

**Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada
Drosophila sp.**

SKRIPSI

**Veronica Ratih Ayu Permatasari
31130031**



**Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
Yogyakarta
2017**

Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada *Drosophila* sp.

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Veronica Ratih Ayu Permatasari

31130031



Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2017

Lembar Pengesahan

Skripsi dengan judul:

Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada *Drosophila* sp.
telah diajukan dan dipertahankan oleh:

Veronica Ratih Ayu Permatasari
31130031

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Sains pada tanggal **23 Oktober 2017**

Nama Dosen

1. Dr. Dhira Satwika, M.Sc
(Dosen Pembimbing I/Penguji)
2. Dr. Guntoro
(Dosen Pembimbing II/Penguji)
3. Dr. Budi Setyadi Daryono, M.Agr.Sc
(Penguji/ Ketua Tim Penguji)

Tanda Tangan



Yogyakarta,

Disahkan Oleh :

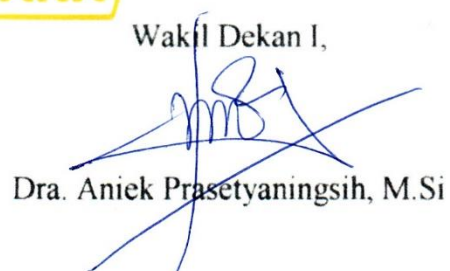
DU TA WACANA

Dekan,



Drs. Kisworo, M.Sc

Wakil Dekan I,



Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Veronica Ratih Ayu Permatasari

NIM : 31130031

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul :

“Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada *Drosophila* sp.”

adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu di dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, ... 01 November 2017 ...



Veronica Ratih Ayu Permatasari

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas berkat dan karuniaNya, sehingga skripsi dengan judul “**Isolasi dan Identifikasi Molekuler Yeast Antagonis pada *Drosophila sp.***” dapat terselesaikan dengan baik. Semua proses yang terjadi dan terlaksana selama penelitian hingga penulisan dapat terselesaikan dengan baik berkat bimbingan, bantuan, dan motivasi dari banyak pihak. Dengan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Dhira Satwika, M.Sc, selaku dosen pembimbing pertama yang sudah dengan baik dan sabar memberikan bantuan, dukungan dan motivasi terhadap penulis.
2. Dr. Guntoro, selaku dosen pembimbing kedua yang telah dengan dengan sabar dan tekun memberikan dukungan, saran, kritik, dan pandangan yang membangun penulis.
3. Dr. Budi Setyadi Daryono, M.Agr.Sc, selaku penguji yang memberikan kritik dan saran yang membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.
4. Staff dan Laboran Fakultas Bioteknologi UKDW atas kesabarannya membantu selama proses penelitian.
5. Kedua orang tua, Ignatius Hendro Suprpto dan MM Dwi Murti Handayani yang selalu mendorong saya untuk melakukan yang terbaik dalam penelitian ini. Kedua kakak, Yulius Pramana Jati dan Elizabeth Galih Ayu Lestari untuk dukungan serta waktu yang diberikan kepada saya. Adik Agatha Putri Ayu Ratnasari atas keceriaan yang diberikan.
6. Teman-teman dan orang-orang yang terkasih. Dea Inanditya dan Gan Edytia sebagai teman diskusi selama pengerjaan skripsi ini. Teman-teman angkatan 2013 yang sudah memberikan canda tawa, pengalaman dan bantuan selama pengerjaan skripsi maupun selama 4 tahun ini. Samuel Reynaldi yang selalu memberikan dukungan moril dalam penelitian hingga penulisan ini terselesaikan.
7. Kepada kakak dan adik angkatan, Gabriella Anindita, Arga Nugraha, Eunike Ilona, Evelyn Ferdian, Fina Chintia, dan Filomena yang menemani dan memberikan dukungan moril dalam penyelesaian penelitian ini.
8. Seluruh pihak yang tidak dapat dituliskan satu persatu, atas bantuan, kritik, motivasi dan dukungan yang telah diberikan.

Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan kemajuan ilmu pengetahuan dan Pendidikan. Penulis berharap penelitian yang sudah ini dpat dikembangkan dan dilanjutkan oleh berbagai pihak dan adik-adik Fakultas Bioteknologi UKDW.

Yogyakarta, 01 November 2017

Penulis.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
ABSTRAK.....	xi
ABSTRACT.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	1
1.3. Tujuan Penelitian.....	1
1.4. Manfaat Penelitian.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	2
2.1. Pengertian Umum <i>Yeast</i>	2
2.2. Pemanfaatan <i>Yeast</i>	2
2.3. <i>Drosophila</i> sp.....	3
2.4. Hubungan Interaksi antara <i>Yeast</i> dengan <i>Drosophila</i> sp.....	3
2.5. Identifikasi Molekuler.....	4
2.5.1. Polymerase <i>Chain Reaction</i> (PCR).....	4
2.5.2. Analisis pohon filogenetik.....	4
BAB III BAHAN DAN METODE.....	6
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	6
3.2. Sampel Penelitian.....	6
3.3. Alat Penelitian.....	6
3.4. Bahan Penelitian.....	6
3.5. Tahapan Penelitian.....	6
3.5.1. Isolasi <i>yeast</i> dari saluran pencernaan <i>Drosophila</i> sp.....	6
3.5.2. Uji aktivitas penghambatan isolat <i>yeast</i> terhadap strain <i>yeast</i> sensitif.....	6
3.5.3. Isolasi DNA.....	7
3.5.3.1. Isolasi DNA total <i>yeast</i>	7
3.5.3.2. Isolasi DNA linear plasmid.....	7
3.5.4. Identifikasi molekuler.....	7
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	9
4.1. Isolasi <i>Yeast</i>	9
4.2. Uji Aktivitas Penghambatan Isolat <i>Yeast</i> terhadap Strain <i>Yeast</i> Sensitif.....	10
4.3. Analisis Molekuler.....	12
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	22
5.1. Kesimpulan.....	22
5.2. Saran.....	22
DAFTAR PUSTAKA.....	23

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Kondisi PCR yang digunakan untuk amplifikasi sampel DNA <i>yeast</i>	8
Tabel 2. Koloni <i>yeast</i> yang didapatkan dari isolasi <i>yeast</i> pada saluran pencernaan <i>Drosophila</i> sp. .	10
Tabel 3. Hasil uji aktivitas penghambatan isolat <i>yeast</i> terhadap <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1c.	11
Tabel 4. Sepuluh <i>hit</i> teratas dari analisis BLAST isolat D325 pada <i>data base</i> NCBI.	14
Tabel 5. <i>Candida</i> sp yang mampu menghambat <i>Candida glabrata</i> IMUFRJ-50083 yang ditemukan pada <i>Drosophila</i> sp	15
Tabel 6. Sepuluh <i>hit</i> teratas hasil analisis BLAST sampel DNA isolat D701 dari <i>data base</i> NCBI.	18
Tabel 7. <i>Killer toxin</i> yang dihasilkan <i>yeast</i> dan lokasi gen atau plasmid pengkode protein toxin	20

©UKYDWN

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Bagian-bagian dari sel <i>yeast</i>	2
Gambar 2. <i>Drosophila</i> sp	3
Gambar 3. Sampel <i>Drosophila</i> sp dan saluran pencernaan <i>Drosophila</i> sp.....	9
Gambar 4. Morfologi mikroskopis sel yeast D701 dan D325.....	10
Gambar 5. Contoh hasil uji aktivitas penghambatan yeast antagonis terhadap isolat sensitif.	11
Gambar 6. Hasil penghambatan dari isolat yeast D325 dan D701.....	12
Gambar 7. Hasil foto elektroforesis DNA sampel D325 dan D701	15
Gambar 8. Pohon filogenetik D325.....	18
Gambar 9. Pohon filogenetik D701.....	22

©UKDW

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi medium yang digunakan	27
Lampiran 2. <i>Flow chart</i> tahap penelitian	29
Lampiran 3. Gambar isolat <i>yeast</i> D325 dan D701	32
Lampiran 4. Gambar hasil uji antagonis isolat <i>yeast</i>	33
Lampiran 5. Urutan basa nukleotida	34
Lampiran 6. Hasil BLAST urutan nukleotida pada <i>Genbank</i> NCBI untuk isolat D325	35
Lampiran 7. Hasil BLAST urutan nukleotida pada <i>Genbank</i> NCBI untuk isolat D701	40

©UKDW

Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada *Drosophila* sp.

Veronica Ratih Ayu Permatasari
31130031

Program Studi Biologi Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta.

ABSTRAK

Pemanfaatan mikrobial sudah banyak dilakukan untuk menunjang kebutuhan produksi produk bioteknologi. Salah satu mikrobial yang pemanfaatannya sudah banyak digunakan adalah *yeast*. *Yeast* biasa berperan dalam peningkatan produk fermentasi. Selain sebagai penunjang produk fermentasi, *yeast* yang mampu menghasilkan racun bagi mikrobial sensitif sudah banyak dimanfaatkan untuk menekan populasi mikrobial yang tidak diinginkan dalam pertanian, industri dan kesehatan. Kemampuan *yeast* antagonis dalam menghambat pertumbuhan dari mikrobial sensitif dapat berasal dari kromosom dan ekstrakromosomal dsDNA atau dsRNA yang telah disebut sebagai *virus-like element* (VLEs). *Yeast* antagonis banyak ditemukan di saluran pencernaan serangga terutama *Drosophila* sp. *Drosophila* sp dikenal sebagai vektor alami dari beberapa spesies *yeast* karena *Drosophila* hinggap pada buah-buahan yang matang atau busuk yang menjadi habitat *yeast* dan *yeast* antagonis. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi molekuler *yeast* antagonis yang ada pada saluran pencernaan *Drosophila* sp. Saluran pencernaan diperoleh dengan pembedahan dan *plating* menggunakan medium YPD agar. Koloni *yeast* kemudian dilakukan pengamatan makroskopis, mikroskopis, dan uji antagonisme menggunakan strain *yeast* sensitif, yaitu *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1c. *Yeast* yang mampu menghambat strain sensitif kemudian dilakukan isolasi DNA menggunakan metode isolasi total *yeast* DNA dan isolasi DNA linear plasmid, hasil tersebut kemudian digunakan untuk mengkarakterisasi sifat molekuler dari isolat yang didapatkan. Selanjutnya isolat disekuensing menggunakan *genetic marker internal transcribed spacer* (ITS) 5.8S rDNA. Urutan basa DNA yang didapatkan kemudian dilakukan *alignment* menggunakan analisis BLAST dan konstruksi pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik menunjukkan isolat D325 memiliki kekerabatan dengan *Candida* sp dan isolat D701 memiliki kekerabatan dengan *Trichosporon* sp. Hubungan yang terjadi antara *yeast* dengan *Drosophila* sp atau *host* lainnya dapat berupa hubungan yang positif atau negatif, bergantung pada peran yang dihasilkan. Ditemukannya isolat *yeast* antagonis pada *Drosophila* sp perlu dilakukan uji agar diketahui daerah yang mengkode basis genetik sifat antagonis yang dihasilkan.

Kata kunci: *Drosophila* sp, *yeast* antagonis, ITS, *Candida* sp, *Trichosporon* sp.

Isolation and Molecular Identification of Antagonistic Yeast from *Drosophila* sp.

Veronica Ratih Ayu Permatasari

31130031

**Dept. of Biology, Faculty of Biotechnology
Duta Wacana Christian University, Yogyakarta**

ABSTRACT

Utilization of microbes for the production of biotechnological products has long been known. One of the most widely used microbes is yeast; it has role in the improvement of fermentation products, such as bread and wine. In addition to this, some yeasts are capable of producing toxins to suppress undesirable microbial populations in agriculture, industry and health. The ability of antagonistic yeasts to inhibit the growth of sensitive strain are attributed from chromosomes and extrachromosomal dsDNA or dsRNA, known as virus-like elements (VLEs). Antagonistic yeasts have been reported found in the digestive tract of insects, like *Drosophila* sp. It is known as a natural vector of some yeasts as it consume ripe or decayed fruits that are known to be the habitat of yeasts, including the antagonistic yeasts. It is the aim of this research to isolate and molecularly identify the antagonistic yeast(s) from the digestive tract of *Drosophila* sp. It was dissected and then plated on YPD agar. The occurring yeasts colonies were then separated and subjected to macroscopic and microscopic examination, as well as screened for the antagonistic activity against the sensitive strain, i.e. *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1c. Isolates were then picked for further observation based on its inhibition on the sensitive strain. Yeast total DNA and plasmid isolation was performed to characterize the molecular trait of the selected isolates. Furthermore, the DNA will be sequenced by employing internal transcribed spacer (ITS) of 5.8 rDNA as genetic marker. Sequence analysis was then performed by conducting multiple sequence alignment employing BLAST, and the construction of phylogenic tree. Based on the resulting phylogenetic trees, one isolate is identify as *Candida* sp and the other as *Trichosporon* sp. These results imply that there might be complex interaction between the endosymbiont yeast(s) and *Drosophila* sp as the host. Further experiments need to be done to clearly identify the antagonistic yeasts found, and to identify the genetic basis of its antagonistic activity.

Keywords : *Drosophila* sp, antagonistic yeast, ITS, *Candida* sp, *Trichosporon* sp

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang memiliki tingkat biodiversitas tinggi. Banyak flora, fauna dan mikrobia yang ditemukan berada di Indonesia. Pemanfaatan dari flora, fauna dan mikrobia di Indonesia sudah banyak digunakan dalam berbagai bidang bioteknologi, baik dalam bidang kesehatan, industri, dan lingkungan.

Yeast merupakan sel eukariotik uniseluler yang termasuk dalam kingdom fungi. Dalam perkembangannya di dunia, spesies *yeast* telah dikenali sebanyak 1.500 spesies (Kurtzman & Fell, 2006). Kemampuan *yeast* dalam menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi, membuat *yeast* banyak digunakan. *Yeast* yang menggunakan sumber karbon berupa glukosa, fruktosa, sukrosa dan maltosa membuat *yeast* dimanfaatkan dalam bidang industri pangan. Selain mampu menggunakan gula sebagai sumber karbon, *yeast* dikenal mampu menggunakan alkohol dan lemak organik sebagai sumber karbon.

Yeast banyak ditemukan di lingkungan dan sering diisolasi dari media atau sampel yang memiliki kandungan gula tinggi. Selain media yang memiliki kandungan gula tinggi, *yeast* dapat ditemukan pada serangga yang merupakan vektor alaminya. Pada serangga, *yeast* banyak ditemukan dalam saluran pencernaan (Suh, 2005). Salah satu serangga yang dikenal memiliki hubungan simbiosis dengan *yeast* adalah *Drosophila* sp. Simbiosis yang terjadi antara *yeast* dengan *Drosophila* sp dapat berupa hubungan yang menguntungkan atau merugikan, baik terhadap *Drosophila* sp, *yeast*, dan bakteri yang ada di *Drosophila* sp.

Terdapat *yeast* yang dikenal mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain yang berada di lingkungannya. *Yeast* yang mampu menghasilkan penghambatan tersebut masuk dalam kategori *yeast* yang bersifat antagonis. Sifat antagonis yang dihasilkan dapat berupa protein atau kemampuan merubah kondisi lingkungan. *Yeast* yang mampu menghasilkan protein dikenal sebagai *killer yeast*. *Killer yeast* sudah dimanfaatkan dalam peningkatan hasil produksi yang melibatkan *yeast*. *Killer yeast* digunakan untuk mengeliminasi *yeast* atau jamur yang tidak dibutuhkan.

Beberapa penelitian telah menemukan *yeast* antagonis dan *killer yeast* yang ada pada saluran pencernaan serangga. Berdasarkan latar belakang tersebut, dilakukan isolasi *yeast* dari saluran pencernaan *Drosophila* sp untuk didapatkannya *yeast* yang bersifat antagonis.

1.2. Perumusan Masalah

1.2.1. Isolasi dan identifikasi *yeast* yang memiliki sifat antagonis dari saluran pencernaan *Drosophila* sp.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Melakukan isolasi dan identifikasi secara molekuler *yeast* yang memiliki sifat antagonis dari saluran pencernaan *Drosophila* sp.

1.4. Manfaat Penelitian

- 1.4.1. Mendapatkan isolasi *yeast* yang memiliki sifat antagonis dari saluran pencernaan *Drosophila* sp.
- 1.4.2. Eksplorasi jenis *yeast* simbiotik pada serangga.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Terdapat dua isolat *yeast*, D325 dan D701 yang mampu menghasilkan aktivitas penghambatan yang konsisten di setiap pengujiannya. Hasil isolasi DNA kedua isolat tersebut menunjukkan tidak adanya materi genetik lain yang didapatkan selain DNA kromosom. Hasil elektroforesis tidak menunjukkan adanya materi genetik *virus like element*. Analisis BLAST pada *data base* NCBI menunjukkan kekerabatan dekat D325 dengan *Candida tropicalis*. Isolat D701 memiliki kekerabatan dekat dengan *Trichosporon faecale*, *Trichosporon asahii*, dan *Trichosporon insectorum*. Berdasarkan pohon filogenetik, kedua isolat tersebut memiliki hubungan dengan beberapa spesies *yeast* yang dikenal sebagai *killer yeast* dan beberapa spesies dikenal sebagai *killer yeast* yang sifatnya berasal dari kromosomal.

Hasil dari penelitian ini dapat dilakukan uji lanjutan untuk melihat stabilitas jangka panjang dari sifat antagonis kedua isolat *yeast* tersebut. Selain itu juga perlu dilakukannya pengujian dua isolat tersebut terhadap *yeast* atau jamur atau mikroorganisme lain yang bersifat patogen untuk melihat kemampuan sifat antagonis yang dihasilkan isolat tersebut. Perlu juga dilakukan identifikasi dengan *genetic marker* lain yang fungsional sehingga dapat diketahui pasti asal dari sifat antagonis kedua *yeast* tersebut.

5.2. Saran

- 5.2.1. Perlu dilakukannya uji lanjutan pada isolat yang sudah didapat.
- 5.2.2. Perlu dilakukan optimalisasi komponen-komponen penunjang metode penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abranches J, Morais PB, Rosa CA, Mendonça-Hagler LC, Hagler AN. 1997. The incidence of killer activity and extracellular protease in tropical yeast communities. *Can. J. Microbiol* 43:326-336.
- Arguello JR, Sellanes C, Lou YR, Raguso RA. 2013. Can yeast (*S. cerevisiae*) metabolic volatiles provide polymorphic signaling. *PLoS ONE* 8(8): e70219. doi:10.1371/journal.pone.0070219
- Asnani A, Ryandini D, Suwandari. 2015. Karakterisasi dan identifikasi spesies aktinomisetes K-3E. *Prosiding Seminar Nasional* 5:19.20.
- Begon M. 1982. *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, London, pp. 345–384.
- Belda I, Ruiz J, Alonso A, Marquina D, Santos A. 2017. The Biology of *Pichia membranifacies* Killer Toxins. *MDPI Journal* 9(112). doi:10.3390/toxins9040112.
- Cappelli A, Ulissi U, Valzano M, Damiani C, Epis S, Gabrielli MG. 2014. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS ONE* 9(5):1-9. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095988.
- Colombo AL, Padovan ACB, Chaves, GM. 2011. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (4): 682-700. doi:10.1128/CMR.00003-11
- de Oliveira Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VM. 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian. J. Microbiol.* 44 (2): 341–349. doi:10.1590/S1517-83822013000200001
- Dharmayanti NLPI. 2011. Filogenetika molekuler: Metode Taksonomi Organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa* 21(1):1-10.
- El-Banna AA, Malak A, El-Shan, Shehata MG. 2011. Yeast producing killer toxin: an overview. *Alex. J. Fd. Sci & Technol* 8(2)41-53.
- Entian KD. 1980. Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Mol. Gen. Gene.* 178(3): 633–637. PMID: 6993859
- Fagarasanu A, Mast FD, Knoblach B, Rachubinski RA. 2010. Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast. *Nature. Rev Mol Cell Biol* 11(2010):644-654. doi:10.1038/nrm2960.
- Frohloff F, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig KD, Schaffrath R. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *The EMBO J* 20(2001):1993-2003.
- Fitriati Y, Wiyono S, Sumarauw IO. 2013. Khamir antagonis untuk pengendalian penyakit antraknosa pada buah avokad selama penyimpanan. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 9(5):153-159. doi:10.14692/jfi.9.5.153.
- Fuentefria AM, Suh SO, Landell MF, Faganello J, Schrank A, Vainstein MH, Blackwell M, Valente P. 2008. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anomorphic basidiomycetous killer yeast. *Mycol, Res* 112(2008):93-99. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.05.001.
- Ganter PF, Starmer WT, Lachance MA, Phaff HJ. 1986. Yeast communities from host plants and associated *Drosophila* in southern Arizona: new isolations and analysis of the relative importance of hosts and vectors on community composition. *Oecologia* 70:386–392.
- Gibson CM, Hunter MS. 2010. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecol. Lett.* 13:223-234. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01416.x

- Gonzales F. 2004. Symbiosis between yeasts and insects. Introductory paper at the Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science. Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp. Swedish.
- Gueho E, GS de Hoog, MT Smith. 1992. Neotypification of the genus *Trichosporon*. 61:285–288.
- Hamby KA, Hernández A, Boundy-Mills K, Zaloma FG. 2012. Associations of yeasts with spotted-wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(14): 4869-2873. doi:10.1128/AEM.00841-12
- Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. 2000. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 38(4):1510-1515. doi:0095-1137/00/\$04.0010
- Heras-Vazquez FJL, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, Rodriguez-Vico F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.* 3:3-9.
- Joshi M, Deshpande JD. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Intl. J. Biomed. Res.* 1(5): 81-97.
- Kast A, Voges R, Schroth M, Schaffrath R, Klassen R, et al. (2015) Autoselection of Cytoplasmic Yeast Virus Like Elements Encoding Toxin/Antitoxin Systems Involves a Nuclear Barrier for Immunity Gene Expression. *PLOS Genetics* 11(5): e1005005. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005005>
- Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A. 1994. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Klok CJ, Harrison JF (2009) Atmospheric Hypoxia Limits Selection for Large Body Size in Insects. *PLOS ONE* 4(1): e3876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003876>
- Kumar BR. 2012. *DNA sequencing: Methods and applications*. Intech. Rijeka, Croatia. ISBN 978-953-51-0564-0.
- Kurtzman CP, Fell JW. 2005. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. In: *The Yeast Handbook*, Gábor P, de la Rosa CL (eds). Springer, Berlin, pp. 11–30. ISBN 3-540-26100-1.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 2006. *Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology*. In: Rosa, C.A. and Peter, G (eds) *The Yeast Handbook*. Springer-Verlag Berlin Herdelberg, Germany, pp 11-30.
- Liu W, Li LP, Zhang JD, Li Q, Shen H, Chen SM, HE LJ, Yan L, Xu GT, Mao AN M, Jiang YY. (2014). Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole. *PloS one.* 9. e103442. [10.1371/journal.pone.0103442](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103442).
- Lobo, I. (2008) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nat. Ed* 1(1):215
- Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. 1997. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (3): 369-400. doi: 0893-8512/97/\$04.0010
- Magliani W, Conti S, Frazzi R, Ravanetti L, Maffei DL, Polonelli L. 2006. Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Curr. Mol. Med.* 5(4):443–452. doi:10.2174/1566524054022558
- Morais PB, Martins MB, Klaxzko LB, Mendonça-Hagler LC, Hagler AN. 1995. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(12):4251-4257. doi: 0099-2240/95/04.0010
- Muccilli S, Restuccia C. 2015. Bioprotective role of yeast. *Review. Microorganisms* 3:588-611. doi:10.3390/microorganisms3040588.

- Nguyen NH, Suh SO, Blackwell M. 2007. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycol.* 99 (6): 842–858. PMID 18333508. doi:10.3852/mycologia.99.6.842.
- Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 64 (1): 34–50. doi:10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000
- Oyeka CA, Ugwu LO 2002. Fungal flora of human toe webs. *Mycoses* 45 (11–12): 488–491. doi:10.1046/j.1439-0507.2002.00796.x
- Perez MF, Contreras L, Garnica NM, Fernández-Zenoff MV, Farías ME, Sepulveda M. 2016. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *Research Article PLoS ONE* 11(10): e0165590. doi:10.1371/journal.pone.0165590
- Platania C, Restuccia C, Muccilli S, Cirvilleri G. 2012. Efficacy of killer yeast in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiol* 30(2012):219-225.
- Purwitasari E, Pangastuti A, Setyaningsih R. 2004. The influence of growth media to the protein content of *Saccharomyces cerevisiae* in producing single cell protein. *Bioteknolog* 1(2):37-42. doi: 10.13057/biotek/c010202
- Reuter M, Bell G, Greig D. 2007. Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. *Curr. Biol.* 17: R81–R83.
- Satwika D, Klassen R, Meinhardt F. 2012. Anticodon nuclease encoding virus-like elements in yeast. Mini review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:345-356. doi: 10.1007/s00253-012-4349-9
- Scotch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque A, Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *PNAS* 109(16):6241-6246.
- Spencer JFT, de Spencer ALR, Laluce C. 2002. Non conventional yeast. Mini review. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 58:147-156. doi: 10.1007/s00253-001-0834-2
- Stam JC, Kwakman J, Meijer M, Stuitje AR. 1986. Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of *Kluyveromyces lactis*: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nucl. Ac. Res.*14(17): 6871-6883.
- Starmer WT, Fogleman JC. 1986. Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat. *J. Chem. Ecol.* 12:1037–1055.
- Suh SO, McHugh JV, Pollock DD, Blackwell M. 2005. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycol. Res.*109 (3): 261–265. doi:10.1017/S095375620500238
- U.S. Department of Energy Office of Science. 3 June 2009. Fuel Ethanol Production: GSP Systems Biology Research Genomic Science Program.
- Walker K, Skelton H, Smith K. 2002. Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *J of Cutan Pathol.* 29(10):616–618. doi:10.1034/j.1600-0560.2002.291009.x
- Yaguchi A, Rives D, Blenner M. 2017. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance. *AIMS Microbiol* 3(2):227-2427. doi:10.3934/microbiol.2017.2.227.
- Young TW, Yagiu M. 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek.* 44 (1): 59–77. doi:10.1007/BF0040007.