. Precipitação de proteína com acetona	19
3.5.1.3. Precipitação de proteína com sulfato de amônio	19
3.5.2. Dosagem de proteínas dos diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico	19
3.5.3. Caracterização do perfil de proteínas nos diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico	20
3.5.4. Atividade <i>killer</i> do precipitado da levedura, após submissão aos diferentes métodos de precipitação	20
3.6. Caracterização da toxina <i>killer</i>	20
3.6.1. Condições ótimas para atividade da toxina <i>killer</i> de <i>Sporobolomyces koalae</i>	21
3.7. Purificação parcial da toxina <i>killer</i> produzida por <i>S. koalae</i>	21
3.7.1. Purificação e caracterização bioquímica	21
3.7.2. Avaliação das frações quanto à atividade de Quitinases e β -1, 3-glucanases	22
3.7.3. Avaliação das frações quanto à atividade <i>killer</i>	22
3.7.4. Tricina – SDS Page (Caracterização do perfil de proteínas da fração ativa)	22
3.8. Extração e detecção de plasmídeo de RNA de fita dupla (dsRNA) de <i>S. koalae</i> 23	
4. RESULTADOS	24
4.1. Identificação e caracterização fenotípica da levedura <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42)	24
4.1.1. Identificação molecular da espécie de levedura	24

4.1.2. Condições ótimas de crescimento da colônia de <i>S. koalae</i> e caracterização fenotípica.	25
4.1.3. Caracterização morfológica celular de <i>S. koalae</i>	29
4.2. Detecção de atividade <i>killer</i> no precipitado proteico da levedura.	29
4.3. Caracterização do perfil proteico de <i>S. koalae</i>	31
4.3.1. Análise proteômica em segunda dimensão	32
4.3.2. Determinação cinética de quitinases e β -1, 3-glucanases	33
4.3.3. Determinação de Atividade Proteolítica	34
4.4. Estudo do rendimento do precipitado proteico de <i>S. koalae</i>	35
4.4.1. Dosagem de proteínas dos diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico	35
4.4.2. Caracterização do perfil de proteínas nos diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico	36
4.4.3. Atividade <i>killer</i> do precipitado da levedura, após submissão aos diferentes métodos de precipitação	37
4.5. Caracterização da toxina <i>killer</i>	39
4.5.1. Condições ótimas para atividade da toxina <i>killer</i> de <i>Sporobolomyces koalae</i>	39
4.6. Purificação parcial da toxina <i>killer</i> produzida por <i>S. koalae</i>	41
4.6.1. Purificação e caracterização bioquímica	41
4.6.2. Avaliação das frações quanto à atividade de Quitinases e β -1, 3-glucanases	42
4.6.3. Avaliação das frações quanto à atividade <i>killer</i>	43
4.6.4. Tricina – SDS Page (Caracterização do perfil de proteínas da fração ativa)	46

4.7. Extração e detecção de plasmídeo de RNA de fita dupla (dsRNA) de *S. koala*10

5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS	52

DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE TOXINA KILLER PRODUZIDA POR *Sporobolomyces koalae*

RESUMO – O fenômeno *killer* é característico de leveduras que produzem e excretam proteínas ou glicoproteínas que são inibidoras de células microbianas sensíveis. A estabilidade e atividade das toxinas *killer* são altamente sensíveis a fatores como pH, temperatura de incubação das leveduras, composição e propriedades físico-químicas do meio e concentração de células sensíveis. *Sporobolomyces koalae* é uma nova espécie de levedura com potencial para produção de toxina *killer*. No intuito de se conhecer mais sobre as funções desse microrganismo no ecossistema, esse trabalho teve por objetivos: (i) detectar a atividade *killer* do precipitado proteico de *S. koalae*, (ii) caracterizar bioquimicamente e funcionalmente o precipitado proteico *S. koalae*, (iii) purificar parcialmente a toxina *killer* produzida por *S. koalae* e, finalmente, (iv) verificar sua ação antagônica sobre *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum*, patógenos que ocorrem na pós-colheita de citros. Pelos resultados obtidos neste trabalho, foi possível detectar a presença de atividade *killer* no precipitado proteico da levedura *S. koalae* contra células sensíveis da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006. O precipitado proteico da levedura apresenta várias proteínas com diferentes tamanhos moleculares e, parte dessas proteínas é positiva para atividade de β 1,3-glucanase, quitinase e protease, podendo ser uma dessas enzimas ou, o sinergismo entre elas, o responsável pelo fator *killer* da levedura. A funcionalidade de suas proteínas para atividade *killer* aumenta em pH 4.9 e em uma faixa de temperatura de 22 °C a 27 °C e, o melhor agente precipitante das proteínas da levedura foi o etanol 80%. A purificação parcial das proteínas, que constituem o precipitado proteico de *S. koalae*, mostrou a existência de aproximadamente quatro bandas proteicas em uma das frações de purificação, Fração 1, com tamanhos aproximados que variaram de 8 a 65 kDa. A atividade *killer*, presente no precipitado proteico da levedura *S. koalae*, não apresenta ação antagônica sobre *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum*.

Palavras-chave: Enzimas hidrolíticas, *Geotrichum citri-aurantii*, levedura, *Penicillium digitatum*, proteína, SDS-Page

DETECTION, CHARACTERIZATION AND PARTIAL PURIFICATION OF *KILLER* TOXIN PRODUCED BY *Sporobolomyces koalae*

ABSTRACT - The *killer* phenomenon is characterized by yeasts that produce and excrete proteins or glycoproteins that are inhibitors of sensitive microbial cells. The stability and activity of *killer* toxins are highly sensitive to the factors such as pH, the temperature of incubation of yeasts, composition and physical-chemical properties of the medium and concentration of sensitive cells. *Sporobolomyces koalae* is a new species of yeast with potential for *killer* toxin production. In order to know more about the functions of this microorganism in the ecosystem, this work had as objectives: (i) to detect the *killer* activity of the *S. koalae* protein precipitate, (ii) to characterize biochemically and functionally the *S. koalae* protein precipitate, (iii) to partially purify the *killer* toxin produced by *S. koalae*, and, finally, (iv) to verify its antagonistic action on *Geotrichum citri-aurantii* and *Penicillium digitatum*, pathogens that occur in the postharvest of citrus. By the results obtained in this work, it was possible to detect the presence of *killer* activity in the protein precipitate of *S. koalae* against sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006. The protein precipitate from yeast has several proteins with different molecular sizes and some of these proteins are positive for β 1,3-glucanase, chitinase and protease activity. It may be one of these enzymes or synergism between them, the responsible for the *killer* factor. The functionality of their proteins for *killer* activity increases at pH 4.9 and a temperature range of 22 °C to 27 °C and the best precipitant of protein from yeast was ethanol (80%). Partial purification of the proteins showed the existence of approximately 4 protein bands in one of the purification fractions, Fraction 1, with approximate sizes ranging from 8 to 65 kDa. The *killer* activity, present in the protein precipitate of yeast *S. koalae*, did not present antagonistic action on *G. citri-aurantii* and *P. digitatum*.

Keywords: Hydrolytic enzymes, *Geotrichum citri-aurantii*, Yeast, *Penicillium digitatum*, protein, SDS-Page

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Principais aplicações descritas das leveduras <i>killer</i> e suas respectivas toxinas.....	09
Tabela 2. Tampão de Extração de DNA de leveduras usando CTAB.....	12
Tabela 3. Características Culturais das Colônias	26
Tabela 4. Atividade Quitinase e β -1,3-glucanase de <i>Sporobolomyces koalae</i>	34
Tabela 5. Atividade <i>killer</i> (cm) dos diferentes precipitados proteicos contra a levedura sensível <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	37
Tabela 6. Influência de diferentes pH na atividade <i>killer</i> de <i>S. koalae</i>	40
Tabela 7. Influência de diferentes temperaturas na atividade <i>killer</i> de <i>Sporobolomyces koalae</i>	40
Tabela 8. Atividade de Quitinase e β -1, 3-glucanase das frações resultantes da cromatografia DEAE - Celulose do precipitado proteico de <i>Sporobolomyces koalae</i>	43
Tabela 9. Teste de atividade <i>killer</i> das frações da cromatografia em DEAE- Celulose do precipitado proteico de <i>Sporobolomyces koalae</i>	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Isolado de <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42) da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura Sylvio Moreira –IAC, Cordeirópolis – SP, Brasil. Levedura cultivada em meio de cultura BDA a 27 °C por 3 dias.	05
Figura 2. Gel de agarose (1%) do produto de PCR da linhagem de levedura selecionada. 1Kb – marcador molecular.	24
Figura 3. Caracterização fenotípica de <i>Sporobolomyces koalae</i> em diferentes meios de cultura, temperaturas e pH, após 10 dias de incubação.	25
Figura 4. Célula de <i>Sporobolomyces koalae</i> observada em microscópio óptico (40x).	29
Figura 5. Atividade <i>killer</i> do precipitado proteico de <i>Sporobolomyces koalae</i> . Atividade representada por um halo de inibição e zona azul ao redor do halo, indicativo de morte celular da levedura sensível <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006. Meio de cultura YEPD- azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C. (P- precipitado proteico de <i>S. koalae</i> (20 µL) e C – Controle negativo com água destilada estéril (20 µL).	30
Figura 6. Atividade <i>killer</i> do precipitado proteico de <i>Sporobolomyces koalae</i> . 1- contra <i>Penicillium digitatum</i> ; 2- contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i> . Meio de cultura YEPD- azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C. (P- precipitado proteico de <i>Sporobolomyces koalae</i> (20 µL) e C – Controle negativo com água destilada estéril (20 µL).	31
Figura 7. Caracterização do perfil proteico de <i>S. koalae</i> . SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida (13%), tampão Tris-glycine (pH 8.3). MM- Padrão Molecular, 1 ao 4 - Replicatas do precipitado.	32

- Figura 8.** Caracterização bioquímica do extrato bruto proteico de *Sporobolomyces koalae*. SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida (11%), tampão Tris-glycine (pH 8.3). Eletrofore 2D e ponto isoelétrico do extrato bruto proteico de *Sporobolomyces koalae* (150µg) em gradiente não-linear (3-11 NL).33
- Figura 9.** Atividade Proteolítica. 100 µL de azocaseína (4%) em Tris 100 mM (pH 8,0) incubado com diferentes concentrações do precipitado proteico (2,5; 6,0; 12,0 µg/mL) durante 1 h a 37 °C. Atividade proteolítica determinada espectrofotometricamente (λ 442 nm). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,01 na absorbância.34
- Figura 10.** Concentração de proteínas (mg/mL) presente nos precipitados com diferentes agentes à partir da cultura de *Sporobolomyces koalae* cultivada em 1 L de YEPD líquido por 72 horas à 27 °C.35
- Figura 11.** Caracterização do perfil proteico de *Sporobolomyces koalae* com diferentes agentes precipitantes. SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida (13%), tampão Tris-glycine (pH 8.3). PM- Padrão molecular; 1 – Controle (Perfil de proteínas de *S. koalae*); 2 – Etanol 80%; 3 – Etanol 2x volume; 4 – Acetona; 5– Sulfato de Amônio.36
- Figura 12.** Atividade *killer* apresentada pelos precipitados proteicos de *Sporobolomyces koalae*, obtidos a partir de diferentes agentes precipitantes, contra a levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006. Meio de cultura YEPD-azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C. ..38
- Figura 13.** Atividade *killer* apresentada pelos precipitados proteicos de *Sporobolomyces koalae*, obtidos a partir de diferentes agentes precipitantes, contra o fungo *Geotrichum citri-aurantii*. Meio de cultura YEPD-azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C.38
- Figura 14.** Atividade *killer* apresentada pelos precipitados proteicos de *Sporobolomyces koalae*, obtidos a partir de diferentes agentes

- precipitantes, contra o fungo *Penicillium digitatum*. Meio de cultura YEPD-azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C39
- Figura 15.** Condições de pH e de temperatura para a atividade *killer* utilizando o precipitado proteico de *Sporobolomyces koalae* contra *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006). Meio de cultura YEPD + azul de metileno.41
- Figura 16.** Cromatografia de troca iônica em DEAE - Celulose do extrato bruto de *Sporobolomyces koalae*. 150 mg de extrato bruto diluído em tampão Acetato (10 mM, pH 5,0) aplicado em coluna cromatográfica contendo DEAE - Celulose (1,6 cm x 100 cm) eluído no mesmo tampão em fluxo contínuo (0,6 mL/min, 4mL/tubo). Perfil cromatográfico representado pela leitura dos tubos em espectrofotômetro (λ 280nm).42
- Figura 17.** Avaliação das frações quanto à atividade *killer* contra a levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 ($1,0 \times 10^6$ células/mL). Frações diluídas em H₂O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. Incubação das culturas por 72h a 27 °C. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. C - Controle (Tampão Acetato 10 mM, pH 5).44
- Figura 18.** Avaliação das frações quanto à atividade *killer* contra o fungo *Geotrichum citri-aurantii* ($1,0 \times 10^5$ células/mL). Frações diluídas em H₂O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. Incubação das culturas por 72h a 27 °C. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. C- Controle (Tampão Acetato 10 mM, pH 5)..45
- Figura 19.** Avaliação das frações quanto à atividade *killer* contra o fungo *Penicillium digitatum* ($1,0 \times 10^5$ células/mL). Frações diluídas em H₂O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. Incubação das culturas por 72h a 27 °C. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. C- Controle (Tampão Acetato 10 mM, pH 5).45
- Figura 20.** Tricina –SDS- Page da fração ativa (F1) da cromatografia de troca iônica. (PM) Padrão Molecular; (1) Fração 1 (10 μ g/ μ L); (ppt) Precipitado proteico de *S. koalae* (10 μ g/ μ L). Condições eletroforéticas: 2h, 20 mA, 90V. Gel

corado com Azul de Coomassie R-250, Acrilamida-bisacrilamida (4 % no gel de aplicação e concentração da amostra; 10 % no gel de espaçamento; 16 % no gel separação), tampão Tris-tricina 1M, pH=8,25 , SDS (0,1%).46

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% da extração de dsRNA da levedura *S. koalae* – ACBL 42 e KL-28 padrão *killer* K1. Padrão de peso molecular λ Hindi III.47

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Sporobolomyces*, descrito pela primeira vez por Kluyver e Van Niel em 1924, pertence ao filo Basidiomycota; classe Urediniomycetes; ordem Sporidiales e família Sporidiobolaceae. Indivíduos deste gênero são frequentemente isolados de fontes ambientais, como ar, folhas de árvores, cascas de laranja; de mamíferos; pássaros e plantas (RODRIGUEZ et. al., 2010).

As espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Sporobolomyces* produzem blastoconídios bilateralmente simétricos e têm CoQ₁₀ como sua principal ubiquinona. Este grupo também é caracterizado pela incapacidade de fermentar açúcares, ausência de xilose em hidrolisados de células inteiras e positivo para diazônio azul B e reações de urease (HAMAMOTO; NAKASE, 2000; SATOH; MAKIMURA, 2008). De acordo com o catálogo de todos os organismos vivos conhecidos, esse gênero de levedura possui 56 espécies catalogadas (Catalog of Life/Col, 2017).

Dentre as espécies catalogadas, encontra-se *S. koalae*, relatada pela primeira vez por Satoh e Makimura (2008), após isolamento da levedura a partir de secreções nasais de Koalas Queensland, mantidos em um parque zoológico japonês. No Brasil, Ferraz et al. (2016) isolaram essa levedura a partir de folhas de laranja “Valência”, de um pomar localizado no município de Mogi Guaçu/SP, relatando sua possível aplicação como um agente de controle biológico da podridão azeda de citros. Segundo os autores, os possíveis mecanismos de ação envolvidos no biocontrole referem-se à produção de enzimas hidrolíticas (quitinase e β -1,3-glucanase) e de toxina *killer* pela levedura.

As podridões fúngicas que ocorrem na pós-colheita de citros, com destaque à podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*), ao bolor verde (*Penicillium digitatum*) e ao bolor azul (*P. italicum*) são os principais problemas de ordem fitossanitária da citricultura, em todos os países produtores.

Fungicidas, como tiabendazol e imazalil, são comumente utilizados para o controle de doenças de pós-colheita em citros (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002; MERCIER; SMILANICK, 2005). No entanto, para as condições de Brasil, não existe produto registrado para o controle da podridão azeda, embora em outros países da

Europa e África do Sul o fungicida guazatine tenha registro para o controle de *G. citri-aurantii* (McKAY et al., 2012; KELLERMAN et al., 2018).

A falta de opção de produtos para o controle de doenças de pós-colheita em citros tem levado ao uso contínuo e excessivo dos poucos produtos que apresentam registro para o controle dessas doenças, ocasionando problemas como surgimento de linhagens resistentes dos patógenos aos tratamentos químicos, bem como, problemas relacionados à poluição ambiental e de saúde pública. Diante do exposto, muitos pesquisadores têm demonstrado a eficácia do controle biológico, como uma alternativa ao uso do controle químico.

Espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de biocontrole de diversos fitopatógenos (FERRAZ et al., 2016; KUPPER et al., 2013; MASIH et al., 2001; MORETTO et al., 2014;) e um dos mecanismos de ação desses microrganismos é a produção de toxina *killer* (PARAFATI et al., 2016; PEREZ et al., 2018).

O fenômeno *killer* é caracterizado por leveduras que produzem e excretam proteínas ou glicoproteínas que são inibidoras de células microbianas sensíveis. Assim, estas proteínas são designadas como "proteínas *killer*" ou "toxinas *killer*". Cepas de leveduras *killer* são imunes às suas próprias toxinas, mas podem ser sensíveis às toxinas de outros organismos (PALFREE; BUSSEY, 1979; POLONELLI et al., 1986; BUSSEY, 1990). A natureza da levedura *killer* implica em um grande fator de concorrência, considerando-se que as toxinas dessas leveduras podem impedir o desenvolvimento de outros microrganismos, proporcionando uma vantagem seletiva durante as primeiras fases do crescimento microbiano (STOLL et al., 2005).

Os principais constituintes da parede celular de leveduras são o (1→3)-β-D-glucana (50%), (1→6)-β-D-glucana (5%) e manoproteínas. Contendo, também, (1→6)-β-D-glucana com algumas ligações (1→3)-β (14%) e quitina (0,6 a 9%). A função dos polissacarídeos na parede celular é a de recepção de proteínas, mas ainda pouco se sabe sobre este mecanismo (SANTOS et al., 2000). Assim como β-glucanases, as quitinases e outras hidrolases, também estão associadas com a hidrólise intra e inter poliméricas dos constituintes da parede celular de microrganismos (RAST et al., 2003).

Estudos realizados por Bussey (1972) evidenciaram que a atividade *killer* está relacionada diretamente com a presença de glucanas, fato esse esclarecido com o trabalho posterior de Zhu e Bussey (1989), onde se comprovou a necessidade da presença de glucanas agindo como sítios de ligação específicos da toxina junto à parede celular, embora segundo os autores, a simples ligação da toxina junto à parede celular não é suficiente para a atividade *killer*.

A estabilidade e atividade das toxinas *killer* são altamente sensíveis a fatores como pH, temperatura de incubação das leveduras, composição e propriedades físico-químicas do meio e concentração de células sensíveis. Normalmente, as toxinas expressam a atividade *killer* em valores de pH ácido que variam entre 4 e 5, e temperaturas entre 20 °C a 25 °C (IZGU et al., 1997).

Os caracteres genéticos de codificação e expressão das toxinas *killer* apresentam variações de acordo com a biologia e fisiologia dos distintos gêneros e espécies de leveduras, de um modo geral, as toxinas são expressas através do envolvimento de duas bases genéticas: exclusivamente por genes cromossomais ou, através da combinação destes com elementos genéticos extra-cromossomais (WICKNER, 1996; GOLUBEV, 2006).

Embora Ferraz et al. (2016) tenham mencionado sobre a produção de toxina *killer* pela célula de *S. koalae* e sua ação antagônica contra uma levedura sensível ao fator *killer*, não se sabe quais são as proteínas que são excretas por esse organismo e se as mesmas estariam envolvidas na atividade *killer* antagônica contra o fitopatógeno *Geotrichum citri-aurantii*.

Por se tratar de uma nova espécie de levedura com potencial para produção de proteínas e, também, no intuito de se conhecer mais sobre as funções desse microrganismo no ecossistema e suas possíveis aplicações biotecnológicas, esse trabalho teve por objetivos: (i) detectar a atividade *killer* do precipitado proteico de *S. koalae*; (ii) caracterizar bioquimicamente e funcionalmente o precipitado proteico *S. koalae*; (iii) purificar parcialmente a toxina *killer* produzida por *S. koalae* e, finalmente, (iv) verificar sua ação antagônica sobre *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum*, patógenos que ocorrem na pós-colheita de citros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Sporobolomyces* spp. e *Sporobolomyces koalae*

Sporobolomyces spp. é uma levedura comumente isolada de fontes ambientais, como ar, folhas de árvores e cascas de laranja. Os habitats naturais são: humanos, mamíferos, aves, meio ambiente e plantas. O gênero *Sporobolomyces* contém, de acordo com o catálogo de todos os organismos vivos conhecidos, 56 espécies catalogadas (Catalog of Life/Col, 2017), sendo que o mais comum é *Sporobolomyces salmonicolor* (DE HOOG et al., 2000).

Sporobolomyces é um basidiomiceto (liberação de esporos ativos em condições de alta umidade). As colônias de *Sporobolomyces* crescem rapidamente em cerca de 5 dias. A temperatura ideal de crescimento é de 25-30 °C. Alguns isolados podem deixar de se desenvolver a 35-37 °C. As colônias são enrugadas e brilhantes. A cor alaranjada brilhante para as colônias é típica e pode ser comparada com as colônias de *Rhodotorula* spp. (LARONE, 1995; SUTTON et al., 1998).

Produzem células tipo levedura (blastoconídios), pseudo-hifas e hifas verdadeiras. As células tipo levedura (blastoconidia, 2-12 x 3-35 µm) são o tipo mais comum de conídios e são ovais (NANJUNDASAMY; PRAVEEN, 2010). As pseudo-hifas e as verdadeiras hifas são muitas vezes abundantes e bem desenvolvidas (LARONE, 1995; SUTTON et al., 1998).

S. koalae foi relatada pela primeira vez por Satoh e Makimura (2008), após isolamento da levedura a partir de secreções nasais de Koalas Queensland, mantidos em um parque zoológico japonês. No Brasil, Ferraz et al. (2016) isolaram *S. koalae* (Figura 1) a partir de folhas de laranja “Valência”, de um pomar localizado no município de Mogi Guaçu/SP, relatando sua possível aplicação como um agente de controle biológico da podridão azeda de citros, ocasionada pelo fitopatógeno *Geotrichum citri-aurantii*. Em seus estudos, os autores mencionaram a capacidade

dessa levedura em produzir toxina *killer*, após teste com uma levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006. E desde então, diversos estudos estão sendo realizados a fim de se conhecer e explorar mais essa levedura e suas funções no meio ambiente, dada a escassez de informação na literatura a respeito desse microrganismo.



Figura 1. Isolado de *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42) da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura Sylvio Moreira –IAC, Cordeirópolis – SP, Brasil. Levedura cultivada em meio de cultura BDA a 27 °C por 3 dias.

2.2. Toxina *killer* e Leveduras *killer*

Toxina *killer* são exotoxinas ou micocinas, de natureza proteica ou glicoproteica produzida e excretada por algumas espécies de leveduras (MAGLIANI et al., 1997).

Foi detectada pela primeira vez em 1963 por Bevan e Makower, os autores observaram que alguns isolados de *S. cerevisiae* secretavam alguma substância

que era letal para outras leveduras da mesma espécie. Desde então, as leveduras *killer* têm sido isoladas em diferentes habitats de várias partes do mundo, existindo mais de 90 gêneros de leveduras como: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Rhodothorula*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Ustilago* e *Zigowilopsis* (CHEN et al., 2000; SCHMITT; BREINING, 2002).

O habitat de maior isolamento de leveduras *killer* são as frutas, representando 1/3 de todas as leveduras isoladas com esse fenótipo. As frutas oferecem condições ideais para o desenvolvimento das leveduras e estabilidade de suas toxinas tais como: baixo pH, temperatura e concentração adequada de açúcares (MAGLIANI et al., 1997), além de estarem expostas ao ambiente, sendo visitadas por vetores como abelhas, besouros, pássaros ou outros animais (KURTZMAN; FELL, 2006).

Os efeitos dessas leveduras *killer* no ambiente indicam que as toxinas *killer* produzidas representam um modelo de competição biológica entre os gêneros e espécies (HARDY, 1975; PEREZ et al., 2001; ZAGORC et al., 2001; CARREIRO et al., 2002), sendo um mecanismo biológico na regulação da dinâmica das populações nos ecossistemas (CASSONE et al., 1997). Conferindo às linhagens produtoras uma vantagem competitiva, em relação às células sensíveis, por nutrientes disponíveis no meio (MARQUINA et al., 2002).

A atividade *killer* é mediada por receptores de parede celular específico nos microrganismos sensíveis. As leveduras *killer* são definidas como produtoras de exotoxinas capazes de matar células sensíveis pertencentes à mesma espécie ou gênero, sendo que, a levedura produtora é imune à sua toxina (BEVAN; MAKOWER, 1963). Como são secretadas, as toxinas atuam sobre outras leveduras sensíveis sem contato direto célula-célula, mas sim por mecanismos específicos através de receptores de parede e membrana celular (WALKER et al., 1995). Os efeitos letais das toxinas *killer* sobre as células sensíveis ocorrem após ligação a esses receptores específicos da parede celular e membrana plasmática e translocação para o citoplasma.

Essas toxinas, quando dentro das células sensíveis, provocam: aumento da permeabilidade da membrana plasmática, causando ruptura e perda de íons

potássio, ATP e metabólitos intracelulares; inibição e síntese dos principais componentes da parede celular como glucana, manose e quitina; inibição da síntese de DNA e o bloqueio da fase G1 do ciclo celular (CASTORIA et al., 2001; SANTOS et al., 2002; GOLUBEV, 2006). Em alguns casos, essa toxina é capaz de afetar a célula sensível imediatamente após ligação à parede celular, por inibição do transporte de L-leucina e de prótons que normalmente seriam transportados com aminoácidos para o interior da célula. A toxina modifica o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática, inibindo o bombeamento para o meio externo, principalmente, em células que metabolizam ativamente glicose, porém, todos esses efeitos dependem da concentração da toxina no meio (BRITES, 2003).

As toxinas *killer* apresentam estabilidade de sua atividade sensível a fatores como: pH, temperatura de incubação das leveduras, composição do meio de cultura e concentração de células sensíveis (IZGU et al., 1997).

Os caracteres genéticos de codificação das toxinas *killer* são por dois alelos genéticos, por genes cromossomais ou através da combinação destes com elementos genéticos extra-cromossomais, que representam a base citoplasmática, constituída por RNA de fita dupla encapsulado (dsRNA) conhecido como VLPs (vírus-like particles) ou vírus de RNA e os plasmídeos de DNA de fita dupla linear (WICKNER, 1996; GOLUBEV, 2006).

2.3. Aplicação biotecnológica de toxina *killer*

Leveduras *killer* e suas toxinas vêm sendo utilizadas desde a sua descoberta com diferentes aplicações biotecnológicas, ambientais, médicas e industriais como:

- Em processos fermentativos industriais, onde as leveduras *killer* são utilizadas como “starters”, ou seja, iniciadoras do processo fermentativo, devido, principalmente, à vantagem conferida pela característica *killer* em combater contaminantes nativos do processo produtivo de bebidas e, alimentos em geral

(SANGORRÍN et al., 2001; LOPES et al., 2005; LIMA et al., 2007; LOPES et al., 2007; SANGORRÍN et al., 2007).

- No biocontrole de fungos deteriorantes e/ou micotoxigênicos em alimentos (LIMA et al., 2013; FIEIRA et al., 2013). Leveduras aplicadas com eficiência no controle de microrganismos indesejáveis na preservação de alimentos (PALPACELLI et al., 1991).
- Na área terapêutica e preventiva humana e animal, no desenvolvimento de agentes antimicóticos, de anticorpos e antibióticos, sintéticos ou naturais, capazes de exercer as mesmas atividades das toxinas *killer* correspondentes e, de vacinas idiopáticas (BUZZINI; MARTINI, 2001; MAGLIANI et al., 2001; POLONELLI et al., 2003; MAGLIANI et al., 2004; MAGLIANI et al., 2005; FIORI et al., 2006).
- Em tecnologias de DNA recombinante (SCHMITT; BREINIG, 2002), em modelo para o estudo dos mecanismos de regulação e processamento de polipeptídeos em eucariotos, de taxonomia, além de futuras aplicações em pesquisas de controle e expressão de vírus em organismos eucariontes (MARQUINA et al., 2002).
- Na área biomédica, as leveduras *killer* estão sendo utilizadas, particularmente, na biotipagem de espécies patogênicas como *Candida albicans*, *Cryptococcus* spp. e *Staphylococcus epidermidis* (YOUNG; YORGIU, 1978; POLONELLI et al., 1985; FUENTEFRIA et al., 2008).
- Como agentes de controle biológico de fungos responsáveis por doenças de pós-colheita de frutas e vegetais (FERRAZ et al., 2016; PARAFATI et al., 2016; PEREZ et al., 2018).

Outras aplicações de Leveduras *killer* e suas toxinas estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais aplicações descritas das leveduras *killer* e suas respectivas toxinas.

Campo de aplicação Biotecnológica	Aplicação
Controle Biológico na Agricultura	Atividade antifúngica contra podridão da madeira e fungos fitopatogênicos.
Fermentação de bebidas	Controle de contaminantes indesejáveis e como linhagens iniciadoras de processos fermentativos.
Pesquisa de biologia celular em células eucarióticas	Estudos de biossíntese, processamento celular e secreção de proteínas.
Tecnologia de alimentos	Preservação de alimentos de origem natural.
Genética	“Fingerprinting” de leveduras do vinho. Tecnologia do DNA recombinante.
Medicina	Atividade zimocida contra patógenos.
Taxonomia	Padrão de sensibilidade <i>killer</i> como indicativo de parentesco filogenético.

Fonte: Marquina et al. (2002).

2.4. *Killer* x fitopatógenos que ocorrem na pós-colheita em frutos cítricos

O Brasil é, notadamente, um país voltado para o agronegócio. A importância da produção brasileira extrapola as fronteiras territoriais e ganha destaque no comércio internacional, e é no suco de laranja que o país mostra sua liderança, pois o país detém atualmente mais da metade da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% da sua produção (NEVES, 2010).

Os exportadores brasileiros precisam atender a uma série de exigências, as quais envolvem questões fitossanitárias, de embalagem, consistência na qualidade do produto e regularidade na entrega (NEVES, 2010). Dentro deste contexto, o setor enfrenta problemas, principalmente, com os fitopatógenos que ocorrem na pós-colheita.

As consideráveis perdas nas culturas de importância econômica resultam da susceptibilidade das frutas às infecções fúngicas, desencadeadas por fatores ambientais e danos mecânicos na colheita, beneficiamento das frutas e estocagem.

As técnicas de manuseio e conservação na pós-colheita de frutos vêm recebendo grande atenção nos últimos anos, pois os danos nesta fase podem superar em torno de 20%, decorrentes principalmente de doenças (FISCHER et al., 2009).

Os fungos são os principais causadores de doenças de pós-colheita, e dentre eles os fungos *G. citri-aurantii* e *Penicillium digitatum* merecem destaque.

A podridão azeda, também conhecida por podridão ácida, causada pelo fungo leveduriforme *G. citri-aurantii* ocorre em todos os países produtores da cultura, afetando todas as espécies e cultivares, sendo que os frutos das variedades de tangerinas geralmente desenvolvem a doença mais rapidamente do que os das variedades de laranjas ou grapefruits (TALIBI et al., 2012).

Os bolores são os principais causadores de doenças de pós-colheita dos citros, em particular o bolor verde, causado por *P. digitatum*, um patógeno frequente em frutos na pós-colheita de citros no Brasil (FEICHTENBERGER et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2005).

Embora os prejuízos causados pela podridão azeda sejam relativamente menores, quando comparadas aos bolores, a doença pode ocorrer com maior impacto dependendo do ano, da estação e da área de cultivo (KLEIN et al., 2016). Além do que, não há produtos registrados para o controle dessa doença no Brasil.

Até recentemente, o controle dessas doenças dependia fortemente de fungicidas químicos. No entanto, as preocupações do consumidor com os efeitos danosos do uso excessivo e indiscriminados desses produtos químicos para a saúde humana e para o meio ambiente, têm estimulado a investigação do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que atendam as normas de saúde e segurança atuais (KIM; LEE, 2015). Os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores para uma utilização prática no controle de fitopatógenos em diversas culturas (FERRAZ et al., 2016; MORETTO et al., 2014).

Neste contexto, as leveduras possuem várias características que as tornam boas candidatas como agentes no controle biológico, como a alta capacidade de sobrevivência e ocupação de espaço; produzem e excretam compostos de caráter antagônico e, são tolerantes a fungicidas. Algumas leveduras apresentam o fator *killer*, que são proteínas ou peptídeos capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos, como o de fungos filamentosos. Pesquisas visando incremento na

produção do fator *killer*, aliado à caracterização molecular abrem perspectivas para o desenvolvimento deste novo elemento no controle biológico (COMITINI et al., 2004; IZGU et al., 2006).

Desde que foi relatado pela primeira vez o fenômeno *killer*, em leveduras de vários gêneros e espécies, esta atividade tem sido amplamente estudada, ganhando reconhecimentos industriais importantes (ALADDIN et al., 2018). O uso de leveduras *killer*, como agentes de controle biológico de fungos responsáveis por doenças de pós-colheita de frutas e vegetais estão sendo investigadas cada vez mais nas últimas duas décadas (PARAFATI et al., 2016; PEREZ et al., 2018). Grzegorzczuk et al. (2017), por exemplo, relataram os efeitos antagônicos das leveduras *killer* *Debaryomyces hansenii* KI2a, *D. hansenii* MI1a e *Wickerhamomyces anomalus* BS91, quando testadas *in vitro* e *in vivo* contra *Monilinia fructigena* e *M. fructicola*. Parafati et al. (2015), também, observaram alta atividade *killer* de *W. anomalus* e *S. cerevisiae* no biocontrole *in vitro* de *Botrytis cinerea*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Foram utilizados no presente estudo a levedura *killer* *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42), a levedura sensível ao fator *killer* (*Saccharomyces cerevisiae*, NCYC 1006), os fungos fitopatogênicos *G. citri-aurantii* e *P. digitatum*, 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 (*S. cerevisiae*, KL88) foi cedida pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

3.2. Identificação e caracterização fenotípica da levedura *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42)

3.2.1. Identificação molecular da espécie de levedura

O isolado ACBL-42 foi identificado através da análise do seu material genético, utilizando técnicas de biologia molecular.

Para extração de DNA foi utilizado o protocolo do método CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio). A solução tampão de extração foi preparada antes de iniciar o protocolo, de acordo com a quantidade de amostras de DNA que foram extraídas. Preparou-se 30 mL do seguinte tampão:

Tabela 2. Tampão de extração de DNA de leveduras usando CTAB.

COMPONENTE	[ESTOQUE]	[FINAL]	PESAR/PIPETAR
CTAB	----	2%	0,6 g
NaCl	5 M	1,4 M	8,4 ml
Tris-HCl pH – 7.5	1 M	200 Mm	6,0 mL
EDTA pH – 8.0	0.5 M	20 Mm	1,2 mL
PVP	----	1%	0,3 g
H ₂ O	----	q.s.p	8,0 mL
		Volume final	30 L

A cultura da levedura (1×10^5 células mL⁻¹) foi cultivada em 20 mL de meio de cultura batata-dextrose (BD), sob agitação de 150 rpm à 25 °C, por 36 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 15.000 rpm, a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado macerado com N₂ líquido, com o auxílio de cadinho e pistilo, até a obtenção de um pó fino.

O pó foi transferido para eppendorf (2 mL) contendo 800 µL de tampão de extração CTAB pré-aquecido a 65 °C, onde foi adicionado 2µL de β-mercaptoetanol e 2 µL de Proteinase K e, em seguida foi transferido para banho-maria a 65 °C por

15 min. Posteriormente, adicionou-se um volume de 800 µL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) e a amostra foi homogeneizada em vortex por 2 min. e centrifugada a 12.000 rpm por 7 min.

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e repetiu-se a etapa anterior. Novamente foi transferida a fase aquosa para novo tubo e feita a digestão com RNAse A - 100 µg/ mL / 37 °C / 30 min. Foi Adicionado de 0,6 a 1,2 volumes de Isopropanol gelado (-20 °C) e deixado por 30 min à -80 °C, e então centrifugado a 12.000 rpm, por 10 min à 20 °C. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 50 µL de ETOH 70 % e centrifugou-se à 12.000 rpm / 5 min. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram secos (tubos abertos na capela de exaustão). Em seguida, os pellets secos foram ressuspensos em 100 µL de água Milli-Q ou T.E. A quantidade e a qualidade (pureza) do DNA extraído foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c).

A amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, incluindo o gene 5.8S, foi realizada através de reação de PCR, utilizando-se os seguintes *primers*: *forward*- ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e *reverse* - ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), conforme protocolo de White et al., 1994.

A reação ocorreu em um volume de 100 µL, contendo 10 µL do tampão 10X, 3 µL de cloreto de magnésio 50 mM, 8 µL de cada dNTP 2,5 mM, 1 µL de cada *primer* 100 µM, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL), 100 ng de DNA genômico e 51,75 µL de água milli-Q estéril. O ciclo de amplificação correspondeu a: 1 ciclo de 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 2 minutos, e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de 1 ciclo final de extensão 72 °C por 5 minutos. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit comercial “*PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit*” (Invitrogen™).

Para a estimativa da presença, quantidade e integridade dos amplicons, 25 µL do produto de amplificação foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 1X. O gel foi submetido a uma voltagem de 2,24 volts/cm e corrente de 90 mA, por 90 minutos (Fonte EPS301 – Amersham Biotechnology). A estimativa de concentração do DNA foi realizada comparativamente com a espessura e intensidade das bandas do marcador

molecular de 1 Kb (Invitrogen). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 0,3 µL/mL, sendo a visualização do gel realizada em transiluminador de luz UV.

A reação de sequenciamento da região ITS do rDNA foi realizada no Laboratório de Tecnologia, pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, campus de Jaboticabal/São Paulo.

As sequencias obtidas foram trabalhadas, utilizando-se o programa BioEdit, e comparadas com outras já conhecidas e disponíveis no banco de dados GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), sendo estas submetidas a um alinhamento através do aplicativo Clustal W 1.4 (THOMPSON et al., 1994).

Com o objetivo de confirmar a identidade do microrganismo, uma placa de Petri, contendo a cultura da levedura ACBL-42, foi enviada para a Empresa Helixxa Serviços Genômicos - Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Paulínia, SP.

3.2.2. Condições ótimas de crescimento da colônia de *S. koalae* e caracterização fenotípica.

Para o estudo das características fenotípicas, discos da cultura do isolado da levedura, com aproximadamente 5,0 mm de diâmetro, oriundos de colônia jovem (com 72 horas de crescimento), foram transferidos para o centro de placa de Petri, contendo os seguintes meios de cultura: BDA (batata, dextrose e ágar), YEPD (extrato de levedura, peptona, glicose e ágar) YM (extrato de levedura, peptona, glicose, extrato de malte e ágar), Fubá-Dextrose-Ágar e Sabouraud (extrato de malte-ágar), as quais foram mantidas em dois ambientes, claro e escuro e em três temperaturas 22 °C, 25 °C e 27 °C, por dez dias. Foram avaliados o crescimento micelial e caracterização cultural das colônias.

3.2.3. Caracterização morfológica celular de *S. koalae*

A caracterização morfológica da levedura ACBL-42 foi realizada através da técnica de microcultivo, tendo lâminas de microscopia como suporte para pequenos blocos dos meios BDA, YEPD, YM, FUBÁ e SABOURAUD, onde foram inoculados fragmentos de cultura e recobertos por lamínulas. Decorrido dez dias para desenvolvimento e crescimento, foram retiradas as lamínulas e coradas com lactofenol para a observação microscópica e visualização das estruturas.

3.3. Detecção de atividade *killer* no precipitado proteico da levedura

Para o crescimento da cultura de *S. koalae*, a levedura foi cultivada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido YEPD. Após 72 horas de crescimento, 2 mL foram transferidos para outros frascos de Erlenmeyer contendo o mesmo meio de cultura, para manter o padrão de crescimento uniforme, mantidos a 150 rpm à 27 °C, por 72 horas. Após 72 horas a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C para a remoção de células e, o sobrenadante submetido à precipitação com etanol 80%, de acordo com a metodologia de Labbani et al. (2015).

Para avaliar o fator *killer* do precipitado proteico de *S. koalae* (ACBL-42) utilizou-se a metodologia descrita por Woods e Bevan (1968) e modificada por Ferraz et al. (2016). Foi testada a produção de toxina *killer* produzida por *S. koalae* contra a levedura sensível (*S. cerevisiae*, NCYC 1006) e contra os fitopatógenos *G. citri-aurantii* e *P. digitatum*.

Uma alíquota de 200µL de uma suspensão de células da levedura sensível (10^5 células/mL) ou dos fungos fitopatogênicos (10^5 células/mL) foi transferida e espalhada na superfície do meio ágar YEPD-azul de metileno pH 4,6, contido em placa de Petri. Após a secagem da cultura, discos de papel de filtro estéreis foram adicionados sobre a mesma e, em seguida, uma alíquota de 20µL do precipitado

proteico de *S. koalae* foi transferida sobre os discos de papel filtro. A incubação das culturas se deu em estufa para BOD a 25 °C e a avaliação da atividade *killer* foi realizada após 48 horas.

3.4. Caracterização do perfil proteico de *S. koalae*

Para caracterizar o perfil proteico do precipitado (item 3.3) de *S. koalae*, utilizou-se eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida como descrito por Laemmli (1970), na concentração de 13% e Tris-glicina (pH 8.3) como tampão da corrida eletroforética (20mA, 100V/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, o qual foi corado com solução de Azul de Coomassie R-350 para visualização das bandas de proteínas.

3.4.1. Análise proteômica em segunda dimensão

Com o objetivo de determinar qual o ponto isoelétrico característico das proteínas excretadas por *S. koalae*, foi realizada a análise proteômica por eletroforese bidimensional, através de focalização isoelétrica e SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida, segundo metodologia adaptada de Teixeira et. al. (2005).

Para focalização isoelétrica o precipitado proteico de *S. koalae* (mg) foi submetido à focalização isoelétrica usando strips (Immobiline drystrip) de gradiente não linear de pH (7cm, 3-11), juntamente com uma solução de hidratação por um período de 4 horas, sobre refrigeração a 4 °C. Em seguida, a fita foi submetida a uma corrida eletroforética por 6 horas (12000 V/h 25 μ A, 0,5 W/strip).

Após o término da focalização, a drystrip foi tratada com ditioneitol (DTT – 10mg/mL) e iodoacetamida (IAA – 25 mg/mL), sendo acoplada, posteriormente, ao gel de acrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 13% (100 V/20mA/ 2h30min), usou-se Tris-glicina (pH 8.3) como tampão da corrida eletroforética. O gel foi corado com solução de Azul de Comassie R-350.

3.4.2. Determinação cinética de quitinases e β -1, 3-glucanases

Para identificar a presença de enzimas como quitinases e β -1, 3-glucanases, a estratégia consistiu em identificar componentes enzimáticos do precipitado proteico da levedura através de técnicas clássicas (MILLER, 1959), como a quantificação colorimétrica de glicose liberada do substrato glicol quitina ou laminarina, através da dosagem de açúcares redutores. Reação realizada em 200 μ L de tampão McIlvaine, (pH 6,0) ou Acetato de Sódio (0,1 M, pH 5,0); 100 μ L da amostra do precipitado e 100 μ L de glicol quitina ou laminarina (1 %). A mistura da reação foi incubada (30 °C, 1 h). A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria (λ_{540}) após adição do reagente ADNS (ácido dinitrosalicílico) (200 μ L). Uma unidade de atividade (U/L) é definida como a quantidade de enzima que catalisa 1g de açúcar redutor formado nas condições de ensaio.

3.4.3. Determinação de Atividade Proteolítica

A avaliação da atividade proteolítica foi realizada utilizando como substrato a azocaseína como descrito por Benitez et al. (2001). Diferentes concentrações da amostra do precipitado (0,25; 0,45; 0,9 μ g/ μ L) foram incubadas (37 °C, 1 hora) com 100 μ L de azocaseína (4 mg/mL). Em seguida, a reação foi interrompida com 400 μ L de ácido tricloro acético 10 % e centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. No sobrenadante resultante adicionou-se 700 μ L de NaOH

525 mM. Determinou-se a absorbância a 442 nm, contra o branco apropriado e, como controle positivo, foi utilizada tripsina (10 %) e azocaseína, seguindo as mesmas especificações.

3.5. Estudo do rendimento do precipitado proteico de *S. koalae*

3.5.1. Diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico

Com o objetivo de determinar maior rendimento de proteínas com maior atividade, a levedura foi cultivada em meio líquido YEPD por 72 horas, a 150 rpm conforme descrito no item 3.3.

Para a obtenção do precipitado proteico, a cultura de *S. koalae* foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C para a remoção de células e, o sobrenadante submetido à precipitação com diferentes agentes precipitantes:

3.5.1.1. Precipitação de proteína com etanol

O sobrenadante do meio de cultura foi testado com etanol numa proporção de 80% (v/v) (LABBANI et al., 2015) ou 2:1 (v/v) (SOARES; SATO, 2000). O etanol gelado foi adicionado na proporção correta em 200 mL do sobrenadante da cultura, deixado overnight a 4 °C, em seguida foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min e o precipitado proteico foi solubilizado em água destilada e concentrado em liofilizador por 24 h.

3.5.1.2. Precipitação de proteína com acetona

O sobrenadante do meio de cultura foi testado com acetona numa proporção 2:1 (v/v) (SOARES; SATO, 2000). O solvente foi adicionado em 200 mL do sobrenadante da cultura, deixado overnight a 4 °C, em seguida foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min e o precipitado proteico foi solubilizado em água destilada e concentrado em liofilizador por 24 h.

3.5.1.3. Precipitação de proteína com sulfato de amônio

O sobrenadante do meio de cultura foi precipitado com sulfato de amônio com 80 % de saturação (VILLALBA et al., 2016). Para tal, com o auxílio de um agitador magnético, 176 g de sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante e deixado overnight a 4 °C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C e o precipitado proteico foi solubilizado em água destilada e concentrado em liofilizador por 24 h. O precipitado foi dialisado em membrana de celulose de retenção de proteínas acima de 12 kDa, durante 48 horas a 4 °C, utilizando o mesmo tampão da amostra.

3.5.2. Dosagem de proteínas dos diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico

A quantificação total de proteínas foi determinada pelo Método do Biureto (GORNALL et al., 1949), adicionando-se a placa de Elisa, 200 µL do Reagente Biureto e 10 µL dos diferentes precipitados liofilizados ressuspensos em água destilada (50 mg/mL) com posterior incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura de absorbância a 540 nm foi feita contra o branco (reagente

biureto e meio de cultura com os respectivos agentes precipitantes), sendo subtraído de cada amostra o valor do branco. As leituras de absorbâncias foram plotadas em curva padrão para albumina e a quantidade de proteína foi expressa em mg/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata (SD=3).

3.5.3. Caracterização do perfil de proteínas nos diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico

Para caracterizar o perfil proteico, utilizou-se eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida na concentração de 13% e Tris-glicina (pH 8.3), conforme descrito no item 3.4.

3.5.4. Atividade *killer* do precipitado da levedura, após submissão aos diferentes métodos de precipitação

Para avaliar o fator *killer* dos precipitados proteicos de *S. koalae* (ACBL-42) utilizou-se a metodologia descrita por Woods e Bevan (1968) e modificada por Ferraz et al. (2016). Como descrito no item acima 3.3.

3.6. Caracterização da toxina *killer*

3.6.1. Condições ótimas para atividade da toxina *killer* de *Sporobolomyces koalae*

Para determinar as melhores condições da atividade da toxina *killer* de *S. koalae*, foram preparados meios de cultura YEPD-azul de metileno conforme descrito no item 3.3, no entanto, os meios foram ajustados nos seguintes pH: 3,5; 4,0; 4,6; 4,9 e 5,4. Alíquotas de 20 µL do precipitado proteico foram testadas quanto à sua atividade *killer*. Para atividade *killer*, as culturas foram incubadas a 4, 22, 25, 27 e 30 °C e avaliadas quanto ausência e/ou presença da zona azul e do halo de inibição, após 72 horas.

3.7. Purificação parcial da toxina *killer* produzida por *S. koalae*

3.7.1. Purificação e caracterização bioquímica

A etapa de purificação de proteínas consistiu na aplicação do extrato bruto de *S. koalae* (150 mg) diluído em tampão Acetato (10 mM, pH 5,0) em uma coluna de cromatografia de troca iônica contendo gel de DEAE – Celulose (1,6 cm x 100 cm) eluído no mesmo tampão em fluxo contínuo (0,6 mL/min, 4 mL/tubo). O perfil cromatográfico foi determinado espectrofotometricamente (λ 280nm). A cromatografia foi realizada em sistema cromatográfico AKTAprime plus (GE Healthcare®). As frações foram separados e concentradas em liofilizador ALPHA 2-4 LDplus (CHRISTI®) e submetidos à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) supracitadas. Foram aplicados 10 µg/µL das amostras no gel sob condições eletroforéticas de 2 horas, 20 mA, 100 V. O gel foi corado com Azul de Coomassie R-350.

3.7.2. Avaliação das frações quanto à atividade de Quitinases e β -1, 3-glucanases

As frações F1 a F6 (diluídas em água MiliQ) na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foram avaliadas quanto à atividade de Quitinases e β -1, 3-glucanases, conforme descrito anteriormente no item 3.4.2.

3.7.3. Avaliação das frações quanto à atividade *killer*

A frações F1 a F6 (diluídas em água MiliQ) na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foram avaliadas quanto ao fator *killer*, contra a levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006) e fitopatógenos *G. citri-aurantii* e *P. digitatum*, utilizando a metodologia Woods e Bevan (1968) modificada por Ferraz et al. (2016) e citada no item 3.3.

3.7.4. Tricina – SDS Page (Caracterização do perfil de proteínas da fração ativa)

Para caracterizar o perfil proteico, utilizou-se o sistema de eletroforese da marca Amersham Bioscience e a metodologia de preparação dos géis foi realizada, de acordo com a técnica descrita por Schägger e Jagow (1987). Para polimerização do gel de corrida foram utilizadas soluções de dois monômeros (acrilamida / bis) em três diferentes concentrações: a) 4 % no gel de aplicação e concentração da amostra; b) 10 % e 16 % para os géis de espaçamento e separação, respectivamente. As amostras foram preparadas para aplicação, solubilizando-se 100 μL do extrato em 100 μL de tampão (4 % SDS, 12 % glicerol, 50 mM de Tris, 2 % β -mercaptoetanol, 0,01 % azul de Coomassie R- 250 em pH 6,8). A corrida eletroforética foi realizada em sistema contendo tampão A (Anodo, Tris 1M, HCl 0,225 M, pH 8,9) e Tampão B (Catodo, Tris 1 M, Tricina 1 M, SDS 1 %, pH 8,25). A

corrida foi realizada em duas etapas: a primeira de 30 min sob uma tensão de 30 V e a segunda, de 2 h, sob uma tensão de 90 V. Para identificação dos peptídeos foi utilizado o padrão de massa molecular (ColorBurst), com as seguintes proteínas (em kDa): 210; 90; 65; 40; 30; 20; 13; 8.

3.8. Extração e detecção de plasmídeo de RNA de fita dupla (dsRNA) de *S. koalae*

Para a extração seguiu-se a metodologia descrita por Maqueda et al., (2010) com modificação. As culturas de células da levedura foram crescidas em meio de cultura YEPD, em overnight a 150 rpm, centrifugadas à 4.000 rpm por 6 min, lavadas com Na₂EDTA 50 mM (pH 7,5), centrifugadas novamente e, incubadas em 1 mL de Tris-H₂SO₄ 50 mM, pH 9,3 contendo 1 % de 2-mercaptoetanol durante 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram centrifugadas à 5.000 rpm por 10 min e ressuspendidas em 1 mL de NaCl 0,1 M / Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 / Na₂EDTA 10 mM/ 0,2 % (SDS). Em seguida, foi adicionado 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). Após adição de 1/10 volume (70 µL) de acetato de sódio 3 M, os ácidos nucleicos foram precipitados adicionando-se 1 mL de isopropanol, previamente arrefecido, incubados durante 5 min à temperatura ambiente e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70 %, deixado secar por 2 min e dissolvido em 50 µL de TE pH 8, em seguida foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo brometo de etídio, utilizado como padrão molecular de bandas o λ Hind III, em uma corrida de 90 V por 2 horas.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação e caracterização fenotípica da levedura *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42)

4.1.1. Identificação e confirmação da espécie de levedura

O resultado mostrou que o isolado ACBL-42, apresentou região ITS do rDNA em 600 bp, a comparação da sequência obtida contra a base de dados NCBI apresentou 98 % de identidade para *Sporobolomyces koalae* (Figura 2).

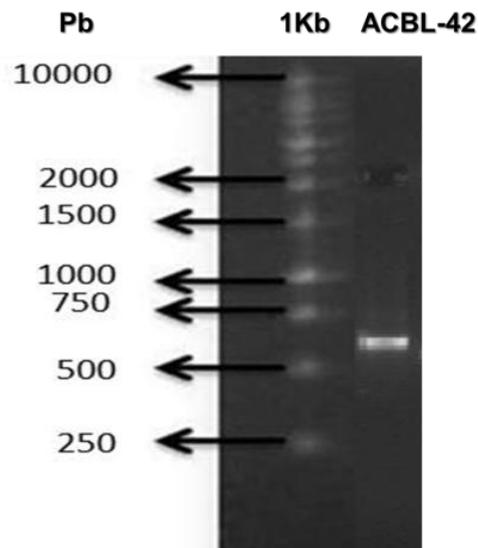


Figura 2. Gel de agarose (1 %) do produto de PCR da linhagem de levedura selecionada. 1 Kb – marcador molecular, (Agentes de Controle Biológico Levedura – ACBL).

4.1.2. Condições ótimas de crescimento da colônia de *S. koalae* e caracterização fenotípica.

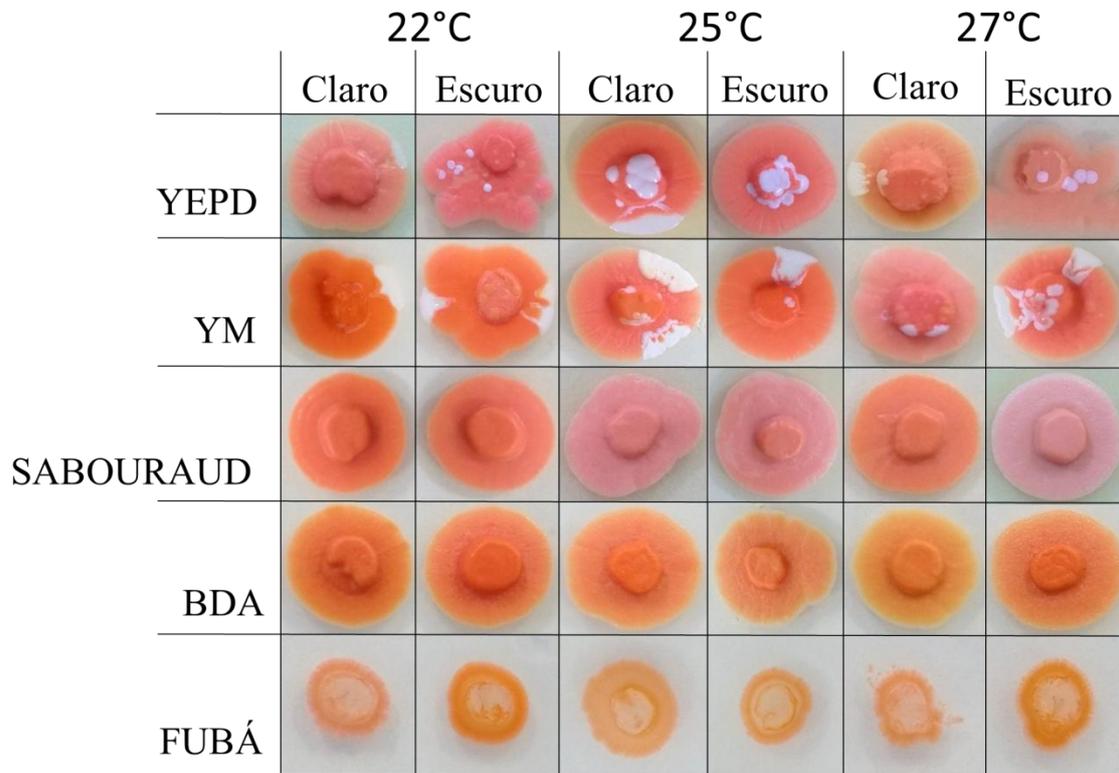


Figura 3. Caracterização fenotípica de *Sporobolomyces koalae* em diferentes meios de cultura, temperaturas e pH, após 10 dias de incubação.

Tabela 3. Características Culturais das Colônias.

	Meio de Cultura	Ambientes	Cor	Textura	Tamanho (cm)	Elevação	Tipo de borda	Brilho
22°C	YEPD	Claro	Pêssego e Branco	Creмоса	1,58	Convexa	Ondulada	Fosco
		Escuro	Pêssego e Branco	Creмоса	1,92	Convexa	Lobada	Fosco
	YM	Claro	Laranja e Branco	Creмоса	1,61	Convexa	Ondulada	Brilhante
		Escuro	Laranja e Branco	Creмоса	1,45	Convexa	Ondulada	Brilhante
	SABOURAUD	Claro	Salmão	Creмоса	1,5	Convexa	Lisa	Fosco
		Escuro	Salmão	Creмоса	1,48	Convexa	Lisa	Fosco
	BDA	Claro	Laranja	Creмоса	1,48	Convexa	Lisa	Fosco
		Escuro	Laranja	Creмоса	1,45	Convexa	Lisa	Fosco
	FUBÁ	Claro	Laranja	Filamentosa	0,85	Achatada	Filamentosa	Brilhante

25°C	YEPD	Escuro	Laranja	Filamentosa	0,96	Achatada	Filamentosa	Brilhante	
		Claro	Laranja e Branco	Creмоса	1,46	Convexa	Lisa	Brilhante	
		Escuro	Salmão e Branco	Creмоса	1,53	Convexa	Ondulada	Fosco	
	YM	Claro	Laranja e Branco	Creмоса	1,61	Convexa	Ondulada	Fosco	
		Escuro	Laranja e Branco	Creмоса	1,66	Convexa	Lisa	Brilhante	
	SABOURAUD	Claro	Rose	Creмоса	1,65	Convexa	Ondulada	Fosco	
		Escuro	Rose	Creмоса	1,7	Convexa	Ondulada	Fosco	
	BDA	Claro	Laranja	Creмоса	1,56	Convexa	Ondulada	Fosco	
		Escuro	Laranja	Creмоса	1,85	Convexa	Ondulada	Fosco	
	FUBÁ	Claro	Laranja	Filamentosa	1,01	Achatada	Filamentosa	Brilhante	
		Escuro	Laranja	Filamentosa	1,05	Achatada	Filamentosa	Brilhante	
	27°C	YEPD	Claro	Laranja e	Creмоса	1,53	Convexa	Ondulada	Fosco

YM	Escuro	Branco Pêssego e Branco	Cremosa	1,62	Convexa	Lobada	Fosco
	Claro	Pêssego e Branco	Cremosa	1,45	Convexa	Ondulada	Fosco
	Escuro	Salmão e Branco	Cremosa	1,57	Convexa	Lisa	Fosco
SABOURAUD	Claro	Salmão	Cremosa	1,6	Convexa	Lisa	Fosco
	Escuro	Rose	Cremosa	1,67	Convexa	Lisa	Fosco
BDA	Claro	Laranja	Cremosa	1,52	Convexa	Lisa	Fosco
	Escuro	Laranja	Cremosa	1,57	Convexa	Lisa	Fosco
FUBÁ	Claro	Laranja	Filamentosa	0,95	Achatada	Filamentosa	Brilhante
	Escuro	Laranja	Filamentosa	0,97	Achatada	Filamentosa	Brilhante

4.1.3. Caracterização morfológica celular de *S. koalae*

As células de *S. koalae*, observadas microscopicamente, apresentaram-se no formato oval (Fig.4), não havendo diferença entre os meios de cultura e condições ambientais testadas.

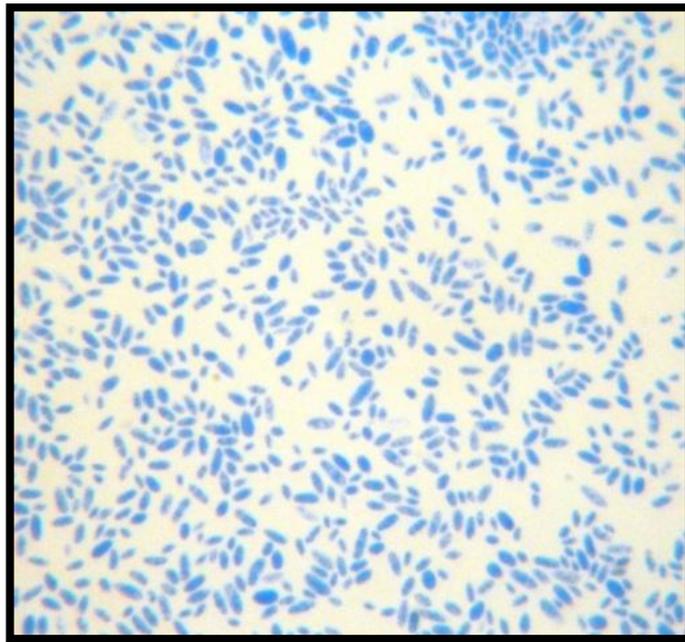


Figura 4: Células de *Sborobolomyces koalae*, cultivada em meio de cultura YEPD, observadas em microscópio óptico (40x).

4.2. Detecção de atividade *killer* no precipitado proteico da levedura

O precipitado proteico de *S. koalae*, apresentou atividade *killer* (Fig. 5) quando testado contra a levedura *S. cerevisiae* NCYC 1006, sensível ao fator *killer*. Mostrando um significativo halo de inibição, seguido de uma zona azul (indicativo de morte celular da célula sensível).

Já quando o precipitado proteico foi testado contra os fungos fitopatogênicos *G. citri-aurantii* e *P. digitatum*, não foi detectado atividade *killer* (Fig. 6).

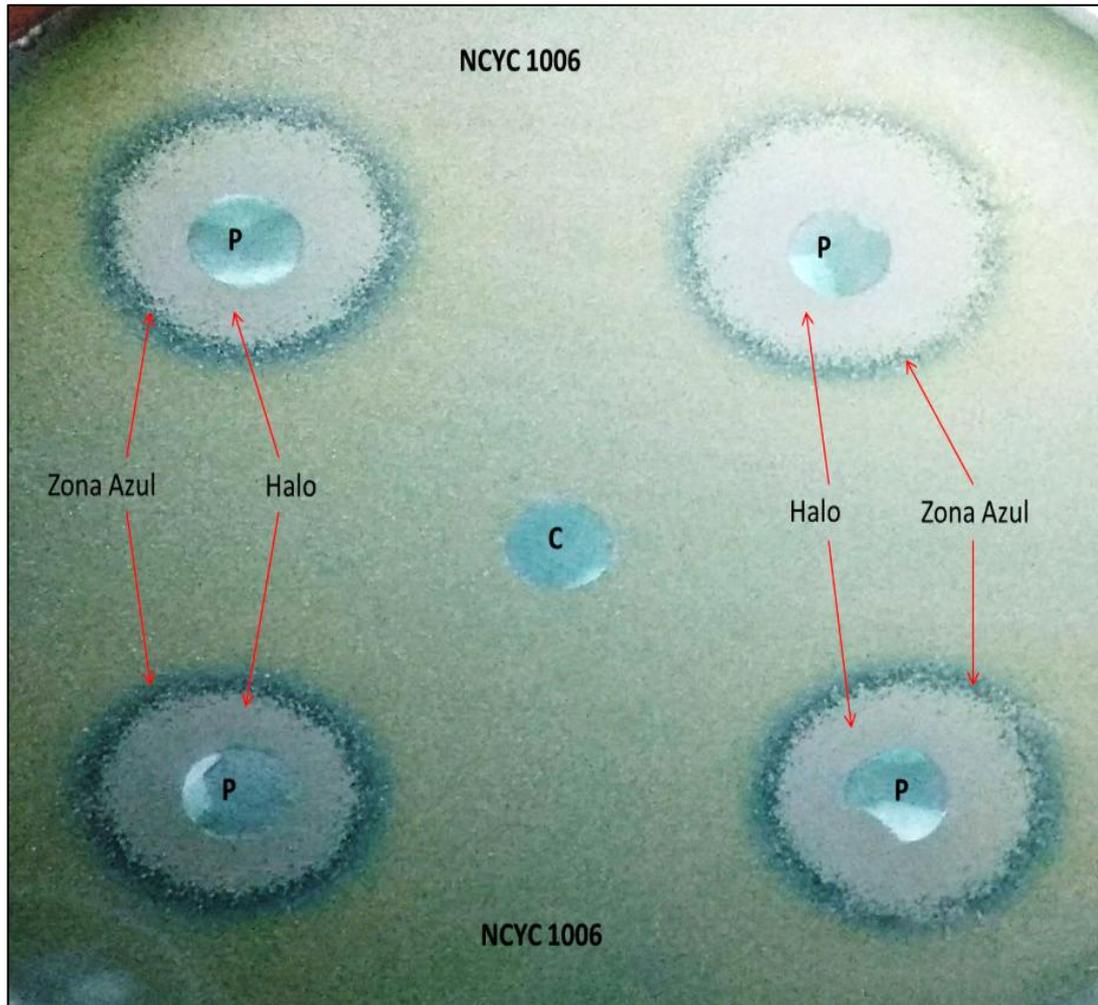


Figura 5. Atividade *killer* do precipitado proteico de *Sporobolomyces koalae*. Atividade representada por um halo de inibição e zona azul ao redor do halo, indicativo de morte celular da levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006. Meio de cultura YEPD- azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C. (P- precipitado proteico de *Sporobolomyces koalae* (20 μ L) e C – Controle negativo com água destilada estéril (20 μ L).

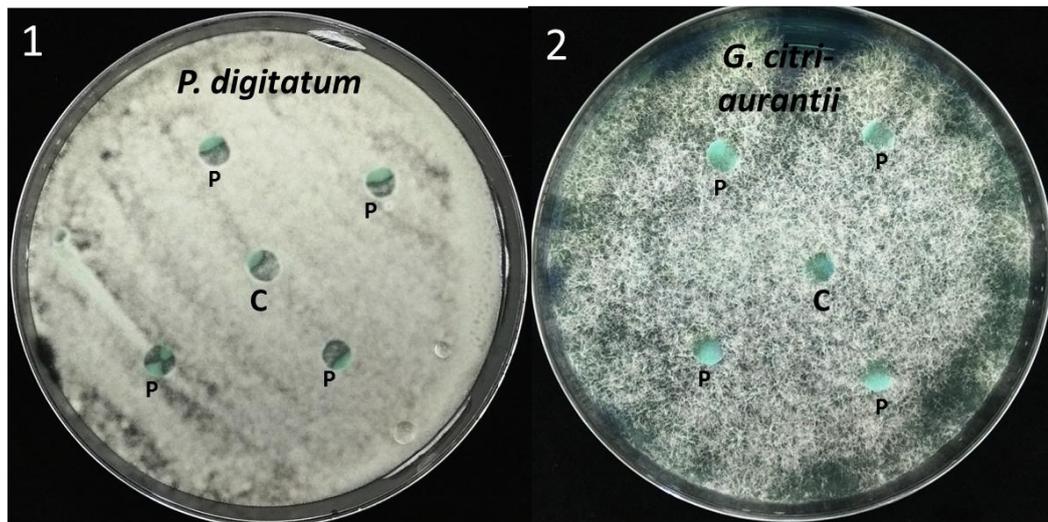


Figura 6. Atividade *killer* do precipitado proteico de *Sporobolomyces koalae*. 1- contra *Penicillium digitatum*; 2- contra *Geotrichum citri-aurantii*. Meio de cultura YEPD- azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C. (P- precipitado proteico de *S. koalae* (20 μ L) e C – Controle negativo com água destilada estéril (20 μ L).

4.3. Caracterização do perfil proteico de *S. koalae*

A Figura 7 mostra o perfil de proteínas secretadas e identificadas no extrato de *S. koalae*. A identificação de proteínas no extrato bruto da levedura, em SDS – Page, revelou a presença de um grupo heterogêneo com massa molecular relativa entre ($M_r \sim 10$ e 90 kDa).

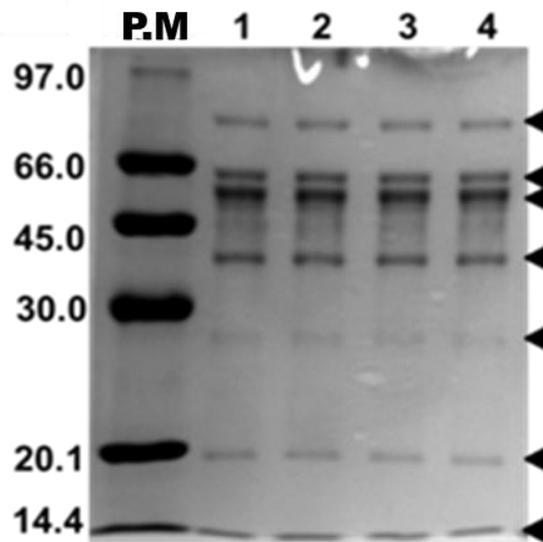


Figura 7. Caracterização do perfil proteico de *Sporobolomyces koalae*. SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida (13%), tampão Tris-glicina (pH 8.3). MM- Padrão Molecular, 1 ao 4 - Replicatas do precipitado.

4.3.1. Análise proteômica em segunda dimensão

Os resultados da análise proteômica mostram que a espécie de levedura estudada é capaz de produzir e secretar diferentes proteínas, com massa molecular e ponto isoelétrico característico de proteínas neutras a alcalinas. Pode-se evidenciar um perfil de proteínas com caráter alcalino, quando submetidas à análise proteômica em segunda dimensão (Fig. 8).

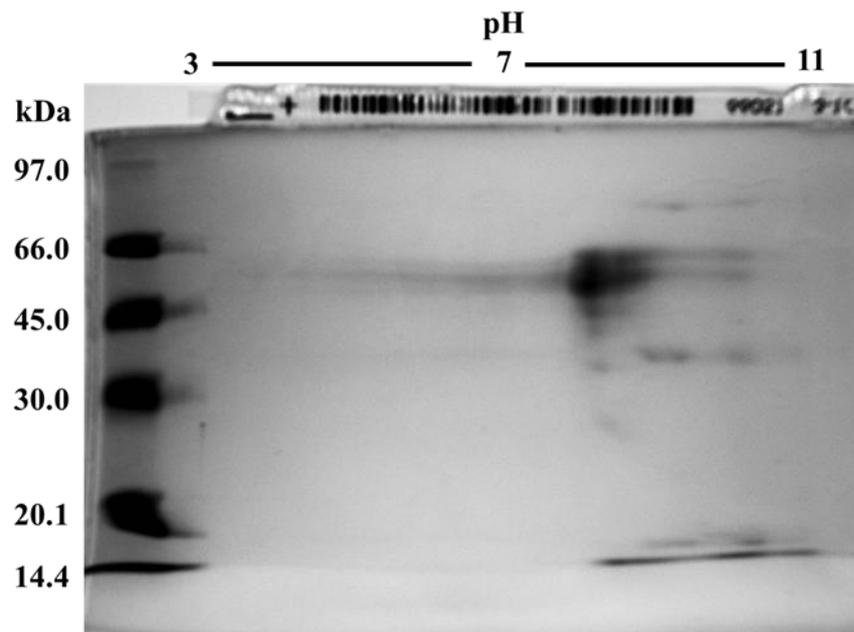


Figura 8. Caracterização bioquímica do extrato bruto proteico de *Sporobolomyces koalae*. SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida (11 %), tampão Tris-glicina (pH 8.3). Eletroforese 2D e ponto isoelétrico do extrato bruto proteico de *Sporobolomyces koalae* (150 µg) em gradiente não-linear (3-11 NL).

4.3.2. Determinação cinética de quitinases e β -1, 3-glucanases

Para a caracterização cinética e identificação das enzimas produzidas por *S. koalae*, utilizou-se ensaios enzimáticos com substratos específicos para atividades de quitinase e β -1, 3-glucanase.

Podemos observar (Tabela 4) que houve produção de quitinase e β -1,3 glucanase, a partir do precipitado proteico excretado por *S. koalae*, e a concentração dessas enzimas aumentou com a concentração de proteínas.

Tabela 4. Atividade Quitinase e β -1,3-glucanase de *Sporobolomyces koalae*.

Proteínas (mg)	Quitinase ($\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	β -1,3 glucanase ($\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
0,25	0,56	0,56
0,6	1,01	1,05
1,2	1,12	1,12

4.3.3. Determinação da atividade proteolítica

Os resultados observados na Figura 9 mostraram a presença de enzimas com atividade proteolítica, sendo este efeito dependente da concentração do extrato proteico.

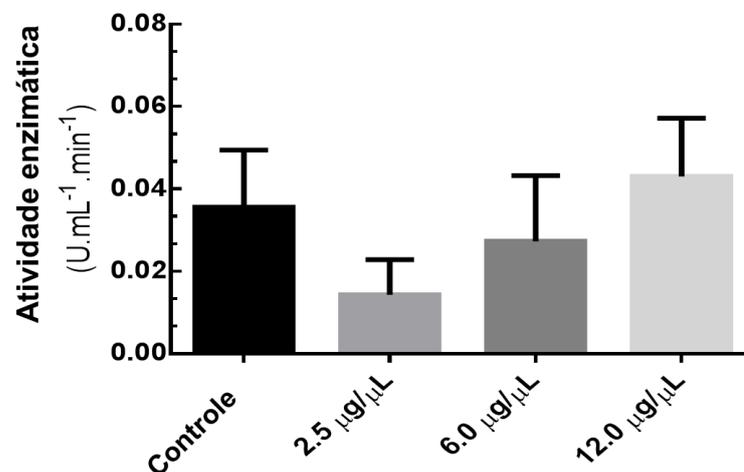


Figura 9. Atividade proteolítica. 100 μL de azocaseína (4 %) em Tris 100 mM (pH 8,0) incubado com diferentes concentrações do precipitado proteico (2,5; 6,0; 12,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Atividade proteolítica determinada espectrofotometricamente (λ 442 nm). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,01 na absorvância.

4.4. Estudo do rendimento do precipitado proteico de *S. koalae*

4.4.1. Dosagem de Proteínas por diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico

Com o intuito de aumentar o rendimento de proteínas de *S. koalae*, diferentes agentes precipitantes foram utilizados. A concentração de proteínas foi maior quando foi utilizado o Sulfato de amônio com (16,17 mg/mL), seguido pelo Etanol 2x volume (6,89 mg/mL), Etanol 80% (5,88 mg/mL) e Acetona (0,55 mg/mL), respectivamente.

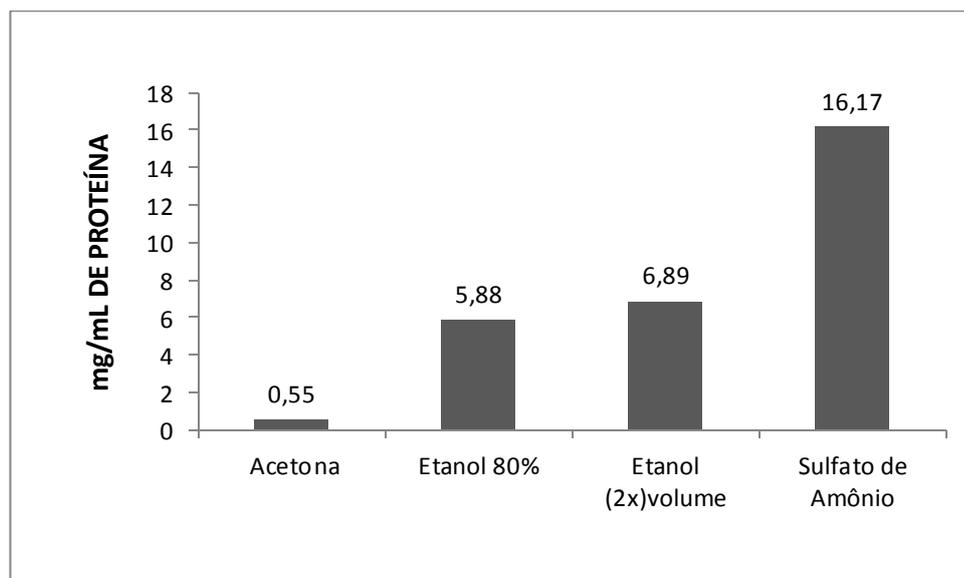


Figura 10. Concentração de proteínas (mg/mL) presente nos precipitados com diferentes agentes à partir da cultura de *Sporobolomyces koalae* cultivada em 1 L de YEPD líquido por 72 horas à 27 °C.

4.4.2. Caracterização do perfil de proteínas nos diferentes métodos de obtenção do precipitado proteico

O perfil de proteínas foi alterado quando se variou os agentes precipitantes da cultura de *S. koalae*. Quando se utilizou etanol 80 %, verifica-se uma maior separação das proteínas e intensidade de todas as bandas proteicas (Fig. 11 - 2), quando comparado com os demais precipitantes.

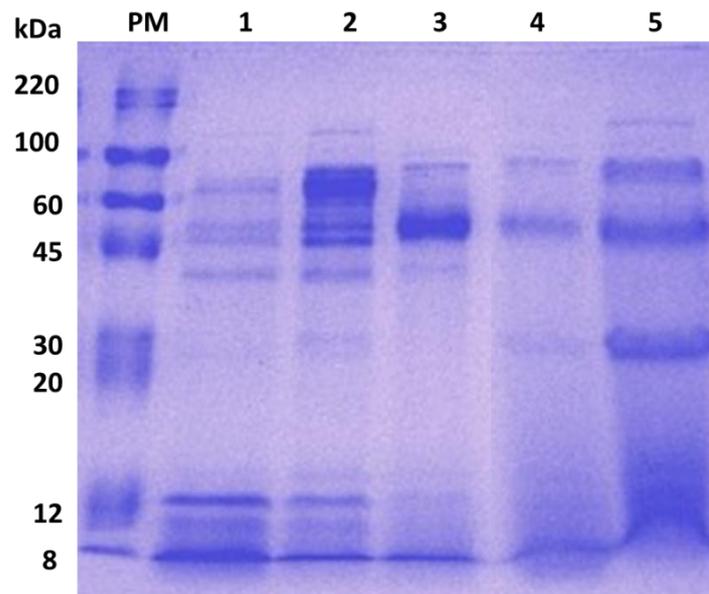


Figura 11. Caracterização do perfil proteico de *Sborobolomyces koalae* com diferentes agentes precipitantes. SDS-PAGE em gel de acrilamida-bisacrilamida (13%), tampão Tris-glicina (pH 8.3). PM- Padrão molecular; 1 – Controle (Perfil de proteínas de *S. koalae*); 2 – Etanol 80 %; 3 – Etanol 2x volume; 4 – Acetona; 5– Sulfato de amônio.

4.4.3. Atividade *killer* do precipitado da levedura, após submissão aos diferentes métodos de precipitação

Observou-se que quando se utilizou o etanol 80 %, como agente precipitante, a atividade *killer* de *S. koalae* contra a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC1006 foi bem maior que nos demais agentes de precipitação (Tabela 5 e Fig. 12).

Com os fitopatógenos *G. citri-aurantii* e *P. digitatum* não foi observado atividade *killer*, independente da utilização dos diferentes agentes precipitantes (Fig. 13 e 14).

Tabela 5. Atividade *killer* (cm) dos diferentes precipitados proteicos contra a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006.

Precipitados Proteicos	Tamanho médio do halo de inibição (cm)
Etanol 80 %	1,13 a ⁽¹⁾
Etanol (2x) volume	0,55 b
Sulfato de Amônio	0,50 b
Acetona	0,00 c

(1) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

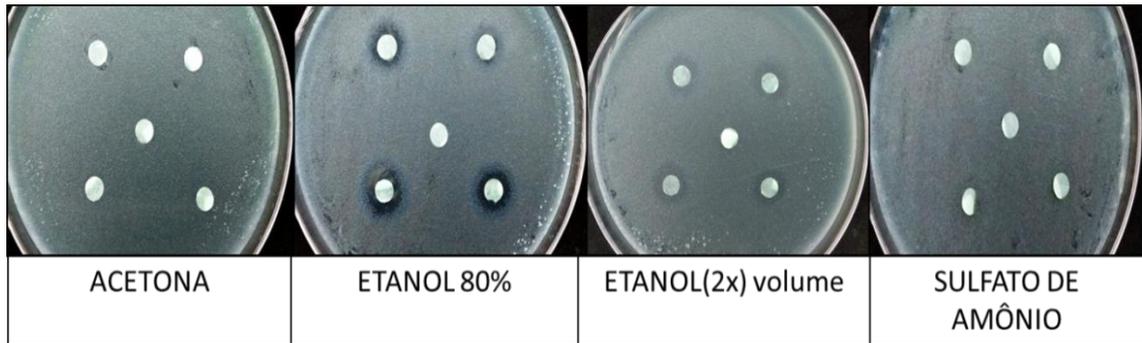


Figura 12. Atividade *killer* apresentada pelos precipitados proteicos de *Sporobolomyces koalae*, obtidos a partir de diferentes agentes precipitantes, contra a levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006. Meio de cultura YEPD-azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C.

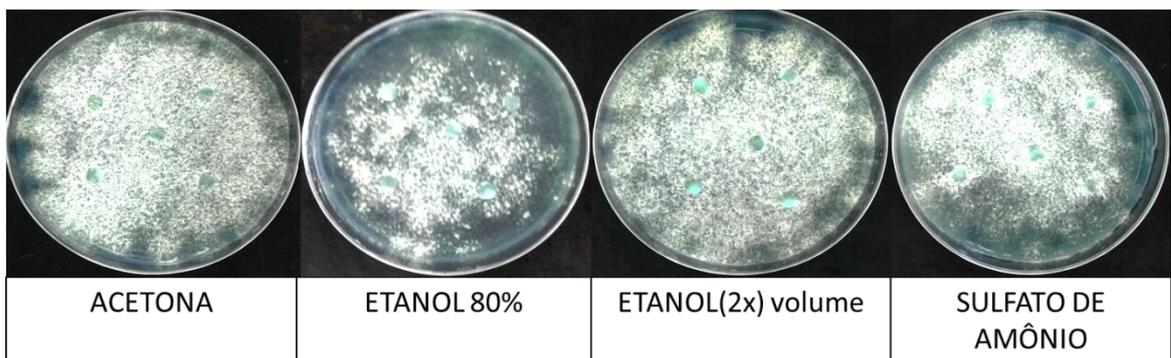


Figura 13. Atividade *killer* apresentada pelos precipitados proteicos de *Sporobolomyces koalae*, obtidos a partir de diferentes agentes precipitantes, contra o fungo *Geotrichum citri-aurantii*. Meio de cultura YEPD-azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C.

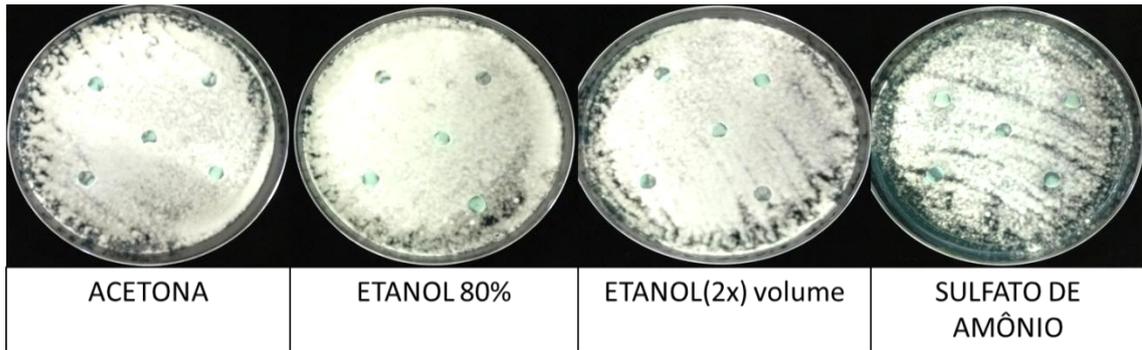


Figura 14. Atividade *killer* apresentada pelos precipitados proteicos de *Sporobolomyces koalae*, obtidos a partir de diferentes agentes precipitantes, contra o fungo *Penicillium digitatum*. Meio de cultura YEPD-azul de metileno (pH 4,6) a 27 °C.

4.5. Caracterização da toxina *killer*

4.5.1. Condições ótimas para atividade da toxina *killer* de *Sporobolomyces koalae*

Foram avaliadas as melhores condições de pH e de temperatura para a atividade *killer* utilizando o precipitado proteico de *S. koalae*. A maior atividade *killer* foi observada em condições de pH 4.9, seguido do pH de 5.4, 4.6, 3.5 e 4.0, respectivamente (Tabela 6).

Com relação às temperaturas testadas, não houve diferença estatística entre as temperaturas de 22 °C, 25 °C e 27 °C, onde todas apresentaram atividade *killer* contra a levedura sensível. Porém, a atividade *killer* diminuiu nas temperaturas de 30 °C e 5 °C (Tabela 7 e Fig. 15).

Pode-se observar que, no pH 4.9 e na temperatura de 22 °C, o precipitado proteico de *S. koalae* apresentou maior atividade, ilustrado pelo halo de inibição, linha e zona azul (esses últimos são indicativos da morte celular da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) (Fig. 15).

Tabela 6. Influência de diferentes pH na atividade *killer* de *Sporobolomyces koalae*.

pH	Médias	
pH 3.5	0,75	d ⁽¹⁾
pH 4.0	0,62	e
pH 4.6	0,89	c
pH 4.9	1,20	a
pH 5.4	1,06	b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 7. Influência de diferentes temperaturas na atividade *killer* de *Sporobolomyces koalae*.

Temperaturas	Médias	
5 °C	0,16	c ⁽¹⁾
22 °C	1,17	a
25 °C	1,15	a
27 °C	1,14	a
30 °C	0,92	b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

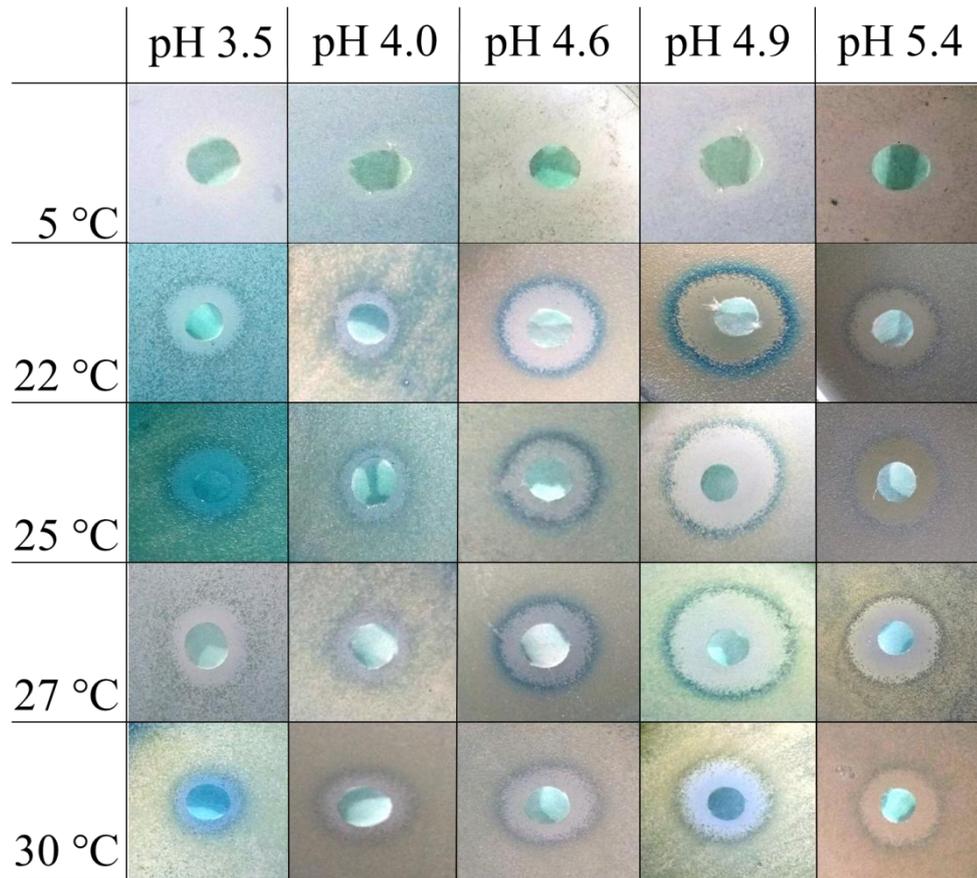


Figura 15. Condições de pH e de temperatura para a atividade *killer* utilizando o precipitado proteico de *Sporobolomyces koalae* contra *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006). Meio de cultura YEPD + azul de metileno.

4.6. Purificação parcial da toxina *killer* de *Sporobolomyces koalae*

4.6.1. Purificação parcial e caracterização bioquímica

Após a identificação de possíveis enzimas envolvidas no biocontrole e determinação de componentes proteicos principais, seguiu-se com a etapa de purificação. Os picos resolvidos foram separados em 6 frações, reunidos e submetidos aos ensaios de atividade *killer* e enzimas hidrolíticas.

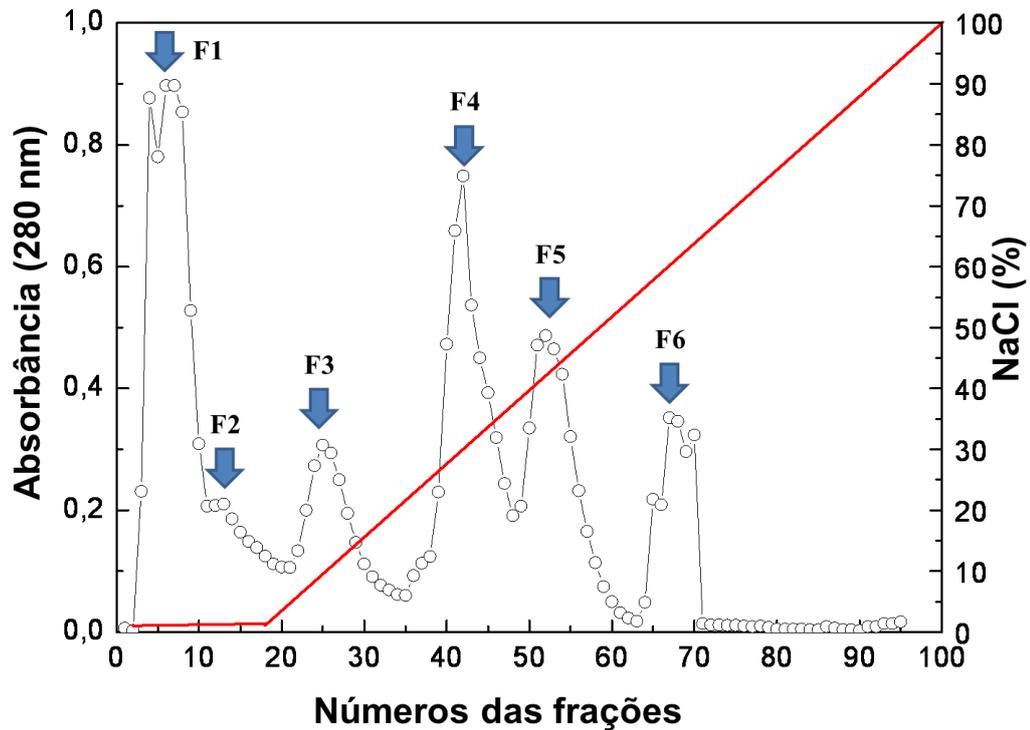


Figura 16. Cromatografia de troca iônica em DEAE - Celulose do extrato bruto de *Sporobolomyces koalae*, 150 mg de extrato bruto diluído em tampão Acetato (10 mM, pH 5,0) aplicado em coluna cromatográfica contendo DEAE - Celulose (1,6 cm x 100 cm) eluído no mesmo tampão em fluxo contínuo (0,6 mL/min, 4 mL/tubo). Perfil cromatográfico representado pela leitura dos tubos em espectrofotômetro (λ 280 nm).

4.6.2. Avaliação das frações quanto à atividade de Quitinases e β -1, 3-glucanase

Foi detectada atividade de quitinases e β -1, 3-glucanases somente na fração 1 resultante da cromatografia de DEAE- Celulose com o precipitado proteico de *S. koalae*.

Tabela 8. Atividade de Quitinase e β -1, 3-glucanase das frações resultantes da cromatografia DEAE - Celulose do precipitado proteico de *Sporobolomyces koalae*.

Amostras	β- 1,3- glucanase (g.L⁻¹.min⁻¹)	Quitinase (g.L⁻¹.min⁻¹)
Precipitado Proteico		
total	6,85	7,85
Fração 1	4,96	4,90
Fração 2	0	0
Fração 3	0	0
Fração 4	0	0
Fração 5	0	0
Fração 6	0	0

4.6.3. Avaliação das frações quanto à atividade *killer*

As frações resultantes da cromatografia foram analisadas quanto sua atividade e pode-se observar que somente a fração 1 apresentou atividade *killer* contra a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006. (Tabela 9 e Fig. 17).

Com relação ao teste de atividade das frações obtidas não foi detectada atividade *killer* contra os fitopatógenos (Fig.18 e 19).

Tabela 9. Teste de atividade *killer* das frações da cromatografia em DEAE-Celulose do precipitado proteico de *S. koala*.

FRAÇÕES							
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
+	-	-	-	-	-	-	-

+: atividade *killer* ≤1 mm; ++: atividade *killer* >1 mm; -: ausência de atividade *killer*.

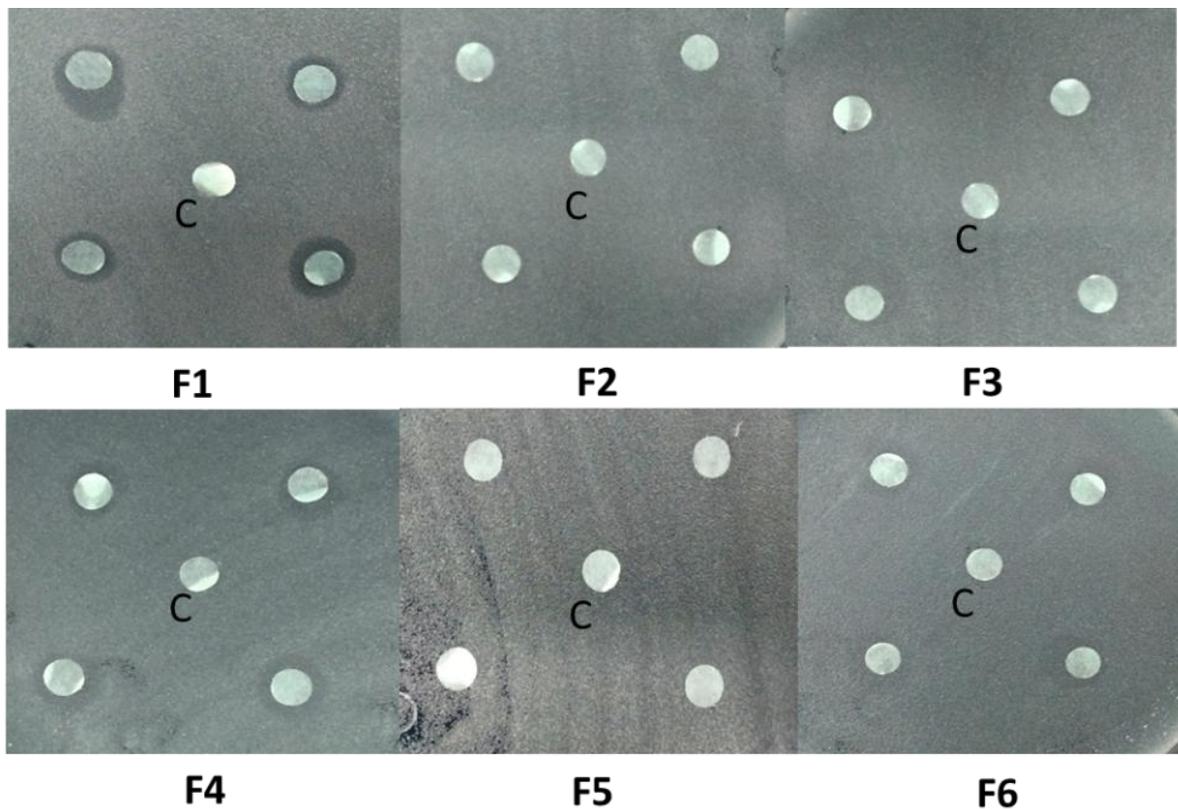


Figura 17. Avaliação das frações quanto à atividade *killer* contra a levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 ($1,0 \times 10^6$ células/mL). Frações diluídas em H₂O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. Incubação das culturas por 72 h a 27 °C. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. C - Controle (Tampão Acetato 10 mM, pH 5).

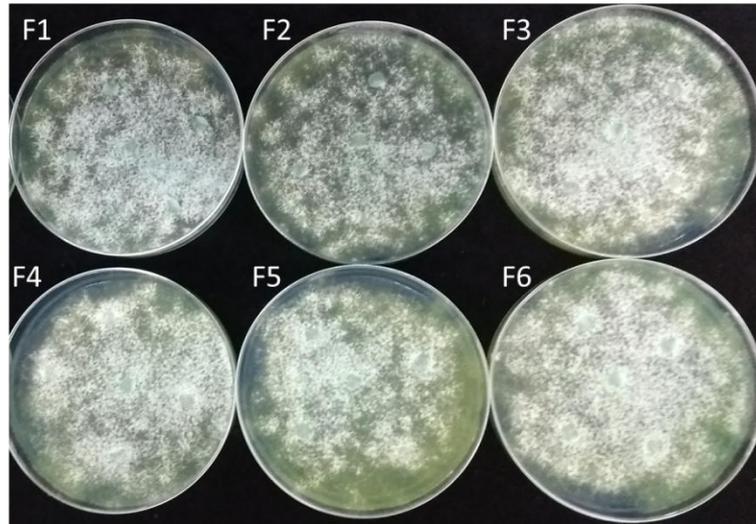


Figura 18. Avaliação das frações quanto à atividade *killer* contra o fungo *Geotrichum citri-aurantii* ($1,0 \times 10^5$ células/mL). Frações diluídas em H₂O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. Incubação das culturas por 72 h a 27 °C. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. C- Controle (Tampão Acetato 10mM, pH 5).

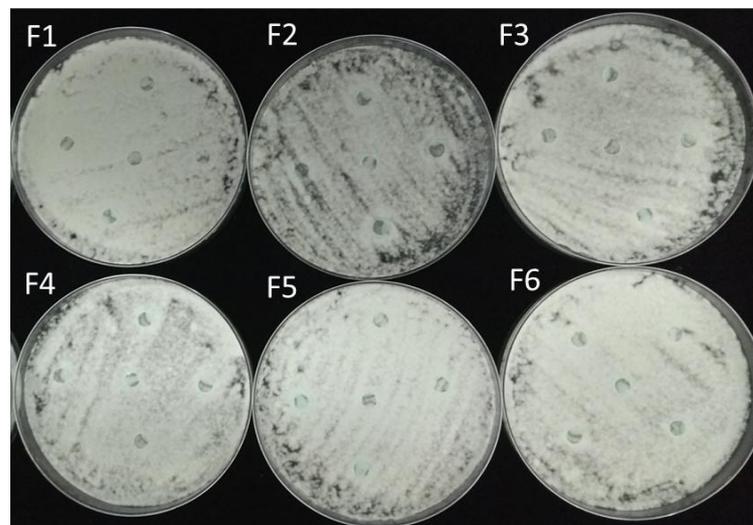


Figura 19. Avaliação das frações quanto à atividade *killer* contra o fungo *P. digitatum* ($1,0 \times 10^5$ células/mL). Frações diluídas em H₂O MiliQ e adsorvidas em discos de papel. Incubação das culturas por 72 h a 27 °C. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. C- Controle (Tampão Acetato 10 mM, pH 5).

4.6.4. Tricina – SDS Page (Caracterização do perfil de proteínas da fração ativa)

A fração (Fração 1) que apresentou atividade *killer* (item 4.6.1) foi submetida à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Pode-se notar, pelo perfil proteico (Fig. 20), que houve uma purificação parcial das proteínas com diferentes pesos moleculares, verificando-se a existência de aproximadamente 4 bandas proteicas com tamanho aproximado que variam de 8 a 65 kDa.

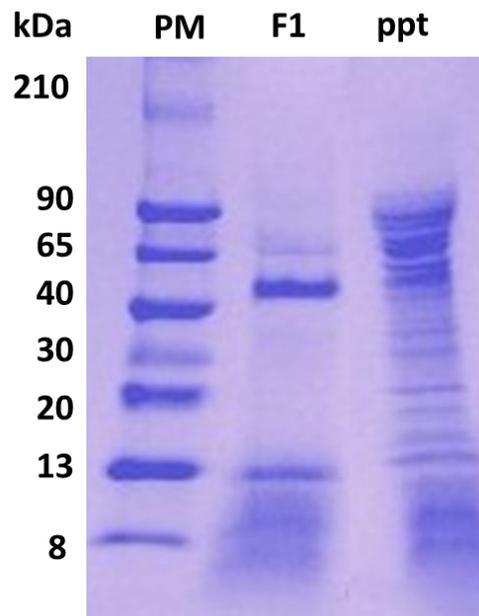


Figura 20. Tricina – SDS Page da fração ativa (F1) da cromatografia de troca iônica. (PM) Padrão Molecular; (1) Fração 1 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); (ppt) Precipitado proteico de *S. koalae* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Condições eletroforéticas: 2h, 20 mA, 90V. Gel corado com Azul de Coomassie R-250, Acrilamida-bisacrilamida (4 % no gel de aplicação e concentração da amostra; 10 % no gel de espaçamento; 16 % no gel separação), tampão Tris-tricina 1 M, pH=8,25 , SDS (0,1 %).

4.7. Extração e detecção de plasmídeo de RNA de fita dupla (dsRNA) de *S. koalae*

A extração e detecção de dsRNA do isolado ACBL-42 foi analisada por eletroforese em gel de agarose. Os resultados mostraram que a levedura não apresenta as duas espécies de plasmídeo dsRNA (L e M-dsRNA) necessárias para produção da toxina *killer*, quando comparado com a cepa padrão *killer* (KL88), tipo K1 (Fig. 21). Portanto, acredita-se que pelo resultado apresentado, que a toxina *killer* produzida por *S. koalae* pode ser de origem cromossomal.

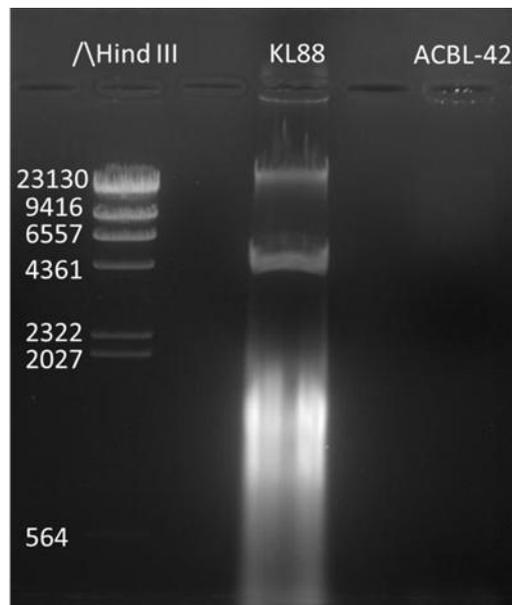


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1 % da extração de dsRNA da levedura *S. koalae* – ACBL 42 e KL-28 padrão *killer* K1. Padrão de peso molecular λ Hindi III.

5. DISCUSSÃO

Sporobolomyces koalae é uma nova espécie de levedura com potencial para produção de toxina *killer*, porém, não existem relatos na literatura sobre quais são as proteínas que são excretadas por esse organismo e quais estariam envolvidas na

atividade *killer*. No intuito de se conhecer mais sobre as funções desse microrganismo no ecossistema e assim, suas possíveis aplicações biotecnológicas, esse trabalho apresenta resultados sobre a caracterização parcial bioquímica e funcional da toxina *killer* produzida pela levedura.

Durante a realização desse trabalho foi possível observar que *S. koalae* apresenta um grupo heterogêneo de proteínas alcalinas, em seu perfil proteico, com uma variação de tamanho entre 10 a 90 kDa. Toxinas *killer* possuem variadas massas moleculares que variam entre gêneros e espécies, sendo seu tamanho determinado pelos tipos de resíduos monossacarídeos que as constitui (IZGU et al., 2006). Dentre as proteínas, foi possível identificar a presença de protease, β - 1,3 glucanase e quitinase, que podem estar relacionadas com a atividade *killer* de *S. koalae*.

Os resultados obtidos no respectivo trabalho sobre as características da toxina *killer* de *S. koalae* e as possíveis proteínas envolvidas, especialmente, protease e a β - 1,3 glucanase corroboram com vários autores de literatura. Andrade (2011) caracterizou uma toxina *killer* de *Kodamaea ohmeri* ES92 como uma glicoproteína de massa molecular maior que 30 kDa, ao passo que a toxina de *Pichia anomala* NCYC 432 foi determinada em 47 kDa.

Buzzini e Martini (2002) verificaram a atividade enzimática proteolítica extracelular de microrganismos leveduriformes, como *Pseudozyma antarctica* e fungos filamentosos. Dentre as proteases, a classe pertencente às serino-proteases alcalinas se encontra entre as mais estudadas quanto às suas propriedades funcionais (MA et al., 2007; NI et al., 2008a; NI et al., 2008b; NI et al., 2009) além de caracterizadas com peso molecular relativo de, aproximadamente 30 kDa, o que corrobora com a faixa de peso molecular encontrado no respectivo estudo. Nesse contexto, Zhang et al., (2012) verificou que proteases secretadas, extracelularmente, por *Aureobasidium pullulans* foram responsáveis pela atividade de biocontrole contra patógenos de pós-colheita em maçãs e pêssegos.

Diversos gêneros de leveduras, como *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* e *Saccharomyces* apresentam atividade de β -glucanases (DEL REY et al., 1979; SALIGKARIAS et al., 2002; BAR-SHIMON et al., 2004) e, segundo Brock (1965), as duas exo-hidrolases (β -1,3 e β -1,6- glucanases) produzidas por *Hansenula wingei*

apresentavam peso molecular na faixa de 30 kDa (IZGU et al., 2004). Por outro lado, Dake et al. (2004) revelaram que a massa molecular da enzima β -1,3-glucanase purificada era cerca de 230 kDa, diferindo de outras glucanases de fungos que apresentam tamanhos que variam de 12 kDa a 83 kDa.

Yamamoto (1986) mostrou que toxina *killer* de *H. marakii* tem como sítio de ligação β -1,3-glucana, principal constituinte da parede celular fúngica e, que quando em contato com a parede do fungo a toxina causava danos à permeabilidade, tornando-a osmoticamente frágil e defeituosa, resultando em morte celular. O autor relatou, também, que essa toxina é codificada por genes cromossomais, assim como, a toxina *killer* de *S. koalae* deste estudo, que pode ser de origem cromossomal.

A baixa ou ausência de atividade *killer* pode ser atribuída à incapacidade de secreção; ao direcionamento da produção ao metabolismo intracelular ou à insuficiência dos métodos de detecção. Além disso, a atividade enzimática dos microrganismos pode sofrer interferência tanto dos fatores biológicos, bem como, físico-químico como, pH e temperatura (MACCHERONI et al., 2004).

No respectivo trabalho, observou-se que, as melhores condições de atividade da proteína *killer* foi em pH 4.9 e numa faixa de temperatura que variou de 22 a 27 °C. Havendo uma diminuição da atividade quando a toxina foi submetida a pH mais ácido (3.5 e 4.0) e em condições de temperaturas de 5 °C e a 30 °C. Ao contrário desse estudo, Muccilli et al. (2013) relataram que, *Wickerhamomyces anomalus* BS91 exibiu atividade *killer* contra células sensíveis de *S. cerevisiae* em uma faixa de pH de 3 a 4,5 e temperatura de 22 a 30 °C. Os autores descrevem, ainda, ser a toxina *killer* uma β -1,3-glucanase. Ainda, nesse contexto, outros autores como Soares e Sato (2000) demonstraram ótima atividade para a toxina de *S. cerevisiae*, em valores de pH entre 4,2 a 4,7. Marquina et al. (2001) relataram que o pH ideal para a produção de toxinas *killer* por *Williopsis Saturnus* var. *mrakii* é de 3,5, enquanto que, para *Debaryomyces hansenii* CYC 1021 é de 4.0. As proteínas *killer* do gênero *Hansenula*, particularmente, possuem estabilidade em ampla faixa de pH (4,0-10,0) e manutenção da atividade à 100 °C (ASHIDA, 1983).

De um modo geral, a maioria das toxinas apresenta máxima atividade e estabilidade em pH 4.5, tornando-se as toxinas instáveis e inativas em valores acima

de 5,0 (BUZZINI et al., 2007). Tal fato não está de acordo com as condições encontradas neste estudo, uma vez que em pH 5.4 a toxina manteve a sua atividade.

Com relação ao estudo dos métodos de precipitação de proteínas, apesar das metodologias em que foram avaliados sulfato de amônio e de etanol (2:1 v/v), como agentes precipitantes, apresentarem maior concentração de proteínas (mg/mL), optou-se por utilizar a precipitação com etanol 80 % (v/v), pois na análise de proteínas por SDS-Page foi possível visualizar uma maior separação das bandas e com mais intensidade, além de propiciar melhor atividade *killer*.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que houve uma purificação parcial das proteínas que constituem o precipitado proteico de *S. koalae*, onde a fração 1 mostrou a existência de aproximadamente 4 bandas proteicas com tamanho aproximado que variam de 8 a 65 kDa, com atividade *killer* sobre células sensíveis de *S. cerevisiae* e apresentando também atividade de quitinase e β -1,3-glucanase. No entanto, novas estratégias de purificação devem ser realizadas na fração 1, para separação dessas proteínas de maneira a elucidar qual das bandas é realmente responsável pelo fator *killer*.

O uso de leveduras *killer* como agentes de controle biológico de fitopatógenos que ocorrem em frutos e vegetais na pós-colheita tem sido relatado por vários autores (PARAFATI et al., 2016; PEREZ et al., 2018). No entanto, pelos resultados apresentados no respectivo estudo, não foi observado atividade *killer*, no precipitado proteico de *S. koalae*, contra os fitopatógenos testados, *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum*. Tal fato sugere que a atividade *killer* não é um dos mecanismos de ação adotado pela levedura no biocontrole desses patógenos, no entanto, pelo fato dessa levedura apresentar toxina *killer* contra células sensíveis (*S. cerevisiae* NCYC 1006), outros fitopatógenos devem ser testados quanto à sensibilidade ao fenômeno *killer* por *S. koalae*.

Os resultados apresentados neste estudo respondem, também, a hipótese levantada por Ferraz et al. (2016). Segundo os autores, o potencial de *S. koalae* no biocontrole da podridão azeda em frutos cítricos poderia estar relacionado à atividade *killer* da levedura. Dessa maneira, pode se dizer que esse mecanismo de ação não é o principal responsável pelo controle da doença.

Maiores estudos sobre as possíveis aplicações biotecnológicas dessas proteínas excretadas por *S. koalae* deverão ser realizados, até mesmo, no que se refere ao desenvolvimento de novas moléculas para controle de microrganismos de interesses.

6. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

- a) Foi possível detectar a presença de atividade *killer*, no precipitado proteico da levedura *Sporobolomyces koalae*, contra células sensíveis da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006;
- b) O precipitado proteico de *S. koalae* apresenta várias proteínas com diferentes tamanhos moleculares e, parte dessas proteínas é positiva para atividade de β 1,3-glucanase, quitinase e protease, podendo ser uma dessas enzimas ou, o sinergismo entre elas, o responsável pelo fator *killer* da levedura;
- c) A funcionalidade de suas proteínas para atividade *killer* aumenta em pH 4.9 e em uma faixa de temperatura de 22 °C a 27 °C;
- d) A purificação parcial das proteínas, que constituem o precipitado proteico de *S. koalae*, mostrou a existência de aproximadamente quatro bandas proteicas em uma das frações de purificação, Fração 1, com tamanhos aproximados que variaram de 8 a 65 kDa;
- e) A atividade *killer*, presente no precipitado proteico da levedura *S. koalae*, não apresenta ação antagônica sobre *G. citri-aurantii* e *P. digitatum*.

7. REFERÊNCIAS

ALADDIN, A.; MALEK R. A.; EL ENSHASY, H. A. *Killer Yeast, a Novel Biological Control of Soilborne Diseases for Good Agriculture Practice*, p.71-86. **Springer Nature Singapore** Pte Ltd. 2018 71 Z.A. Zakaria (ed.), *Sustainable Technologies for the Management of Agricultural Wastes, Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future*, Disponível em: < https://doi.org/10.1007/978-981-10-5062-6_6.

ANDRADE, M. L. **Caracterização e purificação parcial da toxina *killer* produzida pela levedura *Kodamaea ohmeri* ES92**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ASHIDA, T. New *killer* toxin of *Hansenula mrakii*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, p. 2953-2955, 1983. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10866066>>.

BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, New York. v. 45, p. 140-148, 2004.

BENITEZ, J. A; SILVA, A. J.; FINKELSTEIN, R. A. Environmental Signals Controlling Production of Hemagglutinin/Protease in *Vibrio cholera*. **Infection and Immunity**. v. 69, p. 6549–6553, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6549-6553.2001>>.

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

BRITES, A. S. M. **Seleção de linhagens de *Sacchamomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator *killer*, H2S e o carácter floculante**. 2003, 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

BROCK, T. D. β -Glucanase of yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York., v. 19, p. 623-629, 1965.

BUSSEY, H. Effects of yeast *killer* factor on sensitive cells.. **Nature:New Biology**, Montreal, v. 235, p. 73-75, 1972.

BUSSEY, H. Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast "*killer* toxin". **Experientia**, Suíça, v. 46, p. 193-200, 1990.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Largescale screening of *selected Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* *killer* toxin activity against pathogenic yeasts. **Medical Mycology**, v.39, p.479- 482, 2001.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal Applied Microbiology**, v. 93, p. 1020-1025, 2002. Disponível em: <doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x>.

BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; VAUGHAN-MARTINI, A. The use of *killer* sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 6, p. 749-760, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00238.x>.

DAKE, M. S.; JADHAV, J. P.; PATIL, N. P. Induction and properties of (1->3)- β -D-glucanase from *Aureobasidium pullulans*. **Indian Journal of Biotechnology**, Índia, v. 3, p. 58-64, 2004.

DEL REY, F.; GARCIA-ACHA, I.; NOMBELA, C. The regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. **Journal of General Microbiology**, London. v. 110, p. 83- 89, 1979.

CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI, M.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; MIDDELHOVEN, W.J. Occurrence of *killer* yeasts in leafcutting and nests. **Folia Microbiology**, v.43, n.3, p.259- 262, 2002.

CASTORIA, F.; CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: studies on its modes of action. **Biology and Technology**, v. 22, p. 717, 2001.

CASSONE, A.; BERNARDES, F.; CONTI, S.; POLONELLI, L. Antibodies, *killer* toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature? **Viewpoint Immunology Today**, v. 18, n. 4, p. 164- 168, 1997.

CHEN, W.; HAN, Y.; JONG, S.; CHANG, S. Isolation, purification, and characterization of a *killer* protein from *Schwanniomyces occidentalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, p.5348- 5352, 2000.

COMITINI, F.; DI PIETRO, N.; ZACCHI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. **Microbiology**. v. 150, p. 2535 - 2541, 2004.

DE HOOG, G. S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M. J. Atlas of Clinical Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili. **Reus, Spain**, p. 708-711, 2000.

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.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, v. 2, cap. 28, p. 239-269, 2005.

FIEIRA, C. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 33, p. 40-46, 2013.

FIORI, P.L.; MATTANA, A.; DESSÌ, D.; CONTI, S.; MAGLIANI, W.; POLONELLI, L. In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.891-898, 2006.

FISCHER I. H.; AFONSECA L. S.; SPÓSITO M.B.; AMORIM L. Characterization of the fungal population in citrus packing houses. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, p 449-460, 2009.

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.2530, 2008.

GOLUBEV, W. I. Antagonistic interactions among yeasts. In: **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 197-219.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the Biureto reaction. **Journal of biological chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

GRZEGORCZYK M.; ZAROWSKA B., RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI G. 2017. Postharvest biocontrol ability of *killer* yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. **Food Microbiology**. v. 61, p. 93-101, 2017.

HAMAMOTO. M.: NAKASE. T. Phyllogenetic analysis of the ballistoconidium forming yeast genus *Sporobolomyces* based on 18S rDNA sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1373-1380, 2000. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/50/3/0501373a.pdf?expires=1489082265&id=id&accname=quest&checksum=D0B160088A79A988E9135B9E4E628099>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

HARDY, K. G. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriological Reviews*, v.39, p. 464–515, 1975.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; YUCELIS, A. Identification and killer activity of yeasts contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. **Food microbiology**, v. 14, n. 2, p. 125-131, 1997.

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, n. 4, p. 669-676, 2006.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; DERINEL, Y. 2004. Immunization of the industrial fermentation started culture strain of *Saccharomvces cerevisiae* to a contaminating *Killer*-toxin producing *Candida tropicalis*. **Food microbiology**, v. 21, n. 6, p. 635-640, 2004.

JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 40, p. 411-441, 2002.

KELLERMAN, M.; LIEBENBERG, E.; NJOMBOLWANA, N.; ERASMUS, A.; FOURIE, P. H. Postharvest dip, drench and wax coating application of pyrimethanil on citrus fruit: Residue loading and green mould control. **Crop Protection**, v. 103, p. 115-129, 2018.

KLEIN, M.N.; SILVA, A.C.; KUPPER, K.C. *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32, 12, p. 205, 2016.

KUPPER, K. C.; CERVANTES, A. L. L.; KLEIN, M. N.; SILVA, A. C. Avaliação de micro-organismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 20-31, 2013.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Yeast Systematic and Phylogeny -Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. **Berlin: Springer-Verlag Heidelberg**, p. 11-30, 2006.

LABBANI, F. Z. K.; TURCHETTI, B.; BENNAMOUN, L.; DAKHMOUCHE, S.; ROBERTI, R.; CORAZZI, L.; MERAIHI, Z.; BUZZINI, P. A novel *killer* protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 4, p. 961-970, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-5, 1970.

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

LARONE, D. H. (ed.). **Medically important fungi: a guide to identification**. Washington, D.C., 1995. 3rd ed. ASM Press, p. 1295.

LIMA, J.R.; BRUNO, L.M.; SILVA, J.L.A.; CASIMIRO, A.R.S. Potencial de utilização de leveduras *killer* para produção de cachaça. *Revista Ciência Agrônômica*. v.38, n.4, p.366- 371, 2007.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. R. B.; BRANDÃO, L. R.; ROSA, C. A.; VIANA, F. M. P. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 53, n. 7, p. 590-599, 2013.

LOPES, C.A.; LAVALLE, T.L.; QUEROL, A.; CABALLERO, A.C. Combined use of killer biotype and mtDNARFLP 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.

MA, C. L.; NI, X. M.; CHI, Z. M.; MA, L. Y.; GAO, L. M. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources **Marine Biotechnology**, Springer, v. 9, n. 3, p. 343-351, 2007.

MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 298-302, 2004.

MARQUINA, D.; BARROSO, J.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Production and characteristics of killer *Debaryomyces hansenii* toxin. **Microbiological research**, v. 156, n. 4, p. 387-391, 2001.

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

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D. POLONELLI, L. Yeast *killer* system. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10, p.369–400, 1997.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; ARSENI, S.; FRAZZI, R.; SALATI, A.; POLONELLI, L. *Killer* antiidiotypes in the control of fungal infections. **Current Opinion Investigational Drugs**, v.2, p.477- 479, 2001.

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.1118, 2004.

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

MASIH, E. I.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; MARMARAS, I.; AIT-BARKA, E.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 2, p. 227-232, 2001.

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

McKAY, A. H.; FOSTER, H.; ADASKAVEG, J. Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. **Plant Disease**, v. 96, p. 235-242, 2012.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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**, v. 165, p. 433-438, 2014.

MUCCILLI, S.; WEMHOFF, S.; RESTUCCIA, C.; MEINHARDT, F. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. **Yeast**. v. 30, p. 33–43, 2013.

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

NI, X. M.; CHI, Z. M.; LIU, Z.; YUE, L. X. Screening of protease producing marine yeasts for production of the bioactive peptides. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 27, p. 1-10., 2008a

NI, X. M.; CHI, Z. M.; MA, C. L.; MADZAK, C. Cloning, characterization, and expression of the gene encoding alkaline protease in the marine yeast *Aureobasidium pullulans* 10. **Marine Biotechnology**, v. 10, p. 319-327, 2008b.

NI, X. M.; YUE, L. X.; CHI, Z. M.; LI, J.; WANG, X. H.; MADZAK, C. Alkaline protease gene cloning from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* HN2-3 and the protease surface display on *Yarrowia lipolytica* for bioactive peptide production. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 81-89, 2009.

PARAFATI, L.; CIRVILLERI, G.; RESTUCCIA, C.; WISNIEWSKI, M. Potential role of exoglucanase genes (*waexg1* and *waexg2*) in the biocontrol activity of *Wickerhamomyces anomalus*. **Microbial Ecology**. Disponível em: <https://doi:10.1007/s00248-016-0887-5>. 2016.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; CIRVILLERI, G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**. v. 47, p. 85-92, 2015.

PALPACELLI, V.; CIANI, M.; ROSINI, G. Activity of different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. **FEMS Microbiology Letters**, v.84, p.7578, 1991.

PALFREE, G. F.; BUSSEY, H. Yeast *killer* toxin: purification and the characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. **The FEBS Journal**, v. 93, n. 3, p. 487-493, 1979.

PEREZ, F.; RAMIREZ, M.; REGODON, F.A. Influence of *killer* strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.79, p.393 -399, 2001.

PEREZ, M. F.; ISAS, A. S.; ALADDIN, A.; EL ENSHASY H. A.; DIB, J. R. . *Killer* Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons, p. 87-98. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018 71 Z.A. Zakaria (ed.), Sustainable Technologies for the Management of Agricultural Wastes, **Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future**, https://doi.org/10.1007/978-981-10-5062-6_6. 2018.

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

POLONELLI, L.; LORENZINI, R.; DE BERNARDIS, F.; MORACE, G. Potential therapeutic effect of yeast *killer* toxin. **Mycopathologia**, v. 96, n. 2, p. 103-107, 1986.

POLONELLI, L.; MAGLIANI, W.; CONTI, S.; BRACCI, L.; LOZZI, L.; NERI, P.; ADRIANI, D.; DE BERNARDIS, F.; CASSONE A. Therapeutic activity of an engineered synthetic *killer* antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. **Infection and Immunity**, v.71, p.6205- 6212, 2003.

RAST, D. M.; BAUMGARTNER, D.; MAYER, C.; HOLLENSTEINA, G. O. Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**. v. 64, p. 339-366, 2003.

RODRÍGUEZ, A. P. F.; VALDERRAMA, S.; HENAO, C. M. P.; OSORIO, J.; NEIRA, M. Y. Infecciones fúngicas emergentes: fungemia por *Sporobolomyces salmonicolor*. Reporte de un caso. **Infectio**, v. 14, p. 193-196, 2010.

SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTONA, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida quilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182. **Biological Control**, v. 25, n. 2, p. 151-161, 2002.

SANTOS, A.; MARQUINA, D.; BARROSO, J.; PEINADO, J.M. β -D, glucan as cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. **Letters of Applied Microbiology**, v.34, p.9596, 2002.

SANTOS, A.; MARQUINA, D.; LEAL, J. A.; PEINADO, J. M. (1 \rightarrow 6)-b-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1809-1813, 2000.

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

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.

SATOH, K.; MAKIMURA, K. *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from nasal smears of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 12, p. 2983-2986, 2008.

SCHÄGGER , H; JAGOW, G. V. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa . **Analytical biochemistry**, v.166, p. 368-379, 1987.

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

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 291-297, 2000.

STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. **Mycological Research**, v. 109, n. 3, p. 342-356, 2005.

SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G. **Guide to Clinically Significant Fungi**. Williams & Wilkins, Baltimore,1998.

[TALIBI, I.](#); ASKARNE, L.; [BOUBAKER, H.](#); BOUDYACH, E. [H.](#); [MSANDA, F.](#); SAAID, B.; AIT BEN AOUMAR, A. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. **Crop Protection**, v. 35, p. 41-46, 2012.

TEIXEIRA, M. C.; SANTOS, P. M.; FERNANDES, A. R.; SÁ-CORREIA, I. A proteome analysis of the yeast response to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Proteomics**. v. 5, p. 1889-1901, 2005.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., CLUSTAL, W., 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VILLALBA, M. L.; SÁEZ, J. S.; MONACO, S.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. TDKT. A new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 94-100, 2016.

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

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.

WICKNER, R. B. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 250, 1996.

WOODS, D.R.; BEVAN, E. A. Studies on the nature of the *killer* factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 115-126, 1968.

YAMAMOTO, T. Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a *killer* toxin secreted by *Hansenula mrakii*. **FEBS Letters**, v. 195, n. 1-2, p. 253-257, 1986.

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.

ZAGORC, T.; MARÁZ, A.; CADEZ, N.; JEMEC, K.P.; PETER, G.; RESNIK, M.; RASPOR, P. Indigenous *killer* yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology**, v.18, p.441- 451, 2001.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; VALENTE, S.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 453-464, 2012.

ZHU, H.; BUSSEY, H. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2105-2107, 1989.