



ISBN 978-85-66836-16-5

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE TOXINA *KILLER* PRODUZIDA POR *Aureobasidium pullulans* PARA CONTROLE DE PATÓGENOS DE PÓS-COLHEITA EM CITROS/Partial purification of *killer* toxin produced by *Aureobasidium pullulans* to control postharvest pathogens in citrus. F.L. POLLETTINI^{2,3}; L.P. FERRAZ^{2,3}; V.S. MOURA^{2,3}; M.V. MAZZI⁴; K.C. KUPPER^{2,3}. ²Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico (LFCB), Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC /³Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal)/⁴Fundação Hermínio Ometto (UNIARARAS/Araras). E-mail: fla_poletini@hotmail.com

Aureobasidium pullulans é um microrganismo ubíquo, facilmente encontrado em vários nichos ecológicos, incluindo solo, água e tecido vegetal. Moléculas extracelulares produzidas por essa levedura lhe conferem resistência e tolerância a ambientes desfavoráveis. Por apresentar características fisiológicas diferentes, essa levedura tem aplicação em muitas áreas biotecnológicas. *A. pullulans* também apresenta ação contra diversos patógenos de pós-colheita, como *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *P. expansum* e *Rhizopus stolonifer* através de mecanismos de ação como, competição por nutrientes, produção de metabólitos e enzimas hidrolíticas. Estudos anteriores realizados no LFCB mostraram que um isolado de *A. pullulans* (ACBL-77) apresentou atividade *killer* a uma levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006, além de ter sido eficiente no controle *in vivo* da podridão azeda em frutos cítricos. Portanto, esse trabalho teve por objetivo a purificação parcial desta toxina e, conseqüentemente, verificar a sua atividade antagônica sobre patógenos de pós-colheita (*Geotrichum citri-aurantii* e *P. digitatum*). Inicialmente, a atividade *killer* da levedura foi testada *in vitro* contra os patógenos em meio ácido YEPD-MB (pH 4,6) contido em placas de Petri. Posteriormente, as proteínas extracelulares produzidas pela levedura foram precipitadas com álcool etílico gelado (2:1 v/v) e a quantificação total de proteínas foi determinada pelo Método do biureto. O peso molecular das proteínas presentes no precipitado foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida (13%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (20mA, 100V). Aproximadamente 100mg do precipitado proteico foram submetidos a cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-75 e formiato de amônio (0,05M, pH 6,0) em fluxo contínuo (0,5 mL/min, 2mL/tubo). As frações referentes aos picos foram reunidas, concentradas e testadas quanto à atividade *killer* e os pesos das proteínas de cada amostra foram estimados novamente por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A cromatografia apresentou uma resolução de quatro picos (F1, F2, F3 e F4), conseguindo uma purificação parcial das proteínas confirmada pela eletroforese. A atividade *killer* foi observada nas amostras F2, F3 e F4 contra *S. cerevisiae* (levedura sensível) e contra *P. digitatum*. Conclui-se que, a toxina *killer* encontra-se em uma das amostras que apresentaram atividade contra os microrganismos.

Palavras-chave: *Geotrichum citri-aurantii*; *Penicillium digitatum*; Cromatografia; Controle biológico

¹Apoio: Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, Faculdade de Ciências agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal), Fundação Hermínio Ometto (UNIARARAS/Araras), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).