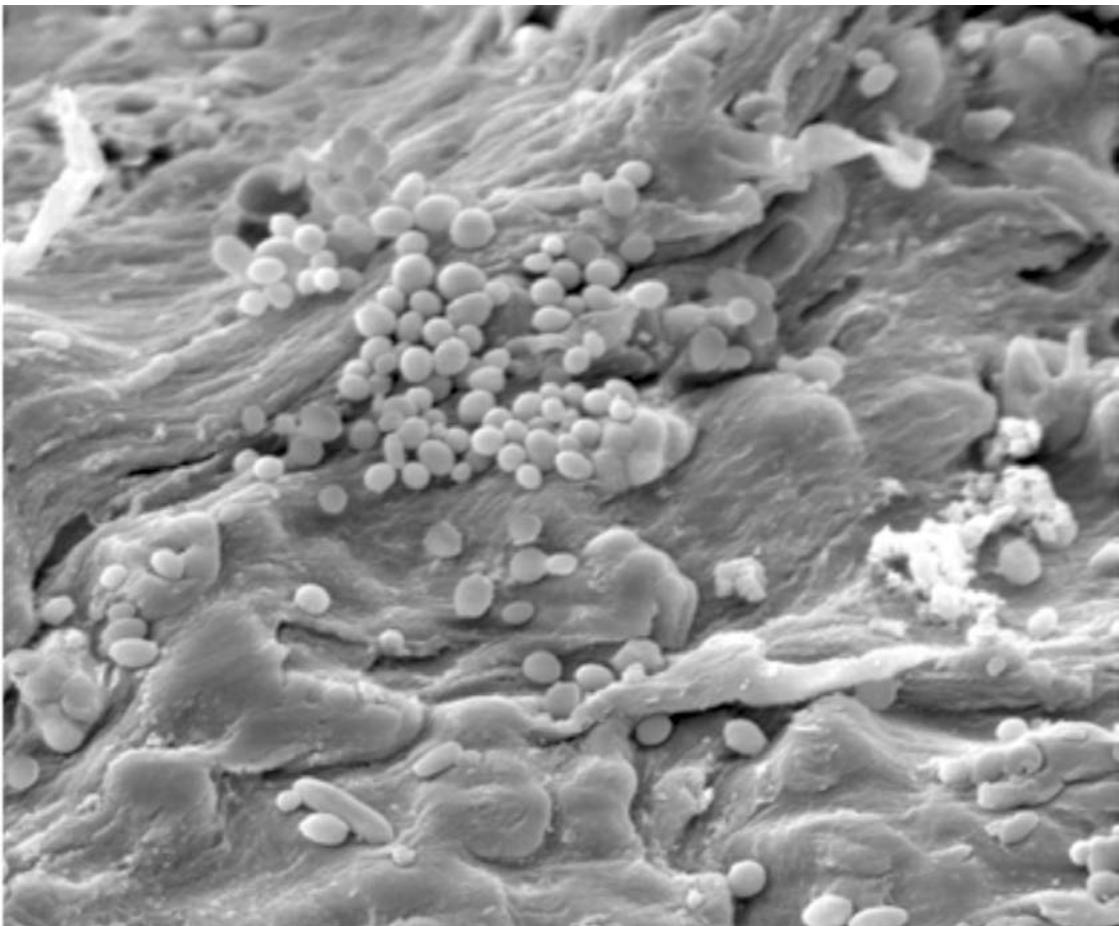


**Obtenção e Identificação de
Leveduras Killer de Frutos
Tropicais**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 75

Obtenção e Identificação de Leveduras Killer de Frutos Tropicais

*Jaqueline Rabelo de Lima
Francisco Marto Pinto Viana
Luciana Rocha Barros Gonçalves
Luciana Rocha Brandão
Carlos Augusto Rosa*

**Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2013**

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (85) 3391-7100

Fax: (85) 3391-7109

www.cnpat.embrapa.br

cnpat.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*

Secretário-Executivo: *Marcos Antonio Nakayama*

Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues*

Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa

Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda

Revisão de texto: *Marcos Antonio Nakayama*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*

Foto da capa: *Colônia de leveduras na superfície de Carica papaya L.*

Eletromicrografia de Jaqueline Rabelo Lima

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1^a edição (2013): versão eletrônica

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Obtenção e identificação de levedura killer de frutos tropicais / Jaqueline Rabelo Ribeiro... [et al]. – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

16 p.; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 75).

1. Bioprospecção. 2. Frutos tropicais. 3. Pós-colheita. I. Lima, Jaqueline Rabelo. II. Viana, Francisco Marto Pinto. III Gonçalves, Luciana Rocha Barros. IV. Brandão, Luciana Barros. V. Rosa, Carlos Augusto. VI. Série.

CDD 579.5

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução	7
Material e Métodos.....	8
Resultados e Discussão.....	10
Conclusão	13
Agradecimentos	13
Referências	14

Obtenção e Identificação de Leveduras Killer de Frutos Tropicais

Jaqueline Rabelo de Lima¹

Francisco Marto Pinto Viana²

Luciana Rocha Barros Gonçalves³

Luciana Rocha Brandão⁴

Carlos Augusto Rosa⁵

Resumo

Desde a identificação do fenótipo killer, no início da década de 1960, várias pesquisas têm apresentado inúmeras aplicações potenciais para leveduras que exibem esse fenótipo; contudo, essas aplicações estão diretamente relacionadas ao habitat da levedura, já que a produção e a excreção da toxina são influenciadas pelas condições do ambiente. Este trabalho objetivou realizar o isolamento e a identificação de leveduras killer a partir de frutos tropicais, visando a sua aplicação em processos biotecnológicos de preservação dessa fonte alimentar. Inicialmente, foram isoladas 580 leveduras a partir de 87 amostras de frutos tropicais (mamão, caju, sapoti, murici, manga e acerola), dentre as quais 29 exibiram o fenótipo killer. Todas as cepas killer foram

¹Engenheira de alimentos, doutora em Biotecnologia, professora do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará, Crateús, CE, jaqueline.lima@uece.br

²Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, marto.viana@embrapa.br

³Engenheira-química, doutora em Engenharia Química, professora associada da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, lrg@ufc.br

⁴Bióloga, aluna de pós-doutorado em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, biolubrandao@yahoo.com.br

⁵Biólogo, doutor em Microbiologia, professor titular de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, carlrosa@icb.ufmg.br

identificadas pelo sequenciamento da região D1/D2 do 26S rRNA, em que ficou demonstrada a presença de *Candida aaseri*, *Pichia kluyveri*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Kodamaea ohmeri*, *Ustilago xerochloae*, *Wickerhamomyces anomalus*.

Palavras-chave: Bioprospecção, frutos tropicais, pós-colheita.

Isolation and Identification of Yeast Killer from Tropical Fruits for Use in Biotechnological Processes

Abstract

*Since the identification of the killer phenotype in the early 1960s, several studies have shown numerous potential applications for yeasts that exhibit this phenotype. However, these applications are directly related to the habitat of the yeast, since the production and excretion of toxin are influenced by environmental conditions. This study is about the isolation and identification of yeasts killer from tropical fruits, for their application in biotechnological preservation of this food source. Initially, 580 yeasts were isolated out of 87 samples of tropical fruits (papaya, cashew, sapota, murici, mango and acerola), among which 29 exhibited the killer phenotype. All killer strains were identified by sequencing the D1/D2 region of the 26S rRNA, which were assigned as *Candida aaseri*, *Pichia kluyveri*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Kodamaea ohmeri*, *Ustilago xerochloae*, *Wickerhamomyces anomalus*.*

Keywords: *Bioprospecting, tropical fruit, postharvest.*

Introdução

O fenótipo killer foi inicialmente descrito em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan e Makower, em 1963 (IZGU et al., 1997).

Segundo a classificação desses pesquisadores, na natureza, é possível a ocorrência de três fenótipos distintos de leveduras: killer, sensível e neutro. Cepas com atividade killer seriam aquelas capazes de secretar uma glicoproteína (fator killer) com capacidade de matar outras linhagens sensíveis. As linhagens neutras seriam aquelas que não produzem toxinas e são imunes a elas (HIDALGO; FLORES, 1994). A expressão do fenótipo killer confere às leveduras produtoras vantagem competitiva sobre outros microrganismos quando expostas a um meio nutricional com recursos limitados (GORETTI et al., 2009).

Os efeitos letais das toxinas killer sobre as células sensíveis ocorrem após duas ações básicas: ligação da toxina a receptores específicos de parede celular e membrana plasmática e translocação para o citoplasma. Uma vez dentro da célula, as toxinas provocam o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, causando: ruptura e perda de íons potássio, ATP e metabólitos intracelulares; inibição e síntese dos principais componentes da parede celular como glicanas, manoses e quitina; inibição da síntese de DNA e o bloqueio da fase G1 do ciclo celular (CASTORIA et al., 2001; GOLUBEV et al., 2006).

Desde sua identificação, várias aplicações potenciais vêm sendo sugeridas para esses microrganismos, como: agentes de preservação de alimentos (LIU; TSAU, 2009; GORETTI et al., 2009; SANGORRÍN et al., 2001); agentes de controle em fermentações industriais (CIANI; FATICENTI, 2001; LIMA et al., 2007); modelos para estudo em biologia molecular e biotipagem de microrganismo (FUENTEFRIA, 2008); ação antifúngica (BANERJEE; VERMAT, 2000; BUZZINI; MARTINI, 2001); estimulante para produção de anticorpos monoclonais com potencial aplicação na produção de vacinas (MAGLIANE et al., 2007); e, mais recentemente, no controle de fitopatógenos em pós-colheita (GOUVEIA, 2007; COELHO et al., 2007; HASHEM; ALAMRI, 2009).

A expressão do fenótipo killer é influenciada por vários fatores do ambiente, sobretudo pelo pH do meio e pela temperatura de incubação (LIMA et al., 2007; SANTOS; MARQUINA, 2004). Portanto, a utilização desses microrganismos está condicionada à manutenção de condições favoráveis à produção e excreção da toxina. A realização de prospecção dentro do nicho ecológico da levedura pode facilitar sua aplicação potencial, reduzindo a necessidade de operações de controle e, consequentemente, os custos do processo, além de garantir a viabilidade dos microrganismos nas condições de uso pretendidas.

Nesse contexto, este trabalho objetivou o isolamento e a identificação de leveduras produtoras de toxina killer associadas a frutos tropicais.

Material e Métodos

Coleta de frutos e isolamento das leveduras

De agosto de 2009 a maio de 2010, foram coletadas, em unidades de distribuição de frutos e em propriedades produtoras de frutas no Estado do Ceará, 87 amostras de frutos tropicais: mamão (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale* L.), sapoti (*Manilkara zapota* L.), murici (*Byrsonima crassifolia* L.), manga (*Mangifera indica*) e acerola (*Malpighia glabra* L.). Os frutos, acondicionados em recipientes térmicos, foram levados ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram selecionados de acordo com o estádio de maturação e integridade.

Para as análises, realizadas imediatamente após a seleção, foram preparadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) a partir de 25 g de amostra da casca dos frutos pesquisados em 225 mL de solução salina fisiológica. Cada diluição foi plaqueada em duplicita, utilizando a técnica do spread plate em ágar batata dextrose (BDA-Difco), de pH 3,5, ajustado com ácido tartárico a 10%. As placas foram incubadas por 72 horas a 28 °C e, após a incubação, até 5 colônias com características morfológicas distintas foram isoladas de cada placa e submetidas ao teste killer.

Determinação do fenótipo killer

A atividade killer foi testada em triplicata, utilizando meio YEPD (extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹, ágar 20 g L⁻¹), com 0,003% de azul de metileno e tamponado com tampão citrato 0,01 M., para pH 4,2. As cepas *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) e *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006), sensíveis à maioria das toxinas killer conhecidas, foram cultivadas por 24 horas a 28 °C em BDA, suspendidas em solução salina fisiológica até 4 x 10⁵ células mL⁻¹, espalhadas na superfície do meio com cotonetes estéreis e incubadas a 25 °C por 30 minutos. As leveduras a serem testadas foram inoculadas como um único ponto na superfície das placas semeadas com as leveduras sensíveis. Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C por 72 horas. A presença de halo de inibição ao redor do ponto de inoculação indicou a positividade do teste (VITAL et al., 2002; CABRAL et al., 2009).

Para fins de controle, foram utilizadas, simultaneamente, em cada teste, quatro cepas padrões killer, K₁ (NCYC 232) *Saccharomyces cerevisiae*, K₂ (NCYC 732) *Saccharomyces cerevisiae*, K₄ (NCYC 388) *Candida glabrata* e K₆ (NCYC 587) *Kluveromyces fragilis*.

Identificação das leveduras

Os isolados foram inicialmente agrupados com base em suas características morfológicas, produção de urease, assimilação de açúcares, fontes de nitrogênio e compostos amilolíticos. As leveduras foram também caracterizadas por *fingerprinting* em reações de polimerase em cadeia (PCR), empregando-se marcadores microssatélites (MSP-PCR) (LIBKIND et al., 2003).

Para extração do DNA, colônias de leveduras foram crescidas em ágar Sabouraud modificado (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 2%) a 15 °C por uma noite, transferidas para tubos (Eppendorf) contendo 100 µl de tampão de extração (50 mmol Tris L⁻¹; 250 mmol NaCl L⁻¹; 50 mmol EDTA L⁻¹; 0.3%, w/v SDS; pH 8,0) e incubadas a 65 °C por 30 minutos. A seguir, 100 µL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados a cada

tubo de extração. A mistura foi agitada vigorosamente em vortex, incubada por 3 minutos e centrifugada por mais 3 minutos a 13.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. O DNA foi seco por uma noite em temperatura ambiente, suspenso em 100 mL de Tampão TE (10 mM Tris, 10 mM Na-EDTA, pH 8,0) e armazenado sob refrigeração.

PCR *fingerprinting* e sequenciamento

O iniciador (GTG₅) – algumas vezes com o M13 (GAGGGTGGCGGTTCT) – foi utilizado nos experimentos de PCR *fingerprinting*, empregando marcador molecular de microssatélite para distinguir diferentes linhagens. As de leveduras que possuíam padrões de banda idênticos foram agrupadas e consideradas da mesma espécie. Linhagens representativas de cada MSP-PCR grupo foram submetidas à análise da sequência do domínio D1/D2 da subunidade maior do rRNA. Linhagens fisiologicamente distintas e com padrões únicos após a análise do PCR *fingerprinting* também foram selecionadas para identificação direta pelo sequenciamento da região D1/D2 do gene do rRNA.

Para as reações de sequenciamento, o DNA foi extraído utilizando o método descrito anteriormente. O domínio variável da subunidade maior do gene do rRNA foi amplificado segundo descrito por Lachance et al. (1999) utilizando os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'). Os produtos de PCR obtidos após as reações utilizando os iniciadores foram purificados e sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBacetm (Amersham Biosciences, USA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados GenBank utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997).

Resultados e Discussão

Inicialmente, foram isoladas 580 leveduras a partir de mamão, caju, sapoti, murici, manga e acerola. A seleção de agentes a partir do ambiente e do substrato de ação potencial favorece a sua aplicação por minimizar custos operacionais, além de garantir a produção de

compostos de interesse, tais como a toxina killer. Droby et al. (2009) e Janisiewicz e Korsten (2002) relatam que, quando se busca, por exemplo, agentes para biocontrole, a prospecção deve ser realizada dentro do nicho ecológico do patógeno.

Entre os isolados, 29 (5%) foram classificados como leveduras killer, segundo critérios definidos por Vital et al. (2002). Leveduras killer são frequentemente obtidas em alimentos e bebidas; contudo, o percentual de isolamento é bastante variável. A partir de 155 leveduras isoladas de frutas e solo obtidos na floresta amazônica, mata atlântica e uma fazenda orgânica, Cabral et al. (2009) detectaram a presença de 15 cepas com fenótipo killer. Coelho (2005), avaliando a ocorrência de leveduras killer entre isolados de frutos, identificou 13 isolados com exibição do fenótipo, entre os 44 avaliados. A produção da toxina killer é uma estratégia de defesa do organismo; portanto, a expressão do fenótipo é influenciada por fatores seletivos bióticos e abióticos presentes em seu nicho ecológico.

Como referido acima, uma grande diversidade de leveduras pode ser constatada neste trabalho; no entanto, a diversidade de leveduras especializadas na produção da toxina killer foi mais reduzida, verificando-se um percentual, na superfície de frutas tropicais, que não chegou a 5% do total isolado. Isso é explicável pela própria natureza do fenômeno de antibiose, sendo a produção e excreção da toxina influenciada pelas pressões seletivas do ambiente.

O agrupamento inicial dos 29 isolados killer por meio do PCR *fingerprinting* evidenciou a formação de 17 perfis genéticos, conforme apresentado na Figura 1.

A identificação molecular dos 29 isolados, por meio do sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA, evidenciou a presença de cinco diferentes espécies. Na Figura 2, pode-se verificar que 17 cepas foram classificadas como *Kodamaea ohmeri*, 5 como representantes da espécie *Wickerhamomyces anomalus*, 4 como *Pichia kluveri* e 2 como *Candida aaseri*. Apenas uma levedura foi identificada como *Meyerozyma guilliermondii*.

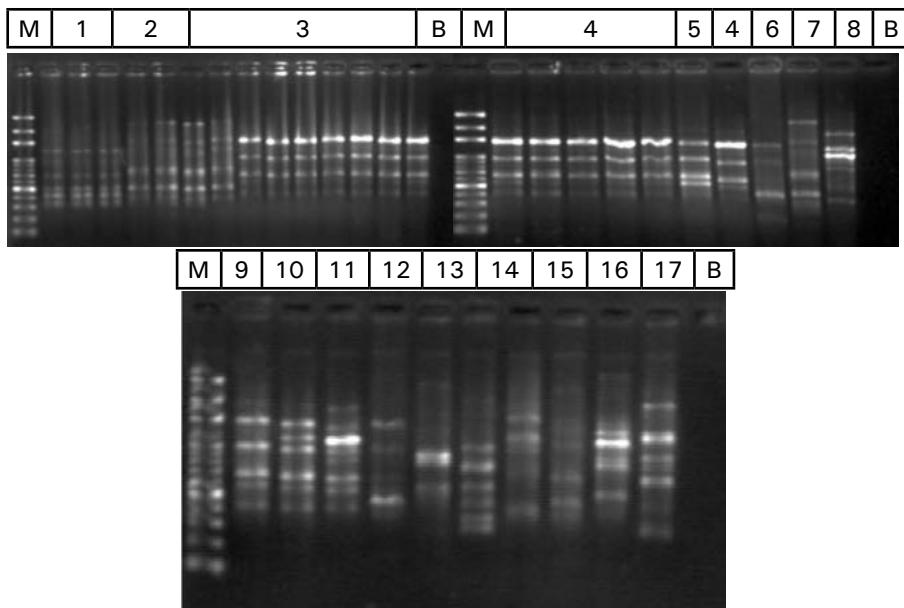


Figura 1. Géis de agarose (1,0%) dos produtos de PCR utilizando o primer ISSR (GTG5) das linhagens killer isoladas de frutos tropicais. M – marcador de peso molecular 100 bp; B – branco. Números de 1 a 17 apresentam perfis cromatográficos.

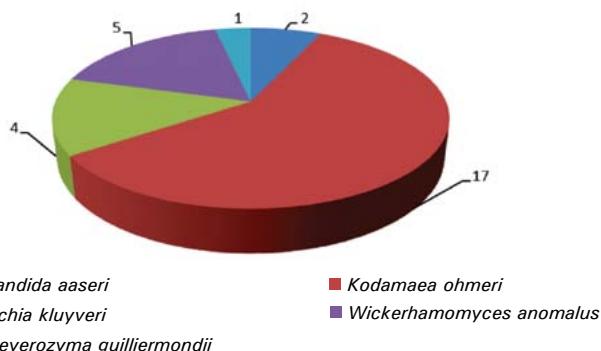


Figura 2. Percentual de distribuição de espécies de leveduras em frutas tropicais: mamão (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale* L.), sapoti (*Manilkara zapota* L.), murici (*Byrsonima crassifolia* L.), manga (*Mangifera indica*) e acerola (*Malpighia glabra* L.).

A capacidade de produção da toxina killer tem sido evidenciada entre várias espécies de leveduras (SCHMITT; BREING, 2002), e a diversidade encontrada está diretamente associada ao substrato de isolamento. Lima, et al. (2007), isolando leveduras killer a partir de mosto de fermentação alcoólica, constatou a presença de *Saccharomyces cereviseae* e *Kluyveromyces* sp., enquanto Cabral et al. (2009), analisando leveduras isoladas de frutos e solos da Amazônia, reportou a existência de maior diversidade de espécies, identificando cepas de *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia lunata* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

Conclusão

Leveduras produtoras de toxinas killer podem ser obtidas da superfície de frutas tropicais, representando, porém, um pequeno percentual do total de leveduras presente nessa superfície.

Agradecimentos

Os autores agradem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Embrapa Agroindústria Tropical, pelo apoio financeiro a este trabalho.

Referências

- ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- BANERJEE, H.N.; VERMAT, M. Search for a novel killer toxin in yeast *Pichia pastoris*. **Plasmid**, v. 40, p. 181-183, 2000.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. **Medical Mycology**, v. 39, p. 479-482, 2001.
- 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**, v. 40, p.108-110, 2009.
- CASTORIA, F.; CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: studies on its modes of action. **Biology and Technology**, v. 22, p. 7-17, 2001.
- CIANI, M.; FATICENTI, F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservatives agent to control apiculate wine yeasts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3058-3063, 2001.
- COELHO, A. R. **Controle de *Penicillium expansum* / Biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita.** 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

COELHO, A.R.; CELLI, M.G.; ONO, E.Y.S.; WOSIACKI, G.; HOFFMANN, F.L.; PAGNOCCA, F.C.; HIROOKA, E.Y. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts with perspectives of application in biocontrol and patulin degradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 725-733, 2007.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p. 137-145, 2009.

FUENTEFRIA, A. M. **Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2008. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GOLUBEV, W. I, Antagonistic interactions among yeasts. In: ROSA, C.A.; PETER, G. (Org.). **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer, 2006. p.197- 219.

GORETTI, M.; TURCHETTI, B.; BURATTA, M.; BRANDA, E.; CORAZZI, L.; VAUGHAN-MARTINI, A.; BUZZINI, P. , In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.131, p. 178-182, 2009.

GOUVEIA, A. **Controle em campo de pó-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HASHEM, M.; ALAMRI, S. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, 123-130, 2009.

HIDALGO, P.; FLORES, M. Occurrence of the killer character in yeasts associated with Spanish wine production. **Food Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 161-167, 1994.

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

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

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W.T.; BARKER, J. S. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 172-177, 1999.

LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; VAN BROOCK, M. R.; SAMPAIO, J. P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, p. 313-322, 2003.

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

LIU, S.; TSAO, M. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 280-282, 2009.

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

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, v. 150, p. 2527-2534, 2004.

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

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**, v. 33, p. 230-235, 2002.



Agroindústria Tropical

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

