



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613746-6 A2**

(22) Data de Depósito: 13/07/2006
(43) Data da Publicação: 08/02/2011
(RPI 2092)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82
C12N 15/29
C07K 14/415

(54) Título: **POLIPEPTÍDEO EXTRAÍDO DE PLANTAS DO GÊNERO LUPINUS OU PRODUZIDO DE FORMA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS QUE O CODIFICA E SUA UTILIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO ANIMAL, COMO PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E NA LUTA CONTRA FUNGOS PATOGENICOS**

(30) Prioridade Unionista: 21/07/2005 PT 103322, 28/06/2006 PT 103511

(73) Titular(es): Artur Ricardo Nascimento Teixeira, Instituto Superior de Agronomia, Ricardo Manuel de Seixas Boavida Ferreira, Sara Alexandra Valadas da Silva Monteiro, Virgílio Borges Loureiro

(72) Inventor(es): ARTUR RICARDO NASCIMENTO TEIXEIRA, RICARDO MANUEL DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, SARA ALEXANDRA VALADAS DA SILVA MONTEIRO, VIRGÍLIO BORGES LOUREIRO

(74) Procurador(es): Flávia Salim Lopes

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006052403 de 13/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/010459 de 25/01/2007

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO EXTRAÍDO DE PLANTAS DO GÊNERO LUPINUS OU PRODUZIDO DE FORMA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS QUE O CODIFICA E SUA UTILIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO ANIMAL, COMO PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E NA LUTA CONTRA FUNGOS PATOGENICOS Esta invenção está relacionada com a extração de uma proteína das sementes, cotilédones ou plântulas do gênero Lupinus, bem como com o modo de produzi-la de forma recombinante e de expressá-la em plantas geneticamente modificadas. Devido a características excepcionais exibidas por esta proteína no que se refere: a sua potente atividade antifúngica e anti-Oomicetes, que confere a proteína grande potencialidade como fungicida, (2) a sua forte atividade promotora do crescimento de plantas, particularmente notória em plantas doentes ou naturalmente enfraquecidas, (3) a sua resistência extrema à desnaturação, que permite a utilização da proteína em condições de campo, (4) a sua grande susceptibilidade ao ataque proteolítico, que a torna inócua para o ambiente e não tóxica para o homem e (5) a sua composição de aminoácidos bem equilibrada. É reivindicada a sua utilização, ou de qualquer modificação da proteína que mantenha as suas propriedades biológicas, como suplemento em nutrição humana ou animal e como fungicida, insecticida, promotor do crescimento, fertilizante ou na preparação de organismos geneticamente modificados.

POLIPEPTÍDEO EXTRAÍDO DE PLANTAS DO GÊNERO *LUPINUS* OU
PRODUZIDO DE FORMA RECOMBINANTE, SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
QUE O CODIFICA E SUA UTILIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO ANIMAL, COMO
PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E NA LUTA CONTRA FUNGOS
5 PATOGÊNICOS

ÁREA DA INVENÇÃO

Esta invenção está incluída na área da Biologia, com sua aplicabilidade prática como fungicida, inseticida, promotor do crescimento ou fertilizante pertence aos campos
10 das Ciências Agrônomas e Agricultura, e em que a sua aplicabilidade como suplemento na dieta de animais pertence ao campo da Nutrição Humana e Animal.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a um polipeptídeo com
15 propriedades antifúngicas, anti-Oomicetes e propriedades promotoras do crescimento de plantas. extraído de sementes, cotilédones ou plântulas do gênero *Lupinus* e sua aplicação no controle de agentes patogênicos que atacam plantas e como bioestimulante de plantas. Este polipeptídeo pode ser
20 aplicado diretamente em plantas, ou as plantas podem ser geneticamente modificadas para expressarem o polipeptídeo nos seus tecidos. Adicionalmente, devido às suas características inerentes incomuns, o polipeptídeo pode ser utilizado na preparação de concentrados protéicos úteis
25 como suplementos na dieta do homem e outros animais.

A presente invenção também descreve a seqüência de nucleotídeos do DNA correspondente ao fragmento genético que codifica o polipeptídeo de *Lupinus*, bem como a sua seqüência de resíduos de aminoácidos, microorganismos
30 transformados com o fragmento genético que codifica o

polipeptídeo de *Lupinus* e métodos para a sua aplicação como fungicida, inseticida, promotor do crescimento de plantas ou fertilizante ou como suplemento em nutrição humana ou animal.

5 Também é um objetivo desta invenção o polipeptídeo caracterizado pela seqüência de resíduos de aminoácidos referida acima na qual um ou mais resíduos de aminoácidos estão ausentes, foram substituídos ou adicionados, ou que mantém as suas atividades biológicas depois de sofrer
10 modificação química, tal como, por exemplo, glicosilação.

O controle de agentes patogênicos constitui um problema grave em todo o mundo no que se refere às colheitas mais importantes. Os fungos patogênicos são particularmente importantes no que diz respeito ao
15 armazenamento de produtos agrícolas. Atualmente, o controle do crescimento de fungos é geralmente feito por aplicações maciças de fungicidas químicos. No entanto, os produtos fitofarmacêuticos atualmente disponíveis no mercado têm várias desvantagens graves. Por um lado, têm custos
20 econômicos e ambientais elevados; por outro lado, muitas espécies de fungos têm desenvolvido mecanismos de resistência a alguns dos melhores fungicidas, muitas vezes tornando-os obsoletos em alguns anos após a sua introdução no mercado.

25 Apesar das plantas não possuírem um sistema imunológico semelhante ao dos animais, desenvolveram uma resistência inerente ao ataque de fungos patogênicos. Contudo, as técnicas empregadas para o crescimento, colheita e armazenamento de plantas na agricultura moderna
30 freqüentemente promovem condições boas ou ótimas para o

desenvolvimento de patógenos.

Adicionalmente, o número de patógenos microbianos que podem afetar e danificar colheitas é bastante elevado. Como exemplo podem referir-se os seguintes gêneros: *Alternaria*,
5 *Ascochyta*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Diplodia*,
Erysiphe, *Fusarium*, *Gaeumanomyces*, *Macrophomina*, *Nectria*,
Phoma, *Phomopsis*, *Phymatotrichum*, *Phytophthora*, *Plasmopara*,
Puccinia, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Uncinula* e *Verticillium*. A
10 aplicação dos fungicidas atualmente disponíveis no mercado
está limitada a alguns destes gêneros e não é uma solução
eficaz no controle de infecções de plantas.

Uma estratégia alternativa na luta contra patógenos microbianos é a identificação e purificação de substâncias de origem biológica com atividade antifúngica potente. A
15 identificação desses compostos envolve pesquisar uma
variedade de organismos, como plantas e microorganismos,
quanto a substâncias que são subsequentemente testadas em
ensaios antifúngicos e, por fim, são isoladas e
caracterizadas.

20 Deste modo já foram isoladas muitas classes de
proteínas antifúngicas, incluindo quitinases, proteínas
ricas em cisteína que se ligam fortemente à quitina, β -1,3-
glucanases, permeatinas, tioninas e proteínas de
transferência de lípidos. Pensa-se que estas proteínas
25 desempenham um papel fundamental nas defesas naturais de
plantas contra o ataque de patógenos.

Na literatura disponível são descritas várias metodologias relativas à utilização de proteínas antifúngicas, extraídas de plantas ou microorganismos, quer
30 para aplicação direta nos agentes patogênicos quer em

plantas transgênicas que expressam essas proteínas. As proteínas antifúngicas mais frequentemente utilizadas nestas metodologias incluem quitinases, glucanases, proteínas do tipo osmotina e lisozimas. Vários estudos
5 demonstraram que plantas geneticamente modificadas que super-expressam estas proteínas exibem resistência acrescida a muitos patógenos (EP 0392 225).

Técnicas modernas da Biologia Molecular permitiram o desenvolvimento de tecnologia de DNA recombinante e, conseqüentemente, transformação de plantas com genes que
10 codificam proteínas antifúngicas. Este procedimento envolve, habitualmente, a inserção do gene que codifica a proteína de interesse num tecido de uma planta, seguida de regeneração de uma planta completa a partir do tecido de
15 planta geneticamente modificado.

Todavia, a atividade de algumas destas proteínas é reduzida pela presença de íons, em particular potássio, sódio ou cálcio. Por este motivo, apesar das proteínas poderem exibir uma atividade antifúngica potente em ensaios
20 *in vitro*, podem ser ineficazes *in vivo* devido às elevadas concentrações fisiológicas dos íons que podem ocorrer naturalmente nos tecidos das plantas transformadas.

O documento "Ramos, Paula Cristina Rodrigues, et al. - "Accumulation of a lectin-like breakdown product of beta-conglutin catabolism in cotyledons of germinating *Lupinus albus* L. seeds" *Planta* (Heidelberg), volume 203, nº 1,
25 1997, páginas 26-34" descreve o isolamento e purificação de um polipeptídeo de 20 kDa que é um produto de degradação intermediário do catabolismo da beta-conglutina, a proteína
30 de reserva semelhante à vicilina, que interage com uma

variedade de glicoproteínas e possui atividade do tipo lectina. Na Tabela 1 deste documento são descritas várias seqüências de aminoácidos N-terminais, incluindo a do polipeptídeo de 20 kDa isolado de sementes de *L. albus*. No
5 entanto, a seqüência N-terminal apresentada na Tabela 1 deste documento inclui exclusivamente a identidade dos resíduos nº 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20 e 23. Isto corresponde a um total de 15 resíduos dos 173 resíduos de aminoácidos que compõem a seqüência (B) da
10 presente invenção. De fato, a seqüência N-terminal deste documento não é a responsável pelas propriedades biológicas relacionadas com o polipeptídeo da presente invenção. Além disso, a seqüência N-terminal descrita no documento referido é destinada a ser utilizada para construir
15 "primers" adequados, que então podem ser utilizados em biologia molecular como primeiro passo do processo longo e incerto de sequenciação de genes e proteínas, ao passo que o objetivo principal da presente invenção é revelar um polipeptídeo que exhibe várias atividades biológicas.

20 O documento "Database UniProt [Online] 16 de Agosto de 2004 (2004-08-16) - "Beta-conglutin"" revela uma proteína obtida de *Lupinus albus*, especialmente beta-conglutina. Esta proteína é a principal proteína de reserva de sementes presente em sementes de *Lupinus*. Apesar de ser a precursora
25 do polipeptídeo com a seqüência (B), de acordo com a presente invenção, estes dois polímeros correspondem a moléculas distintas por alguns motivos, especialmente a) a beta-conglutina é considerada uma proteína, com uma estrutura quaternária típica, ao passo que a molécula com a
30 seqüência B não deve ser considerada uma proteína mas sim

um polipeptídeo; b) a beta-conglutina, tal como a grande maioria das proteínas, é facilmente destruída por condições severas. Em oposição, o polipeptídeo da presente invenção é extremamente resistente à desnaturação, suportando ebulição prolongada, tratamento com ácidos ou bases fortes, detergentes e solventes orgânicos. Adicionalmente, é resistente à radiação ultravioleta solar; c) estas duas moléculas desempenham papéis completamente diferentes na natureza - enquanto a beta-conglutina é uma proteína de reserva de sementes, o polipeptídeo da presente invenção tem um papel protector na planta, exibindo uma potente atividade antifúngica e uma atividade promotora do crescimento. Por outro lado, enquanto a beta-conglutina possui atividades catalíticas fortes de quitosanase e quitinase, o polipeptídeo da presente invenção exibe atividade catalítica de beta-N-acetil-D-glucosaminidase e um nível baixo de atividade de quitosanase.

O documento "Database UniProt [Online] 24 de Maio de 2005 (2005-05-24) - "Vicilin-like protein (fragment)"" revela um fragmento (comprimento: 531 resíduos de aminoácidos; massa molecular: 62 032 Da) da mesma proteína (isto é, beta-conglutina) descrita no documento anterior (comprimento: 533 resíduos de aminoácidos; massa molecular: 62 130 Da). Em consequência, todos os comentários feitos acima relativamente a este documento aplicam-se igualmente ao documento em análise.

Em conclusão, torna-se imperativo a identificação e purificação de novos compostos de origem biológica que exibem propriedades antipatogênicas na luta contra os patógenos que afetam plantas. Deve ser dada importância

particular aos compostos que são eficazes numa gama larga de patógenos e que mantêm a atividade biológica em condições *in vivo*.

As práticas agrícolas têm sido otimizadas, durante um
5 longo período de tempo, para promover o crescimento e desenvolvimento de plantas e para aumentar a produção das colheitas. Por outro lado, é previsível que, a médio até longo prazo, possa haver escassez de alimentos em muitas áreas do globo. As técnicas correntes para controlar o
10 crescimento de plantas em condições ambientalmente controladas são dispendiosas e requerem equipamentos complexos. Por estes motivos, muitos investigadores têm pesquisado e relatado substâncias fisiologicamente ativas, naturais ou sintéticas, que exibem um efeito de reforço no
15 crescimento e desenvolvimento de colheitas. No entanto, apenas algumas destas substâncias tiveram aplicação prática em condições agrícolas reais. Em conseqüência, também é cada vez mais importante descobrir ou desenvolver promotores do crescimento de plantas ecologicamente
20 corretas e sem toxicidade para o homem, animais e meio ambiente.

As vagens de leguminosas ou, mais especificamente, as suas sementes são consideradas em todo o mundo a principal fonte de proteínas para nutrição animal e humana. A este
25 respeito, a soja tem um papel predominante, não só pelo elevado teor protéico e qualidade das suas sementes mas também pela sua riqueza em óleo. Todavia, do ponto de vista agrícola, a soja requer solos férteis e um fornecimento de água abundante. As plantas pertencentes ao gênero *Lupinus*
30 conquistaram, ao longo das últimas décadas, uma posição

relevante, forte e de grandes potencialidades em comparação com a soja. Se, por um lado, as suas sementes possuem níveis de proteínas e óleo comparáveis aos da soja, por outro lado, as suas espécies estão bem adaptadas a solos pobres e a condições de baixa disponibilidade de água. Por estes motivos, os tremoçoceiros têm sido considerados, por vezes, os "parentes pobres" da soja.

O nível elevado de alcalóides que são tóxicos para animais e que estão naturalmente presentes em tremoços tradicionais do tipo selvagem tem atrasado, desde há muito, a cultura generalizada de espécies de *Lupinus* e a utilização das suas sementes para consumo animal e humano. Este é o principal motivo por que a cultura do tremoço tem ficado muito aquém da cultura da soja. Em Portugal, por exemplo, o consumo tradicional de tremoços tem estado associado, desde há muito tempo, à ingestão de cerveja. Estas sementes são primeiramente fervidas em água (o aquecimento a 100°C destrói a capacidade de germinação das sementes mas não bloqueia o processo de imbibição) e depois são imersas em água corrente durante alguns dias, para remover os alcalóides tóxicos. No entanto, a aplicação recente de técnicas de cultura permitiu o desenvolvimento das denominadas variedades de tremoçoceiros doces, caracterizadas por conterem um baixo teor de alcalóides nas sementes (< 0,004% p/p), em oposição às culturas amargas tradicionais (teor de alcalóides > 0,004% p/p). Por este motivo, os tremoços de variedades de tremoçoceiros doces podem ser utilizados com segurança na alimentação humana e animal.

Em conseqüência, é previsível um desenvolvimento

crescente de produtos alimentícios derivados de tremoceiros para nutrição humana e animal, como aconteceu algumas décadas atrás com a soja. Isto é particularmente importante no caso de proteínas dos tremoços, albuminas ou globulinas.

5 RESUMO DA INVENÇÃO

Espera-se que a presente invenção resolva o problema técnico associado à identificação e purificação de compostos de origem biológica que sejam capazes de controlar uma larga gama de agentes patogênicos que afetam colheitas e que atuem como promotores do crescimento de plantas mantendo as suas atividades biológicas em condições *in vivo*.

A solução baseia-se na caracterização e identificação de um polipeptídeo presente em plantas pertencentes ao gênero *Lupinus* que exhibe as seguintes características incomuns: (i) uma atividade antifúngica e anti-Oomicetes potente, que confere grande potencialidade como fungicida; (ii) uma forte atividade promotora do crescimento de plantas, particularmente notória em plantas doentes ou naturalmente enfraquecidas; (iii) uma resistência extrema à desnaturação, que permite a sua utilização em condições de campo; (iv) uma susceptibilidade muito elevada à proteólise, que o torna inócuo para o ambiente e não tóxico para o homem e animais, e (v) uma composição de aminoácidos bem equilibrada.

Em conseqüência, o primeiro aspecto da presente invenção refere-se ao polipeptídeo com a seqüência B

(5' KIRVLER FDQRTNRLN LQNYRIVEFQ SKPNTLILPK HSDADYVLVV
 LNGRATITIV NPDRRQAYNL EYGDALRIPA GSTSYILNPD DNQKLRVVKL
 30 AIPINNPGYF YDFYPSSTKD QQSYFSGFSR NTLEATFNTR YEEIQRIILG NED

3').

Um segundo aspecto da presente invenção diz respeito a um fragmento de DNA que codifica esse polipeptídeo. A invenção também se refere à utilização do polipeptídeo, ou de qualquer preparação que o contenha, como fungicida, inseticida, promotor do crescimento ou fertilizante, quer por aplicação direta em forma recombinante quer por expressão em organismos geneticamente modificados. Por fim, a invenção considera a utilização do polipeptídeo, ou de qualquer preparação que o contenha, como um suplemento em nutrição humana ou animal.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

Figura 1 - Folhas de videira altamente infectadas com oídio foram pulverizadas com água (folha da direita) ou com a proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* (folha da esquerda). (A) 24 horas após a pulverização; (B) 2 meses após a pulverização.

Figura 2 - Observações por microscopia óptica da germinação de esporos do fungo responsável pelo oídio em videiras. Os esporos fúngicos foram cuidadosamente removidos da superfície de folhas jovens de videira infectadas e foram inoculados em agar água 0,6% (p/v). (A), (B) e (C) - Controles; (D) e (E) - adição de 200 µg da fração protéica total de uvas maduras que contém proteínas relacionadas com a patogênese (PR); (F) e (G) - adição de 200 µg da proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus*. Cada ensaio foi observado após 24 e 48 horas. Empregou-se microscopia por contraste de fase e a ampliação utilizada foi 125X.

Figura 3 - Observações em microscópio metalúrgico de

folhas de videira. (A) Folhas saudáveis; (B) folhas infectadas com oídio; (C) folhas infectadas com oídio 12 horas após pulverização com a proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus*. A ampliação utilizada está especificada em cada fotografia.

Figura 4 - Efeito do polipeptídeo de *Lupinus*, produzido de forma recombinante em *Escherichia coli*, na germinação e desenvolvimento de esporos de *Uncinula necator*, o agente causador do oídio.

Figura 5 - Roseiras na mesma fase de desenvolvimento foram pulverizadas com água (roseira da direita) ou com uma solução que continha o polipeptídeo extraído de *Lupinus* (200 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL; roseira da esquerda). A fotografia mostra a fase de desenvolvimento de ambas as plantas três semanas após a pulverização.

Figura 6 - Plantas de melancia criadas num viveiro. Seis semanas após o início da germinação, as plantas foram pulverizadas com água (controle; A), um extrato bruto de *Lupinus* que continha 100 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL (B), um promotor do crescimento de plantas comercialmente disponível no mercado (concentração recomendada pelo fabricante) (C), e um extrato em bruto de *Lupinus* que continha 200 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL (D). Monitorizou-se a experiência durante duas semanas e fotografou-se as plantas.

Figura 7 - Perfil típico da insolubilidade das globulinas de plantas do gênero *Lupinus* em função das concentrações de cálcio e magnésio. Este perfil é exemplificado para o efeito destes cátions na auto-

agregação da proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* (■) e de β -conglutina de *Lupinus* (○). β -Conglutina (0,5 mg.mL⁻¹; ○) e a proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* (0,5 mg.mL⁻¹; ■) foram purificadas de sementes secas ou de cotilédones separados de plântulas que germinaram e cresceram durante oito dias, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um novo polipeptídeo com propriedades antifúngicas potentes, que exibe uma atividade poderosa na germinação e desenvolvimento de esporos de patógenos fúngicos e de Oomicetes em plantas, e com atividade promotora do crescimento de plantas, particularmente notória em plantas doentes ou naturalmente enfraquecidas. A invenção também considera a utilização do polipeptídeo, ou de qualquer preparação que o contenha, como suplemento em nutrição humana ou animal. A seqüência de nucleotídeos do DNA do fragmento genético que codifica o polipeptídeo de *Lupinus* não partilha nenhuma homologia significativa com nenhuma outra proteína/polipeptídeo antifúngico que tenha sido isolado de plantas. O polipeptídeo de *Lupinus* constitui um novo tipo de polipeptídeo entre as proteínas antifúngicas descritas em plantas.

O polipeptídeo referido na presente invenção é purificado de cotilédones extraídos de plântulas germinadas do gênero *Lupinus*. A presente invenção inclui a descrição da metodologia empregada para isolar o polipeptídeo de tecidos da planta, a seqüência de nucleotídeos do DNA do fragmento genético (A) que o codifica e a seqüência

correspondente de resíduos de aminoácidos (B).

(A)

5' CGTAGACAAAGGAACCCTTATCACTTCAGCTCTCAAAGATTCCAAACTCTTTACAAA
 AATAGGAATGGCAAATCCGTGTGCTCGAGAGGTTTGACCAAAGAACCAATAGACTTGA
 5 GAATCTCCAAACTACCGCATTGTTGAGTTCCAATCAAACCTAACACTCTCATTCTCC
 CTAAACTCTGATGCTGACTACGTCCTCGTTGTACTCAATGGTAGAGCCACAATCACG
 ATAGTAAACCCTGATAGAAGACAAGCATATAACCTTGAGTATGGCGATGCTCTCAGAAT
 CCCAGCTGGCTCAACTTCATATATCCTTAACCCGGATGACAACCAGAAGCTTAGAGTAG
 TCAAGCTCGCAATACCCATCAACAATCCTGGCTACTTTTATGATTTCTATCCATCGAGT
 10 ACTAAAGACCAACAATCCTACTTCAGTGGCTTCAGCAGGAACACTTTAGAGGCCACCTT
 CAATACTCGTTATGAAGAGATACAAAGGATTATTTTAGGGAATGAGGAT3'

(B)

5' KIRVLER FDQRTNRLN LQNYRIVEFQ SKPNTLILPK HSDADYVLV
 LNGRATITIV NPDRRQAYNL EYGDALRIPA GSTSYILNPD DNQKLRVVKL
 15 AIPINNPGYF YDFYPSSTKD QQSYFSGFSR NTLEATFNTR YEEIQRIILG NED
 3'

Este polipeptídeo parece ocorrer naturalmente apenas durante um período de tempo muito curto do tempo de vida de plântulas do gênero *Lupinus*. Os presentes inventores demonstraram que a β conglutina, a principal proteína de reserva das sementes do gênero *Lupinus*, é o precursor biossintético do polipeptídeo de *Lupinus*. De fato, o polipeptídeo de *Lupinus* é um polímero altamente processado que sofreu vários níveis de modificação química. Este fato aumentou tremendamente a dificuldade do seu estudo, incluindo a sequenciação de resíduos de aminoácidos e dos nucleotídeos correspondentes. Durante a formação das sementes, o gene que codifica a β conglutina é transcrito no mRNA correspondente, cuja tradução resulta na síntese do precursor biossintético da β conglutina. Em seguida, este

precursor é extensamente processado, incluindo glicosilação, de onde são produzidas as várias dezenas de diferentes tipos de subunidades que compõem a β conglutina. No ciclo seguinte de crescimento vegetativo, vários dias após o início da germinação, os etapas iniciais do catabolismo da β conglutina envolvem clivagem proteolítica de todas ou da maior parte das suas subunidades constituintes, resultando na acumulação de uma proteína nativa, como subunidade principal, correspondente ao polipeptídeo descrito nesta invenção. Devido às suas propriedades antifúngicas intrínsecas, que são naturalmente exploradas pela planta-hospedeiro, este polipeptídeo é mantido em concentrações muito elevadas nos cotilédones das plantas em desenvolvimento, durante uma fase da vida em que a planta é mais sensível a ataques de fungos e insetos. Passados alguns dias, o polipeptídeo é degradado e os seus aminoácidos são utilizados no crescimento da planta jovem.

O polipeptídeo de *Lupinus* descrito na presente invenção exibe algumas propriedades que o distinguem das outras proteínas antifúngicas descritas na literatura. Isto torna-o num alvo promissor, com grandes potencialidades para o desenvolvimento de um método eficiente para controlar os fungos que afetam plantas e/ou animais:

(1) Atividade antifúngica e anti-Oomicetes potente, que confere ao polipeptídeo grande potencialidade como fungicida,

(2) Forte atividade promotora do crescimento de plantas, particularmente notória em plantas doentes ou naturalmente enfraquecidas,

(3) Resistência extrema à desnaturação, que permite a

utilização do polipeptídeo em condições de campo,

(4) Grande susceptibilidade ao ataque proteolítico, que o torna inócuo para o ambiente e não tóxico para o homem, e

5 (5) Composição de aminoácidos bem equilibrada.

O polipeptídeo também pode ser utilizado como inseticida, promotor do crescimento ou fertilizante, e como suplemento alimentício em nutrição humana ou animal.

Dois problemas práticos da agricultura contemporânea
10 são a redução ou inibição do crescimento observada em plantas doentes ou naturalmente enfraquecidas e a toxicidade normalmente associada aos bioestimulantes disponíveis. O polipeptídeo extraído de tecidos de plantas *Lupinus* exibe uma forte atividade promotora do crescimento
15 no crescimento e desenvolvimento de plantas. De fato, preparações ou extratos de *Lupinus* que contêm o polipeptídeo possuem uma forte atividade bioestimulante em todas as plantas testadas, incluindo, por exemplo, videira, roseira, planta da melancia e tomateiro. Este efeito é
20 notório para concentrações da proteína nativa que contêm o polipeptídeo iguais ou superiores a 200 µg/mL. Os outros componentes presentes em extratos não puros do polipeptídeo de *Lupinus* valorizam as preparações, pois atuam como fertilizante foliar. A ausência de toxicidade do
25 polipeptídeo de *Lupinus* para o homem, animais e meio ambiente indica que as suas aplicações em agricultura não exercem nenhum efeito prejudicial no meio ambiente.

Outro aspecto da presente invenção diz respeito à metodologia utilizada para a produção recombinante do
30 polipeptídeo de *Lupinus* em bactérias, com a finalidade de

expressá-lo de forma constitutiva em plantas geneticamente modificadas. Estas plantas acabarão por exibir um nível elevado de resistência a fungos patogênicos, especialmente no que se refere aos fungos difíceis de controlar (como é o caso dos fungos responsáveis pelas denominadas doenças do lenho), contra os quais os fungicidas tradicionais de aplicação exógena são completamente ineficazes.

O polipeptídeo foi extraído de plântulas de *Lupinus albus* cv. LeBlanc com oito dias de idade. As sementes foram colocadas numa sala com temperatura constante (25°C de dia, 20°C de noite) com um fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuridão.

Após a colheita, os cotilédones foram congelados em nitrogênio líquido. Extraíu-se o polipeptídeo em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, que continha NaCl 10% (p/v), EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 10 mM e EGTA (ácido etileno-glicol-bis(β -aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetracético) 10 mM. Após um período de incubação de 30 minutos a 4°C, o extrato foi centrifugado a 30.000 g, durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi dessalinizado e a proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* foi subsequentemente purificada por FPLC (Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas e Péptidos) - cromatografia de troca aniônica.

A sequenciação N-terminal do polipeptídeo extraído de *Lupinus* foi feita por degradação de Edman. A seqüência obtida de resíduos de aminoácidos foi utilizada para conceber "primers" degenerados. Extraíu-se mRNA total de sementes de *Lupinus albus* em desenvolvimento numa fase em que ocorre a síntese máxima do precursor β conglutina.

Extraiu-se o mRNA utilizando protocolos/kits para a purificação de mRNA de material de plantas. O cDNA correspondente ao fragmento genético que codifica o polipeptídeo extraído de *Lupinus* foi amplificado por PCR (reação em cadeia de polimerase) utilizando os "primers" degenerados previamente concebidos. Utilizando como modelo a seqüência de nucleotídeos obtida conceberam-se novos "primers", e obteve-se a seqüência de nucleotídeos completa do fragmento genético que codifica o polipeptídeo extraído de *Lupinus* pela técnica de 3' e 5' RACE (amplificação rápida das extremidades do cDNA).

O polipeptídeo de *Lupinus* foi produzido de forma recombinante na bactéria *Escherichia coli*. O fragmento genético que codifica o polipeptídeo de *Lupinus* foi clonado num vetor adequado, permitindo a associação do gene de interesse ao promotor *T7lac*. Este promotor é indutivo; em conseqüência, a expressão dos genes a ele associados ocorre exclusivamente na presença do açúcar isopropiltio- β -galactósido. Por fim, as células competentes de *Escherichia coli* foram transformadas.

Como descrito acima, o polipeptídeo de *Lupinus* foi obtido de bactérias numa forma recombinante. No entanto, para ser testado quanto à sua atividade antifúngica, o polipeptídeo recombinante de *Lupinus* teve de ser isolado de todas as outras proteínas/polipeptídeos bacterianos. Para esta finalidade, o polipeptídeo de *Lupinus* foi previamente produzido numa forma recombinante com um cauda de resíduos histidina (Cauda de His). A metodologia empregada para a sua purificação baseou-se na afinidade elevada dos íons níquel para a Cauda de His. Deste modo, com íons de níquel

ligados a uma matriz de agarose, purificou-se o polipeptídeo recombinante sabendo que, de entre todas as proteínas/polipeptídeos presentes no extrato bacteriano total, apenas o polipeptídeo de *Lupinus* se liga à matriz de agarose. Subsequentemente recuperou-se o polipeptídeo de *Lupinus*, após um conjunto adequado de lavagens e eluições, e removeu-se a Cauda de His após tratamento com uma enzima proteolítica apropriada.

A escolha cuidadosa de um promotor adequado é um pré-requisito para a modificação genética de plantas. Estão descritos na literatura vários tipos de promotores que permitem a expressão dos genes associados. Para expressar o fragmento genético que codifica o polipeptídeo descrito na presente invenção, o promotor selecionado pode ser indutivo ou constitutivo, dependendo do tipo de expressão requerida. A escolha do promotor também é importante para dirigir o polipeptídeo sintetizado para o tecido ou compartimento celular selecionado (modificações pós-transcrição).

A transformação de plantas pode ser realizada por diferentes metodologias, tais como, por exemplo, transformação de plantas via *Agrobacterium*, transformação de protoplastos, transferência genética para grãos de pólen, injeção direta em órgãos reprodutores ou embriões imaturos e bombardeamento de partículas. Cada um destes métodos tem vantagens e desvantagens específicas. Ainda assim, todos foram já utilizados em diferentes tipos de plantas.

Para transformar plantas com o fragmento genético que codifica o polipeptídeo de *Lupinus*, o método selecionado foi transformação via *Agrobacterium* (Fraley et al., 1983),

utilizando um vetor de expressão adequado que contém uma região codificadora para o gene de interesse associada a um gene marcador apropriado. A regeneração de plantas, desenvolvimento de plantas e transferência de plantas para o meio de cultura a partir de um único protoplasto podem ser realizadas seguindo várias metodologias disponíveis na literatura. Este processo inclui várias etapas relativas à seleção de células transformadas e à cultura subsequente destas células pelos métodos habituais empregadas no desenvolvimento de culturas embriogênicas. Por fim, as plântulas regeneradas crescem num meio de cultura adequado, habitualmente solo.

Também é um objetivo da presente invenção qualquer formulação agrícola que inclua, como ingrediente ativo, o polipeptídeo com a seqüência B, glicosilado, fosforilado, alquilado e/ou prenilado, ou uma forma recombinante do polipeptídeo obtido por transformação de células caracterizada por ser utilizada na prevenção, controle e luta contra fungos patogênicos ou Oomicetes ou pragas causadas por insetos, ou como promotor do crescimento ou fertilizante.

Outro aspecto da presente invenção está relacionado com os níveis frequentemente reduzidos de proteínas/polipeptídeos de plantas das dietas humana e animal e, alguns casos, com a baixa digestibilidade das proteínas e uma composição de aminoácidos desequilibrada. De fato, preparações em bruto que contêm o polipeptídeo de *Lupinus* possuem não só uma globulina importante (a proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo objetivo da presente invenção) mas também uma variedade de albuminas

que estão naturalmente presentes no material da planta utilizado na extração da proteína. Em consequência, estas preparações brutas do polipeptídeo de *Lupinus* são particularmente ricas em proteínas e podem ser utilizadas
5 como suplemento protéico em nutrição animal ou humana, na forma de tofu (após precipitação de globulinas com cálcio e magnésio) ou na forma de requeijão (após precipitação das albuminas pelo calor).

A análise da composição de aminoácidos do polipeptídeo
10 de *Lupinus* e a sua grande susceptibilidade a todas as proteases testadas (incluindo tripsina, quimotripsina, subtilisina, proteinase K e pronase) indicam que este polipeptídeo tem elevado valor nutritivo para animais. No entanto, o polipeptídeo considerado na presente invenção é
15 uma globulina. Por este motivo, o polipeptídeo de *Lupinus* ou a proteína nativa que o contém é insolúvel em água e em soluções salinas diluídas, mas é rapidamente solúvel em soluções de elevada força iônica. Ainda assim, as globulinas de vagens de leguminosas só são insolúveis na
20 presença de cálcio, magnésio e outros cátions alcalino-terrosos (Ferreira et al., 1999). Estes cátions divalentes, com carga positiva a valores de pH neutro, atuam como pontes eletrostáticas entre moléculas de globulinas com carga negativa, promovendo ou induzindo a sua auto-
25 agregação em complexos que são tão grandes que são insolúveis (Ferreira et al., 1999; Ferreira et al., 2003). O tofu, por exemplo, é uma coalhada semelhante a queijo ou requeijão preparado por adição de íons cálcio e magnésio a um extrato aquecido de soja. Os dois cátions são
30 habitualmente utilizados na preparação de tofu e estão

comercialmente disponíveis na forma de Nigari®. Deste modo, uma preparação em bruto do polipeptídeo de *Lupinus*, contendo globulinas e albuminas, pode ser utilizada na preparação de concentrados de globulinas de *Lupinus* após a sua precipitação com cálcio e/ou magnésio. A Figura 7, por exemplo, mostra o padrão de precipitação da proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo (■) como uma função de concentrações de cálcio e magnésio adicionados. Para fins comparativos também se apresenta o perfil de precipitação da sua proteína precursora, β -conglutina (a principal proteína de reserva presente em sementes de *Lupinus*; ○). As albuminas que permanecem no soro resultante também podem ser recuperadas, por exemplo, por precipitação pelo calor, num processo semelhante ao utilizado na preparação de requeijão (precipitação pelo calor das albuminas do leite que permanecem no soro após a remoção de caseína durante o fabrico do queijo). Deste modo, preparações que contêm o polipeptídeo de *Lupinus* podem ser utilizadas como suplemento protéico na dieta humana ou animal.

Para se entender o potencial da presente invenção seguem-se vários exemplos práticos. No entanto, estes exemplos não são limitadores, no sentido de que poderão ser empregadas metodologias alternativas na utilização do polipeptídeo de *Lupinus* como agente de controle antifúngico e de Oomicetes, como inseticida, como promotor do crescimento, como fertilizante ou como suplemento protéico na dieta humana ou animal.

EXEMPLOS PRÁTICOS

Exemplos 1 e 2 - Efeito da pulverização da proteína nativa que contém o polipeptídeo de *Lupinus* na superfície

de folhas de videira infectadas com o fungo *Uncinula necator* (o agente causador do oídio na videira).

Avaliou-se a atividade antifúngica do polipeptídeo de *Lupinus* após pulverização da superfície de uma folha de videira com uma solução que continha 200 µg da proteína nativa pura que contém o polipeptídeo/mL. Como controle, uma folha semelhante foi pulverizada com água em condições idênticas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1 e mostram que a folha de videira permanece saudável dois meses após a pulverização das folhas com a proteína nativa que contém o polipeptídeo, sem vestígios da presença do fungo, apesar das folhas pulverizadas terem sido mantidas, sempre e permanentemente, em contacto próximo com folhas altamente infectadas.

Realizou-se outro ensaio seguindo uma metodologia idêntica, mas as observações das superfícies das folhas de videira tratadas foram feitas utilizando um microscópio metalúrgico (Figura 3).

Exemplo 3 - Efeito da proteína nativa que contém o polipeptídeo de *Lupinus* na germinação e desenvolvimento de esporos de *Uncinula necator*.

Removeram-se esporos do fungo *Uncinula necator* da superfície de folhas de videira infectadas, tendo sido inoculados em agar água 0,6% (p/v) que continha 200 µg da proteína nativa pura que contém o polipeptídeo de *Lupinus* por mL ou 200 µg da fração protéica total de uvas maduras (que continha proteínas PR) por mL. A germinação dos esporos e desenvolvimento dos tubos germinativos foram monitorizados por microscopia óptica, utilizando o sistema de lente de fase de contraste, durante 24 e 48 horas. Os

resultados obtidos, apresentados na Figura 2, mostram que ocorreu uma redução acentuada na presença do meio que continha o polipeptídeo de *Lupinus*, não só do número de esporos germinados mas também do comprimento dos tubos germinativos. Este efeito é notório quando comparado com o resultado observado na presença das proteínas PR.

Exemplo 4 - Efeito da proteína nativa que contém o polipeptídeo de *Lupinus* na germinação e desenvolvimento de esporos do fungo *Phomopsis viticola* (o agente causador de excoiose na videira).

Esporos do fungo *Phomopsis viticola* foram inoculados em meio PDA (agar dextrose de batata). Passados 15 minutos, os esporos foram removidos e misturados com uma solução que continha a proteína nativa que contém o polipeptídeo de *Lupinus* num volume final de 25 µL. Estas gotículas foram colocadas em placas de Petri e recobertas com lâminas de vidro que foram subsequentemente seladas, criando uma câmara húmida. Monitorizou-se o desenvolvimento dos esporos por observações de microscopia óptica. Foi evidente uma inibição clara da germinação dos esporos. Após 24 horas, as hifas em desenvolvimento sofreram lise.

Exemplo 5 - Efeito do polipeptídeo recombinante de *Lupinus* na germinação de esporos do fungo *Uncinula necator*.

Purificou-se o polipeptídeo recombinante de *Lupinus*, expresso em bactérias, e testou-se a sua atividade antifúngica. Estes ensaios foram realizados como previamente descrito nos exemplos 2 e 3. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 4, mostram que o polipeptídeo recombinante exibiu propriedades antifúngicas idênticas as observadas para o polipeptídeo extraído de

plantas *Lupinus*. Após um período de incubação de 48 horas na presença do polipeptídeo recombinante de *Lupinus* observou-se destruição das paredes celulares dos esporos.

Exemplo 6 - Efeito do polipeptídeo recombinante de *Lupinus* na germinação de esporos do Oomicete *Plasmopara viticola* (o agente causador do míldio).

Removeram-se esporos do Oomicete *Plasmopara viticola* da superfície de folhas de videira infectadas, tendo sido colocados em agar água 0,6% (p/v) que continha 200 µg do polipeptídeo puro recombinante de *Lupinus* por mL. Monitorizou-se a germinação dos esporos durante 48 horas por observações de microscopia óptica. Utilizou-se como controle germinação de esporos em agar água. Após 24 horas, as paredes celulares dos esporos foram destruídas, com libertação concomitante do conteúdo celular.

Exemplo 7 - Efeito da pulverização da proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* em roseiras.

Avaliou-se a atividade bioestimulante da proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo após pulverização das superfícies foliares de uma roseira com um extrato em bruto de *Lupinus* que continha 200 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL. Como controle, uma roseira numa fase de desenvolvimento idêntica e incubada nas mesmas condições ambientais foi pulverizada com água. O resultado obtido, fotografado três semanas após a pulverização, está apresentado na figura 5 e mostra um crescimento superior da planta pulverizada com o polipeptídeo de *Lupinus*, evidenciando um aparecimento prematuro dos primeiros botões florais.

Exemplo 8 - Efeito da pulverização da proteína nativa

que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* em plantas de melancia de viveiro.

Avaliou-se a atividade bioestimulantea do polipeptídeo de *Lupinus* após pulverização das superfícies foliares de plantas de melancia de viveiro com seis semanas de idade com um extrato em bruto de *Lupinus* que continha 200 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL. O ensaio foi realizado em condições de estufa e as plantas foram pulverizadas com água (controle; A); um extrato em bruto de *Lupinus* que continha 100 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL (B); um promotor do crescimento de plantas comercialmente disponível no mercado (concentração recomendada pelo fabricante) (C), e um extrato em bruto de *Lupinus* que continha 200 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL (D). Em cada ensaio utilizaram-se vinte e quatro plantas. O ensaio foi monitorizado durante as duas semanas subseqüentes, e os resultados obtidos estão apresentados na figura 6. As plantas pulverizadas com a concentração mais elevada do polipeptídeo de *Lupinus* (200 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL; D) exibiram o maior desenvolvimento e um crescimento foliar superior em comparação com plantas tratadas com água ou com o promotor do crescimento de plantas comercialmente disponível no mercado. As plantas pulverizadas com a concentração mais baixa do polipeptídeo de *Lupinus* (100 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL; B) exibiram um nível menor de desenvolvimento mas que ainda foi mais elevado do que o observado para as plantas pulverizadas apenas com água. Em conseqüência, o nível de aplicação recomendado consiste em pulverizar as plantas com

uma preparação bruta do polipeptídeo de *Lupinus* que contenha 200 µg de proteína nativa que contém o polipeptídeo/mL.

Exemplo 9 - Efeito da pulverização da proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* em plantas de videira infectadas com *Uncinula necator* (o agente fúngico causador do oídio, economicamente a doença mais importante da videira em todo o mundo).

Preparou-se um extrato bruto de *Lupinus* que continha 200 µg da proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo por mL. Plantas de videira infectadas com *Uncinula necator* e mantidas em condições de estufa foram pulverizadas com o extrato ou com água (controle). Vinte e quatro horas após a aplicação observaram-se as plantas pulverizadas - relativamente ao controle, as plantas pulverizadas com o polipeptídeo de *Lupinus* exibiram mais vigor e revelaram o aparecimento de novos gérmens. Esta situação manteve-se durante pelo menos uma semana, após o que as plantas, previamente enfraquecidas pela presença do fungo, se tornaram exuberantes e com muitas folhas novas sem nenhum sintoma da doença.

Exemplo 10 - Determinação das concentrações ótimas de cálcio e magnésio necessárias para a preparação de um concentrado de proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo do tipo tofu.

A composição de aminoácidos bem equilibrada da proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo, bem como a sua excelente digestibilidade (o polipeptídeo é facilmente hidrolisado nos seus aminoácidos componentes por ação das proteases do trato digestivo humano), salientam o

grande potencial nutritivo do concentrado do polipeptídeo de *Lupinus* preparado após precipitação, com cálcio + magnésio 5 mM, das globulinas presentes numa preparação bruta da proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo (ver figura 7).

REFERÊNCIAS

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffman, N. L., & Woo, S. C. (1983). "Expression of bacterial genes in plant cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **80**, 4801-4807.

Ferreira, R. B., Franco, E., & Teixeira, A. R. (1999). "Calcium- and magnesium-dependent aggregation of legume seed storage proteins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3009-3015.

Ferreira, R. B., Freitas, R. L., & Teixeira, A. R. (2003). "Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is eletrostatic in nature, rather than lectin-mediated". *FEBS Letters*, **534**, 106-110.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA
 DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, Ricardo Manuel
 VALADAS DA SILVA MONTEIRO, Sara Alexandra
 NASCIMENTO TEIXEIRA, Artur Ricardo
 BORGES LOUREIRO, Virgílio

<120> POLIPEPTÍDEO EXTRAÍDO DE PLANTAS DO GÊNERO *LUPINUS*
 OU PRODUZIDO DE FORMA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE
 NUCLEOTÍDEOS QUE O CODIFICA E SUA UTILIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO
 ANIMAL, COMO PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E NA LUTA
 CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS

<130> PPI 34874/06

<150> PT 103322
 <151> 2005-07-21

<150> PT 103511
 <151> 2006-06-28

<160> 2

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
 <211> 519
 <212> DNA
 <213> *Lupinus*

<400> 1
 cgtagacaaa ggaaccctta tcaactcagc tctcaaagat tccaaactct
 ttacaaaaat 60

aggaatggca aaatccgtgt gctcgagagg tttgaccaa gaaccaatag
 acttgagaat 120

ctccaaaact accgcattgt tgagttccaa tcaaaaccta acacttctcat
 tctccctaaa 180

cactctgatg ctgactacgt cctcgttgta ctcaatggta gagccacaat
 cacgatagta 240

aaccctgata gaagacaagc atataacctt gagtatggcg atgctctcag
 aatcccagct 300

ggctcaactt catatatacct taaccgggat gacaaccaga agcttagagt
 agtcaagctc 360

gcaataccca tcaacaatcc tggctacttt tatgatttct atccatcgag
tactaaagac 420

caacaatcct acttcagtgg cttcagcagg aacactttag aggccacctt
caatactcgt 480

tatgaagaga tacaaaggat tatttttaggg aatgaggat 519

<210> 2
<211> 173
<212> PRT
<213> Lupinus

<400> 2

Arg Arg Gln Arg Asn Pro Tyr His Phe Ser Ser Gln Arg Phe Gln
Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Lys Asn Arg Asn Gly Lys Ile Arg Val Leu Glu Arg Phe
Asp
20 25 30

Gln Arg Thr Asn Arg Leu Glu Asn Leu Gln Asn Tyr Arg Ile Val
Glu
35 40 45

Phe Gln Ser Lys Pro Asn Thr Leu Ile Leu Pro Lys His Ser Asp
Ala
50 55 60

Asp Tyr Val Leu Val Val Leu Asn Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ile
Val
65 70 75
80

Asn Pro Asp Arg Arg Gln Ala Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Asp Ala
Leu
85 90 95

Arg Ile Pro Ala Gly Ser Thr Ser Tyr Ile Leu Asn Pro Asp Asp
Asn
100 105 110

Gln Lys Leu Arg Val Val Lys Leu Ala Ile Pro Ile Asn Asn Pro
 Gly

115

120

125

Tyr Phe Tyr Asp Phe Tyr Pro Ser Ser Thr Lys Asp Gln Gln Ser
 Tyr

130

135

140

Phe Ser Gly Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Thr Phe Asn Thr
 Arg

145

150

155

160

Tyr Glu Glu Ile Gln Arg Ile Ile Leu Gly Asn Glu Asp

165

170

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo extraído de plantas do gênero *Lupinus*, com uma seqüência N-terminal [5'RRQRNPYHFS SQRFQTLTKN RNG 3'], caracterizado pelo fato de:

5 (a) a seqüência de resíduos de aminoácidos apresentada em (B);

(B)

5, KIRVLER FDQRTNRLEN LQNYRIVEFQ SKPNTLILPK HSDADYVLVV
 LNGRATITIV NPDRRQAYNL EYGDALRIPA GSTSYILNPD DNQKLRVVKL
 10 AIPINNPYGF YDFYPSSTKD QQSYFSGFSR NTLEATFNTR YEEIQRIILG
 NED₃,

e

(b) A seqüência de resíduos de aminoácidos apresentada em (B) em que um ou mais resíduos de aminoácidos estão
 15 ausentes, foram substituídos, adicionados ou modificados, e o polipeptídeo exibe atividade antifúngica e anti-Oomicetes, atividade promotora do crescimento de plantas e/ou manter as suas propriedades biológicas.

2. Polipeptídeo extraído de plantas do gênero
 20 *Lupinus*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser glicosilado, fosforilado, alquilado e/ou prenilado.

3. Fragmento de DNA que codifica o polipeptídeo da reivindicação 1 caracterizado pelo fato de:

25 (a) a seqüência de nucleótidos apresentada em (A);

(A)

5, CGTAGACAAAGGAACCCTTATCACTTCAGCTCTCAAAGATTCCAACTCTTT
 ACAAAAATAGGAATGGCAAATCCGTGTGCTCGAGAGGTTTGACCAAAGAACCAATAGA
 CTTGAGAATCTCCAAACTACCGCATTGTTGAGTTCCAATCAAACCTAACACTCTCAT
 30 TCTCCCTAAACTCTGATGCTGACTACGTCCTCGTTGTA CTCAATGGTAGAGCCACAA

TCACGATAGTAAACCCTGATAGAAGACAAGCATATAACCTTGAGTATGGCGATGCTCTC
AGAATCCCAGCTGGCTCAACTTCATATATCCTTAACCCGGATGACAACCAGAAGCTTAG
AGTAGTCAAGCTCGCAATACCCATCAACAATCCTGGCTACTTTTATGATTTCTATCCAT
CGAGTACTAAAGACCAACAATCCTACTTCAGTGGCTTCAGCAGGAACACTTTAGAGGCC
5 ACCTTCAATACTCGTTATGAAGAGATACAAAGGATTATTTTAGGGAATGAGGAT₃,

(b) a seqüência de nucleótidos apresentada em (A) em que um ou mais nucleótidos estão ausentes, foram substituídos, adicionados ou modificados, e codifica um polipeptídeo com atividade antifúngica e anti-Oomicetes,
10 atividade promotora do crescimento de plantas e/ou que mantém as suas propriedades biológicas.

4. Vetor recombinante caracterizado pelo fato de conter o fragmento de DNA da reivindicação 3.

5. Célula transformada caracterizada pelo fato de ser transformada com o vetor recombinante da reivindicação
15 4.

6. Célula transformada, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de ser derivada da *Escherichia coli*.

20 7. Célula transformada, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de ser derivada de uma planta, animal ou microorganismo.

8. Planta transgênica caracterizada pelo fato de conter uma célula transformada da reivindicação 5 e pelo
25 fato de exibir resistência a fungos patogênicos, Oomicetes ou pragas causadas por insetos, que é por regeneração da referida célula transformada.

9. Método para produzir o polipeptídeo da reivindicação 1, caracterizado pelo fato de incluir uma
30 cultura de células transformadas das reivindicações 5, 6 ou

7 e a recuperação do polipeptídeo com atividade antifúngica a partir de uma cultura de células ou de um extrato celular.

10. Formulação ou preparação bruta do polipeptídeo
5 caracterizada pelo fato de incluir, como ingrediente ativo, o polipeptídeo das reivindicações 1 ou 2, ou sua forma recombinante obtida da reivindicação 9.

11. Formulação ou preparação bruta do polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato
10 de ser utilizada na prevenção, controle ou luta contra fungos e Oomicetes, patogênicos ou não, pragas causadas por insetos, como promotor do crescimento de plantas e fertilizante.

12. Utilização do polipeptídeo das reivindicações 1
15 ou 2, ou sua forma recombinante obtida da reivindicação 9, na preparação de uma formulação caracterizada pelo fato de se destinar à prevenção, controle ou luta contra fungos e Oomicetes, patogênicos ou não, insetos, como promotor do crescimento de plantas e fertilizante.

20 13. Utilização do polipeptídeo das reivindicações 1 ou 2, ou sua forma recombinante obtida da reivindicação 9, na prevenção, controle ou luta contra fungos e Oomicetes, patogênicos ou não, pragas causadas por insetos, como promotor do crescimento de plantas e fertilizante
25 caracterizada pelo fato de se aplicar na planta um extracto total ou parcial de *Lupinus* que contém o polipeptídeo das reivindicações 1 ou 2, ou sua forma recombinante obtida da reivindicação 9.

14. Utilização do polipeptídeo das reivindicações 1
30 ou 2, ou sua forma recombinante obtida da reivindicação 9,

ou de uma preparação bruta que o contenha caracterizada pelo fato de ser aplicada como bioestimulante ou como promotor do crescimento e desenvolvimento de plantas, em que a atividade bioestimulante é particularmente observável após pulverização da folhagem de plantas naturalmente enfraquecidas ou infectadas com agentes patogênicos.

15. Utilização do polipeptídeo das reivindicações 1 ou 2, ou sua forma recombinante obtida da reivindicação 9, ou de uma preparação bruta que o contenha caracterizada pelo fato de ser aplicada na preparação de concentrados protéicos para nutrição humana ou animal com elevado valor nutritivo, quer após precipitação de globulinas com sais de cálcio e magnésio quer com e sem tratamento físico, como aquecimento para a precipitação de albuminas.

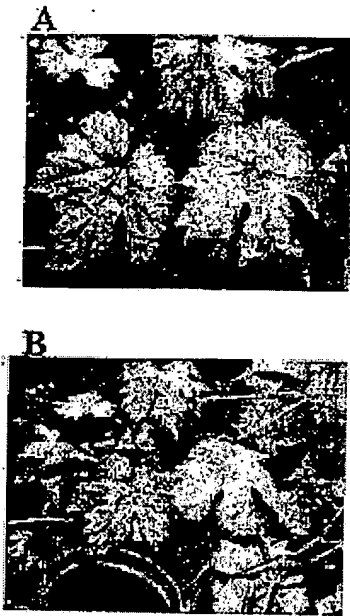


Fig. 1

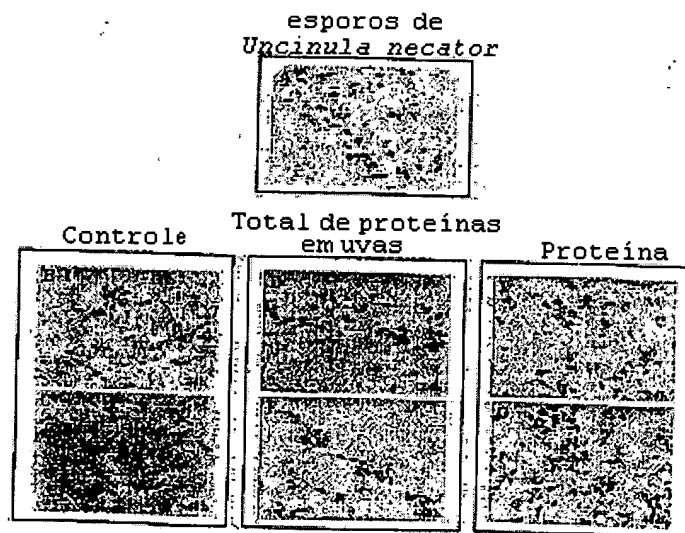


Fig. 2

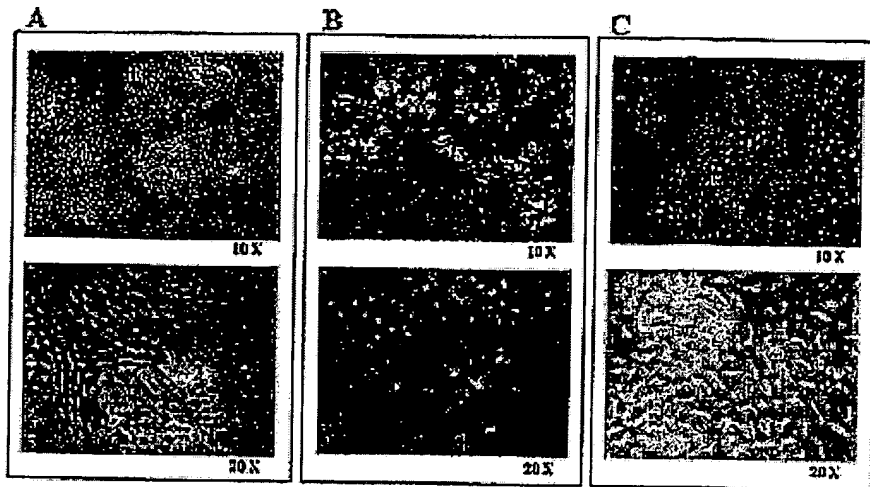


Fig. 3

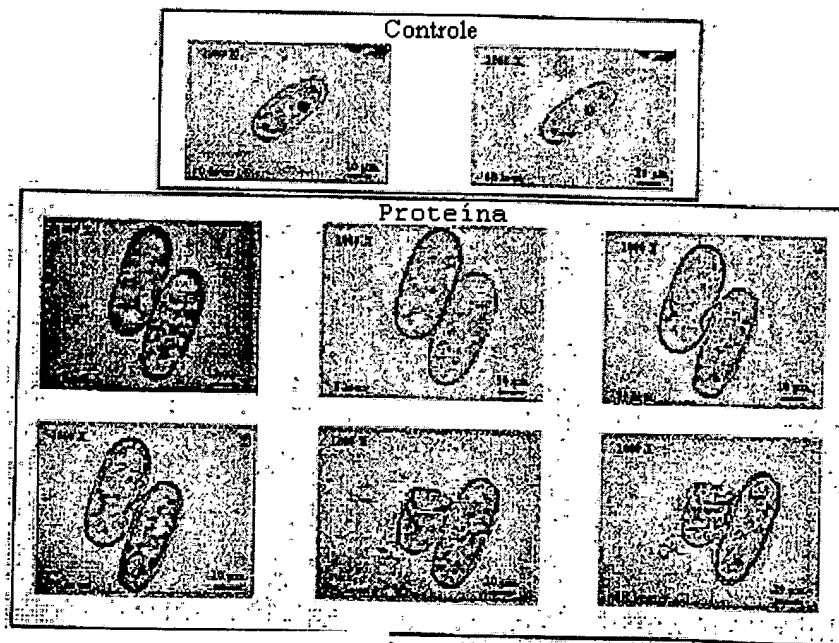


Fig. 4



Fig. 5

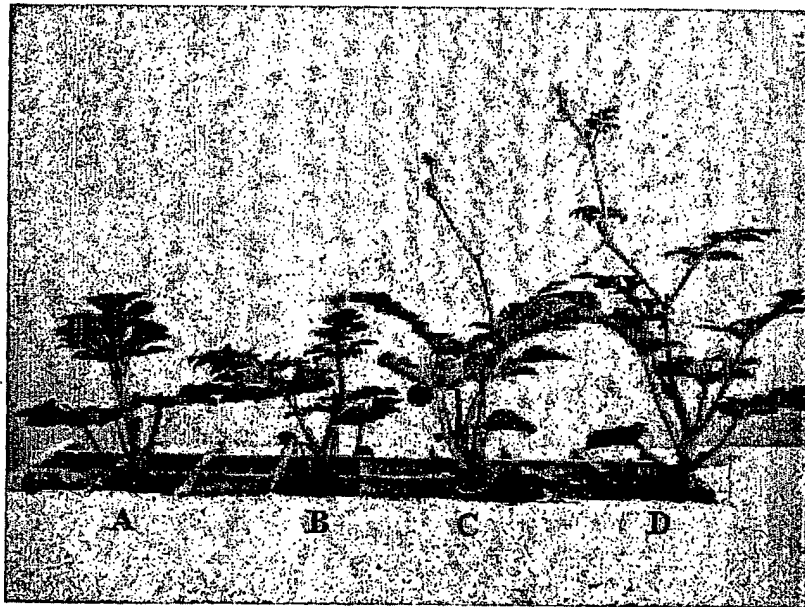


Fig. 6

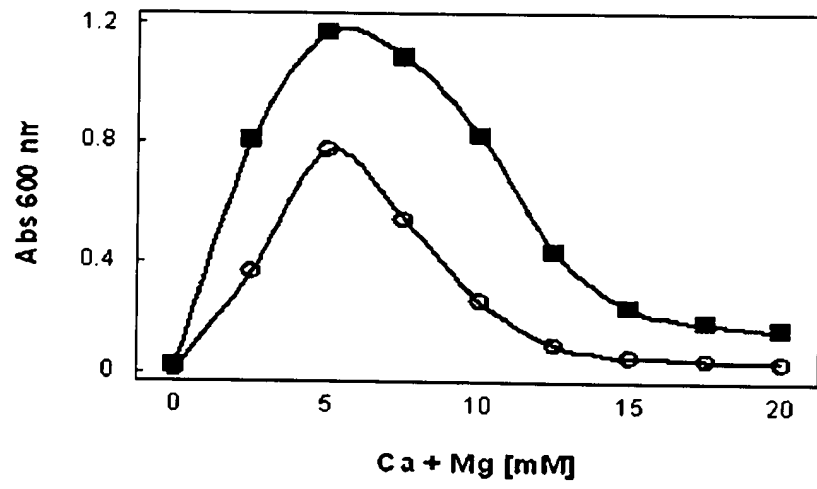


Fig. 7

POLIPEPTÍDEO EXTRAÍDO DE PLANTAS DO GÊNERO *LUPINUS* OU
PRODUZIDO DE FORMA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
QUE O CODIFICA E SUA UTILIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO ANIMAL, COMO
PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E NA LUTA CONTRA FUNGOS
5 PATOGÊNICOS

Esta invenção está relacionada com a extração de uma
proteína das sementes, cotilédones ou plântulas do gênero
Lupinus, bem como com o modo de produzi-la de forma
recombinante e de expressá-la em plantas geneticamente
10 modificadas. Devido as características excepcionais
exibidas por esta proteína no que se refere: a sua potente
atividade antifúngica e anti-Oomicetes, que confere a
proteína grande potencialidade como fungicida, (2) a sua
forte atividade promotora do crescimento de plantas,
15 particularmente notória em plantas doentes ou naturalmente
enfraquecidas, (3) a sua resistência extrema à
desnaturação, que permite a utilização da proteína em
condições de campo, (4) a sua grande susceptibilidade ao
ataque proteolítico, que a torna inócua para o ambiente e
20 não tóxica para o homem e (5) a sua composição de
aminoácidos bem equilibrada. É reivindicada a sua
utilização, ou de qualquer modificação da proteína que
mantenha as suas propriedades biológicas, como suplemento
em nutrição humana ou animal e como fungicida, insecticida,
25 promotor do crescimento, fertilizante ou na preparação de
organismos geneticamente modificados.