



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde – Decania  
Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal.**

**ECOLOGIA DE LEVEDURAS MICOCINOGÊNICAS E POTENCIAL  
DE APLICAÇÃO COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO.**

**ANDERSON DE SOUZA CABRAL**



**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia  
Vegetal da Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências  
(Biotecnologia Vegetal).**

**Rio de Janeiro – Brasil  
2009**

ECOLOGIA DE LEVEDURAS MICOCINOGÊNICAS E POTENCIAL  
DE APLICAÇÃO COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO.

**ANDERSON DE SOUZA CABRAL**

Dr<sup>a</sup>. LEDA CRISTINA SANTANA MENDONCA-HAGLER

Prof<sup>a</sup>. Titular – IMPPG/UFRJ

Orientadora

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Biotecnologia Vegetal).**

**Rio de Janeiro – Brasil  
2009**

Anderson de Souza Cabral

**Ecologia de leveduras micocinogênicas e sua aplicação como agentes de controle biológico.**

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2009.

Orientado por:

---

Dr<sup>a</sup>. Leda Cristina Santana Mendonça-Hagler.

Aprovada por:

---

Dr<sup>a</sup> Denise Maria Mano Pessoa.

---

Dr<sup>o</sup>. Fábio Vieira de Araújo

---

Dr<sup>o</sup>. Fernando Portela Camara

---

Dr<sup>o</sup>. Ricardo Cardoso Vieira

---

Dr<sup>o</sup>. Rodolfo Pinheiro da Rocha Paranhos

Cabral, Anderson de Souza.

Ecologia de leveduras micocinogênicas e sua aplicação como agentes de controle biológico. / Anderson de Souza Cabral. Rio de Janeiro: UFRJ / PBV, 2009.

xiv, 116 f.: 31 cm

Orientador: Leda Cristina Santana Mendonça – Hagler  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 101 – 116.

1. Leveduras “killer”.
2. Leveduras endofíticas.
3. Micocinas.
4. Rizosfera de milho.
5. Biocontrole de Fitopatogênicos – tese I. Mendonça-Hagler, Leda Cristina Santana. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, PBV. III. Ecologia De Leveduras Micocinogênicas e Aplicação como Agente de Controle Biológico.

... é inevitável chegarmos à conclusão que todo o passado e todo o futuro se redundam a um e somente um momento: o presente. Não temos como agir no passado – mas somente nos ressentir ou nos vangloriar no presente. Não temos como agir no futuro – mas somente esperar ou nos prepararmos no presente. Assim, embora tanto o passado como o futuro tenham uma importância relevante, não podemos nos dispersar neles. Não vivemos no passado e não vivemos no futuro. Por isso, a importância de permanecermos onde e quando efetivamente estamos: no aqui-e-agora, descrevendo nosso modo de ser ou agir e, com isso, possibilitando um contato com o que é isto chamado de “presente” e suas necessidades.

Hugo Elidio Rodrigues

Dedico este trabalho e minha vida

À minha querida mãe.

À minha querida esposa, que com todo amor e dedicação, trilhou ao meu lado, todos os meus caminhos.

A meu filho, pelo abraço, pelo carinho e pelo sorriso...

## **Agradecimentos**

Agradecer a pessoas que contribuíram de alguma forma com um trabalho construído ao longo de uma formação é uma tarefa difícil, dado o número de Doutores, Mestres e colegas que compartilharam esses momentos de aprendizado e ao tentar citá-los certamente cometerei omissões injustas, entretanto, considero indispensável destacar pessoas que foram ao mesmo tempo, força, direção, apoio e amizade.

Além disso, um trabalho cujo tempo de dedicação é tão extenso não deixa impunes aqueles que de alguma forma nos rodeiam; nossos amigos e nossa família. Por isso, sem esquecer os anos nos quais faço parte do Laboratório de Ecologia Microbiana e Taxonomia, agradeço:

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Leda Mendonça que até hoje me surpreende com tamanha dedicação, serenidade, perspicácia e força e cuja experiência e generosidade foram essenciais à minha formação

Ao Dr. Allen Hagler cuja contribuição, sempre simpática e direta, somaram importantes esclarecimentos em todo esse percurso no meio científico;

Ao Dr. Andrew Macrae, que entre idas e vindas de nossa convivência buscou dividir sua experiência e redimir possíveis maus entendidos;

À Dr.<sup>a</sup> Fernanda Reinert, e ao Dr.<sup>o</sup> Celso Luiz Salgueiro Lage lideranças indispensáveis na condução de nosso programa de Pós-Graduação, e cuja orientação e compreensão, são fundamentais para a integração aluno instituição;

À Dr.<sup>a</sup> Rosalie Reed e aos amigos de seu laboratório, pelo auxílio com a concentração de toxinas;

À Dr.<sup>a</sup> Viviana Malirat e a Lya Sepúlveda MSc, pela demonstração de amizade e solidariedade, pela disponibilidade dos equipamentos e instalações do Centro Panamericano de Febre Aftosa.

À EMBRAPA Agrobiologia pelo suporte na preparação dos experimentos;

À CAPES, CNPq e PRONEX pelo fomento dispensado;

A minhas grandes amigas Patrícia Oscarina e Selma, que tornavam os dias e, principalmente, os alegres e culturais almoços, momentos inesquecíveis;

A meus companheiros de Doutorado, Tatiane Pinotti, José Roberto, Ida Direito e Zoraidy Lima, que dividiram o espaço do laboratório e suas experiências com a simples vontade de compartilhar, mostrando que a convivência sem competição é o melhor caminho no desenvolvimento de um trabalho;

Ao grande José Olavo, sujeito de difícil definição, dotado de inúmeras qualidades das quais destaco a humildade e dedicação;

Ao amigo Paulo, ex-paulinho, ex-estagiário e agora mestre, companheiro de Matheus, meu filho, nas festas e confraternizações de nosso laboratório. Camarada quase sempre anti-social, as vezes impaciente, mas com certeza, grande amigo;

A minha amiga Marcella, cujo crescimento acompanhei e hoje uso como exemplo de perseverança. Amiga, verdadeira e com um humor invejável;

Aos grandes estagiários Bernardo e Vinício e a nossa sub-estagiária Tainá, que como cidadãos e amigos já estão formados há muito tempo;

Aos amigos Karina, Nathália, Claudinha, Simone, Angela e João, sempre calados, com seus sorrisos entre dentes, mas com a perspicácia da piada na hora certa, da frase desconcertante de alerta, e que sei que se lembram de mim com carinho e amizade.

A nossos externos, Luiz Fernando Granja, Adriana Froes, Dr Jaime, Daniele Alves e Edir Martins pessoas que não são oficialmente pertencentes ao grupo, mas cuja contribuição, jamais será esquecida.

Aos amigos, Maria do Carmo, Patrícia Ferreira, Simone, Paulo (mineiro), Marcos (D'Goes), Andrei, Alexandre (Jaja), Rodrigo Costa e Newton Carlos, que sempre contribuem mesmo à distância.

A meu compadre Alexandre Pimenta, meu amigo dedicado desde os tempos da graduação, sempre presente, e ser humano dotado de uma simplicidade sem igual e grande coração;

À minha querida sogra Aurora, minha quase mãe, cuidadosa, zelosa, e sempre preocupada. Representante, aqui da família que fiz minha, não pelo convívio, mas pela presença e dedicação que todos dedicaram.

A meus pais, meus irmãos e sobrinhos, minha história. Pessoas cuja existência se confunde com a minha e que sei que sempre estarão por perto.

“quem caminha sozinho vai mais rápido, mas quem  
caminha acompanhado vai mais longe.  
A vida começa todo dia”

Érico Veríssimo.

## Sumário

	Agradecimentos	vii
	Resumo	xi
	Abstract	xii
	Sumário	ix
	Índice de Figuras	xiii
	Índice de Tabelas	xiv
	Prefácio	1
	<b>1. Introdução</b>	<b>3</b>
1.1.	Diversidade de leveduras	3
1.2.	A taxonomia de leveduras	11
1.3.	A produção de micocinas por leveduras	15
1.3.1.	A descoberta do fenômeno “killer”	15
1.3.2.	Mecanismos de ação das micocinas	16
1.3.3.	Aplicação de leveduras micocinogênicas em biotecnologia	19
1.4.	Características dos fungos fitopatogênicos selecionados para teste	23
1.5.	Hipótese	28
	<b>2. Objetivos</b>	<b>29</b>
	<b>3. Material e Métodos</b>	<b>30</b>
3.1.	Desenho experimental	30
3.2.	Estirpes utilizadas	30
3.3.	Taxonomia de Leveduras	31
3.3.1.	Taxonomia Convencional	31
3.3.1.1.	Morfologia	31
3.3.1.2.	Testes de Fermentação	32
3.3.1.3.	Crescimento em Diferentes Temperaturas	32
3.3.1.4.	Testes de Crescimento	33
3.3.1.5.	Teste de urease e DBB (corante Diazonium Blue B)	34
3.3.1.6.	Formação de esporos	34
3.3.2.	Caracterização molecular de leveduras	34
3.3.2.1.	Extração de DNA de leveduras	34
3.3.2.2.	Amplificação via PCR da região D1/D2 do 26S rDNA	35
3.3.2.3.	Amplificação via PCR da região espaçadora intergênica (ITS)	36
3.3.2.4.	Reação de Sequenciamento	37

3.3.2.5.	Purificação da reação de sequenciamento com kit comercial	37
3.3.2.6.	Precipitação da reação de sequenciamento com isopropanol	38
3.4.	Caracterização da atividade micocinogênica de estirpes selecionadas	39
3.4.1.	Atividade e Sensibilidade micocinogênica	39
3.4.2.	Efeito do pH e da concentração celular na otimização das condições de expressão da atividade micocinogênica.	39
3.4.3.	Teste de atividade micocinogênica contra fungos fitopatogênicos	40
3.4.4.	Produção do extrato concentrado com micocinas	41
3.4.5.	Teste de atividade micocinogênica com difusão da toxina concentrada	42
3.5.	Efeito da inoculação de leveduras em milho.	42
3.5.1.	Acompanhamento do desenvolvimento do cultivar e das leveduras presentes na rizosfera	44
3.5.2.	Triagem com meios de cultura diferenciais para agrupamento de estirpes de leveduras isoladas do experimento de milho.	47
3.5.3.	Isolamento de leveduras endofíticas	47
	<b>4. Resultados</b>	50
4.1.	Identificação das leveduras micocinogênicas (“killer”)	50
4.2.	Determinação da atividade micocinogênica:	56
4.3.	Efeito do pH na otimização das condições de determinação da atividade micocinogênica.	58
4.4.	Efeito do pH e da densidade celular na otimização das condições de expressão da atividade micocinogênica.	60
4.5.	Teste de atividade micocinogênica com difusão da toxina concentrada:	63
4.6.	Atividade micocinogênica contra fungos fitopatogênicos	64
4.7.	Efeito da inoculação de leveduras em milho.	65
4.7.1.	Triagem com meios de cultura diferenciais para agrupamento de estirpe de leveduras:	67
4.7.2.	Isolamento de leveduras endofíticas	77
	<b>5. Discussão</b>	77
5.1.	Identificação das leveduras micocinogênicas	81
5.2.	Atividade micocinogênica	83
5.3.	Efeito da inoculação de leveduras em milho	93
	<b>6. Conclusões</b>	99
	<b>7. Bibliografia</b>	101
	Anexo	114

## RESUMO

Em um ecossistema, os microrganismos são essenciais, atuando ativamente nos ciclos biogeoquímicos e na cadeia trófica. As leveduras são importantes membros de muitos ecossistemas onde são encontradas associadas a diversos microhabitats relacionados a plantas. Outros habitats incluem solos, corpos d'água e sedimentos, superfície externa e trato intestinal de animais, especialmente de insetos. As populações de leveduras estão envolvidas em uma variedade de processos ecológicos. Na natureza, a habilidade de excretar micocinas, ou toxinas “killer”, pode representar um mecanismo potencial de competição por interferência, na qual a produção de compostos tóxicos previne um competidor de acessar os recursos disponíveis. Essas leveduras vem sendo indicadas para o uso biotecnológico, sobretudo para o controle biológico de fitopatógenos. Sendo assim, 16 estirpes micocinogênicas, pertencentes as espécies *Williopsis saturnus*, *Candida yuanshanicus*, *Pichia membranifaciens*, *P. pijperi*, *C. stellimalicola*, *Dipodascus capitatus* e *Trichosporon asahii*, foram estudadas visando à utilização para tal fim. Diferentemente de estudos prévios nos quais uma única estirpe sensível é utilizada para a bioprospecção da atividade micocinogênica, nós usamos nove leveduras alvo filogeneticamente diferentes. Após avaliação do espectro de atuação das estirpes, pudemos concluir que existe uma variedade de toxinas na nossa coleção de leveduras micocinogênicas e que estas atuam na faixa ácida, porém em distintos valores de pH, mesmo quando as estirpes pertencem à mesma espécie. Observamos que o aumento do número de estirpes alvo testadas resultou na obtenção de uma maior diversidade de leveduras que apresentaram atividade micocinogênica, dentre elas, *Dipodascus capitatus* e *Trichosporon asahii*, espécies ainda não citadas na literatura como micocinogênicas. Devido seu amplo espectro de atuação, inclusive atuando sobre fungos fitopatogênicos, uma estirpe de *Williopsis saturnus* e uma de *Candida yuanshanicus* foram selecionadas e inoculadas em sementes de um cultivar de milho plantadas em casa de vegetação. Após 100 dias de cultivo essas leveduras foram prevalentes em rizosfera e raiz (leveduras endofíticas), nos tratamentos em comparação com o grupo controle não inoculado. Além das espécies introduzidas no cultivar foram encontradas em raízes a espécie *Cryptococcus flavescens* e em rizosfera foram isoladas as espécies *Candida maltosa*, *Cryptococcus laurentii* e *Torulaspota globosa*. As estirpes micocinogênicas inoculadas no cultivar de milho foram consideradas competentes para a colonização da rizosfera de milho e capazes de sobreviver como inoculantes, características importantes para o emprego de leveduras no controle biológico como antagonistas de fungos fitopatogênicos.

## Abstract

In an ecosystem microorganisms are essential; they take an active part in biogeochemical cycles and in food chains. Yeasts are important members of many ecosystems where they are found associated with various plant microhabitats. Other habitats include soil, waters, sediments and external surfaces and intestinal tracts of animals, especially insects. Yeast populations are involved in a variety of ecological processes. In nature, the ability to excrete micotoxins or killer toxins can represent an interference competition mechanism in which toxic compounds prevent competitors having access to available resources. The use of these yeasts in biotechnology has been suggested, particularly for the biological control of plant pathogens. In this work, 16 mycocinogenic strains, belong to the yeasts *Williopsis saturnus*, *Candida yuanshanicus*, *Pichia membranifaciens*, *P. pijperi*, *C. stellimalicola*, *Dipodascus capitatus* e *Trichosporon asahii*, were investigated with a view to evaluate this biotechnological application. Different from previous studies where a single sensitive strain for bioprospection for micocinogenic activity was used, we used nine phylogenetically different target strains. The activity spectrum of our strains suggests that there are a variety at mycotoxins operating at different pH values within the acid range, including for different strains at the same species. Furthermore, we observed that an increase in the number of studied target strains yielded a greater diversity of micotoxin producing yeasts, including *Dipodascus capitatus* and *Trichosporon asahii*. There is no previous report in the literature of mycocinogenic yeasts belonging to these two species. Due to their broad activity spectrum, including against phytopathogenic fungi, a *Williopsis saturnus* and a *Candida yuanshanicus* strain were selected and inoculated on seeds of a maize cultivar which were planted in a greenhouse. After 100 days of cultivation, the inoculated yeasts were prevalent in the treatment, associated with rhizosphere and roots (endophytics yeasts), when compared to a non inoculated control group. In addition to the yeasts cultures inoculated on the maize we also isolated *Cryptococcus flavescens* from roots, where as in rhizosphere *Candida maltosa*, *Cryptococcus laurentii* e *Torulasporea globosa*. The mycocinogenic cultures inoculated on maize were considered effective for the colonization of maize rhizosphere and thus able to survive as an inoculant, important features for the use of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic fungi.

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Incidência de atividade micocinogênica nos diferentes habitats tropicais estudados.	<b>08</b>
<b>Tabela 2</b>	Origem das leveduras micocinogênicas, leveduras alvo e fungos filamentosos utilizados.	<b>31</b>
<b>Tabela 3</b>	Características fenéticas das leveduras micocinogênicas	<b>51</b>
<b>Tabela 4</b>	Identificação das leveduras micocinogênicas por meio do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S rDNA. (CBS Yeast collection)	<b>53</b>
<b>Tabela 5</b>	Comparação das características fisiológicas da estirpe IMUFRJ/51928 com a estirpe tipo de <i>C. yuanshanicus</i> e com espécies taxonomicamente relacionadas.	<b>54</b>
<b>Tabela 6</b>	Padrões de inibição das estirpes de leveduras micocinogênicas.	<b>58</b>
<b>Tabela 7</b>	Faixa de pH para a atividade das estirpes de leveduras micocinogênicas.	<b>59</b>
<b>Tabela 8</b>	Populações de leveduras em rizosfera de milho	<b>67</b>
<b>Tabela 9</b>	Identificação de estirpes de leveduras isoladas de rizosfera de milho.	<b>68</b>
<b>Tabela 10</b>	Padrões obtidos na amostragem da rizosfera de milho analisada após 25 dias do plantio	<b>70</b>
<b>Tabela 11</b>	Padrões de identificação na amostragem da rizosfera de milho analisada após 100 dias do plantio, a partir de 95 estirpes isoladas.	<b>74</b>
<b>Tabela 12</b>	Leveduras isoladas de rizosfera de milho.	<b>75</b>
<b>Tabela 13</b>	Leveduras endofíticas isoladas de raízes de milho (Cultivar Eldorado) identificadas pelo sequenciamento da região D1/D2 26S rDNA.	<b>78</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Modelos dos mecanismos de ação para <i>S. cerevisiae</i>	<b>17</b>
<b>Figura 2</b>	Escala de Wickerham	<b>33</b>
<b>Figura 3</b>	Montagem de experimento em casa de vegetação	<b>44</b>
<b>Figura 4</b>	Mudas com 17 dias após o plantio.	<b>45</b>
<b>Figura 5</b>	Mudas com 25 dias após o plantio.	<b>46</b>
<b>Figura 6</b>	Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária de <i>Candida yuanshanicus</i> <sup>T</sup> e nossa estirpe IMUFRJ/51928(=CBS 11015) com outras espécies de leveduras intimamente relacionadas.	<b>55</b>
<b>Figura 7</b>	Brotamento celular multi-polar de <i>Candida yuanshanicus</i> IMUFRJ/51928 (=CBS11015), 1000X. Barra de referência com 20 micrômetros.	<b>55</b>
<b>Figura 8</b>	Exemplos de padrões obtidos no teste de atividade micocinogênica	<b>56</b>
<b>Figura 9</b>	Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária das estirpes micocinogênicas e as estirpes tipo utilizadas no presente estudo.	<b>57</b>
<b>Figura 10</b>	Halo de inibição em milímetros da estirpe micocinogênica <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i> IMUFRJ/51932 ( $8 \times 10^6$ /mL) em relação à estirpe sensível <i>Metschnikowia lunata</i> .50496 <sup>T</sup>	<b>62</b>
<b>Figura 11</b>	Halo de inibição em milímetros da estirpe micocinogênica <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i> IMUFRJ/51932 ( $8 \times 10^6$ /mL) em relação a estirpe sensível <i>Candida glabrata</i> 50083 <sup>T</sup> .	<b>62</b>
<b>Figura 12</b>	Teste de atividade micocinogênica com difusão da toxina concentrada da estirpe <i>W.saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i> (IMUFRJ/51932) contra a levedura alvo <i>C.glabrata</i> IMUFRJ/50083	<b>63</b>
<b>Figura 13</b>	Plantas de milho (cultivar Eldorado) no 40º dia após o plantio.	<b>66</b>

## Prefácio

Desde sua descoberta em 1963, por Bevan e Makower, e a classificação de suas toxinas em 11 tipos, em 1978, por Young e Yagin; as leveduras “killer”, ou micocinogênicas, têm sido estudadas intensamente, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Este grupo de leveduras inclui estirpes que secretam uma toxina que é letal para uma estirpe sensível de sua mesma espécie ou de espécies de diferentes gêneros, sendo elas mesmas imunes a sua própria toxina. Além disso, estas proteínas possuem um espectro de ação altamente específico e dependem de fatores extrínsecos como pH, temperatura e condições de aeração, como já foi mostrado na década de 60 em trabalhos sobre a natureza do fator “killer” produzido por *Saccharomyces* (Woods & Bevan, 1968).

Atualmente, os diversos estudos que tentam elucidar os mecanismos deste fenômeno podem ser agrupados em três linhas básicas principais: a avaliação da presença do fenótipo “killer” nas diversas comunidades de leveduras existentes; o estudo do modo de ação destas toxinas bem como a origem de sua presença em cada estirpe (plasmidial, viral ou cromossomal); e a aplicação destas características nos diversos campos da ciência, sobretudo na Biotecnologia.

Sabemos que o controle biológico de doenças de plantas mediadas por microrganismos saprofitos ocorre naturalmente, e que algumas bactérias e leveduras antagonistas têm sido relatadas como capazes de reduzir a deterioração de frutas causadas por fungos no período pós-colheita (Chandgoyal & Spotts, 1987). Assim, uma possível aplicação recentemente discutida é

a utilização de leveduras com a habilidade de produzir micocinas como agentes no controle de fungos fitopatogênicos importantes. Isto foi observado em estirpes da levedura *Zygosaccharomyces bailli*, que secreta uma proteína antifúngica, a zygocina (Weiler & Schmitt, 2003), ou ainda, com uma estirpe de *Pichia membranifaciens* que mostrou ter potencial como novo agente para o controle de *Botrytis cinerea*, fungo que afeta culturas como batata, morango, caqui, eucalipto, tomate, uvas e a produção do vinho (Santos & Marquina, 2004). Estas descobertas ampliam os horizontes da utilização da característica “killer” para o controle de pragas que atingem a agricultura. Considerando a importância deste fato para a biotecnologia, foi realizado, durante o desenvolvimento do trabalho de Mestrado intitulado “Bioprospecção e caracterização de leveduras ‘killer’ e seu potencial para utilização em Biotecnologia Vegetal”, concluído neste Programa de Pós-Graduação (Cabral, 2004), um levantamento de leveduras com expressão de micocinas isoladas de habitats estudados em diferentes projetos na Mata Atlântica, Floresta Amazônica e em uma fazenda de agricultura orgânica.

Estes estudos preliminares nos estimularam a buscar um maior conhecimento da ação das micocinas produzidas pelas leveduras pré-selecionadas, e, sendo assim, foram promovidos ensaios contra leveduras filogeneticamente diversas. Tais ensaios permitiram verificar o espectro de antagonismo destas estirpes, bem como suas características quanto ao pH ideal para a expressão das toxinas. Selecionamos estirpes com amplo espectro de atuação e verificamos que estas possuem capacidade para a colonização da rizosfera de milho mostrando íntima relação com a planta.

## 1. Introdução

### 1.1. Diversidade de leveduras

Atualmente, é comum ouvirmos ou tratarmos do termo biodiversidade, entretanto, na ecologia de comunidades este é um capítulo básico, que pode ser entendido como a variedade e a variabilidade existente entre os organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais elas ocorrem. Portanto este termo se refere a relações quantitativas entre riqueza e abundância de espécies dentro das comunidades. A importância da diversidade na caracterização das comunidades foi reconhecida no final do século XIX. Desde então um dos padrões mais notáveis observados na riqueza de espécies em diferentes ecossistemas refere-se as diferenças nas regiões ecológicas, sendo maior nas regiões tropicais do que nos climas temperados, e esse aumento não se restringe aos ecossistemas terrestres (Botha, 2006).

Como parte da diversidade de um ecossistema, os microrganismos, são essenciais, visto que atuam ativamente na reciclagem de nutrientes, realizando em suas atividades metabólicas transformações bioquímicas diretamente relacionadas com os ciclos biogeoquímicos e também na síntese de vários compostos, atuando em vários níveis da cadeia trófica (Atlas & Bartha, 1997). O monitoramento da estrutura de comunidades microbianas foi fundamental para o aumento do conhecimento de suas funções no ambiente. Estas funções podem ajudar a manter um sistema do solo com os nutrientes disponíveis assim como estabilizam agregados do solo para reduzir a erosão e manter a capacidade de armazenamento de água (waterholding capacity) (Kennedy & Gewin, 1997).

Métodos de cultivo fornecem informações sobre a distribuição de leveduras em solos que mostram a importância destas comunidades neste habitat (Lachance & Starmer, 1998). Entretanto a maioria das revisões na ecologia microbiana faz poucas citações sobre leveduras de solo. A maioria dos estudos foi conduzida *in vitro* ou usando microcosmos, sob condições controladas e na ausência de variação dos fatores ambientais que podem influir no metabolismo das leveduras no ambiente natural (Botha, 2006). Devemos lembrar que nos ecossistemas, leveduras podem coexistir com uma larga diversidade de algas, fungos filamentosos, procariotos, protistas macroscópicos e microscópicos, assim como com raízes de plantas. A sobrevivência e desenvolvimento de espécies de leveduras não dependem necessariamente das habilidades individuais específicas, mas é o resultado das interações com a comunidade microbiana de solo (Botha, 2006). Interações binárias de leveduras com outros micróbios estudados *in vitro*, podem contribuir para o melhor entendimento das interações de leveduras de solo em seu habitat natural (Fracchia *et al.*, 2003).

As leveduras são organismos ubíquos na natureza (Botha, 2006; Lachance & Starmer, 1998; Phaff & Starmer, 1987), e são importantes membros de muitos ecossistemas contribuindo significativamente para a biodiversidade (Fleet, 1998). São encontradas associadas a diversas partes das plantas, como folhas, frutas, flores e tecido em decomposição. Ocorrem frequentemente nos solos - que é o repositório final para o armazenamento e desenvolvimento de algumas espécies (Phaff & Starmer, 1987) -, nos sedimentos, nos corpos d'água e na superfície externa e trato intestinal de

animais, especialmente de insetos (Molnár *et al.*, 2008; Lachance & Starmer, 1998; Phaff & Starmer, 1987).

Leveduras de solo são conhecidas por ter habilidade para crescer em condições oligotróficas (Kimura *et al.*, 1998), mas também são isolados de habitats relativamente ricos em nutrientes tais como a rizosfera (Kvasnikov *et al.*, 1975) e restos orgânicos como estrume (Fell & Statzell-Tallman, 1998). Encontrou-se que solos úmidos ricos em nutrientes podem suportar uma maior diversidade de espécies de leveduras que em solos áridos pobres em nutrientes (Spencer & Spencer, 1997). Segundo Phaff e seus colaboradores (1996) uma maior diversidade de leveduras é encontrada em solos abaixo de plantas com frutas, ricas em carboidratos, caídas, desde que estas possam atuar como inóculo para o solo durante o apodrecimento. Entretanto, considerando a heterogeneidade do solo como um habitat, pode se esperar que o número de leveduras e espécies seja distribuído de maneira desigual mostrando ainda uma variação temporal dependendo das circunstâncias ambientais.

Carmo-Sousa (1969) já mencionava que leveduras ocorrem em um grande espectro de tipos de solos de uma vasta diversidade de áreas geográficas, desde zonas árticas até os trópicos. Isso vem se confirmando ao longo dos anos em diversos trabalhos científicos (Vital *et al.*, 2002; Lachance & Starmer, 1998; Abranches *et al.*, 1998; Spencer & Spencer, 1997; Phaff & Starmer, 1987). No entanto, o número de leveduras, as quais ocorrem na maior parte nos primeiros 10 cm de solo em consequência de sua habilidade de crescer aerobicamente em uma larga diversidade de compostos de carbono, é baixo comparados com o número de procariotas e fungos filamentosos (Botha,

2006). Em um ecossistema de solo funcional a transformação de energia ocorre continuamente e inclui micróbios e fauna macroscópica (Coleman & Crossley, 1996). Os agentes primários da decomposição, hábeis para degradar compostos diretamente ou indiretamente derivados das plantas, são as bactérias e fungos filamentosos. Entretanto, as leveduras também são parte do domínio dos fungos e a grande maioria das leveduras descobertas até agora é saprofítica contribuindo para processos de mineralização no ambiente pela utilização de uma larga escala de compostos de carbono orgânico (Botha, 2006). Algumas destas leveduras têm a capacidade de fermentar carboidratos, e muitas são hábeis para assimilar carboidratos e compostos orgânicos não fermentáveis (Kurtzman & Fell, 1998). A ocorrência de leveduras como parte da biota autóctone em solo (Lachance & Starmer, 1998) indica que estes fungos possuem um papel na decomposição e dissipação de energia dentro do ecossistema do solo assim como outros microrganismos (Botha, 2006).

Uma sucessão de populações de leveduras está envolvida em uma variedade de processos ecológicos e bioquímicos devido a sua habilidade em usar os açúcares simples presentes em frutas, vegetais, bebidas e outros produtos agrícolas que são importantes micro-habitats para uma variedade de espécies de leveduras na natureza (Kurtzman & Fell, 1998). Recentemente, a fim de preencher algumas lacunas no conhecimento ecológico, foram realizados estudos sobre a biodiversidade de leveduras no ambiente natural e em áreas de cultivo a fim de definir o impacto destas em produtos alimentícios (Buzzini & Martini, 2000b). Dentre os processos ecológicos estudados, um vem chamando a atenção de diversos grupos de pesquisa pelo mundo, que é a capacidade de excreção, por algumas leveduras, de micocinas, também

chamadas de toxinas “killer”. O fenômeno “killer” não é de ocorrência exclusiva das leveduras. A produção de proteínas que possuem toxicidade específica para organismos relacionados, associada à imunidade específica, é conhecida para fungos da ordem *Ustilaginales* (carvões), mixomicetos, paramécios e bactérias. As proteínas bacterianas com capacidade antibiótica são chamadas de bacteriocinas e para destacar a natureza de tais interações antagonistas é preferível chamar as toxinas “killer” de micocinas e as estirpes “killer” de micocinogênicas (Golubev, 1998).

Em 1984, Tipper e Bostian sugeriram que o verdadeiro papel da excreção de micocinas em comunidades naturais de leveduras é desconhecido e a maior parte das discussões sobre o assunto é aparentemente especulativa (apud Starmer *et al.*, 1986). Entretanto várias relações “killer” - sensíveis foram estabelecidas e a ocorrência muito difundida deste fenômeno nos mostra que este possui um grande papel na ecologia de leveduras (Stumm *et al.*, 1977). A produção de micocinas parece funcionar como um fator limitante a ocorrência de outras leveduras, representando um dos mecanismos de antagonismo entre as leveduras durante a fermentação espontânea (Abranches *et al.*, 1998). Essas toxinas representam um importante papel na ecologia de leveduras, através da eliminação de linhagens sensíveis em substratos onde estas co-ocorrem com leveduras “killer” (Abranches *et al.*, 1998). Um fato que corrobora com esta afirmação é que estirpes de leveduras produtoras de micocinas podem ser isoladas de várias fontes, mas sua ocorrência é mais frequente em habitats onde populações de leveduras atingem uma maior densidade, ou seja, onde a competição é mais intensa (Golubev, 2006). Isso pode ser observado quando analisamos diferentes trabalhos de investigação

da presença da atividade micocinogênica, como podemos verificar na Tabela 1, que resume resultados de trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa. A natureza do fenômeno “killer” sugere ainda que este seja um mecanismo potencial de competição por interferência, no qual a produção de compostos tóxicos impede um competidor de acessar os recursos disponíveis (Morais *et al.*, 1995; Starmer *et al.*, 1987). As leveduras são microrganismos saprofitos e colonizam substratos em decomposição durante a fase inicial da necrose, seria esperada a seleção de um mecanismo que conferisse alguma vantagem durante essa fase (Starmer *et al.*, 1987). Na natureza, a competição ocorre quando dois ou mais indivíduos ou populações afetam de modo adverso o crescimento, sobrevivência, aptidão, e/ou tamanho populacional um do outro, já que os organismos envolvidos geralmente utilizam um recurso comum e pouco abundante (Abranches *et al.*, 1998). Além das leveduras “killer”, existem as chamadas leveduras “super-killer”, que são linhagens que eliminam grande parte das espécies que ocupam um dado substrato (Abranches *et al.*, 1998).

**Tabela 1:** Incidência de atividade micocinogênica nos diferentes habitats tropicais estudados.

Habitat estudado	Nº de isolados		Nº de “killers”		Espécie killer prevalente
	Estirpes	Espécies	Estirpes	Espécies	
Amapa (Fruto)	179	38	23	9	<i>Pichia kluyveri</i>
<i>Drosophila</i>	98	34	9	6	<i>Pichia kluyveri</i>
Cactus	590	34	24	4	<i>Pichia kluyveri</i>
Solo Amazônico	240	57	6	3	<i>Williopsis saturnus var. subsufficiens</i>
Rizosfera de milho	53	12	4	2	<i>Candida yuanshanicus</i>
Jaca (Fruto)	50	12	10	6	<i>Pichia membranifaciens</i>
Goiaba (Fruto)	133	29	22	9	<i>Pichia kluyveri</i>
Fezes de marsupial	60	29	6	2	<i>Pichia anomala</i>

Fruto Amapa (*Parahancornia Amapa*) coletada na Floresta Amazônica (Morais *et al.*, 1995); *Drosophila* e Cactus da Mata Atlântica, Rio de Janeiro (Morais *et al.*, 1992); Solo Amazônico (Vital *et al.*, 2002); Rizosfera de milho de fazenda agroecológica, Rio de Janeiro; Fruto da Jaqueira (*Artocarpus heterophyllus*), Pico da Pedra Branca, Rio de Janeiro (Carvalho, 2007); Fruto da goiabeira (*Psidium guajava*) coletada em Mata Atlântica e área rural, Rio de Janeiro (Abranches *et al.*, 2000); Fezes de marsupial (*Didelphis marsupialis*) coletado em campo de cultivo e pasto, Rio de Janeiro (Abranches *et al.*, 1998).

Esta atividade tem sido detectada principalmente em leveduras isoladas de frutos maduros ou em estágio de apodrecimento, exudatos vegetais,

estruturas vegetais em decomposição, água e raramente em solos (Buzzini & Martini, 2000b; Abranches *et al.*, 2000 e 1998; Morais *et al.*, 1995; Starmer *et al.*, 1987; Stumm *et al.*, 1977). Segundo Starmer (1987), leveduras encontradas em frutos deteriorados apresentam maior incidência de atividade “killer”, enquanto leveduras isoladas de cactos e árvores apresentam baixa atividade “killer”. Isto mostra que o microhabitat do fruto parece favorecer a sucessão de microrganismos capazes de produzir toxinas “killer”. A especificidade dos habitats não é determinada apenas pela composição de nutrientes presentes, mas também por fatores ambientais, tais como pH, temperatura e umidade, pelos vetores que se utilizam destes substratos e pela presença de compostos inibitórios como a produção e excreção de toxinas “killer” (Phaff & Starmer, 1987).

Conforme a literatura uma das principais características destas toxinas é que sua atividade está relacionada a grupos que são filogeneticamente relacionados à estirpe produtora, entretanto o grau de relação pode variar consideravelmente, sendo que algumas estirpes micocinogênicas produzem compostos químicos que são ativos contra uma larga escala de ascomicetos e basidiomicetos filogeneticamente distantes (Golubev *et al.*, 2001; Golubev & Nakase, 1991). Até o momento, além do Gênero *Saccharomyces*, esse tipo de toxina já foi detectada nos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Ustilago*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (Schmitt & Breinig, 2002; Young & Yagiu, 1978; Izgu, 2006), o que mostra que esta característica está amplamente distribuída entre as leveduras (Magliani *et al.*, 1997).

É claro que tal distribuição pode ser ainda maior, visto que nas monografias taxonômicas, um número significativo de espécies listadas é estudado a partir de uma única estirpe cuja origem é vagamente descrita. Em virtude do declínio rápido de muitos habitats naturais devido ao desenvolvimento urbano e industrial e ao pequeno número remanescente de regiões selvagem no mundo inteiro, se pressionou a procura por novas leveduras. É de consenso dos ecólogos que a base da ecologia é a descrição taxonômica, entretanto, é vital que os novos exames taxonômicos incluam uma abordagem ecológica, e que os métodos de isolamento sejam planejados para elucidar aspectos ecológicos (Lachance & Starmer, 1998).

O isolamento de microrganismos do ambiente é o primeiro passo do microbiologista na busca por produtos naturais, entretanto não há um meio de cultura ou condição de cultivo que possa favorecer a propagação de todos os tipos microbianos presentes numa amostra ambiental. A quantidade e a diversidade dos microrganismos isolados de um dado micro-habitat é um reflexo da condição natural juntamente com os procedimentos de isolamento e condições de cultivo impostas pelo microbiologista (Hunter–Cevera & Belt, 1999). Grande parte do conhecimento adquirido sobre a distribuição das leveduras no meio ambiente está baseado no uso de poucos métodos de isolamento e de meios de cultivo muito semelhantes, por isso para a detecção de maior diversidade presente nas amostras ambientais, técnicas de enriquecimento utilizando grandes volumes de inóculo, combinadas com meios seletivos podem ser usadas para aumentar a sensibilidade de detecção de determinadas espécies ou grupos de leveduras (Buck *et al.*, 1977; Hagler *et al.*, 1986).

A utilização de meios seletivos de cultivo e modificações nos procedimentos de pré-tratamento das amostras vêm sendo empregados e permitiram, em comparação com os métodos tradicionais de plaqueamento direto, a detecção de diversidade adicional de leveduras de alguns habitats tropicais tais como frutos em decomposição, sedimentos de mangue e fitotelmata de bromélias (Carvalho, 2007; Garcia, 2007; Pinotti, 2003). Porém, quando diferentes métodos e meios de isolamento são utilizados para uma mesma amostra, observamos uma grande redundância no isolamento. Esta redundância pode ser diminuída por métodos de triagens como, por exemplo, através do desenvolvimento de meios contendo corantes capazes de distinguir espécies ou grupos de leveduras baseados em características fisiológicas. Estes meios baseiam-se nas diferenças da produção secundária pelas leveduras durante o metabolismo da glicose, o que resulta em uma variação do pH das colônias e do meio ao seu redor. Estes microrganismos podem oxidar ácidos orgânicos presentes nos meios de cultivo ou de produtos metabólicos formados na cultura, como resultado do metabolismo de fontes de nitrogênio, gerando amônia. A mudança do pH pode ser detectada com indicadores apropriados (Garcia, 2007).

## **1.2. A taxonomia de leveduras**

Dentre os fungos, as leveduras constituem um grupo filogeneticamente diverso, que se apresentam predominantemente sob forma unicelular. Pertencem ao domínio Eucaria, reino Fungi, divisão Eumycophyta (Eumycetes). As classes são distintas segundo a capacidade de formar esporos dentro de ascos – classe Ascomycetes - ou produzi-los externamente

em basídios - classe Basidiomycetes. As espécies para as quais um estágio sexual não é conhecido são classificadas como Ascomycetes ou Basidiomycetes anamorfos, de acordo com a resposta ao teste de DBB-Urease (Hagler & Mendonça-Hagler, 1991).

As leveduras ascomicéticas estão divididas em três classes, a maioria pertence à classe Hemiascomycetes que inclui as leveduras da ordem Saccharomycetales, leveduras que se dividem por brotamento e alguns gêneros classificados como leveduriformes *Ascoidea* e *Cephaloascus*. A classe Archiascomycetes representada por *Schizosaccharomyces* (divisão por fissão), *Taphrina*, *Protomyces*, *Saitoella* e *Pneumocystis*. E os Euascomycetes com os gêneros *Endomyces* e *Oosporidium* (Rosa & Peter, 2006; Kurtzman, 1998). As leveduras basidiomicéticas estão divididas em três classes, Ustilaginomycetes, Urediniomycetes e Hymenomycetes. A identificação e a posição filogenética das leveduras basidiomicéticas nem sempre é fácil, parte devido à dificuldade de se entender a relação filogenética entre as leveduras basidiomicéticas e os fungos filamentosos. O dimorfismo (fase leveduriforme e fase filamentosa) foi reconhecido como estágios distintos nos fungos heterobasidimicetos, como nas espécies de *Tremella* e *Filobasidiella*. Com exceção das espécies de *Xanthophyllomyces*, todos os gêneros de basidiomicetos telomórficos possuem uma fase filamentosa (Fell *et al.*, 2000).

A taxonomia convencional utiliza os vários aspectos morfológicos, fisiológicos, sexuais e ecológicos para classificar e identificar as leveduras (Lopes *et al.*, 1998). Entretanto o polimorfismo existente entre estirpes de leveduras de uma mesma espécie, como também a existência de espécies intimamente relacionadas, resulta por vezes na dificuldade de se identificar

determinadas estirpes com base unicamente nas suas características fenotípicas (Lopes *et al.*, 1998). Hoje, já é universalmente entendido que a classificação de leveduras requer uma abordagem polifásica (Yarrow, 1998), na qual critérios moleculares são combinados a características fenotípicas que tenhamos uma identificação mais precisa (Scorzetti *et al.*, 2002; Kurtzman & Robnett, 1998; Valente *et al.*, 1996). Esta abordagem inclui uma identificação em nível de gênero com o estudo da fisiologia e morfologia celular seguido da utilização de uma ou mais técnicas moleculares, como a hibridização nDNA – nDNA; a determinação de cariótipos por eletroforese em gel de campo pulsante (pulsed field – PFGE); ou o sequenciamento do DNA ribossomal das regiões D1/D2 e ITS (Kurtzman, 1998; Kurtzman & Robnett, 1998; Fell *et al.*, 2000).

As relações filogenéticas entre leveduras tem sido estudadas principalmente por comparação de sequências dos genes rDNA, já que comparações de sequências de diferentes estirpes é feita facilmente e, com a seleção dos genes apropriados, podemos entender a relação filogenética existente (Kurtzman & Robnett, 1998). O principal avanço deste método é que, ribossomos compartilham uma origem evolucionária comum a todos os organismos, o que permite a comparação de grupos de espécies próximas e distantes (Kurtzman, 1992, apud Lopes *et al.*, 1998) Os ácidos ribonucleicos ribossômicos (rRNA) estão presentes em todos os organismos e neles executam a mesma função. São originários de um ancestral comum sendo, portanto, homólogos (Kurtzman, 1992, apud Lopes, *et al.*, 1998). Os genes que os codificam (rDNA) apresentam um grau de conservação elevado podendo acumular variabilidade em maior ou menor grau em diferentes regiões da molécula. Tais regiões variáveis contêm informação suficiente para que se

possa discriminar entre moléculas diferentes. Estirpes de leveduras cujas sequências obtidas da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA mostraram similaridade abaixo de 99% foram consideradas espécies diferentes (Hong *et al.*, 2001; Kurtzman & Robnett, 1998) e estirpes tipicamente coespecíficas diferiram menos do que 1% neste domínio (Stratford *et al.*, 2002; Kurtzman & Robnett, 1998; Kurtzman & Blanz, 1998)

Muitas espécies de leveduras podem ser diretamente identificadas pelo sequenciamento, alinhamento e análise das sequências da região D1/D2 em bancos de dados genéticos disponíveis na Internet e ter assim um enquadramento adequado dentro de uma árvore filogenética. Alternativamente ou de forma complementar, a região intergênica ITS (Internal transcribed spacer) tem sido apresentada para ajudar a elucidar a identificação quando espécies filogeneticamente relacionadas não podem ser separadas unicamente pela análise das sequências da região D1/D2 (Scorzetti *et al.*, 2002; Fell, *et al.*, 2000). Devemos considerar que árvores filogenéticas estruturadas a partir das regiões ITS e D1/D2 não são inteiramente resolvidas, visto que poucos clados receberam a devida atenção, o que resulta em evidências insuficientes para a decisão nomenclatural, principalmente em nível de gênero (Scorzetti *et al.*, 2002). Entretanto, estas árvores filogenéticas são dinâmicas, e conforme novos grupos taxonômicos forem surgindo, os arranjos das ramificações mudarão o que deve evidenciar os relacionamentos evolutivos (Scorzetti *et al.*, 2002; Fell *et al.*, 2000). Atualmente, alguns clados estão sendo reorganizados com base na análise de sequências variadas do rRNA (Kurtzman *et al.*, 2008).

Com o crescimento da engenharia genética e a identificação legal de microrganismos úteis para fim de patente, nasceu a necessidade de uma

identificação precisa de culturas comerciais em nível de estirpe (Buzzini & Martini, 2000b; Lopes *et al.*, 1998). Embora a hibridização nDNA-nDNA tenha sido testada como uma ferramenta útil neste sentido, sua precisão só atinge a espécie. Entretanto, a extrema variabilidade do fenômeno “killer” tem sido apontada, como uma solução para a identificação em nível de subespécie (Buzzini & Martini, 2000b). Padrões de sensibilidade e toxicidade “killer” de algumas espécies podem ser combinados correlacionando-se estes dados com informações de similaridade do seu rDNA (Golubev & Nakase, 1991).

### **1.3. A produção de Micocinas por Leveduras**

#### **1.3.1. A Descoberta do Fenômeno “Killer”**

Em 1963, Bevan e Makower descobriram o fenômeno “killer” em *Saccharomyces cerevisiae* (revisado por Schmitt & Breining, 2002), e a existência de 3 fenótipos para as leveduras: “killer”, neutra e sensível. As leveduras “killer”, ou micocinogênicas, se caracterizam por secretar uma toxina que é letal para determinada estirpe, a qual é chamada sensível, de sua mesma espécie ou de espécies de diferentes gêneros, sendo as estirpes “killer”, imunes a sua própria toxina. As estirpes neutras não produzem toxinas nem são sensíveis a toxinas “killer” (Woode & Bevan, 1968 apud Abranches, 1995).

Young e Yagiu (1978) classificaram 11 tipos de toxinas “killer” ( $K_1 - K_{11}$ ) e 11 diferentes espectros de resistência ( $R_1 - R_{11}$ ), e disseram que estirpes com o mesmo padrão “killer” podem mostrar diferentes espectros de resistência. Além disso, algumas estirpes com toxinas “killer” diferentes podem

possuir o mesmo padrão de resistência. As toxinas são produzidas durante o crescimento exponencial do ciclo celular, onde recursos são abundantes e em geral o pH é baixo. Esta é a condição natural de muitos substratos de leveduras durante a colonização, especialmente em frutas (Starmer *et al.*, 1987). Em um estudo realizado com uma estirpe industrial de *S. cerevisiae*, a atividade máxima da micocina ocorreu após 24 h de crescimento, o que corresponde ao fim da fase de crescimento rápido e o início da fase estacionária (Soares & Sato, 2000). Segundo Starmer *et al.* (1987), a estirpe sensível, pode tornar-se resistente à toxina, caso ocorram mutações nos receptores da parede celular, ponto inicial da atuação da toxina “killer”.

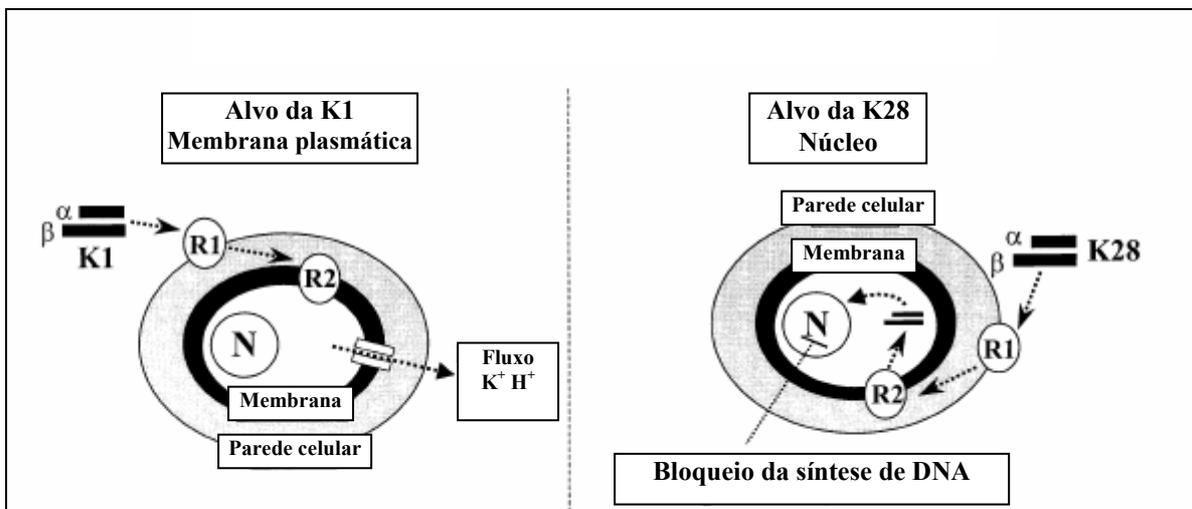
### 1.3.2. Mecanismos de ação das Micocinas

Tão diverso quanto o grupo de leveduras produtoras de micocinas, é seu modo de ação e sua base genética para a expressão fenotípica “killer” (Weiler *et al.*, 2002; Jablonowski & Schaffrath, 2002). Diferentes micocinas parecem exibir diferentes mecanismos de ação (Buzzini & Martini, 2000b) e interagem com receptores de membrana específicos como foi demonstrado em estudos de resistência com mutantes (Hutchins & Bussey, 1983, apud Kawamoto *et al.*, 1990). A determinação genética da atividade micocinogênica pode se dar tanto na forma de um plasmídeo de DNA linear, como na forma de partículas semelhantes a vírus de RNA dupla fita, assim como também pode estar codificada no cromossomo (Magliani *et al.*, 1997 Schmitt & Breinig, 2006). Os sistemas “killer” mais intensamente estudados são aqueles presentes em *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (Weiler *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005; Marquina *et al.*, 2002), porém os mecanismos de *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens*,

*Debaryomyces hansenii* e *Schwanniomyces occidentalis*, vêm sendo investigados (Santos *et al.*, 2005).

Em *S. cerevisiae* as micocinas têm sido classificadas em K1, K2, K3 e K28, sendo que o tipo K3 não foi claramente distinto da toxina K2 (Schmitt & Breinig, 2002; Schmitt *et al.*, 1989, 1996; Young & Yagiu, 1978).

Embora as toxinas do grupo *S. cerevisiae* possuam formas diferentes de ação, compartilham de algumas particularidades: São toxinas virais que promovem a morte das células sensíveis em dois passos, o primeiro envolvendo uma ligação rápida, independente de energia, da toxina ao receptor da parede celular da célula alvo (R1) e o segundo, dependente de energia para a translocação da toxina e interação com o receptor secundário (R2) da membrana plasmática (Schmitt & Radler, 1987).



**Figura 1:** Modelos dos mecanismos de ação para *S. cerevisiae* proposto por Schmitt & Breinig (2002).

A toxina mais estudada até hoje é o tipo K<sub>1</sub> de *S. cerevisiae*. Trata-se de uma proteína de baixo peso molecular, monomérica, termolábil, sendo ativa somente entre pH 4,2 - 4,6. A toxina é secretada durante o crescimento exponencial e mata células sensíveis pela inibição coordenada da síntese de

macromoléculas e danos na membrana plasmática, com posterior perda de ATP e íons potássio (Starmer *et al.*, 1992). As toxinas K1 e K2 agem primeiramente ligando-se ao receptor da parede celular  $\beta$ -1,6-D-glucana penetrando na célula e alcançando o receptor R2, a Kre1p - uma proteína glicosilada da superfície celular. Depois de ancorada na membrana citoplasmática, a toxina exerce seu efeito letal causando a formação de canais de íons e a disfunção da membrana (Schmitt & Breinig, 2002; Wickner, 1996).

A toxina K28 foi a primeira toxina “killer” viral com a qual foi demonstrado que a entrada na célula alvo se dá por endocitose, via complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Eisfeld *et al.*, 2000). Após sua ligação ao receptor  $\alpha$ -1,3,-manoproteína (Schmitt & Radler, 1987) e consequente entrada na célula, a toxina atravessa a trajetória da secreção em sentido inverso - via complexo de Golgi e retículo endoplasmático - , e, subsequentemente, penetra no núcleo celular (citosol), onde traduz seu sinal tóxico impedindo o ciclo celular na fase G1 ou S e bloqueando a síntese de DNA (Eisfeld *et al.*, 2000).

*Kluyveromyces lactis* secreta uma proteína heterodimérica com largo espectro de inibição. Diferente da toxina K1 em *S. cerevisiae*, *K. lactis* não provoca uma rápida formação de poros na membrana citoplasmática, mas inibe a divisão celular (Butler *et al.*, 1991 a, b; Panchal *et al.*, 1985). Sua característica de utilizar a lactose como única fonte de carbono, a distingue da maioria das leveduras e permite que isolados desta espécie sejam utilizados em produtos da indústria de leite (Valderrama *et al.*, 1999 apud Schaffrath & Breinig, 2000).

Outras leveduras têm suas toxinas como alvo de pesquisa e algumas já tiveram seus mecanismos elucidados, no entanto, pesquisadores de vários

campos da ciência, munidos de inúmeras ferramentas de biologia molecular, buscam descrever como atuam as diversas micocinas encontradas, bem como determinar qual é o papel ecológico destes microrganismos na natureza. Somente o conhecimento das interações das toxinas, assim como, de suas características químicas, nos possibilitará utilizar essa característica de algumas leveduras comercialmente.

### **1.3.3. Aplicação de Leveduras Micocinogênicas em Biotecnologia**

A biotecnologia tem sido definida como a aplicação de sistemas biológicos a processos aplicados, na indústria e agricultura. Para que se desenvolva plenamente o potencial de cada um destes sistemas, é necessária a integração das diversas áreas da biologia, incluindo a biologia molecular, a química e a engenharia (Lieberman *et al.*, 1999).

O uso de microrganismos para a obtenção de produtos e processos que beneficiam o nosso estilo de vida sócio-econômico tem sido uma parte da história humana desde os tempos das civilizações mais primitivas (Hunter–Cevera & Belt, 1999). Atualmente, dentre os processos biotecnológicos, destaca-se o biocontrole de fungos fitopatogênicos. Embora representem os primeiros organismos documentados explorados pelo homem como agentes biotecnológicos (Kirsop, 1988), as leveduras, dentre os microrganismos do solo, têm recebido pouca atenção como agentes de biocontrole em comparação com as bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos antagonistas (El –Tarabily, 2006).

O controle biológico de doenças pós-colheita fez grandes avanços, especialmente durante a década passada, quando sua utilização foi provada

sob circunstâncias comerciais (Janisiewicz & Korsten, 2002). Neste período foram registrados nos Estados Unidos da América o BioSave™ 100 E 110 (Jet Harvest Solutions, Longwood, FL, USA) contendo estirpes saprofitas da bactéria *Pseudomonas syringae* (Janisiewicz & Jeffers, 1997; Janisiewicz & Marchi, 1992) e o Aspire™ (Ecogen, Inc., Langhorne, PA, USA) baseado na levedura *Candida oleophila* (Droby *et al.*, 1998, 1993), ambos sendo utilizados para o tratamento pós-colheita de maçã e frutas cítricas. Atualmente, outros produtos biotecnológicos destinados à aplicação pós-colheita com leveduras já estão no mercado: YieldPlus™ (Anchor Yeast, Cape Town, ZAF) contendo *Cryptococcus albidus* (De Koch, 1998 apud Janisiewicz *et al.*, 2008), e Shemer™ (AgroGreen, Asgdod, ISR) contendo *Metschnikovia fructicola* (Karabulut *et al.*, 2002; Kurtzman & Droby, 2001); ambos utilizados no tratamento de muitas frutas, incluindo uva, maçã e frutas cítricas no controle biológico de fitopatógenos.

Na indústria de fermentação a aplicação do fenômeno “killer” tem aumentado consideravelmente. As leveduras “killer” com boas características fermentativas têm sido selecionadas para a produção de cerveja, vinho e saquê, sendo usadas como iniciadores para prevenir contaminações por cepas selvagens sensíveis (Seki *et al.*, 1985). Izgu e colaboradores (1997), sugeriram a utilização das toxinas K3 e K8 para a construção de estirpes industriais dada à resistência destas proteínas contra *Candida tropicalis*. Por outro lado, existem casos em que as leveduras “killer” são as contaminantes, fazendo delas, as responsáveis pela deterioração de alimentos e pela produção de compostos indesejáveis (Seki *et al.*, 1985).

Em alguns estudos foi demonstrado que leveduras de vinho geneticamente modificadas produzindo simultaneamente diferentes toxinas “killer” têm sua habilidade antagônica aumentada significativamente, possibilitando a competição com leveduras “killer” contaminantes, tais como os gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* e *Pichia* (Schmitt & Breining, 2002; Kimura *et al.*, 1995a). O uso da tecnologia do DNA recombinante para a formação de múltiplos padrões de toxinas “killer” em uma levedura confere uma forte vantagem seletiva para aplicação na fermentação industrial, contra contaminação por leveduras “killer” (Schmitt & Breining, 2002).

A aplicabilidade destas toxinas em medicina tem sido sugerida, pelo fato das mesmas não agirem em bactérias, evitando danos a microbiota normal; também por não agirem em células eucarióticas de animais; e, em mamíferos serem rapidamente inibidas pela atividade proteolítica do estômago e duodeno (Pfeiffer *et al.*, 1988).

Durante as duas últimas décadas vem crescendo dramaticamente o aparecimento de infecções por fungos em humanos. Sendo assim, pesquisas têm mostrado que proteínas antifúngicas, peptídeos e seus derivados sintéticos possuem grande potencial para serem usados no tratamento de tais infecções, que acontecem, particularmente em pacientes imunodeprimidos. Toxinas “killer” secretadas, principalmente produzidas por leveduras não-*Saccharomyces*, apresentam um largo espectro de atividade “killer” contra um grande número de patógenos de plantas e humanos, incluindo a atividade anti-*Pneumocytis carinii*, em uma recente descrição de estirpe “killer” de levedura *Pichia anomala* (Schmitt & Breining, 2002).

Outra forma de aplicação do fenômeno “killer” refere-se ao uso deste em manipulação genética de plantas. Na tentativa de se obter resistências a patógenos, plantas têm sido manipuladas geneticamente a fim de produzirem substâncias tóxicas, como polipeptídeos (Selitrennikoff, 2001; Schmitt & Breining, 2002). Estirpes da levedura *Ustilago maydis* são infectadas naturalmente por ds-RNA vírus, que contém informações genéticas para a secreção de uma toxina proteica anti-fúngica. Esta característica tem sido vista como um atrativo e único modelo para a introdução de resistência a fungos em plantas de tabaco (Schmitt & Breining, 2002). Algumas espécies de leveduras mostram significativa atividade, *in vitro*, contra fungos fitopatogênicos, como foi demonstrado contra os fungos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti* e *Phytophthora infestans*, todos inibidos por *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala* e *Williopsis mrakii* (Walker *et al.*, 1995). Outro exemplo de antagonismo foi observado em *Zygosaccharomyces bailli*. Zygocina, uma proteína antifúngica secretada pela levedura mostrou toxicidade contra os fungos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum graminicola* (Weiler & Schmitt, 2003).

Segundo Kimura & colaboradores (1995a), micocinas secretadas por *Williopsis mrakii* e *Williopsis saturnus var. saturnus* apresentaram-se estáveis ao aquecimento e a um amplo espectro de pH, fatores que colaboram para o uso destas toxinas como modelos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. O largo espectro de atividade das toxinas “killer” bem como sua alta especificidade nos permite vislumbrar sua utilização no controle de doenças, sobretudo no biocontrole de fitopatógenos, na tentativa de diminuirmos a necessidade de utilização de pesticidas e os custos da produção agrícola.

#### 1.4. Características dos fungos fitopatogênicos selecionados para teste

O Brasil é reconhecido como um dos principais países na aplicação de práticas agrícolas sustentáveis tais como o cultivo direto e a fixação biológica de nitrogênio. Sua rica biodiversidade e clima tropical permitem que seja um grande exportador de várias frutas e grãos assim como seus produtos derivados.

Apesar destes aspectos favoráveis à agricultura brasileira, ainda temos muitos desafios: os elevados gastos com insumos e pesticidas, por exemplo, que consomem grande parte dos investimentos em pomares de laranja, e a ocorrência de infestações de culturas por fungos fitopatogênicos, responsáveis por grandes perdas na agricultura brasileira.

De acordo com o Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), a venda de defensivos agrícolas de janeiro a outubro de 2008 totalizou um pouco mais de 10 bilhões de Reais, dentre eles os produtos para o controle de fungos fitopatogênicos que infestam culturas na agricultura brasileira, dentre os quais estão as espécies *Colletotricum gloeosporioides*, *Moniliophthora perniciosa* (= *Crinipellis perniciosa*), *Fusarium solani* e *Fusarium graminearum*. Estes gastos não são gastos exclusivos no Brasil. Em um estudo recente Pimenta e seus colaboradores (2008) levantaram que US\$ 30 bilhões são gastos anualmente com pesticidas no mundo inteiro e que 25 milhões de trabalhadores sofrem envenenamento por sua ocupação na agricultura em países em vias de desenvolvimento. Somado a isto, está a preocupação com os resíduos de fungicidas nas frutas e seu possível efeito na saúde humana e no ambiente,

além da resistência aos fungicidas por alguns patógenos (Pimenta *et al.*, 2008; Rist & Rosenberger, 1995). Nos últimos anos os esforços dos pesquisadores têm sido direcionados para o desenvolvimento de novos métodos de controle, sendo o controle biológico a alternativa mais promissora (Kinay & Yildiz, 2008; Pimenta *et al.*, 2008; Rist & Rosenberger, 1995; Droby *et al.*, 1998, 1993). As espécies abaixo citadas são responsáveis por grandes perdas no setor agrícola do país, por isso foram escolhidas, neste trabalho, para testarmos o potencial das leveduras “killer” encontradas, como agentes no biocontrole desses fitopatógenos.

O fungo *Colletotricum gloeosporioides* é responsável pela antracnose, doença que se caracteriza pela presença de manchas necróticas nos frutos, folhas, flores e ramos podendo evoluir para a seca dos ramos e ponteiros, seca ou abscisão das folhas e flores, e queda prematura e / ou podridão do fruto. Este fungo sobrevive como saprófita no tecido morto e tem como principais agentes disseminadores, insetos e respingos de chuva. A infecção ocorre nos frutos ainda jovens, permanecendo latente até que ocorra o crescimento e a maturação dos frutos. A antracnose é considerada a principal doença pós-colheita do mamão e, além disso, trata-se de uma doença muito difundida nas Américas ocorrendo em diversas culturas, como: abacate, pinha, graviola, caqui, tangerina, figo, cupuaçu, fumo, goiaba, maçã, mandioca, manga, maracujá, pimenta do reino, algumas plantas ornamentais e o grupo das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta), que em campos com alta concentração do fungo, 100% dos frutos podem ser atingidos pela doença em pouco tempo (Kurozawa & Pavan, 1997).

Outro fitopatógeno investigado neste trabalho foi o fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da Vassoura-de-Bruxa, doença caracterizada por uma proliferação anormal de brotos laterais seguida de hipertrofia e inchamento da base dos brotos vegetativos (Lopes, 1997); Além dos ramos novos, os sintomas podem ser vistos em frutos e brotos. Muito conhecida no Brasil por ter causado uma crise na produção cacaujeira da Bahia, esta doença foi descoberta em 1895, no Suriname e alastrou-se para toda a América do Sul e parte do Caribe, provocando perdas de até 50% da produção (Dalla Pria & Camargo, 1997). Além do cacau, *Moniliophthora perniciosa* afeta o plantio de urucuzeiros situados próximos a regiões de cacauzeiros infectados e é, economicamente, a pior doença do cupuaçu, pois reduz drasticamente a produção de frutos, podendo atingir 100% do cultivo (Veras *et al.*, 1997).

A espécie *Fusarium solani* foi a responsável pela primeira ocorrência de SDS (Sudden Death Syndrome) no Brasil, mais especificamente no Distrito Federal. A Síndrome da morte súbita (SDS) foi detectada durante a fase de crescimento do cultivo de soja. Os sintomas iniciais consistem no aparecimento de manchas coloridas e necroses. O fungo foi reisolado de raízes doentes, o que mostra o alto grau de infestação com este contaminante (Nakajima *et al.*, 1996).

Comum em culturas de pepino, abóbora, melão e melancia, a Podridão das raízes e do colo é causada pela colonização localizada do fungo *Fusarium solani* e pode afetar as plantas em qualquer estágio de desenvolvimento. As plântulas ficam murchas, podendo ou não tombar, secar e as raízes e região do colo apresentam-se necrosadas. As plantas maiores podem perder o vigor, paralisar o crescimento, murchar e secar. A fusariose, causada por fungos do

gênero *Fusarium* associados ao rizoma e às raízes das plantas afeta culturas de aspargo e é a principal doença da cultura de pimenta-do-reino, uma importante especiaria, cujos principais produtores são o Brasil, a Indonésia, a Índia, a Malásia e o Sri Lanka. Principal redutor da longevidade da cultura, a fusariose dissemina-se rapidamente, podendo dizimar um pimental com 30.000 plantas em dois anos (Trindade & Poltronieri, 1997). No estado do Pará, responsável por mais de 90% da produção nacional de pimenta-do-reino, cerca de 10 milhões de plantas foram destruídas pela doença (Trindade & Poltronieri, 1997). Também causada pelo fungo *Fusarium solani*, a podridão comum de raízes está presente em todas as regiões produtoras de trigo do Brasil com perdas estimadas em 20%. A infecção tem início na semente, e na planta causa uma descoloração parda nos tecidos radiculares que prossegue até atingir a base da planta provocando a morte prematura das folhas basais (Reis *et al.*, 1997).

Além da podridão das raízes, o trigo também é atingido pela giberela, doença associada aos fungos *Fusarium solani* e *Fusarium graminearum*, tendo no Brasil perdas de até 12% (Reis *et al.*, 1997). O fungo, disseminado pelo ar, atinge a flor, colonizando todos os componentes da espiga. A colonização pode impedir a formação de grãos ou ser mais lenta, originando grãos enrugados, ásperos e róseos.

O fungo *Fusarium graminearum* é responsável ainda pela podridão vermelha do colmo, a qual compromete a firmeza do tecido interno causando o tombamento da planta, e pela podridão comum das raízes, cuja descoloração dos tecidos radiculares persiste até atingir a base da planta, matando prematuramente as folhas basais (Reis *et al.*, 1997). Muito comum em regiões

tropicais e temperadas, as doenças causadas pelo fungo *Fusarium graminearum* afetam a produção de grãos e forragens como o sorgo e o trigo.

As espécies citadas são responsáveis por grandes perdas no setor agrícola do país, por isso foram escolhidas, neste trabalho, para testarmos o potencial das leveduras “killer” selecionadas, como agentes a serem empregados no biocontrole desses fitopatógenos.

## 1.5. Hipótese

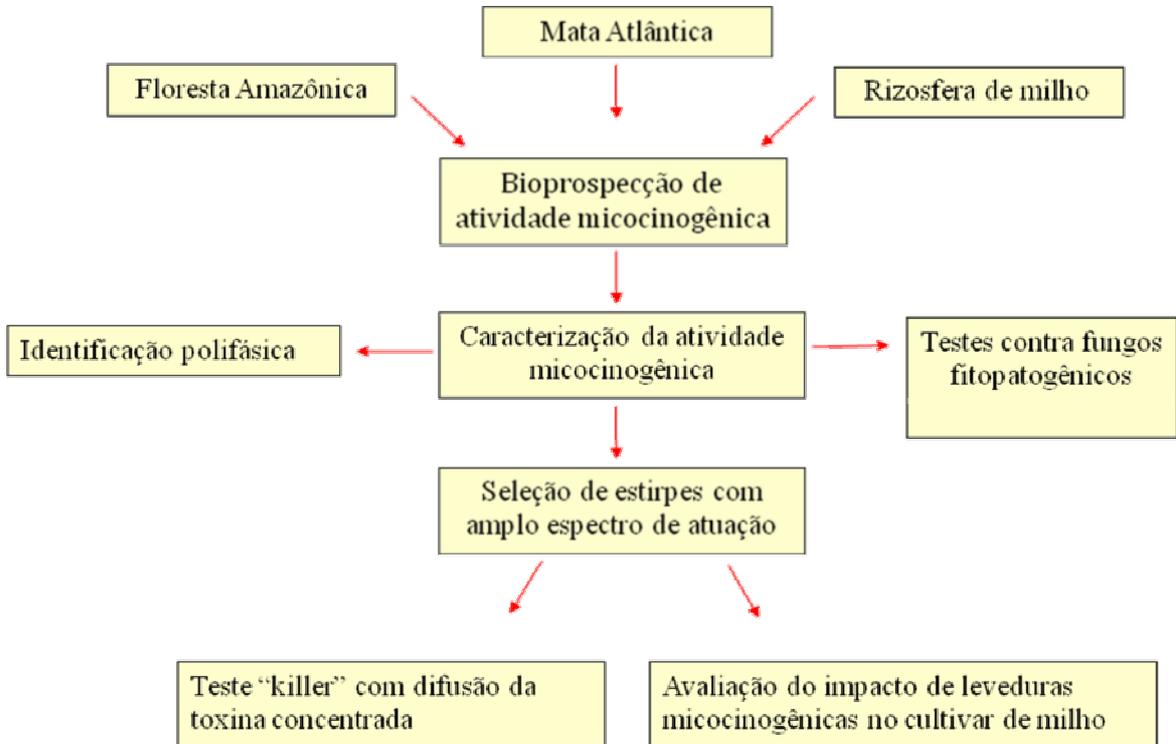
- Os habitats tropicais são reservatórios para a bioprospecção de novas leveduras micocinogênicas que podem ser usadas como inoculantes de plantas, possuindo estreita relação com as raízes, e sendo algumas capazes de inibir os fungos fitopatogênicos.

## 2. Objetivos

- Caracterizar taxonomicamente as leveduras micocinogênicas através de critérios fenotípicos e genotípicos;
- Verificar estirpes micocinogênicas que tenham largo espectro de atividade contra leveduras filogeneticamente diversas e fungos fitopatogênicos;
- Testar o efeito da interação entre as leveduras micocinogênicas selecionadas no crescimento de cultura de milho (*Zea mays*).

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Desenho experimental



#### 3.2. Estirpes utilizadas

Foram utilizadas neste projeto estirpes de leveduras da Coleção de Culturas de Leveduras do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Goes – IMPPG/UFRJ, selecionadas anteriormente (Cabral, 2004). As estirpes de leveduras e de fungos filamentosos utilizadas neste projeto e suas respectivas origens estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Origem das leveduras micocinogênicas, leveduras alvo e fungos filamentosos utilizados.

Estirpe	Identificação	Substrato	Origem
IMUFRJ/51937	<i>Williopsis saturnus var subsufficiens</i>	Solo	Agroecossistema – EMBRAPA/RJ
IMUFRJ/51938	<i>Williopsis saturnus var subsufficiens</i>	Solo	Floresta Amazônica – ESEC/RR
IMUFRJ/51939	<i>Williopsis saturnus var subsufficiens</i>	Solo	Floresta Amazônica – ESEC/RR
IMUFRJ/51919	<i>Williopsis californica</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ
IMUFRJ/51934	<i>Candida yuanshanicus</i>	Rizosfera milho	Agroecossistema – EMBRAPA/RJ
IMUFRJ/51935	<i>Candida yuanshanicus</i>	Rizosfera milho	Agroecossistema – EMBRAPA/RJ
IMUFRJ/51936	<i>Candida yuanshanicus</i>	Solo	Agroecossistema – EMBRAPA/RJ
IMUFRJ/51915	<i>Pichia membranifaciens</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51918	<i>Pichia membranifaciens</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51921	<i>Pichia membranifaciens</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51922	<i>Pichia membranifaciens</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51916	<i>Candida stellimalicola</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51917	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51920	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51914	<i>Dipodascus capitatus</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
IMUFRJ/51923	<i>Trichosporon asahii</i>	Substrato vegetal	Mata Atlântica – Pedra Branca/RJ*
Leveduras Tipo (alvo)			
IMUFRJ/50083 <sup>T</sup>	<i>Candida glabrata</i>		UWO CANADA Y-55
IMUFRJ/51505 <sup>T</sup>	<i>Candida tropicalis</i>		ATCC 750
IMUFRJ/50658 <sup>T</sup>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>		UCD 72-50
IMUFRJ/50342 <sup>T</sup>	<i>Clavispora lusitaniae</i>		UCD 61-4
IMUFRJ/50496 <sup>T</sup>	<i>Metschnikowia lunata</i>		UCD 77-62
IMUFRJ/51700 <sup>T</sup>	<i>Williopsis saturnus</i>		NRRL Y-17396
IMUFRJ/51705 <sup>T</sup>	<i>Cryptococcus laurentii</i>		NRRL Y-2536
IMUFRJ/51707 <sup>T</sup>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		NRRL Y-2510
IMUFRJ/51913	<i>Candida parapsilosis</i>		IMPPG/UFRJ
Fungos fitopatogênicos			
CP136	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Substrato vegetal	EMBRAPA Meio Ambiente
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Substrato vegetal	PESAGRO
	<i>Fusarium solani</i>	Substrato vegetal	PESAGRO
	<i>Fusarium graminearum</i>	Substrato vegetal	EMBRAPA Meio Ambiente

\*Área de Proteção Ambiental (APA) - Parque do Pico da Pedra Branca, RJ

*Wickerhamomyces pijperi* = *Pichia pijperi* – Reorganização de espécies corrente (Kurtzman *et al.*, 2008)

### 3.3. Taxonomia de leveduras

#### 3.3.1. Taxonomia convencional (Yarrow, 1998)

##### 3.3.1.1. Morfologia

As estirpes foram cultivadas em Ágar GYP (Anexo 1) por 72 h a 22°C. Após o crescimento, uma gota de água destilada foi transferida para a superfície de uma lâmina com uma alça de inoculação e, uma porção de uma colônia isolada foi retirada com agulha estéril da placa de Petri e suspensa na

gota d'água. A suspensão foi coberta com uma lamínula e o excesso água foi removido pressionando a lamínula sobre a lâmina e o material observado em microscópio óptico (Leitz, modelo: Laborlux S - contraste de fase) usando as objetivas de 40x e 100x e ocular de 10x. Foram observadas a forma das células (globosas, ovais, alongadas, apiculatas, cilíndricas), a presença de hifas e pseudohifas, o tipo de brotamento (multipolar ou bipolar), fissão, a presença de esporos.

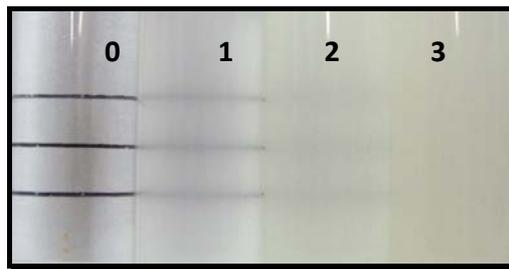
### **3.3.1.2. Testes de fermentação**

A fermentação de glicose foi testada em volume de 3 ml, em tubos de ensaio de 13 x 100 mm com tubos de Durham invertidos. O teste é considerado positivo quando no tubo de Durham se forma uma bolha que ocupa pelo menos 2/3 de seu volume. As linhagens com fermentação positiva foram também testadas para fermentação de outros açúcares, como galactose, maltose e sacarose. O meio utilizado foi o meio basal para fermentação (MBF – Anexo 1) e as leituras realizadas após 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 21 dias de incubação em temperatura ambiente.

### **3.3.1.3. Crescimento em diferentes temperaturas**

Esses testes foram realizados utilizando-se o caldo GYP inoculado, com auxílio de uma alça, com colônias crescidas em placas com meio GYP por 48h. Foi testado, em banho-maria, o crescimento das culturas às temperaturas de 25, 37, 40 e  $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O aparelho foi ajustado para a temperatura desejada usando um termômetro com a calibração confirmada contra um banho de água e gelo e foi assim mantido pelo menos um dia antes da incubação dos testes.

As leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 h e sete dias de incubação, checando-se diariamente a temperatura do banho-maria. O crescimento foi avaliado com o auxílio da escala de Wicherham, e foi considerado positivo, quando a densidade celular superou o valor 2, desta escala (Figura 2).



**Figura 2:** Escala de Wickerham. Os números indicam os valores atribuídos à leitura dos tubos.

#### 3.3.1.4. Testes de crescimento

Os testes de assimilação de fontes de carbono, nitrato, tolerância ao NaCl (10 e 15%) e ciclohexamida foram realizados por meio da técnica de “replica-plate”. Para tanto, foi utilizado um replicador de latão, com 25 pinos de alumínio, que encaixam em 25 poços, também de alumínio. Cada poço recebeu 0,3 mL de inóculo a partir de cultivos em YNB + 0.1% de glicose. Após este procedimento, a parte superior do replicador, contendo os pinos, foi carimbada em placas de Petri com as substâncias a serem testadas. Os controles negativo e positivo dos experimentos foram respectivamente, uma placa com YNB e ágar e outra com YNB, ágar e glicose 0,5%. As leituras foram realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação a 23°C. Foram testadas 37 - 40 fontes de carbono, utilizando produtos com alto grau de pureza.

### **3.3.1.5. Teste de urease e DBB (corante Diazonium Blue B)**

No teste de urease e DBB foi empregado o método descrito em Hagler e Mendonça-Hagler (1991). As leituras de urease foram feitas durante três dias consecutivos. A atividade da enzima urease, quando presente na linhagem, provoca uma viragem do indicador fucsina-ácida, de uma coloração violeta para incolor. Após este teste, as linhagens foram incubadas por 22 a 24 h a 55°C, quando foi adicionado, sobre o crescimento algumas gotas do reagente DBB (15 mg DBB diluído em 15 mL de tampão TRIS, 0,1 M, pH 7,0). As linhagens que apresentaram coloração vermelha foram consideradas positivas e relacionadas aos Basidiomicetos, as demais foram consideradas negativas e relacionadas aos Ascomicetos.

### **3.3.1.6. Formação de esporos**

Estirpes de leveduras que não tiveram uma identificação positiva foram cultivadas por um mês a 25°C nos meios Ágar YM, CMA, Ágar extrato de malte 5% e Ágar V8 (Anexo 1). O material foi observado em microscópio óptico (Axioplan 2 em contraste interferencial diferencial de Nomarski) utilizando-se as objetivas de 40x e 100x.

## **3.3.2. Caracterização molecular de leveduras**

### **3.3.2.1. Extração de DNA de leveduras**

As linhagens foram crescidas em 2 mL de caldo GYP à 26° C por 2-4 dias. As células foram coletadas após centrifugação (2000 g/3 min), utilizando-se tubos para microcentrífuga com capacidade de 1,5 ml; o precipitado foi ressuspendido e homogeneizado em 500 µL de tampão de

extração (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2% de SDS [pH 8.0]) sendo incubado a 65°C por 1 h. Foram adicionados 500 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado cuidadosamente e centrifugado a 10.000 g/8 min. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo de microcentrifuga com capacidade de 1,5 mL, acrescentando-se igual volume de isopropanol (cerca de 400 µL) e homogeneizando-os; os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 min; após este período, foram centrifugados (10.000 g/15 min/5°C); o sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado, com 50 µL de etanol 70% frio e centrifugado a 12.000 g/10 min; o etanol foi descartado e os tubos colocados para secar sobre papel toalha. Após a completa evaporação dos resíduos do etanol, o DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1mM EDTA [pH 8,0]) e estocado à -4°C. A qualidade e quantidade do DNA obtidas foram analisadas após eletroforese em gel de agarose 1,0 % (90 v/30 min), sendo corados com brometo de etídio, visualizados em luz UV e fotografados (Valente 1996, modificado de Vilgalys & Hester, 1990).

### **3.3.2.2. Amplificação via PCR da região D1/D2 do 26S rDNA**

As regiões D1/D2 das linhagens foram amplificadas por PCR, utilizando-se os iniciadores NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') (Kutzman & Robnett, 1998). Foi utilizada a seguinte mistura de reação (Kit Gibco BRL): 38,0 µL de água milli-Q esterilizada; 5,0 µL de tampão de amplificação 10X concentrado com MgCl<sub>2</sub> (concentração final 1,5 mM); 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub>; 1,0 µL de dNTP 10mM; 0,5 µL de Taq DNA polimerase (2,5U); 1,0 µL de cada iniciador: ITS1 e ITS 4

(concentração inicial de 20 pmol/ $\mu$ L); 1  $\mu$ L do DNA alvo (100 a 200 ng). O programa de ciclagem utilizado foi: uma desnaturação inicial 1 ciclo de 94°C/3 min, 52°C/30 seg e 72°C/30 seg; 35 ciclos de 94°C/1 min, 52°C/30 seg. e 72°C/30 seg; com uma extensão final de 72°C/10min. Os produtos de PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,0% (90 v/30 min) sendo corados com brometo de etídio, visualizados em luz UV e fotografados.

### 3.3.2.3. Amplificação via PCR da região espaçadora intergênica (ITS)

A região ITS do rDNA das leveduras selecionadas foi amplificada com os iniciadores universais ITS1(5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS2(5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') de acordo com White *et al.* (1990) (apud, Valente, *et al.*, 1997). Foi utilizada a seguinte mistura de reação (Kit Invitrogen): 38,0  $\mu$ L de água milli-Q esterilizada; 5,0  $\mu$ L de tampão de amplificação 10X com MgCl<sub>2</sub> (concentração final 1,5 mM); 2,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 1,0  $\mu$ L de dNTP 10 mM; 0,5  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (2,5 U); 1,0  $\mu$ L de cada iniciador: ITS1 e ITS 4 (concentração inicial de 20 pmol/ $\mu$ L); 1  $\mu$ L do DNA alvo (100 a 200 ng). O programa de ciclagem utilizado foi: uma desnaturação inicial (1 ciclo) de 3 min/ 95°C; 25 ciclos de 1 min/55°C, 1 min/95°C, 1 min/72°C; e uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1.0% (90 v/30 min) sendo corados com brometo de etídio e fotografados.

#### **3.3.2.4. Reação de sequenciamento de DNA**

O produto de PCR foi purificado utilizando-se o Kit Concert™ Rapid PCR Purification System (Gibco BRL), e quantificado em gel de Ágarose 1,0% (90v/45 min), utilizando-se o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Após esta etapa, as amostra foram submetidas à reação de sequenciamento, utilizando o DNA Sequencing Kit, Big Dye™ Termination Cycle Sequencing, Ready Reaction (ABI PRISM), seguindo recomendações do fabricante.

#### **3.3.2.5. Purificação da reação de sequenciamento com kit comercial**

O produto de PCR foi purificado, utilizando-se o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e depois quantificado em gel de agarose (1,0%; 90 V; 45 min). Após esta etapa, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando-se o kit, Big Dye® Termination v 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, seguindo as recomendações do fabricante.

Após a ciclagem, o produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando-se o kit Centri-Sep Spin Columns da empresa Princeton Separations, comercializado pela Applied Biosystems. Após este procedimento as amostras foram ressuspensas em formamida Hi-Di da Applied Biosystems e aquecidas à 95 °C/2 min para solubilização do “pellet” e desnaturação das fitas do DNA molde marcadas, e logo colocadas em banho de gelo por 2 minutos, para interromper a reação. Em seguida as amostras foram transferidas para o 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), onde a sequência alvo foi analisada. As sequências de rDNA obtidas foram comparadas, via internet, usando o

BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) com sequências depositadas em bancos de dados especializados (Macrae, 2000).

### **3.3.2.6. Precipitação da reação de sequenciamento com isopropanol**

O produto de PCR foi purificado, e depois quantificado em gel de agarose (1,0%; 90 V; 45 min), utilizando-se o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Após esta etapa, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando-se o kit, Big Dye® Termination v 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, seguindo as recomendações do fabricante.

Após a ciclagem, o DNA foi precipitado adicionando-se 40 µL de isopropanol (75%), sendo então incubado à -20°C por 20 minutos, sendo os tubos submetidos à centrifugação (12.000 g; 25 min; 10°C). O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 200 µL de etanol (70%), o conteúdo dos tubos foi homogeneizado em agitador mecânico por 10 segundos e centrifugado a 12.000 g; 5 min. O sobrenadante foi removido com micropipeta. Com a remoção do sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em formamida Hi-Di da Applied Biosystems e aquecidas à 95°C / 2 min para solubilização do “pelet” e desnaturação das fitas do DNA molde marcadas, e logo colocadas em banho de gelo por 2 minutos, para interromper a reação. Em seguida as amostras foram transferidas para o 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), onde a sequência alvo foi analisada. As sequências de rDNA obtidas foram comparadas, via internet, usando o BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) com sequências depositadas em bancos de dados especializados (Macrae, 2000).

### **3.4. Caracterização da atividade micocinogênica de estirpes selecionadas**

#### **3.4.1. Atividade e sensibilidade micocinogênica**

A atividade micocinogênica foi testada, em meio ágar YM (extrato de levedura, 0,3%, extrato de malte, 0,3%, peptona, 0,5%, glicose, 1,0% e ágar 2,0%) acrescido de 0,003% de azul de metileno, tamponado a um pH 4.2 (ou outro valor desejado) com tampão citrato (0,05 M). As estirpes foram confrontadas com nove estirpes alvo de leveduras padrão pertencentes à Coleção de Culturas de Leveduras do IMPPG/UFRJ (Tabela 2), inoculadas de modo a obter um crescimento confluyente.

Depois de crescidas em meio ágar YM (26°C/48 h), as leveduras alvo foram diluídas em água destilada estéril até uma concentração de  $4 \times 10^5$  células/mL. As leveduras alvo foram espalhadas, separadamente, na superfície do meio com “swab” estéril (100 µl). Já as estirpes testadas foram crescidas em caldo YM (26°C/48 h) e inoculadas pela técnica de “replica-plate”. As placas foram, então, incubadas de 48 à 72 h em estufa a 26°C. As leveduras foram consideradas micocinogênicas quando produziram uma zona de inibição com nenhum crescimento e uma zona azul adjacente indicando a morte celular da estirpe sensível (Abranches *et al.*, 1998).

#### **3.4.2. Efeito do pH e da concentração celular na otimização das condições de expressão da atividade micocinogênica**

O teste de atividade micocinogênica foi realizado somente para as leveduras alvo *Candida glabrata* (IMUFRJ/50083<sup>T</sup>), *Metschnikowia. lunata* (IMUFRJ/50496<sup>T</sup>). Em uma primeira fase, as leveduras alvo foram crescidas

em caldo YM (26°C/48h) e o crescimento foi diluído até  $10^{-2}$ . O crescimento celular e suas diluições foram inoculadas por meio de um “swab” estéril (100 µL) em placas de Petri contendo Ágar YM acrescidos de azul de metileno (0,003%) e tamponados nos pHs 4,2 – 4,8 – 5,4 – 6,0, formando uma camada celular homogênea.

A segunda fase deste teste foi a preparação e aplicação das estirpes micocinogênicas: As estirpes de leveduras *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) e *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/50928 e IMUFRJ/50929) foram crescidas em caldo YM (26°C/48 h). O crescimento celular (concentração 1X) das duas estirpes foi diluído dez vezes ( $10^{-1}$ ) e concentrado duas vezes (concentração 2X). A concentração celular para todos os inóculos foi determinada através de contagem na câmara de Neubauer.

Aplicamos as três concentrações (2X, 1X e  $10^{-1}$ ) de células das estirpes produtoras de micocinas por meio de “replica-plate” nas placas previamente inoculadas com as leveduras alvo e incubamos por 72 h a 26°C.

### 3.4.3. Teste de atividade micocinogênica contra fungos fitopatogênicos

As leveduras com atividade micocinogênica, utilizadas neste projeto, foram testadas contra os fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora perniciosa*, *Fusarium graminearum* (Tabela 2). Uma suspensão contendo esporos dos fungos em água estéril foi inoculada, com um “swab” estéril, na parte central de placas de Petri (90 mm), contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), tamponado ao pH 4,2 com tampão citrato 0,1 M e incubadas a 26°C até que o raio de crescimento do fungo atingisse o dobro do tamanho da região do inóculo. Em

seguida, as estirpes micocinogênicas, previamente crescidas em caldo YM ( $1 \times 10^7$ ), foram inoculadas, circundando o fungo, por meio da técnica de “replica-plate”. As placas foram incubadas à 26°C por 10 dias. (modificado de Martins-Corder & de Melo, 1998).

#### 3.4.4. Produção do extrato concentrado com micocinas

As estirpes *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) e *Candida yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) - *Candida yuanshanicus* sp nov. identificada por Liu *et al.*, 2008 - foram crescidas em um litro de caldo YEPD (Extrato de levedura 1,0%, peptona 2,0% e glicose 2,0% e tampão Citrato 0,05M em pH 4,2), por 24 h a 26°C com agitação rotacional (200 rpm) (Soares & Sato, 2000)

Após o cultivo em caldo YEPD, as células de leveduras foram removidas por contínuas centrifugações a 2800 x g, a 4°C. O sobrenadante foi concentrado 10x a 4°C, em membrana de ultrafiltração (Amicon Diaflo), com ponto de corte correspondente a massa molecular (MM) de 10 kDa (Souza *et al.*, 2003). Foram obtidas duas frações, uma contendo moléculas de MM.>10 kDa, chamada de extrato concentrado, e outra contendo moléculas com MM<10 kDa, chamada de fração excluída. A eficiência do procedimento foi acompanhada por meio da utilização do extrato concentrado e da fração excluída no teste de atividade micocinogênico com difusão da micocina concentrada.

#### **3.4.5. Teste de atividade micocinogênica com difusão da toxina concentrada**

A atividade micocinogênica foi testada também por difusão da toxina, utilizando discos de papel com 6 mm de diâmetro embebidos com o extrato concentrado e com a fração excluída de cada estirpe, que foram depositados em placas de Petri contendo Ágar YM (Anexo 1), acrescido de 0,003% de azul de metileno, tamponado ao pH 4.2 com tampão citrato 0,05 M, previamente inoculadas (espalhadas, separadamente, na superfície do meio com “swab” estéril). Com as estirpes alvo *C. glabrata* (IMUFRJ50083<sup>T</sup>) *M. lunata* (50496<sup>T</sup>).

Com os fungos fitopatogênicos, listados na Tabela 2, o ensaio foi realizado em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), tamponado a um pH 4,2 com tampão citrato 0,05 M. Na parte central da placa de Petri (90 mm) foi inoculada, com um “swab” estéril, uma suspensão contendo esporos dos fungos em água estéril, incubadas a 26°C até que o raio de crescimento do fungo atingisse o dobro do tamanho da região do inóculo. Só então, os discos de papel embebidos com a toxina “killer” concentrada foram depositados circundando o fungo (máximo de três por placa).

#### **3.5. Efeito da inoculação de leveduras em milho**

Utilizamos neste experimento sementes de milho da variedade Eldorado (Safrade 2006), fornecidas pela Embrapa Agrobiologia. As sementes foram separadas de acordo com o peso (aproximadamente 0,5 g) e colocadas sobre o algodão umedecido por 72 h a temperatura ambiente (26°C ± 3°).

Para a preparação do pré-inóculo, 300 sementes de milho foram desinfetadas da seguinte forma: álcool 70% (comercial) 1 minuto; água

sanitária 3 minutos; 10 lavagens sucessivas com água destilada estéril (modificado de Botelho, 1996). As estirpes de leveduras *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) e *Candida yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) foram cultivadas em frascos Erlenmeyers (500 mL) contendo 100 ml de caldo YM e incubados por 48 h a 28°C (pré-inóculos). Um volume de 40 ml dos pré-inóculos foram transferidos para 100 g de turfa estéril (autoclavada) e incubados por 48h a 28°C. Foi feito um controle sem tratamento com 100 g de turfa e 40 mL de caldo YM estéril. Um total de 300 sementes, previamente desinfetadas foram colocadas, então, na turfa previamente inoculada, sendo 100 sementes para cada pré-inóculo. As sementes envolvidas pela turfa foram deixadas secar por 2 horas a temperatura ambiente a sombra.

Foram preparados 14 vasos para cada tratamento com 4 kg de solo (Figura 2). O Solo foi retirado do campo de cultivo do Sistema Integrado de Produção Agropecuária (SIPA) Embrapa Agrobiologia (“Fazendinha”), localizada no Km 47 da Antiga Rodovia Rio – São Paulo, Seropédica (22° 44’ 38”S, 43° 42’ 27”W), Rio de Janeiro. Em cada vaso foram colocadas seis sementes inoculadas e os vasos dos três tratamentos foram dispostos de maneira inteiramente casualizada em casa de vegetação. A casa de vegetação Aparecida Esquibel, mantida pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, possui sistema automático de irrigação por gotejamento (Figura 3), e parede com tela.



Figura 3: Montagem de experimento em casa de vegetação.

### 3.5.1. Acompanhamento do desenvolvimento do cultivar e das leveduras presentes na rizosfera do milho

A presença de leveduras no solo foi avaliada antes do plantio, por meio da técnica de espalhamento em placa. Três amostras, contendo 5 g de solo foram colocadas em frascos Erlenmeyers (250 mL). Foram feitas diluições decimais seriadas em salina 0,85% estéril a partir do conteúdo dos Erlenmeyers (250 mL). Alíquotas de 0,1 mL das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  foram inoculadas por meio da técnica de espalhamento em placa, em triplicata, em meio YM (Anexo 1), acrescido de cloranfenicol 200 mg/L e ampicilina 500 mg/L e incubadas por 48 h a 26°C.

Depois de 17 dias de plantio, foi feito o primeiro desbaste das mudas de milho em todos os vasos do experimento (Figura 4). Sempre que possível foram retiradas 3 plantas de cada vaso, uma vez que nem sempre todas as sementes plantadas germinaram. Para tal foram deixadas as mudas que apresentaram maior robustez e que estavam localizadas mais ao centro de cada vaso. As plantas foram cortadas rentes a superfície do solo. O segundo desbaste foi realizado com 40 dias de plantio quando deixamos uma planta por vaso.



**Figura 4:** Mudanças com 17 dias após o plantio.



**Figura 5:** Mudanças com 25 dias após o plantio.

Foi realizado o isolamento de leveduras da rizosfera do cultivar no 25º e no 100º dias após o plantio (Figura 5). As plantas de 3 vasos de cada tratamento foi coletada e 5 g de rizosfera, juntamente com as raízes foram colocadas em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 45 mL de solução de pirofosfato de sódio 0,1% e Tween 0,1% (Wollum, 1982) e colocados em agitador rotacional por 20 minutos a fim de desprender a microbiota aderida a parede das raízes. Foram feitas diluições decimais seriadas em salina 0,85% estéril a partir do conteúdo dos frascos Erlenmeyers (250 mL). Alíquotas de 0,1 mL das diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  foram inoculadas por meio da técnica de espalhamento em placa, em triplicata, em meio YM (Anexo 1) acrescido de cloranfenicol 200 mg/L e ampicilina 500 mg/L e incubadas por 48 h a 26°C. Após o cultivo, colônias representativas foram selecionadas e propagadas por esgotamento em placas com meio YM. As colônias isoladas foram submetidas ao crescimento em placa com meios de cultura diferenciais. Estirpes de leveduras representativas dos padrões encontrados na rizosfera coletada no

25º dia foram selecionadas para a extração de DNA e sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S, conforme descrito anteriormente.

### **3.5.2. Triagem com meios de cultura diferenciais para agrupamento de estirpes de leveduras isoladas do experimento de milho**

A triagem das leveduras com meios diferenciais foi realizada em placas de Petri de 145 x 20 mm com meio BIL (0,5% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de sulfato de amônia ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e 0,1% de fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Carvalho, 2007). A este meio foram adicionados e combinados os corantes verde de bromocresol, azul de metileno e eosina conforme descrito no Anexo 1. As leveduras estudadas foram repicadas por meio da técnica de “replica-plate” e incubadas a temperatura ambiente (26 ± 3°C). As leituras foram realizadas após 3 dias de incubação e foi observada a coloração das colônias no centro e nas bordas e, quando existente, a coloração do halo formado em volta das colônias (Garcia, 2007, modificado por Hagler, comunicação pessoal).

### **3.5.3. Isolamento de leveduras endofíticas**

O isolamento de leveduras endofíticas foi realizado com raízes de três plantas de cada tratamento (IMUFRJ/51938 – IMUFRJ/51934 – controle). Esse procedimento foi realizado a partir do procedimento descrito por Garcia (2007) com pequenas adaptações (Hagler, comunicação pessoal).

A raiz de cada planta foi lavada com água destilada estéril e depois colocada em um frasco Erlenmeyer contendo Tween 80% e novamente lavada com água destilada estéril. A raiz foi então transferida para um copo de

liquidificador estéril. A raiz foi lavada com álcool 75% por 1 min, hipoclorito de sódio 2,5% por 3 min e novamente álcool 75% por 30 seg. Depois, foram feitas duas lavagens com salina estéril.

Para assegurar que as leveduras isoladas estavam no interior dos tecidos vegetais foi preparado um controle de esterilidade. Após a etapa anteriormente descrita, as raízes foram submetidas a uma lavagem adicional com 50 mL de caldo BIL (Carvalho, 2007) com 0,5% de glicose e antibióticos. Após a lavagem final todo o volume do caldo BIL foi colocado em um Erlenmeyer estéril e incubado a 26 °C, sendo nosso controle de esterilidade da superfície da raiz.

Foi acrescentado ao copo do liquidificador, onde ainda estava a raiz, 100 mL de BIL com 0,5% de glicose e antibióticos. A raiz foi processada em liquidificador e a suspensão foi distribuída da seguinte forma: 50 mL foram colocados em um frasco Erlenmeyer (250 mL); 10 mL foram colocados em tubo com rolha de algodão estéril; 0,1 mL foi espalhado em placa de Petri com Ágar BIL. Todos os meios foram incubados a 26°C por 4 dias. Depois da incubação o caldo de cultivo foi repicado, com o auxílio de uma alça, por meio da técnica de esgotamento, para placas de Petri contendo Ágar BIL com 0,5% de glicose e antibióticos. As colônias obtidas foram sucessivamente repicadas para placas de Petri contendo Ágar YM e incubadas a 26°C até a obtenção de culturas puras.

As placas de Petri inoculadas no momento do processamento das raízes foram avaliadas e as colônias obtidas foram sucessivamente repicadas por esgotamento para placas de Petri contendo Ágar YM e incubadas a 26°C até a

obtenção de culturas puras. Os isolados foram identificados pelo sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA.

## 4. Resultados

### 4.1. Identificação das leveduras micocinogênicas (“killer”)

As leveduras micocinogênicas utilizadas no presente estudo foram presuntivamente identificadas anteriormente (Cabral, 2004) e tiveram esta identificação confirmada no decorrer deste projeto de acordo com os critérios taxonômicos descritos por Barnett (1990) e Kurtzman & Fell (1998) como pode ser visto na Tabela 3, assim como pela análise das sequências da subunidade D1/D2 da região 26S do rDNA (Tabela 4 e Figura 6).

As estirpes IMUFRJ/51934 (=CBS11015=MUCL51546), IMUFRJ/51935 e IMUFRJ/51936 não puderam ser identificadas porque a caracterização fenotípica e genotípica não corresponderam a descrição de nenhuma espécie conhecida. Após análise filogenética baseada nas sequências da subunidade D1/D2 da região 26S rDNA (BLAST – número de acesso EU672892), verificamos um percentual de similaridade 88% entre estas 3 estirpes e outras espécies descritas. As espécies mais relacionadas foram *Pichia bovis* (van Uden & Carmo – Souza, 1957) com 60 substituições e 11 “gaps” (indels) e *Pichia canadensis* ((Wickerham) Kurtzman, 1984), com 66 substituições e 9 “gaps”. As três estirpes possuem sequências idênticas para a região intergênica ITS (Internal Transcribed Spacer – BLAST – número de acesso – FJ025782) e das 551 bases submetidas à comparação neste banco de dados, apenas 225 bases puderam ser alinhadas resultando num percentual de similaridade de apenas 91% para a espécie *Pichia rabaulensis*. Os valores encontrados foram inferiores ao critério descrito em Kurtzman e Fell (1998) para definir co-especificidade que considera, para isso, necessária a similaridade de 99%. A formação de esporos por estas estirpes não foi

observada individualmente ou depois de experimentos de cruzamento, realizados durante um mês de crescimento. Também, não foi observada presença de hifa ou pseudo-hifa, conforme testado em meio fubá de milho (Corn Meal Agar).

**Tabela 3:** Características fenéticas das leveduras micocinogênicas.

Espécie	<i>W. saturnus/ Barnett 1990</i>	<i>Wiliopsis saturnus var. subsufficiens</i>	<i>Wiliopsis saturnus var. subsufficiens</i>	<i>Wiliopsis saturnus var. subsufficiens</i>	<i>W. californica/ Barnett 1990</i>	<i>Wiliopsis californica</i>	<i>Candida yuanshanicus</i> <sup>1</sup> / <i>Liu et al 2008</i>	<i>Candida yuanshanicus</i>	<i>Candida yuanshanicus</i>	<i>Candida yuanshanicus</i>	<i>P. membranifaciens/ Barnett 1990</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>P. pijperi/ Barnett 1990</i>	<i>Pichia pijperi</i>	<i>Pichia pijperi</i>	<i>P. kluveri/ Barnett 1990</i>	<i>Candida stellimalicola</i>	<i>D. capitatus/ Barnett 1990</i>	<i>Dipodascus capitatus</i>	<i>T. beigeltii/ Barnett 1990</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
Código	IMPPG/51937	IMPPG/51938	IMPPG/51939	IMPPG/51919	IMPPG/51934	IMPPG/51935	IMPPG/51936	IMPPG/51915	IMPPG/51918	IMPPG/51921	IMPPG/51922	IMPPG/51917	IMPPG/51920	IMPPG/51916	IMPPG/51914	IMPPG/51923								
Substrato de isolamento	1	2	2	3	4	5	5	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
<b>ASSIMILAÇÃO</b>																								
C1 Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2 Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+	+	+
C3 Sorbose	-	-	-	+	+	-	-	v	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	v	-	v	-	-
C4 Glicosamina	-	-	-	-	W	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	-
C5 Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
C6 Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	v	+
C7 L-Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+
C8 D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C9 Rhamnose	+	+	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C10 Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+
C11 Maltose	-	-	-	v	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
C12 Trealose	-	-	-	v	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C13 α D-glucoside	-	-	-	v	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C14 Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	?
C15 Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
C16 Arbutin	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
C17 Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C18 Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
C19 Rafinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C20 Melezitose	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C21 Inulina	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22 Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+
C23 Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	v	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	v	-

Tabela 3: continuação...

Espécie	<i>W. saturnus/ Barnett 1990</i>	<i>Williopsis saturnus var. subsufficiens</i>	<i>Williopsis saturnus var. subsufficiens</i>	<i>Williopsis saturnus var. subsufficiens</i>	<i>W. californica/ Barnett 1990</i>	<i>Williopsis californica</i>	<i>Candida yuanshanicus</i> T/ Liu et al 2008	<i>Candida yuanshanicus</i>	<i>Candida yuanshanicus</i>	<i>Candida yuanshanicus</i>	<i>P. membranifaciens/ Barnett 1990</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>P. pipperi/ Barnett 1990</i>	<i>Pichia pipperi</i>	<i>Pichia pipperi</i>	<i>P. kluyveri/ Barnett 1990</i>	<i>Candida stellimalicola</i>	<i>D. capitatus/ Barnett 1990</i>	<i>Dipodascus capitatus</i>	<i>T. beigeli/ Barnett 1990</i>	<i>Trichosporon asahii</i>		
C24 Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	
C25 Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
C28 D-Glucitol	+	+	+	+	v	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	v	-	
C29 D-Manitol	v	-	-	-	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	v	-	
C30 Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C31 Mio Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+	
C32 Glu 1,5 Lactona	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	v	-	
C38 Lactato	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	v	-	-	-	-	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	
C39 Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	-	-	
C40 Citrato	+	-	-	-	+	-	D	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	v	-	v	-	+	-	-	
C41 Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C42 Etanol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>FERMENTAÇÃO</b>																										
F1 Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
F2 Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F3 Maltose	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F5 Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F6 Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F8 Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F11 Raffinose	-	-	-	-	-	-	?	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>CRESCIMENTO</b>																										
T1 25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	
T3 35°C	?	+	+	+	?	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	?	+	+	?	+	+	+	+	+	+	
T4 37°C	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	v	+	+	v	+	-	+	+	+	+	
T5 40°C	?	-	-	-	?	-	-	-	-	-	?	+	+	+	+	?	+	+	?	+	-	+	+	-	-	
T6 42°C	?	-	-	-	?	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	?	-	-	?	-	-	+	?	-	-	
<b>TESTES ADICIONAIS</b>																										
N1 Nitrato	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
O1 Ciclohexamida 0,1%	?	-	-	-	?	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	?	-	-	?	-	?	+	v	+	+	
O2 Ciclohexamida 0,01%	?	-	-	-	?	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	?	-	-	?	-	?	+	+	+	+	
M1 Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	?	+	+	
O6 NaCl 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	?	-	+	+	+	
O7 NaCl 15%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	?	-	?	-	?	-	-	
M4 DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

+, positivo; -, negativo; ?, resultado indeterminado; w, fraco; D, crescimento atrasado; v, variável.

Substratos de isolamento: 1 – solo de ambiente agrícola; 2 – solo amazônico; 3 – substrato vegetal (Mata Atlântica); 4 – solo de Taiwan (Liu et al, 2008); 5 – Rizosfera de Milho (Ambiente agrícola)

**Tabela 4:** Identificação das leveduras micocinogênicas por meio do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S rDNA (comparado com sequencias de estirpes tipo depositados no banco de dados da coleção de leveduras da CBS).

Estirpes	Similaridade a / b (c)	Identificação genotípica
IMUFRJ/51937	537/538 (99,81%)	<i>Williopsis saturnus var. subsufficiens</i>
IMUFRJ/51938	537/538 (99,81%)	<i>Williopsis saturnus var. subsufficiens</i>
IMUFRJ/51939	537/538 (99,81%)	<i>Williopsis saturnus var. subsufficiens</i>
IMUFRJ/51919	458/458 (100%)	<i>Williopsis californica</i>
IMUFRJ/51934	563/564 (99,82%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
IMUFRJ/51935	563/564 (99,82%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
IMUFRJ/51936	563/564 (99,82%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
IMUFRJ/51915	484/484 (100%)	<i>Pichia. membranifaciens</i>
IMUFRJ/51918	484/484 (100%)	<i>Pichia. membranifaciens</i>
IMUFRJ/51921	484/484 (100%)	<i>Pichia. membranifaciens</i>
IMUFRJ/51922	484/484 (100%)	<i>Pichia. membranifaciens</i>
IMUFRJ/51917	568/568 (100%)	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>
IMUFRJ/51920	568/568 (100%)	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>
IMUFRJ/51916	576/576 (100%)	<i>Candida stellimalicola</i>
IMUFRJ/51914	443/443 (100%)	<i>Dipodascus capitatus</i>
IMUFRJ/51923	573/575 (99,65%)	<i>Trichosporon asahii</i>

A = n° de bases iguais; b = n° total de bases submetidas; c = porcentagem de similaridade

*Wickerhamomyces pijperi* = *Pichia pijperi* – Reorganização de espécies corrente (Kurtzman *et al.*, 2008)

CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Center)

Depois de analisarmos as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas destas três estirpes juntamente com as sequências obtidas da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA e da região intergênica ITS (Internal Transcribed Spacer) pudemos comparar os dados obtidos com as informações constantes no banco de dados da CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Center). Assim determinamos que estas estirpes realmente se tratavam de uma espécie ainda não descrita na literatura. Posteriormente, a nova espécie foi descrita como *Candida yuanshanicus*, tendo como estirpe tipo uma levedura isolada de solo de uma floresta em Taiwan (Liu *et al.*, 2008).

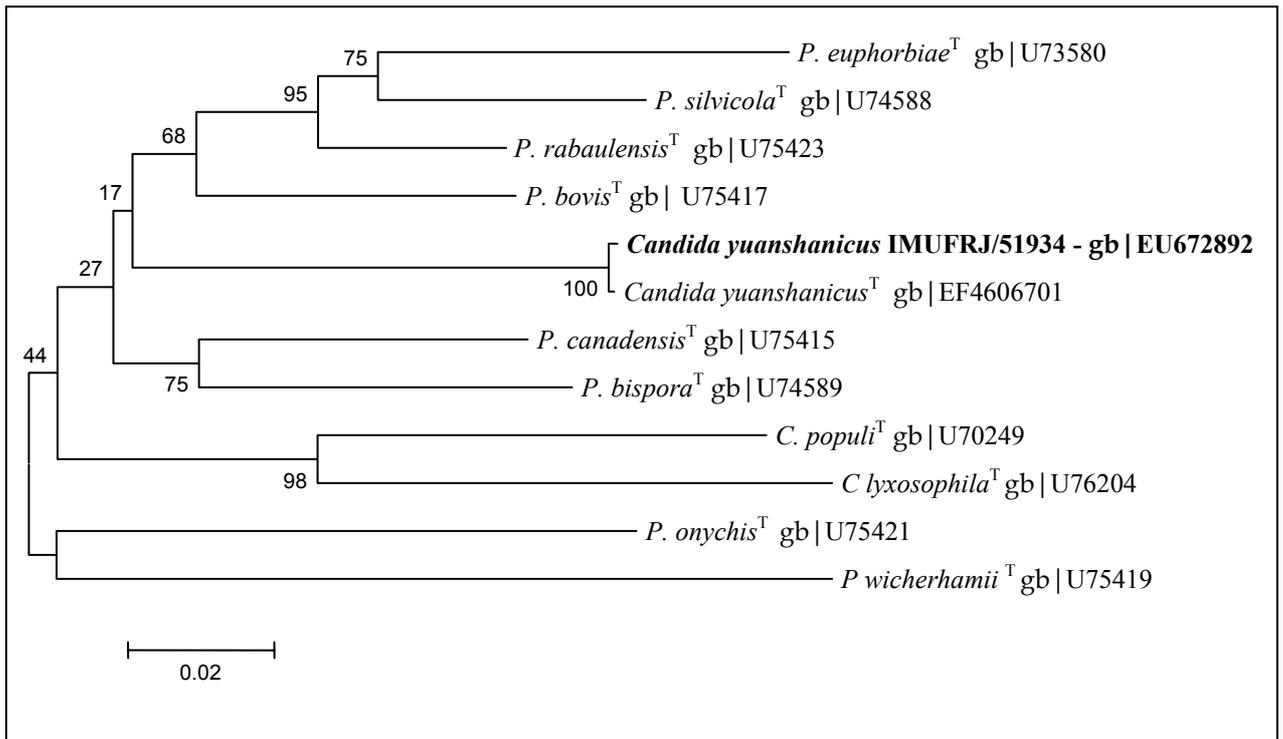
As diferenças encontradas quando comparamos as características fenotípicas de nossas estirpes *C. yuanshanicus*, representada pela estirpe

IMUFRJ/51934, com as características da estirpe tipo de *C. yuanshanicus* e das espécies filogeneticamente relacionadas estão descritas na Tabela 5.

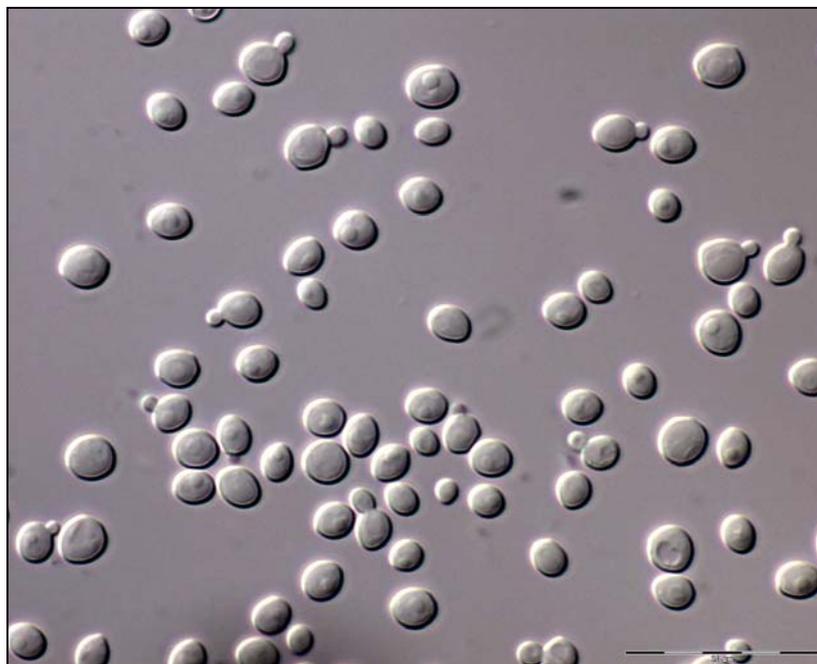
**Tabela 5.** Comparação das características fisiológicas da estirpe IMUFRJ/51934 com a estirpe tipo de *C. yuanshanicus* e com espécies filogeneticamente relacionadas.

	<i>C. yuanshanicus</i> IMUFRJ/51934	<i>C. yuanshanicus</i> <sup>T</sup> Liu et al., 2008	<i>P. bovis</i> <sup>T</sup>	<i>P. canadensis</i> <sup>T</sup>	<i>C. lyxosophila</i> <sup>T</sup>	<i>P. onychis</i> <sup>T</sup>	<i>C. zeylanoides</i> <sup>T</sup>	<i>P. silvicola</i> <sup>T</sup>	<i>C. populi</i> <sup>T</sup>	<i>P. bispora</i> <sup>T</sup>	<i>P. rabaulensis</i> <sup>T</sup>	<i>P. euphorbiae</i> <sup>T</sup>	<i>P. wickerhamii</i> <sup>T</sup>
<b>Assimilação</b>													
Galactose	-	-	-	-	+	-	v	+	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	+	v	-	-	-	-	-
D-Glucosamina	-	W	-	-	+	-	v	-	+	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	+	-	-	v	+	v	-	-	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	-	-	v	-	+	+	v	+	+	v
D-Arabinose	-	-	-	-	-	v	-	-	+	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	v	x	-	-	-	+	+	+	v	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+
α-Methyl-D-Glucosida	+	+	+	v	+	+	-	+	+	x	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Melezitose	+	+	+	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+
Amido	-	-	v	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	w/+	-	v	+	-	v	+	+	v	+	-	+
5-Keto-D-gluconato	-	-	-	-	n	-	+	-	n	-	-	-	+
DL-Lactato	+	-	+	+	+	+	-	v	-	v	+	+	+
Nitrato	-	-	-	v	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Nitrito	-	-	n	n	-	n	v	n	+	n	n	n	n
<b>Fermentação</b>													
Glicose	+	+	+	-	+	+	v	+	+	v	+	+	+
Maltose	-	-	v	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	v	-	-	+	-	-	-	-	+	w	-
Trehalose	-	-	v	-	-	-	v	-	w	-	w	-	-
<b>Additional growth tests</b>													
10% NaCl	-	-	-	-	-	v	v	-	-	-	+	-	x
0,01% Cyclohexamida	-	-	n	n	v	n	+	n	+	n	n	n	n
Crescimento a 37°C	+	-	+	+	-	+	v	v	-	-	+	v	+
Crescimento a 40°C	-	-	n	n	-	n	-	n	-	-	n	n	n

Símbolos: +, positivo; -, negativo; w, fraco; x, positivo ou fraco; v, variável (+/-, w/-); n, não determinado. (Kurtzman & Fell, 1998).



**Figura 6:** Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária de *Candida yuanshanicus*<sup>T</sup> e a estirpe IMUFRJ/51934(=CBS 11015) com outras espécies de leveduras relacionadas baseado no alinhamento da subunidade D1/D2 da região 26S do rDNA. A árvore foi construída usando a distância corrigida de Kimura e MEGA v4 (Tamura et al., 2007). Os números nos ramos indicam os valores de "bootstrap" em porcentagem, baseados em 1000 repetições. A barra de escala representa 0,02 substituições de nucleotídeos em cada posição. gb | Identificação da sequência no Gen Bank.

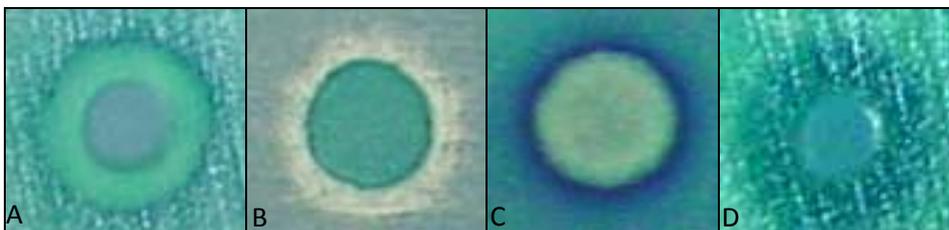


**Figura 7:** Brotamento celular multi-polar de *Candida yuanshanicus* IMUFRJ/51934 (=CBS11015), 1000X. Barra de referência com 20 micrômetros. YM/24h/26°C.

#### 4.2. Determinação da atividade micocinogênica

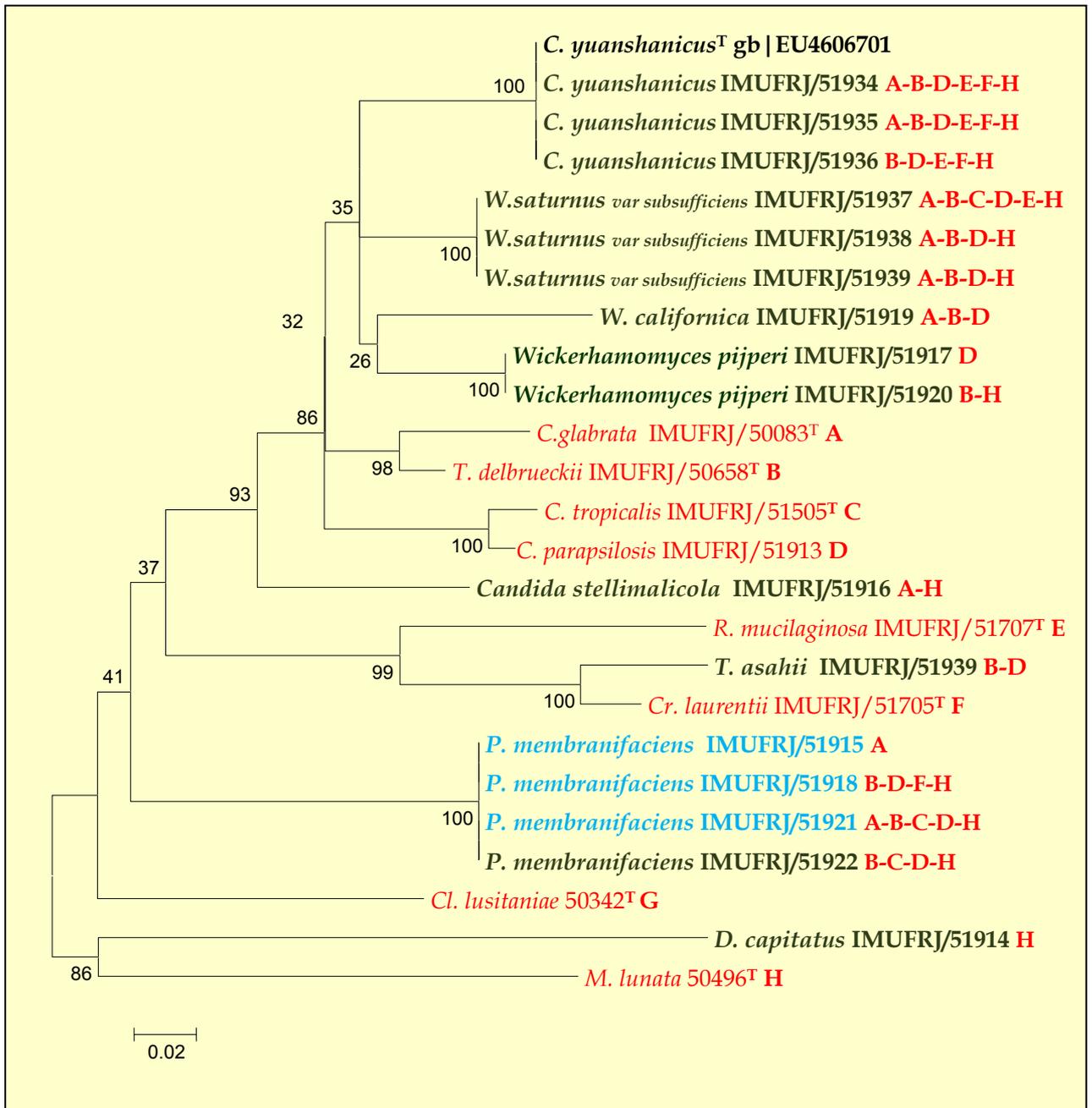
Testes preliminares foram realizados para a determinação da capacidade micocinogênica das estirpes de leveduras utilizadas (Cabral, 2004). Durante o presente estudo, novos testes foram aplicados objetivando verificar a presença e a constância da produção micocinogênica, considerando, dentre outros fatores, o tempo de manutenção das estirpes em coleção em cultura pura sem interação com outras estirpes e com o ambiente natural. Foi possível verificar variações no padrão de antagonismo deste grupo de leveduras frente às diversas leveduras usadas como alvo (Tabela 6).

Para as estirpes IMUFRJ/51915, IMUFRJ/51918, IMUFRJ/51921, identificadas como *P. membranifaciens*, nos testes de atividade micocinogênica realizados ao longo do projeto não foi possível identificar o halo azul característico desta atividade (Figura 8-A), mas sim, e eventualmente, um pequeno halo de inibição (Figura 8-B) contra as leveduras alvo *M. lunata*, *Cr. laurentii*, *C. glabrata*, sendo que a estirpe IMUFRJ/51923 mostrou um espectro de ação mais amplo inibindo as leveduras alvo *C. glabrata*, *M. lunata*, *R. mucilaginosa*, *Cr. laurentii* e *T. delbrueckii*.



**Figura 8:** Exemplos de padrões obtidos no teste de atividade micocinogênica. **A)** padrão de atividade micocinogênica esperado com crescimento da colônia, halo de inibição e halo adjacente com azul mais forte, indicando morte celular. **B)** padrão de antagonismo onde só podemos ver o crescimento da colônia e o halo de inibição ao seu redor. **C)** crescimento da colônia e halo adjacente com azul bem forte. **D)** crescimento da colônia e halo adjacente espesso com azul mais forte.

As leveduras estudadas mostraram atividade micocinogênica contra leveduras alvo filogeneticamente distantes e estirpes de uma mesma espécie mostraram diferentes padrões de atividade micocinogênica (Figura 9).



**Figura 9:** Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária das estirpes micocinogênicas e as estirpes alvo utilizadas no presente estudo baseado no alinhamento da subunidade D1/D2 da região 26S do rDNA. A árvore foi construída usando a distância corrigida de Kimura e MEGA v4 (Tamura et al., 2007). Os números nos ramos indicam os valores de "bootstrap" em porcentagem, baseados em 1000 repetições. A barra de escala representa 0,01 substituições de nucleotídeos em cada posição.

- Leveduras alvo (A-B-C-D-E-F-G-H)
- Leveduras micocinogênicas (As letras indicadas ao lado de cada estirpe correspondem às leveduras alvo que sofreram ação micocinogênica)
- Leveduras antagonistas (As letras indicadas ao lado de cada estirpe correspondem às leveduras alvo inibidas)

**Tabela 6:** Padrão de inibição das estirpes de leveduras micocinogênicas e leveduras alvo.

	Leveduras alvo*								
	<i>C. glabrata</i> <sup>T</sup>	<i>M. lunata</i> <sup>T</sup>	<i>C. lusitanae</i> <sup>T</sup>	<i>T. delbrueckii</i> <sup>T</sup>	<i>C. tropicalis</i> <sup>T</sup>	<i>R. mucilaginosa</i> <sup>T</sup>	<i>Cr. laurentii</i> <sup>T</sup>	<i>W. saturnus</i> <sup>T</sup>	<i>C. parapsilosis</i> <sup>T</sup>
<b>Estirpes micocinogênicas</b>									
IMUFRJ/51937- <i>W. saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>	K	AK	-	AK	AK	K	-	-	AK
IMUFRJ/51938- <i>W. saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>	K	K	-	AK	-	-	-	-	AK
IMUFRJ/51939- <i>W. saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>	K	K	-	AK	-	-	-	-	AK
IMUFRJ/51919- <i>W. californica</i>	AK	A	-	AK	A	-	A	-	AK
IMUFRJ/51934- <i>C. yuanshanicus</i>	AK	K	-	AK	-	K	AK	-	AK
IMUFRJ/51935- <i>C. yuanshanicus</i>	AK	K	-	AK	-	K	AK	-	AK
IMUFRJ/51936- <i>C. yuanshanicus</i>	A	K	-	AK	A	K	AK	-	AK
IMUFRJ/51915- <i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	A
IMUFRJ/51918- <i>P. membranifaciens</i>	-	A	-	A	-	-	A	-	A
IMUFRJ/51921- <i>P. membranifaciens</i>	A	A	-	A	A	-	-	-	A
IMUFRJ/51922- <i>P. membranifaciens</i>	K	AK	-	AK	AK	-	A	-	AK
IMUFRJ/51916- <i>Candida stellimalicola</i>	AK	AK	-	-	-	-	-	-	A
IMUFRJ/51917- <i>W. pijperi</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	AK
IMUFRJ/51920- <i>W. pijperi</i>	A	AK	-	AK	-	-	-	-	A
IMUFRJ/51914- <i>Dipodascus capitatus</i>	-	AK	A	A	-	-	A	-	A
IMUFRJ/51923- <i>Trichosporon asahii</i>	A	A	-	AK	A	A	A	-	AK

A – Antagonismo; K – Atividade micocinogênica (“KILLER”) As leveduras alvo são estirpes tipo (T).

### 4.3. Efeito do pH na determinação da atividade micocinogênica

A atividade micocinogênica foi avaliada com objetivo de determinar as condições ótimas de pH para a produção da toxina. O resultado deste teste também serviu de parâmetro para a seleção de estirpes com um espectro de atividade mais amplo. Com modificações nos valores de pH, verificamos que algumas estirpes apresentaram variação no padrão de antagonismo. Outras estirpes, entretanto, mantiveram o padrão constante independentemente dos valores de pH. Observamos que, quando estirpes produtoras de micocinas pertencentes à mesma espécie são comparadas, estas podem apresentar padrões de atividade idênticos ou diferentes (Tabela 7).

**Tabela 7:** Faixa de pH para a atividade das estirpes de leveduras micocinogênicas.

	Leveduras alvo*								
	<i>C. glabrata</i> <sup>T</sup>	<i>M. lunata</i> <sup>T</sup>	<i>C. lusitanae</i> <sup>T</sup>	<i>T. delbrueckii</i> <sup>T</sup>	<i>C. tropicalis</i> <sup>T</sup>	<i>R. mucilaginosa</i> <sup>T</sup>	<i>Cr. laurentii</i> <sup>T</sup>	<i>W. saturnus</i> <sup>T</sup>	<i>C. parapsilosis</i> <sup>T</sup>
<b>Estirpes micocinogênicas</b>	Faixa de pH de ocorrência de atividade micocinogênica								
IMUFRJ/51937- <i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	3,6-4,4	4,2	-	3,6-4,4	4,0	4,2	-	-	3,6-4,0
IMUFRJ/51938- <i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	3,6-6,0	3,6-4,8	-	3,6-4,8	-	-	-	-	3,6-4,4
IMUFRJ/51939- <i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	3,6-6,0	3,6-4,8	-	3,6-4,8	-	-	-	-	3,6-4,4
IMUFRJ/51919- <i>W. californica</i>	4,0-4,8	-	-	4,8	-	-	-	-	3,6
IMUFRJ/51934- <i>C. yuanshanicus</i>	3,6	3,6-4,4	-	4,0-4,8	-	4,0-4,4	4,0-4,4	-	3,6-4,0
IMUFRJ/51935- <i>C. yuanshanicus</i>	3,6	3,6-4,4	-	4,0-4,8	-	4,0-4,4	4,0-4,4	-	3,6-4,0
IMUFRJ/51936- <i>C. yuanshanicus</i>	-	3,6-4,4	-	4,0-4,4	-	4,0-4,4	4,0-4,4	-	3,6-4,0
IMUFRJ/51915- <i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMUFRJ/51918- <i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMUFRJ/51921- <i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMUFRJ/51922- <i>P. membranifaciens</i>	4,2	4,0-4,2	-	3,6-4,4	4,2	-	-	-	4,2
IMUFRJ/51916- <i>Candida stellimalicola</i>	3,6-4,2	3,6-4,2	-	-	-	-	-	-	-
IMUFRJ/51917- <i>W. pijperi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6
IMUFRJ/51920- <i>W. pijperi</i>	-	3,6	-	4,0-4,8	-	-	-	-	-
IMUFRJ/51914- <i>Dipodascus capitatus</i>	-	3,6-4,2	-	-	-	-	-	-	-
IMUFRJ/51923- <i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	3,6-4,8	-	-	-	-	3,6-4,4

Os testes foram realizados de 4 a 12 vezes; (-) negativo para atividade micocinogênica; As leveduras alvo são estirpes tipo (T).

Na Tabela 7, podemos verificar que as leveduras da espécie *W. saturnus var. subsufficiens* quando confrontadas com a levedura alvo *C. glabrata* produzem atividade micocinogênica em diferentes faixas de pH. A levedura *W. saturnus var. subsufficiens* estirpe IMUFRJ/51937 mostrou ser capaz de produzir atividade micocinogênica contra um maior número de estirpe alvo, no entanto, sua toxina parece atuar em uma faixa de pH mais ácida. As estirpes de *W. saturnus var. subsufficiens* IMUFRJ/51938 e IMUFRJ/51939 conseguem produzir atividade em uma faixa de pH um pouco mais elevada, sendo que sua toxina, quando na presença de *C. glabrata*, é letal em uma faixa de pH mais ampla (Figura 11).

As estirpes da espécie nova *Candida yuanshanicus* (Liu *et al.*, 2008), também apresentaram um amplo espectro de atuação da atividade micocinogênica. Notamos que sua atividade ocorreu dentro do pH considerado

ótimo pela literatura (Starmer *et al.*, 1992), no entanto as estirpes desta espécie não foram capazes de inibir a levedura *C. glabrata*, cuja estirpe original (Tabela 2) vem sendo utilizada como estirpe alvo sendo sensível à maioria das estirpes micocinogênicas testadas (Vital *et al.*, 2002; Abranches *et al.*, 2000).

As demais estirpes mostraram um espectro de atuação mais pontual dentro das condições estabelecidas na metodologia deste estudo, entretanto, não devem ser descartadas, mas sim novamente consideradas para estudos futuros. O padrão de produção da atividade micocinogênica pelas estirpes *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51934) e *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) foi um dos critérios utilizados para a escolha de representantes desta coleção para utilização em testes subsequentes.

#### **4.4. Efeito do pH e da densidade celular na otimização das condições de expressão da atividade micocinogênica**

As estirpes *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51934) e *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934, IMUFRJ/51935), foram submetidas ao confronto com as leveduras sensíveis *C. glabrata* e *M. lunata*, em um teste onde a concentração celular de inóculo para todas as estirpes (micocinogênica e sensíveis) era conhecida. Nosso objetivo era investigar a relação da concentração celular inoculada e a faixa de pH da atividade micocinogênica para entender melhor a relação inóculo-atividade para estas duas estirpes.

As leveduras alvo na concentração  $10^{-2}$ /mL não apresentaram o crescimento confluyente indispensável para a visualização da atividade micocinogênica em placa de Petri. Sendo assim, utilizamos neste teste suspensões celulares cuja variação das concentrações celulares ficou na faixa

de  $3 \times 10^7/\text{mL}$  a  $3 \times 10^8/\text{mL}$  para a estirpe alvo *C. glabrata* e e na faixa de  $1 \times 10^7/\text{mL}$  a  $1 \times 10^8/\text{mL}$  para a estirpe alvo *M. lunata*.

A estirpe IMUFRJ/51938 quando confrontada com a estirpe Tipo *Metschnikowia lunata* (50496<sup>T</sup>) mostrou atividade micocinogênica nos pHs 4,2 e 4,8, nas concentrações  $8,3 \times 10^5/\text{mL}$ ,  $8,3 \times 10^6/\text{mL}$  e  $1,7 \times 10^7/\text{mL}$ . Foi evidente um aumento da área de atividade micocinogênica (colônias, halo de inibição e linha de morte celular) à medida que a concentração da estirpe alvo diminuía e a medida que a concentração do inóculo aumentava, não sendo muito evidente o aumento da área para os inóculos cuja ordem de grandeza foi de  $10^7$ . Um exemplo do que foi registrado está demonstrado na Figura 10. Esta mesma estirpe quando confrontada com a estirpe Tipo *Candida glabrata* (50083<sup>T</sup>) mostrou atividade micocinogênica em todos os valores de pH testados e em uma faixa de concentração celular variando entre  $8,3 \times 10^5/\text{mL}$ ,  $8,3 \times 10^6/\text{mL}$  e  $1,7 \times 10^7/\text{mL}$ . Foi evidente um aumento da área de atividade micocinogênica (colônias, halo de inibição e linha de morte celular) à medida em que a concentração da estirpe alvo diminuía (variação entre  $5 \times 10^7/\text{mL}/\text{cm}^2$  e  $5 \times 10^6/\text{mL}/\text{cm}^2$ ) e a medida em que a concentração do inóculo aumentava, não sendo muito evidente o aumento entre os inóculos cuja ordem de grandeza é de  $10^7$ . Um exemplo do que foi registrado está demonstrado na Figura 11.

As estirpes IMUFRJ/51934 (nas concentrações celulares de  $2,4 \times 10^7/\text{mL}$  e  $1,2 \times 10^6/\text{mL}$ ) e IMUFRJ/51935 (nas concentrações celulares de  $2,0 \times 10^7/\text{mL}$  e  $1,0 \times 10^6/\text{mL}$ ) mostraram leve traço de inibição em pH 4,2 para a levedura alvo *M. lunata*, o que foi mais evidente nas placas contendo leveduras alvo em sua menor diluição. Em placas contendo Ágar YM

tamponados em pH 4,8 a inibição foi ainda menor e em pH 5,4 quase não foi vista.

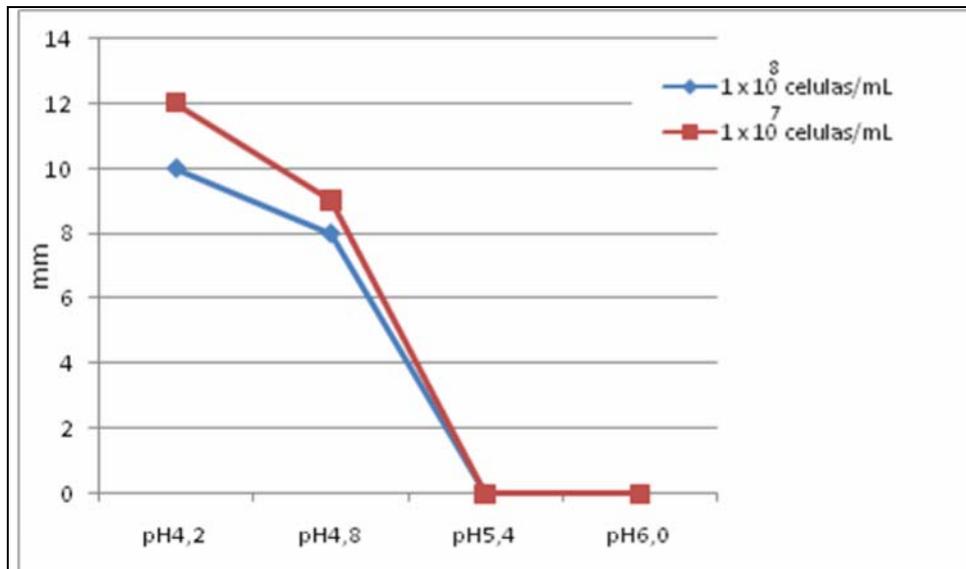


Figura 10: Halo de inibição em milímetros da estirpe micocinogênica *W. saturnus* var. *subsufficiens* (IMUFRJ/51938) ( $8 \times 10^6$ /mL) em relação à estirpe sensível *Metschnikowia lunata*.(50496<sup>T</sup>).

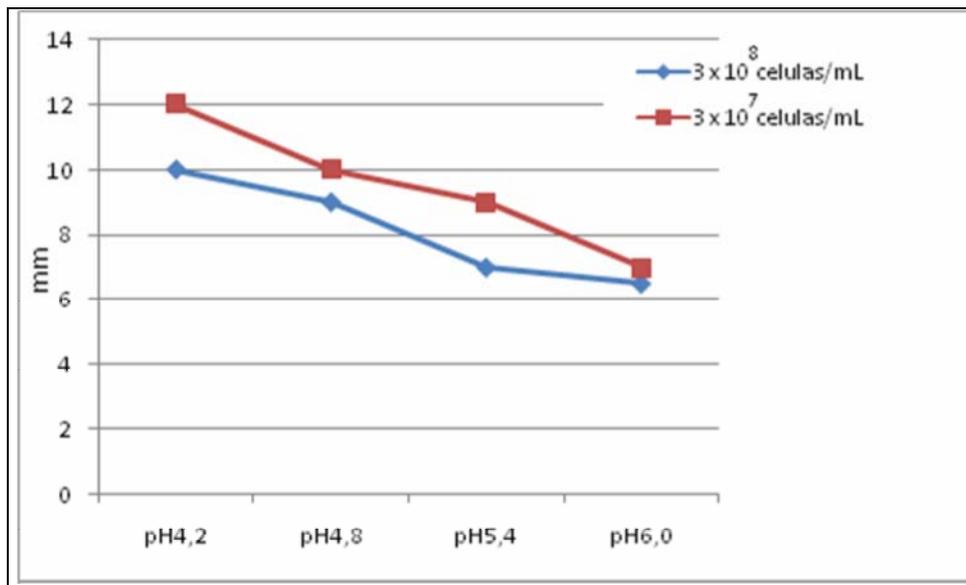


Figura 11: Halo de inibição em milímetros da estirpe micocinogênica *W. saturnus* var. *subsufficiens* (IMUFRJ/51938) ( $8 \times 10^6$ /mL) em relação a estirpe sensível *Candida glabrata* (50083<sup>T</sup>).

#### 4.5. Teste de atividade micocinogênica com difusão da toxina concentrada

Nos testes com a estirpe *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) tivemos a ação da toxina visualizada ao redor dos discos contendo o extrato concentrado, o que não ocorreu ao redor dos discos contendo a fração excluída como podemos ver na Figura 12. Note que dois discos de cada tratamento foram colocados na placa e que podemos visualizar o halo de inibição ao redor dos discos com o extrato concentrado (Figura 12-C) e um halo de morte celular (Figura 12-D, azul mais escuro) adjacente ao primeiro.

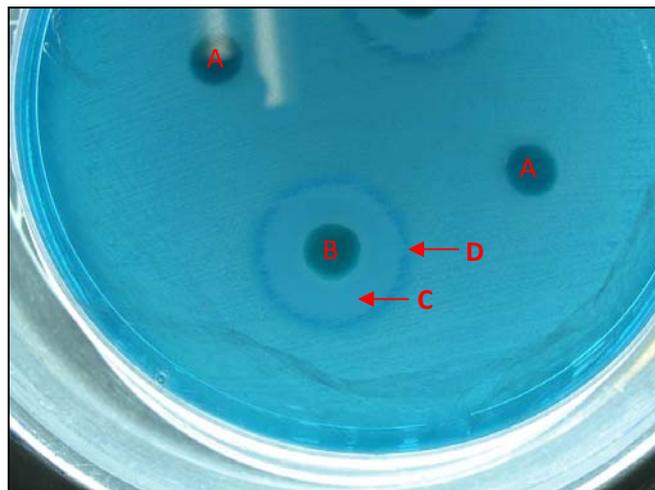


Figura 12: Teste de atividade micocinogênica com difusão da toxina concentrada da estirpe *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) contra a levedura alvo *C. glabrata* (IMUFRJ/50083). A) fração excluída; B) extrato concentrado; C) halo de inibição; D) halo de morte celular.

A presença desta atividade nos ensaios com os discos contendo extrato concentrado à partir da metodologia empregada nos indica que a toxina produzida pela estirpe *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) possui massa molecular acima de 10 kDa. Não foi possível visualizar a presença da toxina produzida pela estirpe *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) no teste de difusão de toxina. Tanto os discos contendo o extrato concentrado quanto

contendo a fração excluída não foram capazes de matar ou mesmo inibir o crescimento das leveduras alvo inoculadas nas placas com Ágar YM.

#### 4.6. Atividade micocinogênica contra fungos fitopatogênicos

Os testes preliminares com esta coleção de leveduras micocinogênicas (Tabela 2) mostraram que algumas estirpes selecionadas possuem potencial para a inibição de fitopatógenos (Cabral, 2004). A inibição do crescimento foi detectada para o fungo *Moniliophthora perniciosa* em confronto com *Dipodascus capitatus* estirpe IMUFRJ/51914 com 12 mm de halo de inibição em placa de Petri e *C. yuanshanicus* estirpe IMUFRJ/51934 apresentando 6 mm de halo de inibição em placa de Petri. O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi inibido por *W. saturnus* var. *subsufficiens* estirpe IMUFRJ/51938 com halo de 8 mm; e *Fusarium graminearum* por *W. saturnus* var. *subsufficiens* estirpe IMUFRJ/51939 com 6 mm de inibição. O antagonismo foi repetido com o fungo *Moniliophthora perniciosa* para a estirpe de *Dipodascus capitatus* (IMUFRJ/51914) com a obtenção de uma inibição um pouco menor (8 mm de halo), assim como para a estirpe de *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) que manteve os 6 mm halo de inibição.

Nos testes de confronto direto subsequentes, realizados *in vitro*, utilizando todas as leveduras micocinogênicas (Tabela 2) contra os fungos fitopatogênicos verificamos uma redução da atividade de antagonismo contra o fungo *Moniliophthora perniciosa* de *Dipodascus capitatus* (IMUFRJ/51914) e *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934), após manutenção das estirpes em coleção. O mesmo aconteceu com as demais estirpes de leveduras utilizadas nestes testes.

Após experimento de concentração da toxina para a estirpe *Williopsis saturnus* (IMUFRJ/51938), o extrato concentrado foi utilizado em confronto com a levedura alvo *C. glabrata* estirpe IMUFRJ/50083 e mostrou atividade produzindo inibição e morte celular (Figura 12). Este extrato concentrado foi utilizado para expor os fitopatógenos a ação da toxina através da difusão da toxina em placas de Petri, entretanto, nas condições estabelecidas para este teste não foi possível visualizar o antagonismo dos fungos por esta estirpe.

#### 4.7. Efeito da inoculação de leveduras em milho

Foram utilizadas neste experimento sementes de milho da variedade Eldorado, que foram selecionadas com base no peso do grão ( $\cong 0,5$  g). A preparação dos vasos foi feita com solo retirado do campo de cultivo do Sistema Integrado de Produção Agropecuária (SIPA), Embrapa Agrobiologia. É um solo de baixa fertilidade, caracterizado por uma camada superficial arenosa sustentada por uma camada subsuperficial compacta de argila. O solo em questão continha 0,88% de C e 1.55% de matéria orgânica, com o pH na faixas 4.7-5.1 (Dados fornecidos pela EMBRAPA Agrobiologia).

As sementes de milho foram inoculadas, separadamente, embebida em caldo YM com uma densidade celular de  $4 \times 10^9$  cels/mL e  $3 \times 10^9$  cels/mL, respectivamente para as leveduras *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) e *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938).

Aproximadamente 80% das sementes de milho cultivar Eldorado submetidas ao teste de germinação *in vitro* germinaram depois de 72 h a temperatura ambiente ( $26^\circ\text{C} \pm 3^\circ$ ). A germinação, no vaso, em casa de vegetação, foi de aproximadamente 90%.

As plantas chegaram ao final do ciclo experimental (100 dias) sem qualquer traço visível de doença de origem biótica ou abiótica, sendo consideradas saudáveis. O peso seco das plantas foi determinado com 40 dias e 100 dias após o plantio (final do experimento). Na última avaliação foram observados os pesos secos médios de  $6,4 \pm 0,8$  g nas plantas coletadas no tratamento com inoculação de *W. saturnus* var. *subsufficiens* (IMUFRJ/51938);  $6,1 \pm 1,0$  g no tratamento com inoculação de *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934); e de  $6,7 \pm 0,9$  g para o controle (sem inoculação de leveduras). A análise estatística não mostrou diferença significativa no peso seco das plantas no decorrer do experimento.

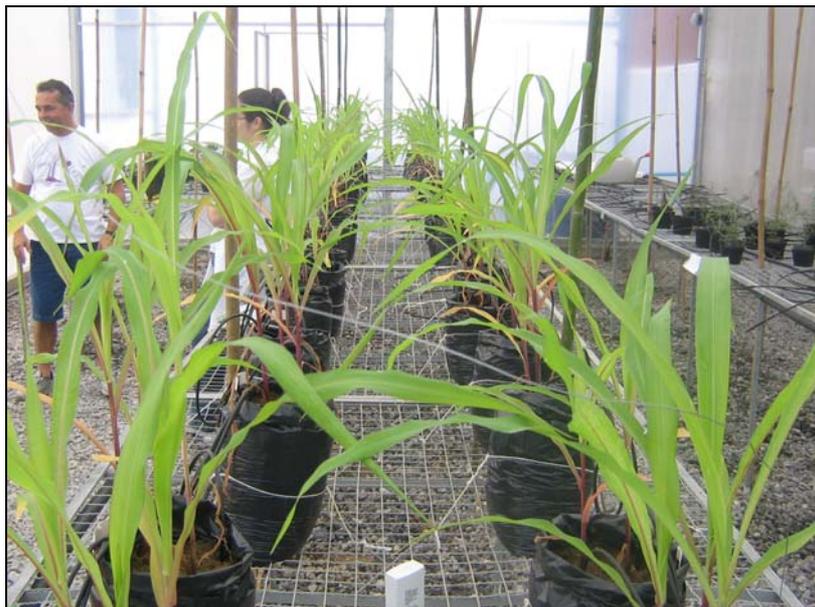


Figura 13: Plantas de milho (cultivar Eldorado) no 40º dia após o plantio. A partir da esquerda o técnico José Olavo Jascinto do Nascimento e a Drª Ida Carolina Direito.

#### 4.7.1. Triagem com meios de cultura diferenciais para agrupamento de estirpe de leveduras

**Tabela 8:** Populações de leveduras em rizosfera de milho.

Inóculo	25 DAP	100 DAP	Detecção do inoculante	
			25 dias	100 dias
<i>C. yuanshanicus</i> IMUFRJ/51934	3 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	1,5 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	(x) [y] (16) [14]	(x) [y] (40) [35]
<i>W. saturnus</i> IMUFRJ/51938	8 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	2,5 x 10 <sup>4</sup> UFC/g	(23) [18]	(33) [29]
Controle – sem inóculo	2,5x 10 <sup>2</sup> UFC/g	1 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	(6) [2*]	(22) [13*]

x – n° de estirpes isoladas; y n° de estirpes isoladas com o mesmo padrão da levedura inoculada;

\* padrão da estirpe IMUFRJ/51934; DAP – Dias após plantio.

O efeito rizosfera para leveduras foi observado nesse experimento, considerando que a população de leveduras no solo natural estava abaixo do nível de detecção por métodos de plaqueamento, e em rizosfera a população atingiu 10<sup>3</sup> UFC/g com 100 dias de plantio (Tabela 8). Nos sistemas inoculados com leveduras, comparando a população 100 dias após o plantio em relação à de 25 dias, observamos o aumento de uma ordem de magnitude para *W. saturnus var. subsufficiens* e para *C. yuanshanicus* a população permaneceu aproximadamente igual. As estirpes isoladas na rizosfera da planta foram identificadas para confirmar a sobrevivência do inoculante.

A triagem com meios de cultura diferenciais (Garcia, 2007), modificado por Hagler (comunicação pessoal) foi a ferramenta utilizada para agrupar as leveduras isoladas da rizosfera de plantas de milho nas duas coletas realizadas durante o experimento.

Amostras da rizosfera do milho foram coletadas no 25º dia após o plantio. Nestas amostras, 45 estirpes de leveduras foram selecionadas com base no conjunto de dados da morfologia colonial dos diferentes meios de cultivo diferenciais. Com o crescimento destas estirpes nos meios de cultivo diferenciais, conseguimos fazer um agrupamento que nos permitiu selecionar

estirpes representativas de diferentes tipos morfológicos que foram identificadas genotipicamente (Tabela 9). Os padrões obtidos com os meios diferenciais, assim como a identificação por meio do sequenciamento da região D1/D2 26S rDNA estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 9:** Identificação de estirpes de leveduras isoladas de rizosfera de milho.

Estirpes	Identificação D1/D2 26S rDNA	Similaridade	Sistema de Inóculo (DAP)
RM 01	<i>Williopsis saturnus var.subsufficiens</i>	533/534 (99%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM06	<i>Candida maltosa</i>	523/525 (99%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM07	<i>Williopsis saturnus var.subsufficiens</i>	537/537 (100%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM08	<i>Williopsis saturnus var.subsufficiens</i>	539/539 (100%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM13	<i>Williopsis saturnus var.subsufficiens</i>	538/538 (100%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM17	<i>Williopsis saturnus var.subsufficiens</i>	537/537 (100%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM20	<i>Cryptococcus laurentii</i>	526/528 (99%)	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias
RM21	<i>Cryptococcus laurentii</i>	526/526 (100%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM24	<i>Candida yuanshanicus</i>	552/553 (99%)	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias
RM30	<i>Candida yuanshanicus</i>	527/530 (99%)	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias
RM38	<i>Cryptococcus laurentii</i>	528/528 (100%)	Controle sem inóculo 25 dias
RM39	<i>Candida yuanshanicus</i>	554/555 (99%)	Controle sem inóculo 25 dias
RM40	<i>Torulaspota globosa</i>	534/537 (99%)	Controle sem inóculo 25 dias
RM41	<i>Candida yuanshanicus</i>	538/539 (99%),	Controle sem inóculo 25 dias
RM42	<i>Torulaspota globosa</i>	475/477 (99%)	Controle sem inóculo 25 dias
RM43	<i>Cryptococcus laurentii</i>	526/528 (99%)	<i>W.saturnus</i> 25 dias
RM45	<i>Torulaspota globosa</i>	495/498 (99%)	Controle sem inóculo 25 dias

DAP – Dias após o plantio.

De acordo com os dados obtidos durante a análise das estirpes isoladas na primeira coleta de rizosfera cultivadas em meios de cultivo diferenciais, verificamos a eficácia desta metodologia no agrupamento de isolados, e na visualização rápida da presença das estirpes que foram inoculadas na fase inicial do experimento. Sendo assim, utilizamos apenas essa ferramenta na análise das estirpes isoladas na segunda coleta.

Com a análise das amostras da rizosfera de milho coletada no 100º dia de cultivo, selecionamos 95 estirpes com base na morfologia externa das colônias. Após a triagem com meios de cultivo diferenciais, selecionamos alguns padrões que estão indicados na Tabela 11.

Buscávamos neste experimento estudar o impacto de leveduras inoculadas para o cultivar de milho, assim como a capacidade de infestação e

permanência por estes microrganismos junto a rizosfera. Verificamos que as estirpes *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) e *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) não inibiram nem estimularam o crescimento das plantas em todos os tratamentos e permaneceram associadas às raízes por todo o período de crescimento. Verificamos, ainda, que outras estirpes da levedura *C. yuanshanicus* foram isoladas, visto que estavam presentes dentre as estirpes originadas do controle, como podemos ver na Tabela 10.

O agrupamento feito a partir de padrões das características fenéticas encontrados em todas as estirpes isoladas da rizosfera de milho está descrito na Tabela 12.

**Tabela 10:** Padrões obtidos na amostragem da rizosfera de milho analisada após 25 dias do plantio

Identificação	<i>W. saturnus</i> Inóculo IMUFRJ/51938	<i>C. yuanshanicus</i> Inóculo IMUFRJ/51934	<i>C. yuanshanicus</i> <i>2<sup>a</sup> estirpe</i>	RM01 * <i>w. saturnus</i>	RM02 *	RM03 *	RM04 *	RM05 *	RM06 * <i>C. maltosa</i>	RM07 * <i>w. saturnus</i>	RM08 * <i>w. saturnus</i>	RM09 *
Fermentação de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formação de película	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Assimilação de xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Assimilação de maltose	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Assimilação de lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de myo-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 36°C	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Crescimento a 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Padrões obtidos	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Teste "killer"												
BILVBCML pH 5,5												
BILVBCML pH 4,0												
YM pH 4,2												
BIL EMB												
BIL EMB 0,05 EL												
BIL												
Nitrato												
Nitrito												
CMA												

\* inóculo IMUFRJ/51938 \*\* inóculo IMUFRJ/51934 \*\*\* controle sem inóculo

Estirpes cujos nomes estão descritos foram identificadas por meio do sequenciamento D1/D2 26S rDNA .

Tabela 10: continuação...

Identificação	<i>W. saturnus</i> Inóculo IMUFRJ/51938	<i>C. yuanshanicus</i> Inóculo IMUFRJ/51934	RM10 *	RM11 *	RM12 *	RM13 * <i>W. saturnus</i>	RM14 *	RM15 *	RM16 *	RM17 * <i>W. saturnus</i>	RM18 *	RM19 *	RM20 ** <i>Cr. laurentii</i>	RM21 * <i>Cr. laurentii</i>
Fermentação de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Formação de película	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Assimilação de xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Assimilação de maltose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Assimilação de lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Assimilação de myo-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Crescimento a 36°C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Crescimento a 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Padrões obtidos	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
Teste "killer"														
BILVBCML pH 5,5														
BILVBCML pH 4,0														
YM pH 4,2														
BIL EMB														
BIL EMB 0,05 EL														
BIL														
Nitrato														
Nitrito														
CMA														

\* inóculo IMUFRJ/51938 \*\* inóculo IMUFRJ/51934 \*\*\* controle sem inóculo

Estripes cujos nomes estão descritos foram identificadas por meio do sequenciamento D1/D2 26S rDNA .

Tabela 10: continuação...

Identificação	<i>W. saturnus</i> Inóculo IMUFRJ/51938	<i>C. yuanshanicus</i> Inóculo IMUFRJ/51934	RM22 *	RM23 *	RM24 ** <i>C. yuanshanicus</i>	RM25 **	RM26 **	RM27 **	RM28 **	RM29 **	RM30 ** <i>C. yuanshanicus</i>	RM31 **	RM32 **	RM33 **
Fermentação de glicose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formação de película	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de xilose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de maltose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de lactose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de myo-inositol	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 36°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Padrões obtidos	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>
Teste "killer"														
BILVBCML pH 5,5														
BILVBCML pH 4,0														
YM pH 4,2														
BIL EMB														
BIL EMB 0,05 EL														
BIL														
Nitrato														
Nitrito														
CMA														

\* inóculo IMUFRJ/51938 \*\* inóculo IMUFRJ/51934 \*\*\* controle sem inóculo

Estirpes cujos nomes estão descritos foram identificadas por meio do sequenciamento D1/D2 26S rDNA .

Tabela 10: continuação...

Identificação	<i>W. saturnus</i> Inóculo IMUFRJ/51938	<i>C. yuanshanicus</i> Inóculo IMUFRJ/51934	RM34 **	RM35 **	RM36 **	RM37 **	RM38 *** <i>Cr. laurentii</i>	RM39 *** <i>C. yuanshanicus</i>	RM40 *** <i>T. globosa</i>	RM41 *** <i>C. yuanshanicus</i>	RM42 *** <i>T. globosa</i>	RM43 * <i>Cr. laurentii</i>	RM44 **	RM45 *** <i>T. globosa</i>
Fermentação de glicose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Formação de película	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de xilose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Assimilação de maltose	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Assimilação de lactose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Assimilação de myo-inositol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Crescimento a 36°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Padrões obtidos	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>D</b>	<b>B</b>	<b>E</b>	<b>B</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>B</b>	<b>E</b>
Teste "killer"														
BILVBCML pH 5,5														
BILVBCML pH 4,0														
YM pH 4,2														
BIL EMB														
BIL EMB 0,05 EL														
BIL														
Nitrato														
Nitrito														
CMA														

\* inóculo IMUFRJ/51938 \*\* inóculo IMUFRJ/51934 \*\*\* controle sem inóculo

Estirpes cujos nomes estão descritos foram identificadas por meio do sequenciamento D1/D2 26S rDNA .

**Tabela 11:** Padrões de identificação na amostragem da rizosfera de milho analisada após 100 dias do plantio, a partir de 95 estirpes isoladas.

Identificação	<i>W. saturnus</i> Inóculo IMUFRJ/51938	<i>C. yuanshanicus</i> Inóculo IMUFRJ/51934	RM49 *	RM55 *	RM 74 *	RM76 **	RM88 **	RM102 **	RM115 ***	RM116 ***	RM133 *
Fermentação de glicose	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Formação de película	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Padrões obtidos	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>N</b>
Teste "killer"											
BILVBCML pH5.5											
BILVBCML pH 4,0											
YM M pH 4,2											
BIL EMB											
BIL EMB 0,05 EL											
BIL											
Nitrato											
Nitrito											
CMA											

\* inóculo IMUFRJ/51938 \*\* inóculo IMUFRJ/51934 \*\*\* controle sem inóculo

**Tabela 12:** Leveduras isoladas de rizosfera de milho.

Nº da estirpe	Padrão fenotípico *	Sistema de inóculo (DAP)	Identificação D1/D2
RM01	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>W.saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>
RM02	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM03	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM04	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM05	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM07	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>W.saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>
RM08	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>W.saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>
RM09	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM10	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM11	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM12	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM13	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>W.saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>
RM14	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM15	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM16	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM17	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>W.saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>
RM18	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM19	A	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM47	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM48	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM49	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM50	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM51	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM52	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM53	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM54	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM56	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM57	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM58	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM59	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM60	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM61	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM62	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM63	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM64	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM65	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM66	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM67	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM68	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM69	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM70	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM71	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM72	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM73	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM75	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM131	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM132	A	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM24	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	<i>C.yuanshanicus</i>
RM25	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM26	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM27	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM28	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM29	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM30	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	<i>C.yuanshanicus</i>
RM31	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM32	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM33	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM34	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	

Nº da estirpe	Padrão fenotípico *	Sistema de inóculo (DAP)	Identificação D1/D2
RM35	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM36	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM37	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM38	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM39	B	Controle sem inóculo 25 dias	<i>C.yuanshanicus</i>
RM41	B	Controle sem inóculo 25 dias	<i>C.yuanshanicus</i>
RM44	B	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	
RM77	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM78	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM79	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM80	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM81	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM83	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM84	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM85	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM86	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM87	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM89	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM90	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM91	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM92	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM93	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM94	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM95	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM96	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM97	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM98	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM99	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM100	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM101	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM103	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM104	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM105	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM106	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM107	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM108	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM109	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM110	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM111	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM112	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM113	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM114	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM119	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM121	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM122	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM123	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM124	B	Controle sem inóculo 100 dias	
RM129	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM130	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM135	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM136	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM137	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM138	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM139	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM140	B	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM06	C	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>Candida maltosa</i>
RM46	C	Controle sem inóculo 25 dias	
RM20	D	<i>C.yuanshanicus</i> 25 dias	<i>Cryptococcus laurentii</i>
RM21	D	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>Cr. laurentii</i>

Nº da estirpe	Padrão fenotípico *	Sistema de inóculo (DAP)	Identificação D1/D2
RM22	D	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM23	D	<i>W.saturnus</i> 25 dias	
RM38	D	Controle sem inóculo 25 dias	<i>Cr. laurentii</i>
RM43	D	<i>W.saturnus</i> 25 dias	<i>Cr. laurentii</i>
RM40	E	Controle sem inóculo 25 dias	<i>Torulaspota globosa</i>
RM42	E	Controle sem inóculo 25 dias	<i>T. globosa</i>
RM45	E	Controle sem inóculo 25 dias	<i>T. globosa</i>
RM49	F	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM82	F	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM55	G	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM74	H	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM76	I	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM126	I	Controle sem inóculo 100 dias	
RM127	I	Controle sem inóculo 100 dias	
RM134	I	<i>W.saturnus</i> 100 dias	
RM88	J	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM102	K	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM115	L	Controle sem inóculo 100 dias	
RM128	L	<i>C.yuanshanicus</i> 100 dias	
RM116	M	Controle sem inóculo 100 dias	
RM120	M	Controle sem inóculo 100 dias	
RM125	M	Controle sem inóculo 100 dias	
RM133	N	<i>W.saturnus</i> 100 dias	

\* Padrão fenotípico obtido com cultivo em meios de cultura diferenciais; DAP – Dias após plantio.

#### 4.7.2. Isolamento de leveduras endofíticas

No isolamento de leveduras endofíticas das raízes do cultivar de milho que utilizamos nos experimentos deste projeto identificamos estirpes isoladas a partir do espalhamento direto em placa de Petri e estirpes que foram isoladas após enriquecimento em caldo BIL.

Após a incubação foi possível verificar, além da presença de colônias de leveduras, a presença de fungos filamentosos. É importante salientar que as placas que foram obtidas a partir de raízes de plantas que receberam o inóculo IMUFRJ/51938 (*Williopsis saturnus* var. *subsufficiens*) continham predominantemente leveduras com presença eventual de colônias de fungos filamentosos. Nas placas originadas dos demais tratamentos encontramos tanto fungos filamentosos como também leveduras que foram isoladas.

Os fungos filamentosos acima tratados foram submetidos ao confronto direto contra as leveduras *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) e *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) em placa de Petri contendo Ágar BDA e nenhum sinal de antagonismo foi detectado, apenas pudemos verificar a coexistência dos fungos filamentosos e das leveduras.

A identificação das estirpes de leveduras endofíticas encontradas está descrita na Tabela 13.

**Tabela 13:** Leveduras endofíticas isoladas de raízes de milho (Cultivar Eldorado) identificadas pelo sequenciamento da região D1/D2 26S rDNA.

Estirpes	Meio	Identificação D1/D2 26S rDNA	Similaridade	Inoculante
EY01	E	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	516/517 (99%)	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>
EY02	P	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	532/532 (100%)	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>
EY03	E	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	496/499 (99%)	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>
EY04	E	<i>Cryptococcus flavescens</i>	538/543 (99%)	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>
EY05	E	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	525/525 (100%)	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>
EY06	E	<i>Candida yuanshanicus</i>	540/543 (99%)	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>
EY14	P	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>	524/526 (99%)	<i>W. saturnus var. subsufficiens</i>
EY07	E	<i>Candida yuanshanicus</i>	511/512 (99%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
EY08	E	<i>Cryptococcus flavescens</i>	543/545 (99%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
EY09	E	<i>Candida yuanshanicus</i>	543/544 (99%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
EY10	E	<i>Candida yuanshanicus</i>	317/318 (99%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
EY11	E	<i>Candida yuanshanicus</i>	511/512 (99%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
EY15	P	<i>Candida yuanshanicus</i>	548/550 (99%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
EY17	P	<i>Candida yuanshanicus</i>	523/525 (99%)	<i>Candida yuanshanicus</i>
EY12	E	<i>Candida yuanshanicus</i>	518/519 (99%)	Sem inóculo
EY13	E	<i>Candida yuanshanicus</i>	235/237 (99%)	Sem inóculo
EY16	P	<i>Candida yuanshanicus</i>	524/526 (99%)	Sem inóculo

E: isoladas em meio de enriquecimento (BIL); P: isoladas por plaqueamento (Ágar YM)

## 5. Discussão

O interesse no potencial biotecnológico das leveduras foi impulsionado pelo reconhecimento de características tais como a facilidade de manuseio e de obtenção de grandes quantidades de massa celular, a habilidade de crescimento em uma ampla variedade de substratos, faixas de pH e taxas de oxigênio. Além disso, as leveduras são organismos, de um modo geral, considerados seguros, sendo apenas umas poucas espécies patógenas oportunistas (Rosa & Peter, 2006). Os diversos grupos de pesquisa que trabalham com micocinas têm avançado no conhecimento desta área, mas a diversidade de toxinas encontradas na natureza e os mecanismos de resistência, assim como a variabilidade genética para esta característica apresentam novos desafios no desenvolvimento de processos biotecnológicos eficientes que façam uso dos mecanismos biológicos que governam as interações antagônicas em fungos.

As estirpes utilizadas no presente estudo foram isoladas no curso de trabalhos sobre a diversidade microbiana de diferentes ambientes brasileiros, e encontram-se depositadas na Coleção de Culturas de Leveduras do IMPPG/UFRJ. A triagem preliminar das leveduras micocinogênicas foi realizada a partir de 240 Isolados de solo da Floresta Amazônica (Vital *et al.*, 2002), 53 isolados de solo e rizosfera de milho de uma fazenda de cultivo orgânico (Costa *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2003) e 50 isolados do fruto em decomposição da jaqueira (*Artocarpus heterophyllus*) (Carvalho, 2007). Considerando a diversidade dos ambientes estudados, conforme esperado, foram encontradas algumas estirpes de leveduras micinogênicas cuja atividade não havia sido anteriormente relatada na literatura, incluindo estirpes de

*D. capitatus*, *T. asahii* e *C. yuanshanicus* (nova espécie isolada de rizosfera de milho). Outras estirpes selecionadas, (*W. saturnus* var. *subsufficiens* e *P. membranifaciens*) eram conhecidas como espécies produtoras de micocinas.

A incidência de atividade micocinogênica pode variar de acordo com o habitat estudado. A frequência de isolamento de leveduras micocinogênicas tem sido mais elevada em ambientes efêmeros ricos em nutrientes (como flores, néctar das flores, frutos maduros e tecidos em deterioração - que contêm altas populações de poucas espécies de leveduras geralmente fermentativas) do que nos ambientes mais estáveis, e ricos em biodiversidade (como solo e água - que tipicamente apresentam número maior de espécies raras). Segundo Lachance e Starmer (1998), leveduras coletadas de frutos em decomposição são mais propensas a apresentar o fenótipo “killer” do que as leveduras isoladas de quaisquer outras comunidades, como necroses de cactos e exudados de árvores. Czárán e Hoeskstra (2003) sugerem que a co-existência de estirpes “killer”, sensíveis e resistentes pode ser explicada pela distribuição destas leveduras em metapopulações. Neste caso, o fenótipo “killer” poderia ser visto como um fenômeno restrito a habitats temporários, como os frutos em decomposição, capazes de manter pequenas comunidades que eventualmente são extintas, mas que ressurgem via recolonização de outros habitats. Nossos estudos foram compatíveis com esta afirmação, como podemos observar na Tabela 1. Verificou-se que, dentre as leveduras estudadas a frequência de estirpes micocinogênicas foi maior dentre aquelas isoladas de frutos do que dentre as estirpes isoladas de outros substratos estudados.

### 5.1. Identificação das leveduras micocinogênicas

As características fenotípicas morfológicas e bioquímicas continuam a ser o principal critério usado para a identificação de um isolado desconhecido. Muitas leveduras de habitats bem estudados podem ser efetivamente identificadas por um taxonomista de leveduras experiente por meio de métodos fenotípicos. Entretanto, os novos biótipos que são frequentemente encontrados em habitats menos estudados são um desafio. Embora os testes fenotípicos convencionais sejam relativamente simples, esses testes são laboriosos e podem apresentar resultados ambíguos. Esta limitação diz respeito principalmente aos grupos que possuem um perfil assimilativo limitado a poucas fontes de carbono e àqueles com perfil assimilativo muito variado. Comparações moleculares têm sido cada vez mais usadas na identificação de leveduras (Kurtzman & Robnett, 1998). Por esta razão, a caracterização taxonômica das leveduras micocinogênicas utilizadas neste projeto deu-se por meio de critérios fenéticos e genéticos, que foram analisados de forma conjunta em uma abordagem polifásica (Yarrow, 1998; Kurtzman & Fell, 1998; Kurtzman, C.P. & Robnett, 1998). Neste contexto a determinação das diversas características fenéticas mostrou que as estirpes (IMUFRJ/51934; IMUFRJ/51935; IMUFRJ/51936) estavam relacionadas ao gênero *Pichia*. Posteriormente, as análises filogenéticas baseadas na sequência da região D1/D2 do 26S rDNA nos mostrou que estas estirpes eram somente 88% similar à cultura tipo das espécies mais relacionadas filogeneticamente: *Pichia bovis* (van Uden & Carmo – Souza, 1957) e *Pichia canadensis* (Wickerham) Kurtzman, 1984). Para esta região do rDNA, a observação de 6 substituições

(1%) é suficiente para que uma espécie seja considerada nova (Kurtzman & Fell, 2006; Kurtzman & Robnett, 1998).

A região intergênica ITS (Internal Transcribed Spacer) tem sido utilizada como critério adicional para elucidar a identificação de leveduras quando espécies filogeneticamente relacionadas não podem ser separadas unicamente pela análise das sequências da região D1/D2 (Scorzetti *et al.*, 2002; Fell *et al.*, 2000). Dada a grande diferença verificada para esta região nas estirpes estudadas e as demais espécies descritas na literatura, as sequências da região ITS não seriam indispensáveis para a separação das estirpes, porém foram importantes para mostrar que esta região é igual para as três estirpes estudadas desta nova espécie.

Apesar do conjunto de critérios moleculares e bioquímicos colocarem esta nova espécie no gênero *Pichia*, devemos lembrar que as leveduras deste gênero são identificadas por apresentarem, dentre outras características, a formação de ascosporos (Kurtzman *et al.*, 2008). Esta característica não foi observada para estas estirpes, após os testes padrão. Na falta desta característica, as estirpes foram incluídas no gênero *Candida*.

A descrição formal da nova espécie foi proposta em artigo submetido pelo nosso grupo ao “Journal of Evolutionary and Systematic Microbiology”, como *Candida middelhovennii*. Simultaneamente ao nosso trabalho, uma levedura, com as mesmas características, foi isolada no solo de Taiwan (solo de floresta em Yuanshan, Illan, 2006), e descrita recentemente (Liu, *et al.*, 2008) recebendo o nome de *Candida yuanshanicus*. Devido à prioridade de quem submeteu primeiro a proposta para publicação, a nova espécie ficou assim designada. A ocorrência de leveduras em solos tem sido reportada em

uma variedade de ambientes geográficos (Lachance & Starmer 1998; Spencer & Spencer 1997; Phaff & Starmer 1987; Carmo-Souza 1969;) Entretanto o isolamento de uma nova espécie, por dois grupos de pesquisadores distintos, em nichos ecológicos tão distantes, consolida a espécie adicionando mais três estirpes e confirma a distribuição ubíqua de muitas espécies de leveduras.

## 5.2. Atividade micocinogênica

A compreensão da ecologia microbiana e o estabelecimento de uma taxonomia microbiana confiável são meios para revelar novidade tanto em nível de organismos quanto de suas propriedades (Bull & Stach, 2004; Bull *et al.*, 2000). A pesquisa para a utilização de leveduras micocinogênicas visando à aplicação em biotecnologia é relativamente nova (Marquina *et al.*, 2002), porém tem sido intensificada na última década. Em nossos levantamentos, os gêneros *Pichia* e *Williopsis* foram os mais frequentes dentre as estirpes produtoras de atividade micocinogênica. Estes gêneros foram apontados como grupos com micocinas de amplo espectro de atividade contra *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Schimitt & Breining, 2002; Marquina *et al.*, 2002; Ohta, *et al.* 1984).

No estudo de Abranches e colaboradores (1997) com isolados de comunidades de leveduras de ambientes tropicais do Brasil, 13 espécies foram selecionadas e *Pichia kluyveri* var. *kluyveri* foi apontada como a mais frequente. Neste estudo, esta espécie foi a que produziu o maior espectro de atividade micocinogênica contra isolados sensíveis e aparentemente produzindo diferentes toxinas. Entretanto, dados obtidos desta estirpe de *Pichia kluyveri* var. *kluyveri*, foram comparados com o espectro de atividade de *Pichia kluyveri* var. *kluyveri* isolado do fruto amapá (Morais *et al.*, 1992) verificando-se

um maior espectro de atividade da segunda em relação a primeira (Abranches *et al.*, 1997). Esta diferença no espectro de atividade micocinogênica pôde ser observada em nossos estudos, não somente para as estirpes dos gêneros *Pichia* e *Williopsis*, como também para o gênero *Candida*, e se explica porque a atividade micocinogênica é dependente da estirpe.

As estirpes de *P. membranifaciens* foram as que apresentaram um menor espectro de atividade micocinogênica, e na maioria dos casos só foi constatado o antagonismo destas leveduras em testes com algumas estirpes alvo utilizadas neste projeto. Este resultado é consistente com o encontrado em um estudo realizado com a fruta goiaba no qual a espécie *P. membranifaciens* estava entre as mais frequentemente encontradas, mas também apresentavam baixo espectro de atividade micocinogênica (Abranches *et al.*, 2000). Contudo, uma estirpe desta mesma espécie foi selecionada para utilização como agente de biocontrole e o extrato concentrado com sua toxina exerceu efeito fungicida para o fungo *Botrytis cinérea* (Santos & Marquina, 2004). Isso nos mostra que existe uma variabilidade de respostas quando tratamos de interações de antagonismo. Este fato tem sido citado como um dos fatores críticos para o emprego mais amplo de agentes de controle biológico (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Botelho, 1996)

As estirpes do gênero *Pichia* encontradas em nosso estudo foram isoladas de substrato vegetal, mais especificamente do fruto em decomposição da jaqueira (*Artocarpus heterophyllus*) no qual, conforme mencionado no início da discussão, por ser um substrato efêmero e rico em nutrientes, é esperada uma maior frequência de leveduras com atividade micocinogênica. A atividade micocinogênica é considerada como um mecanismo de competição por

interferência comum na sucessão de comunidades de leveduras como aquelas em fermentações naturais (Golubev 2006; Abranches *et al.*, 1998; Lachance, 1995; Starmer *et al.*, 1987). Em um trabalho com leveduras isoladas de azeitonas, 49 estirpes mostraram atividade micocinogênica e apenas duas foram consideradas neutras (Hernández *et al.*, 2008). Esses dados foram consistentes com a alta frequência e diversidade de leveduras “killer” isoladas do fruto *Parahancornia amapa* e também de leveduras associadas com drosófilas da Floresta Atlântica (Morais *et al.*, 1995, 1992).

*W. saturnus var. subsufficiens* é conhecida pelo seu amplo espectro de atividade micocinogênica tendo sido frequentemente isolada do solo e habitats relacionados em regiões geográficas diferentes (Kurtzman & Fell 1998; Yamamoto *et al.*, 1986; Ohta *et al.*, 1984). Em nosso estudo, isso foi evidenciado, uma vez que nossas estirpes de *W. saturnus var. subsufficiens* foram oriundas de solo de uma fazenda agroecológica do Rio de Janeiro e de solo da Floresta Amazônica, Roraima. Além disso, detectamos nestas estirpes um amplo espectro de atuação com algumas diferenças entre si, que confirma o caráter estirpe específico do fenótipo “killer” e que uma estirpe micocinogênica pode produzir mais de um tipo de toxina (Tabela 7).

As estirpes de *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938, IMUFRJ/51939) mantiveram a atividade micocinogênica em todos os testes realizados contra *C. glabrata* (IMUFRJ/50083<sup>T</sup> = UWO CANADA Y-55), tipicamente usada como levedura alvo. A estabilidade para as toxinas produzidas pelo grupo *Williopsis*, já foi tratada (Ohta *et al.*, 1984) e é esperado que a expressão de toxina aconteça em grande faixa de pH. Além disso, as leveduras *Williopsis mrakii* (Schimitt & Breining, 2002; Marquina *et al.*, 2002) e

*Williopsis saturnus* (Marquina *et al.*, 2002) foram apontadas, em diferentes trabalhos, como portadoras de base genética cromossomal para a expressão da atividade micocinogênica, o que garante uma maior estabilidade deste fenótipo. Isto foi observado para as nossas estirpes de *W. saturnus var. subsufficiens*.

Uma condição para a bioprospecção da atividade micocinogênica é a utilização de uma estirpe sensível durante os testes, entretanto, o número limitado de estirpes que vêm sendo utilizado para este fim, podem mascarar o número real de leveduras capazes de inibir ou matar outras leveduras. A levedura *C. glabrata* (IMUFRJ/50083<sup>T</sup> = UWO CANADA Y-55) foi utilizada em diferentes trabalhos como sendo uma levedura sensível (Vital *et al.*, 2002; Abranches *et al.*, 2000, 1997), no entanto, a necessidade da inserção de leveduras sensíveis adicionais deve ser considerada em estudos de bioprospecção de estirpes com características micocinogênicas (Hernández *et al.*, 2008; Abranches *et al.*, 1997). Como podemos observar na Tabela 1, em diferentes estudos de prospecção de leveduras micocinogênicas *C. glabrata* foi usada como estirpe alvo. Nestes estudos, a maior incidência de atividade micocinogênica foi detectada para estirpes da espécie *Pichia kluyveri* e isso se deve, dentre outros fatores, à utilização da mesma estirpe alvo, visto que o efeito da toxina ocorre em resposta à ausência de resistência a este fenótipo. Como resultado do aumento do número de estirpes alvo confrontadas com as leveduras testadas, detectamos a atividade micocinogênica para as espécies *Trichosporon asahii* (IMUFRJ/51923) e *D. capitatus* (IMUFRJ/51914) para as quais a presença desta atividade não tinha sido até então relatada.

Mesmo leveduras com um maior espectro de atividade micocinogênica podem ter sua atividade não detectada pela limitação que o uso de apenas uma estirpe sensível e de uma faixa restrita de pH podem trazer. As estirpes de *C. yuanshanicus*, por exemplo, possuem um largo espectro de atuação (Tabela 7). Entretanto, para a estirpe sensível *C. glabrata* (IMUFRJ/50083), o pH no qual foi possível detectar a atividade micocinogênica (pH 3,6) encontra-se abaixo da faixa de pH (4,2- 4,6) considerada ótima para os testes com espécies do gênero *Saccharomyces* (Starmer *et al.*, 1992), cujo sistema “killer” é o mais estudado (Schmitt & Breining, 2006; Marquina *et al.*, 2002) (Tabela 7). Desta forma, nossos dados indicam que a estratégia de bioprospecção usando geralmente o pH considerado ótimo para o modelo *Saccharomyces*, pode não detectar leveduras micocinogênicas com diferentes atividades.

Levando em conta a grande diversidade de leveduras existentes ocorrendo em ambientes tão distintos quanto solos, corpos d’água, frutos, trato intestinal de animais, escolhemos neste trabalho testar um grupo de leveduras alvo bem diverso taxonomicamente, contrariando a ideia que preconiza a ação de micocinas restrito a seu grupo filogenético, ou a grupos filogenéticos relacionados (Golubev *et al.*, 2001; Golubev, 1998). Abordagem semelhante foi usada por Buzzini e Martini (2000 a) que sugerem que a baixa frequência de estirpes micocinogênicas encontradas se deve ao uso de poucas estirpes alvo, em geral *C. glabrata* e *S. cerevisiae*. Se observarmos o filograma que mostra a relação evolutiva entre as leveduras estudadas e as estirpes alvo (Figura 8) verificamos que as estirpes micocinogênicas podem atuar contra leveduras pertencentes à clados mais próximos e mais distantes. Nosso estudo mostrou que, para a triagem de leveduras micocinogênicas, devemos diversificar nossa

escolha de leveduras alvo, e deste modo ampliar a possibilidade de detecção da diversidade de estirpes micocinogênicas nas comunidades de leveduras.

É possível, ainda, que múltiplas toxinas sejam produzidas por estirpes “killer”, como é relatado para o gênero *Saccharomyces* (Schmitt & Breining, 2006) e que estas sejam ativas contra diferentes estirpes susceptíveis (Walker *et al.*, 1995). Talvez isso possa explicar por que estirpes de uma mesma espécie podem apresentar atividade micocinogênica contra diferentes espécies de leveduras. Para as estirpes de *C. yuanshanicus*, por exemplo, observamos que IMUFRJ/51934 e IMUFRJ/51935 apresentaram antagonismo contra a estirpe tipo *C. glabrata*, enquanto IMUFRJ/51936 não mostrou tal atividade (Tabela 7). Estirpes diferentes de uma mesma espécie podem apresentar padrões de atividade distintos devido à ocorrência de fenótipo “killer” com diferentes bases genéticas que podem ser de origem plasmidial, viral ou cromossomal.

Como podemos ver na Figura 8, conseguimos respostas diferentes nos testes de atividade micocinogênica o que dificulta a interpretação do tipo de interação levedura-levedura existente em cada teste realizado. Na Figura 8 (A) vemos o tipo de resposta que consideramos ideal para a verificação da atividade micocinogênica (Abranches *et al.*, 1998). Analisando o aspecto da interação apresentada na Figura 8 (C), apesar de não vermos o halo de inibição, podemos notar a morte celular, indicada pela coloração em um tom de azul mais escuro do que o do corante azul de metileno.

Por outro lado, estirpes que apresentaram somente o halo de inibição, como demonstrado na Figura 8 (B), não nos permitem afirmar que se trata de uma atuação de micocinas, e sim de uma inibição do crescimento celular, pois

sabemos que a produção destas toxinas não é o único modo de ação de leveduras antagonistas, que inclui competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas degradadoras de parede celular, produção de metabólitos antifúngicos, indução de resistência do hospedeiro e micoparasitismo (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006). Como podemos ver na Tabela 6 algumas leveduras apresentaram atividade micocinogênica contra uma determinada levedura sensível, mas foram capazes apenas de inibir (halo de inibição sem morte celular) outras leveduras contra as quais foram testadas, indicando que a melhor condição para a produção da toxina contra determinadas espécies de leveduras não foi atingida. A produção da micocina está condicionada a diversos fatores extrínsecos, tais como pH, temperatura, concentração celular, além de estar relacionada à capacidade de resistência da estirpe atacada (Marquina, *et al.*, 2002; Woods & Bevan, 1968).

Segundo Starmer *et al.* (1987) as toxinas são produzidas durante o crescimento exponencial do ciclo celular, quando os recursos nutricionais são abundantes, e em geral, o pH é ácido. Em um estudo realizado com uma estirpe industrial de *S. cerevisiae*, a atividade máxima da micocina ocorreu após 24 h de crescimento, o que nas condições do experimento corresponde ao fim da fase de crescimento exponencial e o início da fase estacionária (Soares & Sato, 2000). Sendo assim, podemos assumir que estirpes que apresentaram um resultado como o descrito nas Figuras 8(C) e (D), cujo halo de inibição não foi observado, podem ter o crescimento um pouco mais lento do que o das leveduras alvo, ou seja, houve tempo para o crescimento da levedura alvo, já que a toxina ainda não havia sido produzida, ou pelo menos não havia sido produzida em quantidade suficiente para a detecção da

atividade nas condições do teste. Este tipo de comportamento também foi visto para a estirpe de *W. saturnus var. subsufficiens* IMUFRJ/51938 o que corrobora com nossa suposição de que na interpretação do resultado há que se levar em conta que as leveduras alvo e micocinogênica podem ter velocidades de crescimento diferentes. Quando diminuímos a concentração de inóculo para esta estirpe ou elevamos o pH do meio, antes de confrontá-la com a levedura alvo *C. glabrata*, o halo de inibição foi gradualmente diminuído até observarmos somente o halo de morte celular (Figura 11).

Para a exploração biotecnológica é importante a otimização das condições de cultivo para a expressão da atividade micocinogênica; que este fenótipo seja estável, ou seja, que ele não se perca facilmente no cultivo *in vitro* com os repiques sucessivos; que a levedura apresente um amplo espectro de atividade. Desta forma direcionamos nossos estudos para estirpes com características mais promissoras em termos de futuro uso biotecnológico, por isso, selecionamos a estirpes: IMUFRJ/51938 (*Williopsis saturnus var. subsufficiens*), que demonstrou características de expressão cromossomal para sua atuação micocinogênica e vem sendo utilizada em nosso trabalho como padrão de expressão de micocina, e a estirpe *Candida yuanshanicus* (IMUFRJ/51934), que apresentou um espectro de atividade relativamente amplo e inibiu o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Cabral, 2004). Além disso, pudemos confirmar no decorrer deste projeto, tratar-se de uma nova espécie, que foi isolada paralelamente em Taiwan e descrita por Liu *et al.* (2008).

Para as estirpes acima descritas preparamos um concentrado do crescimento celular, chamado de extrato concentrado, que foi usado em teste de difusão em placas contendo leveduras alvo previamente testadas. Como

resultado, verificamos a atividade micocinogênica em placa de Petri (Figura 12) a partir do extrato concentrado da estirpe *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938). Devido a utilização de membrana de ultrafiltração com um ponto de corte correspondente a MM de 10 kDa, sabemos que o extrato concentrado obtido possuía moléculas bioativas produzidos pela estirpe de peso molecular acima de 10 kDa, indicando que a toxina deve possuir um peso molecular acima desta faixa. Esta avaliação nos mostra que a toxina produzida pela estirpe *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) é diferente da toxina HYI, que tem o peso molecular de 9,5 kDa e foi isolada da mesma espécie (Otha *et al.*, 1984). Recentemente, outra toxina de *Williopsis saturnus*, a KT4561 teve seu peso molecular determinado (62 kDa) e mostrou ser efetiva contra a espécie *C. glabrata* na faixa de pH 4,5-8,0. Estudos posteriores devem ser realizados para a determinação efetiva do peso molecular da toxina da estirpe IMUFRJ/51938, porém as características destas leveduras, juntamente com a evidência da existência de uma base genética cromossomal para toxinas produzidas por leveduras do gênero *Williopsis*, indicam que se trate de toxina semelhante (Buzzini *et al.*, 2007, 2004).

Todas as estirpes utilizadas neste projeto foram confrontadas com os fungos filamentosos fitopatogênicos selecionados para teste, mesmo aquelas para as quais não pudemos verificar a atividade micocinogênica propriamente dita, ou ainda, as que não mostraram um grande espectro de atuação contra outras leveduras. Esta decisão foi fundamentada na característica de alta especificidade deste tipo de atividade, e como já foi dito, outros mecanismos de ação podem ser responsáveis pelo antagonismo (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

Muitos fatores interferem com a produção de micocinas, sendo o pH um dos mais relevantes (Cabral, 2004; Golubev, 1998) o qual, por outro lado, sofre alterações em função da variação da temperatura (Soares & Sato, 2000). Além disso, a estirpe sensível pode tornar-se resistente à toxina caso ocorram mutações nos receptores da parede celular (Starmer *et al.*, 1987). O desempenho da ação da toxina produzida por algumas leveduras e a sensibilidade a essa produção por outros fungos está relacionado à concentração das células no ambiente estudado (Helbig, 2002; McGuire, 1994; Young, 1987). Pimenta e seus colaboradores (2008) demonstraram que *Saccharomycopsis schoenii* precisava de uma concentração de pelo menos  $10^8$  células/mL para produzir um controle eficiente dos fungos filamentosos estudados. Entretanto, para uma estirpe de *C. oleophila* testada contra *Colletotrichum musae* e *Fusarium moniliforme*, a mesma concentração celular resultou em uma proteção média de 50% (Lassois *et al.*, 2008).

Os ensaios realizados *in vitro* para verificar o antagonismo de *Dipodascus capitatus* e *Candida yuanshanicus* contra os fungos fitopatogênicos apresentaram resultados variáveis indicando que o estudo da interação levedura micocinogênica – fungo precisa ser aprofundado no que tange às melhores condições de densidade celular e pH. Uma estratégia eficiente para uso de micocinas no controle biológico é a adição da proteína concentrada em formulações que mantenham a atividade biológica do produto no campo. Considerando a variabilidade das estirpes de leveduras na expressão da toxina “killer”, o emprego de estirpes submetidas ao melhoramento genético pode resultar em considerável aumento na produção da proteína (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006). Estudos mais elaborados são necessários para

elucidarmos os mecanismos envolvidos na interação levedura-fungo, que talvez apresente alguma semelhança com a sinalização molecular tipo “quorum-sensing”, processo encontrado em procariotos (Swift *et al.*, 2001).

### 5.3. Efeito da inoculação de leveduras em milho

Visando estudar a capacidade de utilização das estirpes *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) e *C. yuanshanicus* (IMUFRJ/51934) para o controle de fitopatógenos *in vivo*, foi realizado o experimento em casa de vegetação onde verificamos a habilidade de colonização da rizosfera de milho por estes microrganismos bem como sua capacidade de sobrevivência como inoculantes. Para os inoculantes bacterianos ocorre um decaimento da população quando introduzidos no solo (Botelho *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 1996; Van Elsas *et al.*, 1992). Nossos resultados no experimento de rizosfera de milho foram promissores, porque, com 100 dias após o plantio de sementes inoculadas, a população de leveduras permaneceu praticamente estável para o sistema com inóculo de *C. yuanshanicus* e foi uma ordem de magnitude mais elevada para o inoculado *W. saturnus var. subsufficiens* (Tabela 8) mostrando a competência destas estirpes em colonizar a rizosfera, sobreviver e se multiplicar durante o crescimento da planta. As raízes das plantas excretam nutrientes (amino ácidos, ácidos orgânicos, etc) para o solo adjacente, selecionando uma população microbiana do solo que é aumentada nesse habitat. Esse efeito rizosfera tem sido demonstrado para a seleção de populações microbianas do solo, mas ainda é pouco explorado para inoculantes (El-Tarabily, 2004). A avaliação potencial das leveduras como fungos ecologicamente adaptados a rizosfera, é importante para o seu

emprego como agentes de controle biológico atuando como antagonistas de fungos fitopatogênicos (El-Tarabily *et al.*, 2006; El-Tarabily 2004). Gomes e colaboradores (2003) mostraram, através de métodos independentes de cultivo, que a população de fungos da rizosfera do milho sofreu variação entre o período em que as raízes eram jovens e a fase de senescência quando uma maior diversidade de fungos (Ascomycetos e Basidiomycetos) foi detectada. Esse aumento de diversidade também foi detectado em nossos experimentos quando caracterizamos as leveduras isoladas da rizosfera do milho em amostras com 25 e 100 dias após o plantio.

Durante o processo de isolamento de leveduras muitas das culturas obtidas são clones. Esta redundância representa um gasto de tempo e material para a caracterização dos isolados. O emprego de um método rápido de triagem para a redução das culturas redundantes com a utilização de meios diferenciais resulta na otimização do processo de isolamento e identificação de estirpes (Garcia, 2007). Com o crescimento dos isolados em meios de cultivo diferenciais, foram obtidos grupamentos de estirpes e posteriormente foi realizado o sequenciamento de estirpes selecionadas destes grupos, representativas da comunidade, permitindo avaliar a diversidade de leveduras encontradas neste período do plantio. Os inoculantes foram encontrados com viabilidade em seus respectivos sistemas de inóculo (Tabela 9). Conseguimos isolar outra estirpe de *C. yuanshanicus* (diferente do inoculante) nos sistemas sem inóculo usados como controle, o que pode ser esperado, uma vez que esta nova espécie foi primeiramente isolada em rizosfera de milho (Cabral, 2004). É importante ressaltar que a detecção de leveduras no solo antes do plantio foi difícil. No entanto foi possível isolar estirpes das espécies

*Cryptococcus laurentii*, *Torulaspota globosa* e *Candida maltosa*, associadas às raízes ainda jovens das plantas. Estas espécies são comumente encontradas em solos de floresta e de cultivo (Molnár *et al.*, 2008; Beh, 2007; Sláviková & Vadkertiová, 2003; Limtong *et al.*, Vital *et al.*, 2002) e provavelmente já estavam presentes em baixas densidades não detectáveis por métodos de plaqueamento. Espécies cujas populações perfazem cerca de 1% ou menos do total da comunidade são de difícil recuperação por métodos de plaqueamento, neste caso o efeito rizosfera foi o responsável pelo aumento destas populações permitindo sua detecção por métodos de espalhamento em placa.

No isolamento de estirpes da rizosfera 100 dias após o plantio, a análise dos isolados utilizando os meios diferenciais, permitiu identificar estirpes que apresentaram o mesmo padrão de características fenéticas das estirpes inoculadas como pode ser visto na Tabela 12. Também separamos outros grupos de leveduras que apresentaram padrões não encontrados no primeiro isolamento. Os meios diferenciais utilizados neste trabalho foram considerados por Garcia (2007) os mais eficientes para diferenciação de leveduras dentre um conjunto de 10 meios testados. Nós confirmamos a eficácia da metodologia tendo conseguido caracterizar as leveduras do isolamento com 25 dias de plantio e confirmar posteriormente a identificação com o sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA (Tabelas 9 e 10). Isto nos permitiu, no isolamento de leveduras 100 dias após o plantio, utilizar apenas o crescimento dos isolados em meios diferenciais para verificar a permanência dos inoculantes na rizosfera do milho.

A maior diversidade foi encontrada dentre os isolados obtidos com 100 dias de plantio (Tabela 11). Este resultado concorda com os resultados

mostrados por Gomes e colaboradores (2003) que utilizou técnicas independentes de cultivo para analisar a microbiota associada a rizosfera de milho. Em estudo sobre leveduras associadas a videiras, as diferenças detectadas nas populações de leveduras associadas aos frutos maduros foram duas ordens de magnitude maiores do que a obtida em frutos imaturos, entretanto algumas leveduras foram dominantes no período mais próximo da senescência, constituindo 70% do total de estirpes encontradas (Beh, 2007). Em nosso trabalho as leveduras usadas como inoculantes apresentaram esta tendência, mostrando colonização na rizosfera do milho e foram as espécies dominantes isoladas neste habitat (Tabela 12).

A fim de verificarmos a capacidade de colonização do tecido interno das raízes, ao final do experimento de milho, procedemos ao isolamento de leveduras endofíticas, a partir da desinfecção e maceração das raízes de milho, utilizando uma metodologia que foi testada por Garcia (2007) e que se revelou eficiente para demonstrar este tipo de associação. As interações endófito-planta ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção pela planta de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como, a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Souza *et al.*, 2004; Rodrigues & Dias Filho, 1996) por meio, por exemplo, da produção de micotoxinas (D'Mello & Macdonald, 1997; Clay, 1988).

Verificamos que as estirpes de *W. saturnus var. subsufficiens* e *C. yuanshanicus*, inoculadas no momento do plantio, estavam presentes na

raiz do cultivar de milho, sendo a segunda isolada em todos os tratamentos (Tabela 13). Isso demonstra a afinidade dessa levedura com a rizosfera e raízes de milho. As estirpes de *C. yuanshanicus* usadas neste projeto foram originalmente isoladas de rizosfera e, portanto são ecologicamente adaptadas a este habitat. O crescimento destas leveduras na raiz e na rizosfera não prejudicou o desenvolvimento das plantas, demonstrando o potencial destas espécies de leveduras para utilização como agentes de biocontrole, como produtoras de micocinas e também, como vetores de outras características genéticas de importância agrônômica (Souza *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 1992; Pagé *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 1995b; Petering *et al.*, 1991; Seki *et al.*, 1985).

Além disso, a competência para a colonização da rizosfera de milho demonstrada por estas estirpes pode ser explorada para uso como inoculante de outros cultivares onde ocorram patógenos mais suscetíveis à competição por nutrientes e espaço (Zhao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Sugar & Basile, 2007). Os mecanismos de antagonismo presentes também podem ser potencializados através da utilização de combinação de inoculantes como vem sendo proposto (Janisiewicz *et al.*, 2008; Botelho, 2006).

As preocupações com o meio ambiente têm evidenciado a necessidade do uso sustentável dos recursos ambientais. A agricultura convencional vem causando impactos consideráveis ao solo e as águas, por isso, a mudança de certos manejos agrícolas por técnicas mais limpas para o meio ambiente tem se tornado cada vez mais importante. Sendo assim, o uso comercial de microrganismos para o biocontrole dos fitopatógenos deve ser considerado, mesmo quando a doença ou problema é específico de uma área

geográfica relativamente pequena, afeta uma única cultura ou sistema de cultivo, ou é restrita a alguns utilizadores (Cook, 1993).

## 6. Conclusões

Dentro deste contexto, conseguimos contribuir para a ampliação do conhecimento necessário para o uso destas toxinas em processos biotecnológicos. Mostramos que os ambientes naturais são reservatórios de leveduras produtoras de micocinas e que as estirpes utilizadas possuem diferentes espectros de atividade, o que indica a produção de diferentes toxinas. Verificamos que a utilização de uma maior diversidade de leveduras alvo no teste de atividade micocinogênica pode propiciar uma melhor eficiência na bioprospecção de leveduras “killer”. Selecionamos leveduras que não foram descritas anteriormente como produtoras de micocinas. Observamos que o pH é uma variável crítica para a produção de atividade micocinogênica. Nas estirpes de *W. saturnus var. subsufficiens*, a concentração celular do inóculo, não é um parâmetro tão crítico quanto o pH. Verificamos que a toxina produzida por *W. saturnus var. subsufficiens* (IMUFRJ/51938) é diferente da toxina HYI, anteriormente reportada (Ohta *et al.*, 1984), porque possui um peso molecular superior a 10 kDa. Detectamos um extenso espectro de atividade em algumas de nossas estirpes, no entanto, nem sempre ocorreu a supressão de um fitopatógeno, cuja interação com a levedura é afetada por outros fatores. As estirpes *W. saturnus var. subsufficiens* e *C. yuanshanicus* podem ser consideradas competentes para a colonização da rizosfera de milho, sendo a segunda intimamente relacionada com essa planta. A estirpe de *W. saturnus var. subsufficiens* permaneceu micocinogênica após ser re-isolada no experimento de cultivo de milho, no qual tinha sido utilizada como inoculante, preservando a atividade micocinogênica com 100 dias de permanência *in situ*.

Concluimos, portanto, que:

Os ambientes naturais são reservatórios de leveduras produtoras de micocinas. As estirpes selecionadas mostraram diferentes espectros de atividade micocinogênica, indicando a produção de toxinas distintas;

Verificamos que a utilização de uma maior diversidade de leveduras alvo no teste de atividade micocinogênica propicia uma melhor eficiência na bioprospecção, ampliando a possibilidade de detecção de espécies não conhecidas como produtoras de micocinas. O pH e a densidade celular são variáveis importantes na expressão do fenótipo “killer”;

As leveduras podem ser usadas como inoculantes de plantas porque apresentaram estreita relação com as raízes mantendo a atividade micocinogênica durante o crescimento do cultivar de milho sem mostrar traço visível de doenças, permanecendo a cultura sadia;

As leveduras micocinogênicas têm potencial para utilização em agricultura, em substituição a insumos agrícolas de origem química, como agentes de controle biológico ou como vetores para expressão de genes de importância agrônômica, visando um manejo sustentável.

## 7. Referências Bibliográficas

Atlas, R.M, Bartha,R. Microbial ecology: Fundamentals and applications. 1997.

Abranches, J.; Morais P.B.; Rosa, C.A.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can. J. Microbiol*, 43: 328-336, 1997.

Abranches, J.; Valente, P.; Nóbrega, H. N.; Fernandez, F.A.S.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. Yeast diversity and killer activity dispersed in fecal pellets from marsupials and rodents in a Brazilian tropical habitat mosaic. *FEMS Microbiology Ecology*, 26: 27- 33, 1998.

Abranches, J.; Vital, M.J.S.; Starmer, W.T.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycologia*, 92 (1): 16-22, 2000.

Araujo, M. A. V.; Mendonca-Hagler, L. C.; Hagler, A. N.; Elsas, J. D. V.. Selection of rhizosphere competent *Pseudomonas* strains as biocontrol agents in tropical soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12 (6): 589-593, 1996.

Barnett, J.A.; Payne, R.W., Yarrow, D. Yeast: *Characteristics and identification*. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge. 1024p., 1990.

Beh, L.A. investigation of yeasts and yeast-like fungi associated with Australian wine grapes using cultural and molecular methods. A thesis submitted as a fulfillment for the degree of Doctor of Philosophy. University of new South Wales, Sydney, Australia, 2007.

Botelho G. R. Impacto ambiental de *Pseudomonas fluorescens* em rizosfera de milho e uso em biocontrole. Dissertação apresenta ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.

Botelho G. R; Guimarães V., De Bonis, M; Fonseca, M.E.F.; Hagler, A.N.; Hagler, L.C.M. Ecology of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens* in tropical soil. *World of Microbiology & Biotechnology*, 14: 499-504, 1998.

- Botelho, G. R.; Mendonça-Hagçer, L. C.. Fluorescent Pseudomonads Associated with the Rhizosphere of crops - an Overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 401-416, 2006.
- Botha, A. Antagonistic Interactions Among Yeast. Rosa, C. A; Peter, G. (Eds) In *The Yeast Handbook. Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer -. Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- Buck, J. D.; Bubucis, P. M.; Combs, T. J. Occurrence of human associated yeast in bivalve shellfish from Long Island Sound. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 370-378, 1977.
- Bull, A.T.; Stach, J. E. M. An overview of biodiversity – estimating the scale. In: *Microbial Diversity and Bioprospecting*. A. T. Bull (Ed). ASM Press, Washington, D. C., 2004.
- Bull, A. T.; Ward, A. C.; Goodfellow, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Molecular Biology. Reviews.*, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.
- Butler, A. R.; White, J. H.; Stark, M.J.R. Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *Journal of General Microbiology*, 137: 1749 – 1757, 1991. a
- Butler, A. R.; Odonnell R. W; Martin V. J; Gooday, G. W.; Stark, M.J.R. *Kuyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Europen Journal Biochemistry*, 199: 483 – 488, 1991. b
- Buzzini, P. ; Corazzi, L. ; Turchetti, B.; Buratta, M.; Martini, A. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238 (2): 359-365, 2004.
- Buzinni, P. & Martini, A. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 607-611, 2000. a
- Buzinni, P. & Martini, A. Differential growth inhibition as a tool to increase the discriminating power of killer toxin sensitivity in fingerprinting of yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 193: 31 – 36, 2000. b

- Buzinni, 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*, 7: 749-760, 2007.
- Cabral, A. S. Bioprospecção e caracterização de leveduras “killer” e seu potencial para utilização em biotecnologia vegetal. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- Carvalho, P. M. B. Utilização de meios de enriquecimento para bioprospecção de leveduras. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). Disponível em: <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx> . Consultado em 2008.
- Chand-Goyal, T. & Spotts, R. A. biological control of Postharvest Diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biological Control*, 10: 199-206. 1997.
- Clay, K. Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology*, 69: 10-16, 1988.
- Coleman D.C. Crossley, D.A. Secondary production: activities of heterotrophic organisms – microbes. In Coleman D.C., Crossley D.A. (eds) *Fundamentals of soil ecology*, Academic, London, pp 33-195, 1996.
- Costa, R.; Gomes, N.C.M.; Peixoto, R.S. Rumjanek N.; Berg, G.; Mendonça-Hagler, L.C.S.; Smalla, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2434–2447, 2006.
- Czárán, T. L.; Hoekstra, R. F. Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proc. R. Soc. Lond*, 270: 1373-1378, 2003.
- Dalla Pria, M. & Camargo, L.E.A. Doenças do Cacaueiro - *Manual de Fitopatologia*, v12, pg 178, 1997.

- De Koch, S.I., Control of post-harvest decay of fruit by means of antagonistic microorganisms. PhD. Dissertation. University of Stellenbosch, Stellenbosch, 1998.
- D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C.. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166, 1997
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz H., Keren-Tzur, M., Shachnai, A. Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control*, 12: 97-101, 1998.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, b., Cohen, L. Weiss, B., Daus, A., Timar, D., Chalutz, E. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biol. Control*, 3: 47-52, 1993.
- Eisfeld, K.; Riffer, F.; Mentges, J.; Schmitt, M.J. Endocytotic uptake and retrograd transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Molecular Microbiology*, 37 (4): 926 – 940, 2000.
- El-Tarabily, K.A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 69-75, 2004.
- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. Potencial of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47: 25 – 35, 2006.
- Fell, J. W.; Boekhout, T.; Fonseca, A.; Scorzetti, G.; Statzell-tallman, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeast as determined by large subunit rDNA D1/D2/ domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1351-1371, 2000.
- Fell J.W.; Statzell-Tallman, A. *Cryptococcus vuillemin*. In: Kurtzman C.P., Fell J.W. (eds). The yeasts, a taxonomic study, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, 742-767, 1998.

- Fleet, G.H. Microbiology of alcoholic beverages. In: *Microbiology of fermented food*, Vol 1. Wood, B.J. (ed). London: Blackie Academic & Professional. 217-262, 1998
- Fracchia, S.; Godeas, A.; Scervino, J.M.; Sampedro, I.; Ocampo, J.A.; Garcia-Romera, I. interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*, *Soil Biol Biochemistry*, 35:701-707, 2003.
- Garcia 2007. Meios diferenciados para bioprospecção de leveduras endofíticas da bromélia *Neoregelia cruenta*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- Golubev, V.I. & Nakase, T. Mycocinogeny in the Genus *Bullera*: killer activity of *Bullera unica* and intrageneric killer-sensitive relationships. *Microbiology*, 67 (2): 184 – 188, 1991.
- Golubev, W.I. Antagonistic Interactions Among Yeast. Rosa, C. A; Peter, G. (Eds) In *The Yeast Handbook. Biodiversity And Ecophysiology of yeasts*. Springer -. Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- Golubev, W.I. Mycocins (Killer Toxins). In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (eds.) *The Yeasts, A taxonomic Study*. 4<sup>rd</sup> ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam: 55-62, 1998.
- Golubev, W.I.; Kulakovskaya, T.V.; Golubeva, E.W. The yeast *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821 producing an antifungal glycolipid. *Microbiology*, 70 (5): 533 – 556, 2001.
- Gomes, N.C.M.; Fagbola, O.; Costa, R.; Rumjanek, N.G.; Buchner, A.; Mendonça-Hagler, L.; Smalla, K. Dynamics of Fungal communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7): 3758-3766, 2003.
- Hagler, A. N. & Mendonça-Hagler L. C. A Diazonium Blue B test for Yeasts Grown three days on Yeast Carbon Base-Urea Ágar. *Re. Microbiol.*, 22 (1):71-74, 1991.

Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L. C.; Silva Filho, J. B., Santos, E. A.; Farage, S.; Shrank, A.; Oliveira, R. B. Evaluation of microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *Science of the Total Environment*, 58: 151-160, 1986.

Helbig, J. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinérea* in strawberry. *Biological Control*. 47, 85-99, 2002.

Hernández, A.; Martín, A.; Córdoba, M. G.; Benito, M. J.; Aranda, E. & Pérez-Nevado, F. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int J Food Microbiol, Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n. 06071 Badajoz, Spain.*, 121: 178-188, 2008.

Hong, S. G.; Chun, J.; Oh, H. W.; Bae, K. S. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(5), pp.1927-31.2001.

Hunter-Cevera, J. C. & Belt, A. Isolation of Cultures. In: Demain & Davies eds. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM press, Washington, D. C., pp 3-20, 1999.

Izgü, F.; Altinbay, D.; Acum, T. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; Purification, characterization and its  $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 669-676, 2006.

Izgü, F.; Altinbay, D.; Yücelis. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiology*, 14: 125 – 131, 1997.

Jablonowsky, D. & Schaffrath, R. *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase II is affected by *Kluyveromyces lactis* zimocin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (29): 26276 – 26280, 2002.

Janisiewicz, W.J.; Saftner, R.A.; Conway, W.S.; Yoder, K.S. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 374-387, 2008.

Janisiewicz, W.J.; Jeffers, S.N. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and Gray mold of apples in cold storage. *Crop. Prot.* 16: 629-633, 1997.

Janisiewicz, W.J.; Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathology*, 40: 411-414, 2002

Janisiewicz, W.J.; Marchi, A. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.* 76: 555-560, 1992.

Karabulut, O. A.; Cohen, L.; Wiess, B.; Daus, A.; Lurie, S.; | Droby, S. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. *Postharvest Biol. Technol.*, 24, (2), pp. 103-111. 2002.

Kawamoto, S.; Arai, N.; Kobayashi, M.; Kawahara, K.; Iwahashi, H.; Tanabe, C.; Hatori, H.; Ohno, T.; Nakamura, T. Isolation and characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to killer toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70 (4): 222 – 227, 1990.

Kvasnikov E. I.; Nagornaia, S. S.; Shchelokova, I. F. Yeast Flora of Plant Rhizosphere and Phyllosphere. *Mikrobiologiya*, 44 (2), pp.339-46. 1975.

Kennedy, A.C. and Gewin, V.L., Soil microbial diversity: present and future considerations. *Soil Science*, 162: 607-617, 1997.

Kimura, M. A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120, 1980

Kimura, T.; Kitamoto, N.; Ohta, Y.; Kito, Y.; Himura, Y. Structural relationships among killer toxins secreted from the killer strains of the Genus *Williopsis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (1): 85 – 87, 1995.a

Kimura, T.; Kitamoto, N.; Himura, Y.; Kito, Y. Production of HM-1 killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae* transformed with the PDR4 gene and  $\delta$  - sequence –mediated multi-integration system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (5): 423 – 428, 1995.b

- Kimura Y, Nakano Y, Fujita K, Miyabe S, Imasaka S, Ishikawa Y, Sato M. Isolation and characteristics of yeasts able to grow at low concentrations of nutrients. *Yeast*, 14(3), pp. 233-8. 1998.
- Kinay, P and Yildiz, M. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control*, 45: 433 - 440, 2008.
- Kirsop, B. E. Resource Centers. In: Kirsop & Kurtzman eds. *Yeasts: Living Resources for Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 294-302, 1988.
- Kurozawa, C & Pavan, M. A. Doenças das Solanáceas - Manual de Fitopatologia vl2, pg 668, 1997.
- Kurtzman, C.P. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50: 209-217, 1984.
- Kurtzman, C.P., Blanz, P.A. Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 69– 74. 1998.
- Kurtzman, C.P., Droby, S. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *System. Appl. Microbiol*, 24: 395-399, 2001.
- Kurtzman, C.P., Fell; J.W. Yeasts systematic and phylogeny – Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Rosa, C. and Péter, G. Berlin: springer Verlag, 11-30, 2006.
- Kurtzman, C.P., Fell; J.W. *The Yeasts, a taxonomic study* 4<sup>rd</sup> ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1998.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331 – 371, 1998.

- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. & Basehoar-Powers E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. *FEMS Yeast Research*, 8: 939-954, 2008.
- Lachance, M. A. Yeasts communities in natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68: 151-160, 1995.
- Lachance, M. A. & Starmer, W. T. Ecology and Yeasts. In: Kurtzman & Fell eds. *The Yeast, a Taxonomic Study*. 4<sup>th</sup> ed. Kurtzman & Fell (eds.). Elsevier, Amsterdam, 1998.
- Lassois, L., Lapeyre, Bellaire, L.L., Jijakli, M.H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. *Biological Control*. 45: 410-418, 2008.
- Liberman, D. F.; Fink, R. & Schaefer, F. Biosafety and Biotechnology. In: Demain & Davies eds. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM press, Washington, D. C., pp 300-308, 1999.
- Limtong, S.; Imanishi Y.; Jindamorakot S.; Ninomiya S.; Yongmanitchai W.; Nakase T. *Torulasporea maleeae* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from Japan and Thailand. *FEMS Yeast Research*, 8(2): 337-343, 2007.
- Liu, C.H.; Young, S.S.; Chang, T.C.; Lee, C.F. *Candida dajjaensis* sp nov., *Candida yuanshanicus* sp nov., *Candida jianshigensis* sp nov., and *Candida sanyiensis* sp nov., four anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from soil in Taiwan. *FEMS Yeast research*. 8. 815 – 822, 2008.
- Lopes, A.M.Q. Doenças de Anonáceas e do Urucuzeiro - Manual de Fitopatologia vl2, pg 83, 1997
- Lopes, M.B.; Soden, A.; Martens, A.L.; Henschke, P.A.; Langridge, P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 279 – 286, 1998.
- Macrae, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology* 31 (2): 77-82, 2000.

- Magliani, W.; Conti, S.; Gerloni, M.; Bertolotti, D.; Polonelli, L. Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (3): 369 – 400, 1997.
- McGuire, R.G. application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biological control of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biological Control*, 4: 1-7, 1994.
- Marquina, D.; Santos, A.; Peinado, J.M. Biology of Killer yeasts, *International Microbiology*, 5: 65-71, 2002.
- Martins-Corder, M.P. & Melo, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma spp.* A *Verticillium dahliae* KLEB. *Sci. Agric.*,55 (1): 1 – 7, 1998.
- Molnár, O.; Wuczkowski, M.; Prillinger, H. Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: classical isolation, cloning and DGGE. *Micology Progress*, 7: 111-123, 2008.
- Morais, P.B.; Hagler, A.N.; Rosa, C.A.; Mendonça-Hagler, L.C.; Klaczko, L.B. Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. *Can. Journal Microbiol*, 38: 1150-1155, 1992.
- Morais, P.B.; Martins, M.B.; Klaczko, L.B.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12): 4251 – 4257, 1995.
- Morais, P. B.; Rosa, C. A.; Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L. C. Yeast communities of the cactus *Pilosocereus arrabidae* as resources for larval and adult stages of *Drosophila serido*. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, v. 65, p. 313-317, 1994.
- Murray, F. R.; Latch, G. C. M.; Scott, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Molecular General Genetics*, 233: 1-9, 1992.
- Nakajima, T.; Mitsueda, T.; Charchar, M. J. A. First Occurrence of Sudden Death Syndrome of Soybean in Brazil. *JARQ*, 30 (1).1996.
- Ohta Y.; Tsukada, Y.; Sugimori T. Production, Purification and Characterization of HYI, an Antiyeast Substance, Produced by *Hansenula saturnus* Agric. Biol Chern, 48 (4): 903-908, 1984.

Pagé, N.; Gérard-Vincent, M.; Menard, P.; Beaulieu, M.; Azuma, M.; Dijkgraaf, G.J.P.; Li, H.; Marcoux, J.; Nguyen, T.; Dowse, T.; Sdicu, A.; Bussey, H. A *Saccharomyces cerevisiae* Genome-Wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*, 163: 875-894, 2003.

Panchal, C.J.; Meacher, C.; Van Oostrom, J.; Stewart, G.G. Phenotypic expression of *Kluyveromyces lactis* killer toxin against *Saccharomyces spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (2): 257 – 260, 1985.

Petering, J.E.; Symons, M.R.; Langridge, P.; Henschke, P.A. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 3232-3236, 1991.

Pfeiffer, P.; Radler, F.; Caspritz, G.; Hänel, H. Effect of a killer toxin of yeast on Eucaryotic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (4): 1068 – 1069, 1988.

Phaff, H. J. & Starmer, W. T. Yeast Associated with Plants, Insects and Soil. In: Rose and Harrison eds. *The Yeasts*. vol 1. Academic Press, London, pp. 123-180, 1987.

Pimenta, R.S.; Silva, F.L.; Silva, J.F.M.; Morais, P.B.; Braga, D.T.; Rosa, C.A.; Corrêa Jr, A. Biological control of *Penicilliu italicum*, *P. digitatum* and *P.expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Braziliam Journal of Microbiology*, 39:85 - 90, 2008.

Pinotti, T. Utilização de Meio de enriquecimento com 6% de etanol para o isolamento de leveduras ascomicéticas de jaca (*Artocarpus heterophyllus*) em decomposição. Monografia (Bacharelado em Microbiologia e Imunologia)- Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

Reis, E.M., Casa, R.T. & Forcelini, C.A. Doenças do Trigo – Manual de Fitopatologia vl2, pg 731 a 733, 1997.

Rist, K.L.; Rosenberger, D.A. Astorage decay of Apple fruit caused by a *Aureobasidium pullulans*. *Plant Disease*, 79: 425-431, 1995.

Rodrigues, K.F; Dias-Filho, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. *Pesquisa. Agropecuária. Brasileira*, 31(12): 905-909, 1996.

Rosa, C. A; Peter, G. (Eds) In *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer -. Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

Santos, A.; Álvares, M.M.; Mauro M.S.; Abrusci, C.; Marquina, D. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (51); 41881-41892, 2005.

Santos, A. & Marquina, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, 150: 2527-2534, 2004.

Schaffrath, R. & Breunig, K.D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 173 – 190, 2000.

Schimitt, M.J. & Breinig, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26; 257 – 276, 2002.

Schimitt, M.; Brendel, M.; Schwarz, R.; Radler, F. Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. *Journal of General Microbiology*, 135: 1529 – 1535, 1989.

Schimitt, M.J.; Klavehn, P.; Wang, J.; Schönig, I.; Tipper, D.J. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*, 142: 2655 – 2662, 1996.

Schimitt, M. & Radler, F. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *Journal of General Microbiology*, 133: 3347 – 3354, 1987.

Scorzetti, G.; Fell, J. W.; Fonseca, A.; Statzell-Tallmam, A. Systematics of basydeomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2: 495 – 517, 2002.

Seki, T.; Choi, E.W.; Ryu, D. Construction of killer wine yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1211 – 1215, 1985.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/>. Consultado em janeiro de 2009.

Sláviková, E.; Vadkertiová, R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal Basic Microbiol*, 43 (5):430-436, 2003.

Selitreffnikoff, C.P. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7): 2883 – 2894, 2001.

Soares, G. A. M. & Sato, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31; 291 – 297, 2000.

Souza, C.S.L. Distribution of yeasts in nature. In: *The Yeasts. Biology of the yeasts*, A.H Rose & J.S. Harrison (Eds) Academic Press, London. 79-106, 1969.

Souza, R.F.; Gomes, R.C.; Coleho, R.R.R.; Alviano, C.S.; Soares, R.M.A.. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 45 - 50, 2003

Souza, A.Q.L.; Souza, A.D.L., Astolfi Filho, S.; Pinheiro, M. L. B. Sarquis, M.I.M., Pereira, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *ACTA Amazônica*, 34(2): 185-195, 2004.

Starmer, W. T.; Ganter, P. F.; Aberdeen, V. Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (3): 990 – 997, 1992.

Spencer, J. F. T.; Spencer D.M. Ecology: where yeasts live. Spencer, J. F. T.; Spencer D.M (eds). *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer-Verlag, Berlin, pp 33-58, 1997.

Starmer, W. T.; Ganter, P. F.; Aberdeen, V.; Lachance, M.A.; Phaff, H.J. The ecological role of killer yeasts in nature communities of yeasts. *Canadian Journal Microbiology*, 33: 783 – 796, 1987.

Stratford, M.; Bond, C. J., James, S. A., Roberts, I. N. & Steels, H. *Candida davenportii* sp. nov., a potential soft-drinks spoilage yeast isolated from a wasp. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, pp. 1369–1375. 2002.

- Stumm, C.; Hermans, J. M. H.; Middelbeek, E. J.; Croes, A. F.; De Vries, G. J. M. L. Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie van Leeuwenhoek*, 43: 125 – 128, 1977.
- Sugar, D.; Basile, S.R. Timing and sequence of postharvest fungicide and biocontrol agent applications for control of pear decay. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 107-112, 2008.
- Swift, S.; Downie, J. .; Whitehead, N.A.; Barnard, A.M. L.; Salmond, G.P.C.; Williams, P. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances in Microbial Physiology*, 45: 199-270, 2001.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599, (2007).
- Tipper, D.J. and Bostian, K. A. 1984. Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol. Rev.* 48. p. 125-156.
- Trindade, D.R.& Poltronieri, L.S. Doenças da Pimenta-do-Reino – Manual de Fitopatologia vl2, pg579, 1997.
- Valente, P.; Gouveia, F. C.; Lemos, G. A.; Pimentel, D.; Mendonça-Hagler, L. C.; Hagler, A. N. PCR-amplified ITS length variation within the yeast genus *Metschnikowia*. *Journal General Applied Microbiology*, 43: 179 – 181, 1997.
- Valente, P.; Gouveia, F. C.; Lemos, G. A.; Pimentel, D.; Van Elsas, J. D.; Mendonça-Hagler, L. C.; Hagler, A. N. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 137; 253 – 256, 1996.
- Van Elsas, J.D. Environmental pressure imposed on GEMMOs in soil. In: *The releases of Genetically Modified Microorganisms*.eds Stewart-Tul, D.E.S. & Sussman, M. New York: Plenum Press. pp 1-14, 1992
- van Uden, N. & Carmo-Sousa, L. do. Yeast from the bovine caecum. *Journal Gen. Microbiology*, 16: 385-395, 1957.
- Veras, S.M., Lima, M.I.P. & Gasparotto, L. Doenças de Fruteiras da Amazônia – Manual de Fitopatologia vl2, pg406, 1997.

- Vilgalys, R. And Hester, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from Several *Cryptococcus species*. *Journal of Bacteriology*, 172 (8): p. 4238-4246. 1990.
- Vital, M. J. S.; Abranches, J.; Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L. C. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33; 230 – 235, 2002.
- Walker, G. M.; McLeod, A. H.; Hodgson, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127: 213 – 222, 1995.
- Wang, Y.; Bao, Y.; Shen, D.; Feng, Wu; Yu, T.; Zhang, J.; Zheng, X.D. Biocontrol of *Alternaria alternate* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 234-239, 2008
- Weiler, F. & Schmitt, M. J. Zygotin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zigosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Research*, 3: 69 –76, 2003.
- Weiler, F.; Rehfeldt, K.; Bautz, F.; Schmitt, M. J. The *Zigosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygotin: cloning and expression in a heterologous fungal host. *Molecular Microbiology*, 46 (4): 1095 –1105, 2002.
- Weiler, F. & Schmitt, M. J. Zygotin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zigosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Research*, 3: 69 –76, 2003.
- Wickner, R. B. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 60 (1): 250 – 265, 1996.
- Wickerham, L.J.. *Taxonomy of Yeasts*. Techn. Bull. 1029, Washington, D.C.: U.S.D.A. 1951
- Wollum II, A.G. Cultural methods for soil microorganisms. In: *Methods of Soil Analysis*, Eds Miller, R.H. & Keneey, D.R.. Madison: American Society of Agronomy, Vol. 2: 781-801, 1982.

Yamamoto, T.; Imai, M; Tachibana, K.; and Mayumi, M. Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS Letters*, 195: 253-257, 1986.

Yarrow, D. Methods for the isolation and Identification of Yeasts. *In*: Kurtzman and Fell. Eds. *The yeast, a Taxonomic Study*. 4<sup>th</sup> ed. E. 1998

Young, T.W. Killer yeasts. *In*: A. H. Rose and J.S.Harrison (Eds) *The Yeasts: Biology of yeasts*. Vol. 1, Academic Press, London, 1987.

Young, T. W. & Yagiu, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 44: 59 – 77, 1978.

Zhao, Y.; Tu, K.; Shao, X.; Jing, W.; Su, Z. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 113-120, 2008.

ANEXOS

## Anexo 1:

### Formulação dos meios de cultivo

#### Ágar Bil (Base de Isolamento de Leveduras)

- Glicose 0,5%
- Extrato de levedura 0,5%
- Sulfato de amônia ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,1%
- Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1%

Modificações na formulação do meio de cultivo BIL composição dos meios diferenciais:

BILVBCML pH 5,5	Verde de bromocresol (0,02%); Ácido Málico 0,5% Ajustar o pH com Hidróxido de sódio
BILVBCML pH 4,0	Verce de bromocresol (0,02%); Ácido Málico 0,5% Ajustar o pH com Hidróxido de sódio
BIL EMB	Adição de eosina (0,04%) e azul de metileno (0,0065%)
BIL EMB 0,05 EL	Redução do Extrato de levedura para 0,05% e adição de eosina (0,04%) e azul de metileno (0,0065%)

#### Ágar GYP

- Glicose 2%
- Extrato de levedura 0,5%
- Peptona 1%
- Ágar 2%

#### MBF (Meio Base para Fermentação)

- Peptona 0,7%
- Extrato de levedura 0,45%
- açúcar a ser testado 2,0%

#### Ágar GYMP

- Glicose 2%
- Extrato de levedura 2%
- Extrato de malte 0,5%
- Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,5%
- Ágar 2%

### **Ágar Malte**

- Extrato de Malte 5,0%
- Ágar 2%

### **Corn Meal Agar ( Ágar fubá de milho)**

Aqueça 42 g de milho (triturado) em um litro de água destilada a 60° C por uma hora. Filtre o material restante com filtro de papel comum e complete o volume para um litro com água destilada.

- Ágar 2%

### **Ágar Acetato**

- Glicose 0,1%
- Extrato de levedura 0,25%
- Cloreto de potássio 0,18%
- Acetato de sódio trihidratado 0,82%
- Ágar 2%

### **Ágar V8**

- Uma lata de V8
- Mesmo volume de água destilada

O pH foi ajustado para 5,5 com Hidróxido de Sódio (NaOH), filtrado com filtro simples (papel) e diluído para as concentrações 1:2;1:9;1:19.

- Ágar 2%

### **YEPD**

- Glicose 2,0%
- Extrato de levedura 1%
- Peptona 2%
- Tampão Citrato 0,05M em pH 4,2

## Ágar YM

- Glicose 1%
- Extrato de levedura 0,3%
- Extrato de malte 0,3%
- Peptona 0,5%
- Ágar 2%

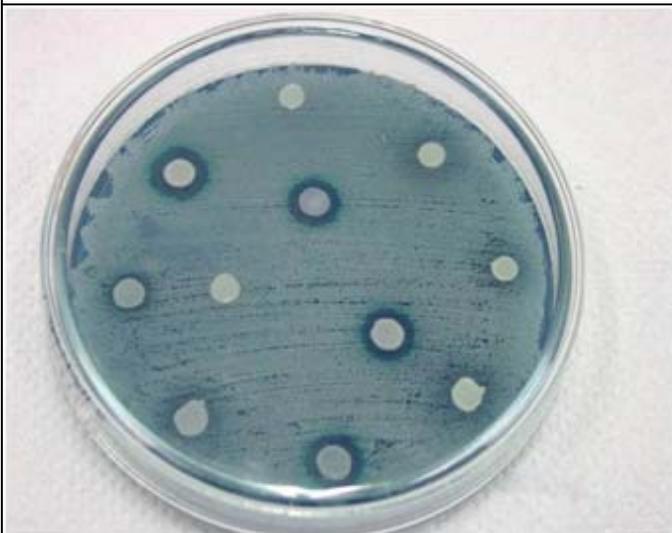
Para testar a atividade micocinogênica o Ágar YM é acrescido de azul de metileno (0,003%) diluído com o tampão Citrato (0,05M).



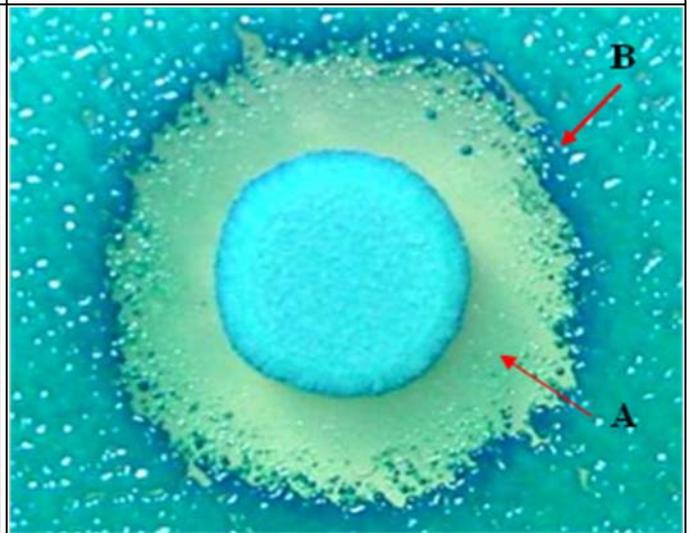
**Figura 13:** Inoculação da estirpe padrão com “swab” em meio YM corado com azul de metileno.



**Figura 14:** Inoculação das estirpes micocinogênicas pela técnica de “replica plate” em meio YM corado com azul de metileno e previamente inoculado com a levedura alvo



**Figura 15:** Atividade micocinogênica em meio YM com azul de metileno.



**Figura 16:** Detalhe da inibição mostrando o halo de inibição (A) e o halo adjacente indicando de morte celular (B).

## Anexo 2

### Sequências 26S ribosomal RNA gene sequência parcial

#### *Williopsis saturnus var. subsufficiens*

IMUFRJ51931 – IMUFRJ/51932 – IMUFRJ 51933

ATTGCCTCAGAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGT  
GCCCAGATTGTAATTTGAAGATAGTTTTCTGGTGTGGCCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACA  
GGACGTACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGCGGGGTGTCCAGTGCTTTGTAGATTTCTA  
TCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCT  
AAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTG  
AAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTAGATCAGACTTGGT  
GTTTTGTGATTATCTTCCCTTCTTGGGTTGTGCACTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCGGT  
CGGATGGCAAGATAATGACATTGGAACGTGGCACTACCTTCGGGTGGTGTGTTATAGCCC  
TTGTTGATGTTGCCTATCTGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGCCTAGGATGCTGGCGTAAT

#### *Candida yuanshanicus*

IMUFRJ51928 – IMUFRJ/51929 – IMUFRJ 51930

GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAA  
GCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCAGTGCCCGTAGGGTAACTCGAGTTGTAATTTGAAG  
AAGGCGACTTTGGACTTGGCCCCTGCCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTACAGAGGGTG  
AGAATCCCGTCTGGCGGGGAGACCCGAGTCTGTGTAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTG  
TTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  
CCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  
GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTAGATCAGACTTGGCGCTGCACGATTACCCG  
CCCCTTGTGGGTGGTGCCTCGTGGGAGCGCTGGGCCAGCATCGATTCCGACGGTAGGA  
TAATGGCAAGCTGAATGTGGCAGCCGCCTTTTGTTCGGTTGTGTTTATAGCGGCTTGCAG  
ATGCTGCCTGGCCGGATCGAGGGCTGCGTCTTTCTAGACTAGGATGCTGGCGTAATGATC  
TAACACCGCCCGTCTTGAACACGGACC

#### *Pichia membranifaciens*

IMUFRJ51915 – IMUFRJ/51918 – IMUFRJ 51921 – IMUFRJ/ 51922

GTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTCGGCACGAGTTGTA  
GAGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGAACAGGGTGCCT  
GAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGGTGTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGCTGACGAGTC  
GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATCCATCTAAGGCTAAATATTGGC  
GAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAG  
TGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGGGGTGCAG  
ACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGGGCGCCCTCTGGGCCAGCATCGGTTCCCTGCT  
GCGGGAGAAGGGGCTCCGGAAGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCGGGGCCAGATGCC  
CGGTGTG

*Wickerhamomyces pijperi*

IMUFRJ/51917 - IMUFRJ/51920

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAT  
CTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAAGTCTGGAGTTGGCCCTTATCTA  
TGTTCCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGGGGAGCCCGATT  
CATGTAGAGTGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAA  
TTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA  
TGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGTTATTA  
GATCAGACTTGGTGTTTGGCGATATTCAGTCTCTCGTAGACTGTTCACTCGCCCTTCACTG  
GGCCAGCATCGTTTTGGGTGGCAGGATAATGGCTGTTGAACGTGGCTTCTCCGGAAGTGT  
TATAGCTTCAGCTGATACTGCCTACCTAGACCGAGGACTGCGGCTTCTGCCTAGGATGCTG  
GCGTAATGATCTAATATCGC

*Candida stellimalicola*

IMUFRJ/51916

AAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT  
CTGGCGTCTTTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAACGGTTCTGCGTTTGGCGACTTGT  
CTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTTTCGATGGGTGCGCGTT  
CGCTTGTGGAGCCAGTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT  
AAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA  
AGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGC  
ATTTGATCAGACTTGGCGGGGCGAGTACTGGCGTCCACTTGTGGGGCGTTTACTGGTGCTC  
TGCTGGGCCAGCATCGATTTGTGCGGCAGGAGAATTGGGCGGGAACGTGGCTGTGCTTC  
GGGACAGTGTTATAGCCCGCTCGGATGCTGCCAGCGTGGATCGAGGACTGCGTTCTTTTT  
GGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATGCCGC

*Dipodascus capitatus*

IMUFRJ/51914

AAGCGGCCAAAGCTCAATTTGAAAACGCTTCGGCGTGTTGTAAGTAAAGTGGTTAGACGCT  
TTTTAATAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCATAGAGGGTGATAGCCCCGTATTAATTGTCT  
AGTGTGCTACTTTAGAGCGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATAGGTGGTAAACT  
CCATCTAAAGCTAAATATTGCTGGGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATG  
AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGCGTGTGAAATTGTTGGAGGGGAAGGCGATGG  
TAGGAATAAGAGGCTGCGGTTTTGAAATAATTGTTTTTCGGGCCACGGTCTCCTGAGCCTGC  
TTTCGCACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACGGTATTGCGAGTGTATGGGTGT  
TAAACCCCAACGCGAAA

*Trichosporon asahii*

IMUFRJ/51923

GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAAGGATCCCCTAGTAACGGCGAGTGAA  
GCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGTCTTCGATTGTCCGAGTTGTAATCTATAGA  
GGCGTTTTCCGTGCCGGACCGTGTCCAAGTCTCCTGGAAAGGAGTATCAAAGAGGGTGAT  
AATCCCGTACTTAACACGACCACCGGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTT  
TGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC  
GATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGT  
ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTTCTTTGGATTCAGCCAGTT  
CTGCTGGTCTACTTCCTTGAACGGGTCAACATCAGTTTTGTCCGGTGGATAAAGGTAGTA  
GGAATGTGACTTCTCCGGAAGTGTTATAGCCTATTATCACATACACTGGGTGAGACTGAGG  
ACTGCAGCTCGCCTTTATGGCCGGCCTT

### **Anexo 3: Documentação dos dados obtidos:**

#### **Artigo**

Cabral, A.S.; Carvalho, P.M.B.; Pinotti, T.; Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C.S.; Macrae, A. Killer yeasts inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa* the causal agent of Witches' Broom disease. *Brazilian Journal of Microbiology*.

---

#### **Comunicações**

PINOTTI, T.; CABRAL, A.; SANTOS, V. B. S.; ROSA, T. S.; LINS, U. G. C.; HAGLER, A. N.. Leveduras endofíticas associadas a diversas plantas cultivadas no sistema de agricultura orgânica e seu potencial na produção de toxinas killer. In: XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2008, Fortaleza. Livro de Resumos do XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 729-731. 2008

CABRAL, A. S.; CARVALHO, P.; MACRAE, A.; HAGLER, A. N.; MENDONCA, L. C. S.; PINOTTI, T.. Incidência de Leveduras "killer" em diferentes ambientes tropicais. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. 280-280, 2005

MENDONCA, L. C. S.; CABRAL, A. S.; HAGLER, A. N.; MACRAE, A.. Killer yeast control the growth of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa* (causal agent of witches broom). In: The International Congress of Mycology, 2005. The International Congress of Mycology, 2005.