

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.705

REQUERENTE: CIBA-GEIGY AG, suíça, industrial, com sede em Klybeckstrasse 141, CH-4002 Basel, Suíça e U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE (USDA-ARS), norte-americana, entidade estatal, com sede em Washington D.C. 20250, Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLO ANTI-PATOGÉNICO À BASE DE ESTIRPES DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS, AGENTES ASSIM OBTIDOS, GENES CODIFICADORES DA SÍNTESE DE ANTIBIÓTICO E UTILIZAÇÃO DOS REFERIDOS ANTIBIÓTICOS"

INVENTORES: JAMES M. LIGON; DWIGHT STEVEN HILL; JEFFREY I. STEIN; CHARLES R. HOWELL; STEPHEN T. LAM, residentes nos Estados Unidos da América do Norte e J. OLE BECKER, residente na República Federal Alemã

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. 20 de Agosto de 1990 e 24 de Maio de 1990, sob os Nos. 570.184 e 705.424 nos Estados Unidos da América do Norte

98.705-

CIBA-GEIGY AG e U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE (USDA-ARS)

"AGENTES DE BIOCONTROLO ANTI-PATOGÉNICO, GENES CODIFICADORES DA SÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS E UTILIZAÇÃO DOS REFERIDOS ANTIBIÓTICOS"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito ao isolamento de estirpes bacterianas purificadas que são eficazes na inibição de patogénios de plantas, incluindo os fungos Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. Estas estirpes são úteis como agentes de biocontrolo e podem ser usadas para produzir metabolitos anti-fúngicos, tais como compostos antibióticos, activos contra o fungo patogénico para plantas Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. Ambas as estirpes bacterianas purificadas e os compostos antibióticos podem ser usados como agentes activos nas composições de biocontrolo. Genes que codificam uma ou mais enzimas úteis na produção de um antibiótico activo contra o fungo patogénico para plantas rhizoctonia solani e Pythium ultimum foram isolados e usados para transformar agentes de biocontrolo que normalmente não são eficazes contra os referidos fungos. Os agentes de biocontrolo transformados podem ser usados para controlar Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. Composições fungicidas compreendendo a combinação de uma estirpe de Pseudomonas fluorescens controladora de

11

doenças biológicas e um fungicida acilalanina são úteis para o controle de fungos.

Campo do Invento

O presente invento está relacionado com a identificação e isolamento de novas estirpes bacterianas que são agentes de biocontrole eficazes. Mais especificamente, o presente invento está relacionado com estirpes bacterianas que se encontram inibirem o crescimento de fungos patogênicos para plantas. Mais especificamente o presente invento está relacionado com estirpes de bactérias anteriormente desconhecidas, tais como membros do gênero Pseudomonas, incluindo membros da espécie Pseudomonas fluorescens, que se encontram produzirem metabolitos anti-fúngicos, tais como compostos antibióticos, que são eficazes contra fungos incluindo os fungos patogênicos para plantas Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. O presente invento está ainda relacionado com o isolamento, identificação e clonagem de genes que codificam a produção das referidas substâncias antibióticas. Mais especificamente, o presente invento está relacionado com genes que codificam substâncias necessárias à biossíntese de uma substância antibiótica que é eficaz contra o fungo patogênico para plantas Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. O presente invento está ainda relacionado com uma composição fungicida compreendendo uma ou mais estirpes de Pseudomonas fluorescens, controladores biológicos de doenças ou um agente de biocontrole obtido a partir das referidas estirpes e um ou mais fungicidas acilalanina juntamente com um veículo aceitável em agricultura.

Sabe-se que culturas crescidas nalguns solos são naturalmente resistentes a certos fungos patogênicos. Ainda, os solos que conduzem ao aparecimento destas doenças podem ser tornados supressores ou resistentes pela adição de pequenas quantidades de solo de um campo supressor. Scher et al., Phytopatology 70:421 (1980). Pelo contrário solos supressores podem passar a condutores de doenças fúngicas através da

autoclavagem, indicando que os factores responsáveis pelo controle da doença são biológicos. Investigação subsequente demonstrou que as bactérias colonizadoras das raízes são responsáveis por este fenómeno conhecido como controle biológico de doenças (BDC). Baker et al., Biological control of plant pathogens, (Freeman Press, san Francisco) (1974).

Em muitos casos, as estirpes mais eficazes de bactérias controladoras biológicas de doenças são *Pseudomonas fluorescens*. Weller et al., Phytopathology, 73:463-469 (1983). Mostrou-se também que estas bactérias promovem o crescimento vegetal na ausência de um fungo patogénico específico através da supressão de microflora prejudicial da rizosfera presente na maior parte dos solos. Kloepper et al., Phytopathology 71:1020-1024 (1981). Agentes patogénicos importantes das plantas que foram eficazmente controlados pela inoculação de sementes com estas bactérias incluem Gaemannomyces graminis, o agente causador de morte súbita do trigo, Cook et al., Soil Biol. Biochem. 8:269-273 (1976) e espécies de Pythium e Rhizoctonia, agentes patogénicos envolvidos no apodrecimento do algodoeiro. Howell et al., Phytopathology 69:480-482 (1979). Rhizoctonia é um agente patogénico para plantas particularmente problemático por vários motivos. Primeiro, ele é capaz de infectar uma larga gama de culturas. Segundo, não existem fungicidas químicos comerciais que sejam eficazes no controle do fungo. Devido a estas circunstâncias, um inibidor contra R. solani será de substancial interesse como potencial controle deste patogénio.

Muitas estirpes de Pseudomonas para o controle biológico de doenças produzem antibióticos que inibem o crescimento de fungos patogénicos. Howell et al., Phytopathology 69:480-482 (1979); Howell et al., Phytopathology 70:712-715 (1980). Estas foram implicadas no controle de fungos patogénicos na rizosfera.

Vários estudos realizados anteriormente focaram o efeito de mutações que resultaram na incapacidade da bactéria ou fungo controlador da doença em sintetizar estes compostos antibióticos. Kloepper et al., Phytopathology 71:1020-1024 (1981); Howell et al., Can. J. Microbiol. 29:321-324 (1983). Nestes casos, a capacidade do organismo para controlar o patógeno é reduzida mas não eliminada. Em particular, Howell et al., Phytopathology 69:480-482 (1979) descreve uma estirpe de Pseudomonas fluorescens que se mostrou produzir uma substância antibiótica que é antagonista de Rhizoctonia solani.

Em Baker et al., Biological Control of Plants Pathogens, (American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.) (1982), páginas 61-106, está descrito que um factor importante no controle biológico é a capacidade de um organismo para competir num determinado ambiente. Assim, é desejável obter estirpes de agentes de biocontrole que sejam eficazes no controle do crescimento de patógenos para plantas, particularmente fungos, tais como Rhizoctonia solani e Pythium ultimum e que sejam capazes de competir agressivamente com bactérias endógenas e outra microflora que exista na rizosfera da planta.

Para se conseguir este objectivo, é ainda desejável obter sequências de DNA que sejam úteis para conferir resistência a Rhizoctonia solani que possam ser usados na manipulação genética de estirpes de agentes de controle biológico que combinem a capacidade de controlar o crescimento de Rhizoctonia com a capacidade de controlar outros patógenos de plantas e/ou a capacidade de competir agressivamente na rizosfera.

Assim, constitui um objectivo do presente invento proporcionar tratamentos fungicidas eficazes para a protecção de culturas relativamente a agentes patogénicos, particularmente

fungos patogénicos, tais como Oomycetes incluindo espécies de Rhizoctonia e Pythium tais como Rhizoctonia solani e Pythium ultimum.

Constitui um outro objectivo do presente invento proporcionar estirpes de biocontrolo de bactérias que possam ser usadas para controlar o ataque patogénico de plantas principalmente de plantas de cultivo.

é uma característica do presente invento proporcionar novas estirpes de bactérias especialmente do género Pseudomonas que sejam úteis na produção de metabolitos antifúngicos, tais como compostos antibióticos, inibidores de patogénicos de plantas, de preferência fungos patogénicos, especialmente Oomycetes incluindo espécies de Rhizoctonia e de Pythium tais como Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. Estas novas estirpes representam na forma purificada agentes de biocontrolo eficazes contra fungos patogénicos para plantas. Eles produzem antibióticos que representam o principio activo. Estes antibióticos podem também ser usados para o controlo de agentes patogénicos de plantas. Assim, é um outro objectivo do presente invento proporcionar agentes de biocontrolo purificados obtidos ou seleccionados a partir de uma das seguintes estirpes de Pseudomonas fluorescens:

- CGA 266446 (ATCC Nº de Acesso 55171);
- CGA 266447 (ATCC Nº de Acesso 55170);
- CGA 267356 (ATCC Nº de Acesso 55169);
- CGA 270293 (ATCC Nº de Acesso 55175);
- CGA 270294 (ATCC Nº de Acesso 55174); e
- CGA 281836 (ATCC Nº de Acesso 55168).

É uma vantagem do presente invento que sejam proporcionados agentes de biocontrole e tratamento fungicida para a protecção eficaz de culturas contra os fungos patogénicos para plantas Rhizoctonia solani e Fythium ultimum.

Constitui um outro objectivo do presente invento proporcionar sequências de DNA que sejam úteis como codificadoras da síntese de compostos antibióticos inibidores de agentes patogénicos para plantas.

Constitui ainda um outro objectivo do presente invento proporcionar genes que possam ser usados para melhorar as capacidades de biocontrole das estirpes de bactérias usadas no biocontrole.

É uma característica do presente invento que sejam proporcionados sequências de DNA e genes que ajudem na produção de uma substância antibiótica que é eficaz contra o fungo patogénico para plantas Rhizoctonia solani.

É uma vantagem do presente invento que sejam proporcionados agentes de biocontrole e genes que sejam activos contra o fungo patogénico para plantas Rhizoctonia solani.

Constitui uma outra vantagem do presente invento que possam ser produzidos agentes de biocontrole capazes de inibir um espectro largo de patogénios de plantas.

É ainda uma outra vantagem do presente invento que possam ser produzidos agentes de biocontrole os quais são capazes de competir agressivamente na rizosfera de plantas, agentes de biocontrole esses que contêm uma sequência de DNA que ajuda na

produção de uma substância antibiótica que é eficaz contra o fungo patogénico Rhizoctonia solani.

De acordo com o presente invento, os objectivos acima podem ser conseguidos através da identificação e isolamento e utilização de novas estirpes de agentes de biocontrolo bacterianos que sejam eficazes contra o fungo patogénico de plantas Rhizoctonia solani e/ou Pythium ultimum e a identificação, isolamento - de preferência a partir dos referidos agentes de biocontrolo - e utilização dos genes que codificam a produção de um antibiótico activo contra o fungo patogénico de plantas Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. A identificação e isolamento de tais agentes e genes de biocontrolo é importante por vários motivos. Primeiro, R. solani é um patogénio de plantas particularmente pernicioso. As plantas afectadas incluem feijoeiro, trigo, tomateiro e batateira para além do algodoeiro. Segundo, não existem tratamentos fungicidas seguros e eficazes ambientalmente para a protecção de culturas contra R. solani. Portanto, a utilização de agentes de biocontrolo incluindo o antibiótico para controlar ou prevenir infecções por R. solani em culturas através da aplicação de um metabolito vivo ou bactéria produtora de antibiótico ou o próprio composto antibiótico, podem proporcionar o primeiro método ambientalmente seguro e eficaz de controlo deste patogénio. Em adição a bactéria pode ser usada para produzir quantidades comerciais de compostos que sejam eficazes no controlo de patogénios de plantas, tais como R. solani.

Ainda, os agentes de biocontrolo do presente invento podem ser usados em misturas conjuntamente com outras estirpes bacterianas que de outra forma não seriam eficazes como agentes de biocontrolo de R. solani e P. ultimum e portanto aumentam a gama de eficácia destas estirpes de biocontrolo. A utilização de agentes de biocontrolo do presente invento em misturas de forma a

aumentar as capacidades de biocontrole de outras estirpes dos agentes de biocontrole da rizosfera é também uma parte do presente invento.

Por exemplo a Patente dos Estados Unidos Nº 4,456,684, (Weller et al.) descreve que a morte súbita, uma doença do trigo causada pelo fungo Gaeumannomyces graminis pode ser controlada nalguns casos pela aplicação de bactérias inibidoras deste patogénio às sementes de trigo antes da plantação. No entanto, sempre que o crescimento de G. graminis está eficazmente sob controle, R. solani pode tornar-se um patogénio do trigo com cada vez mais importância (J. Cook, comunicação pessoal). Assim, os agentes de biocontrole do presente invento podem ser usados com agentes de biocontrole destinados a proteger o trigo da morte súbita e prolongar a sua gama de eficácia para incluir R. solani e P. ultimum.

Os agentes de biocontrole bacterianos do presente invento podem também ser usados em combinação com compostos químicos tais como fungicidas químicos, que sejam compatíveis com as estirpes bacterianas. Entre os fungicidas químicos preferidos encontra-se metalaxil, o qual é eficaz contra Pythium ultimum.

Os agentes de biocontrole bacterianos do presente invento podem também ser úteis para produzir substâncias que possam ser usadas como ingredientes activos em composições antifúngicas para aplicação no habitat dos fungos fitopatogénicos, de preferência às sementes, folhas ou no solo. As substâncias produzidas pelos agentes de biocontrole do presente invento podem ser produzidas de forma conhecida, incluindo revestimento das sementes com uma quantidade eficaz da substância ou aplicação em sulcos da substância directamente no solo. Também se considera que o agente de biocontrole possa ele próprio ser usado como

ingrediente activo nas composições preparadas de forma a não serem fatais para o agente de biocontrolo.

Demonstrámos ainda que os genes que dirigem a biossíntese dos antibióticos podem ser transferidos para outras estirpes bacterianas, especialmente estirpes de *Pseudomonas*, que de outra forma não são agentes eficazes de biocontrolo para *R. solani* e portanto transformam-nas em estirpes de biocontrolo eficazes. A utilização dos genes para melhorar as capacidades de biocontrolo de outras estirpes de biocontrolo da rizosfera está também incluído no invento. Por exemplo, a Patente dos Estados Unidos Nº 4,456,684, (Weller et al.,) descreve que a morte súbita, uma doença do trigo causada pelo fungo *Gaeumannomyces graminis*, pode ser controlada nalguns casos pela aplicação de bactérias inibidoras deste patógeno em sementes de trigo antes da sementeira. No entanto, sempre que o crescimento de *G. graminis* está eficazmente sob controle, *R. solani* pode tornar-se um problema crescente para o trigo (J. Cook, comunicação pessoal). Os genes para a síntese deste antibiótico activo contra *R. solani* poderão ser introduzidos nas estirpes de biocontrolo correntemente empregues para proteger o trigo de morte súbita para prolongar a sua gama de eficácia de forma a incluir *R. solani*.

As sequências de DNA recombinante do presente invento podem ser usadas de forma a produzir uma substância antibiótica que possa ser usada como ingrediente activo em composições antifúngicas para aplicação no solo. Os agentes de biocontrolo recombinantes do presente invento podem ser usados segundo formas conhecidas, incluindo revestimento de sementes com uma quantidade eficaz do agente de biocontrolo ou aplicação em sulcos do agente de biocontrolo directamente no solo. Também é considerado que o agente de biocontrolo possa ele próprio ser usado como

ingrediente activo em composições preparadas de forma a não serem fatais para o agente de biocontrolo.

DEFINIÇÕES

Conforme é usado no presente pedido, os termos que se seguem têm o significado descrito abaixo:

Sequência promotora ou reguladora do crescimento: Uma sequência de DNA não traduzida que aumenta ou de outra forma afecta a transcrição, tradução ou expressão de uma sequência de DNA estrutural associada que codifica uma proteína ou outro produto de DNA. A sequência de DNA promotora está geralmente situada no extremo 5' de uma sequência de DNA traduzida, tipicamente entre 20 e 100 nucleótidos 5' relativamente ao sítio de iniciação da tradução.

Sequência de DNA estrutural ou codificadora: Uma sequência de DNA que é traduzida ou transcrita num organismo para produzir um RNA, uma proteína ou um outro produto de DNA.

Associado com/operacionalmente ligado: Duas sequências de DNA que estejam "associadas" ou "operacionalmente ligadas" estão relacionadas física ou funcionalmente. Por exemplo, uma sequência de DNA promotora ou reguladora é referida como estando "associada com" uma sequência de DNA que codifica um RNA ou uma proteína se as duas sequências estiverem operacionalmente ligadas ou situadas de forma a que a sequência de DNA reguladora afecte a o nível de expressão da sequência de DNA codificador ou estrutural.

Construção quimérica/sequência de DNA quimérica: Uma sequência de DNA recombinante em que uma sequência de DNA

reguladora ou promotora está associada com, ou operacionalmente ligada a uma sequência de DNA que codifica um mRNA ou que é expressa como uma proteína, de tal forma que uma sequência de DNA reguladora é capaz de regular a transcrição ou expressão da sequência de DNA associada. A sequência de DNA reguladora da construção quimérica não está normalmente ligada operacionalmente à sequência de DNA associada como é encontrada na natureza. O termo "heterólogo" é usado para indicar uma sequência de DNA recombinante em que o promotor ou sequência de DNA reguladora e a sequência de DNA associada são isolados a partir de organismos de espécies ou gêneros diferentes.

Acilalaninas: Derivados fungicidas da fenilamida caracterizadas pelo modo de actuação idêntico nomeadamente pelas propriedades controladoras de Oomicetes (Ficomietes). Representantes típicos estão descritos nas Patentes U.S. Nº 4,742,079, 4,151,299, 4,046,911 e em Divulgação de Pesquisa (Agosto 1977) pp 40-41 e na Divulgação de Pesquisa (Nov. 1979) pp632-633.

Metalaxil: Nome comum de um representante típico de um fungicida acilalanina tendo o nome químico N-(2-metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-DL-alaninato. As suas marcas registadas são Ridomil, Apron e (Fubol = mistura com mancozeb). Metalaxil está descrito na Patente US Nº 4,151,299.

Furalaxil: Nome comum de um representante típico de um fungicida acilalanina tendo o nome químico N-(2-furoil)-N-(2,6-xilil)-DL-alaninato. A sua marca registada é Fongarid. Furalaxil está descrito na Patente Britânica Nº 1,44,810. Está também descrito em "The Pesticide Manual" Oitava Edição (1987) p.6840 publicada por The British Crop Protection Council.

Oxadixil: Nome comum de um outro representante químico de um fungicida acilalanina tendo o nome químico 2-metoxi-N-(2-oxo-1,3-oxazolidin-3-il)-acet-2',6'-xilidida. A sua marca registada é Sandofan. Oxadixil está descrito na Patente Britânica Nº 2,058,059. Está também descrito em "The Pesticide Manual" Oitava Edição (1987) p.9175 publicado pelo The British Crop Protection Council.

Benalaxil: Nome comum de um outro representante típico de um fungicida acilalanina tendo o nome químico N-fenilacetil-N-2,6-xilil-DL-alaninato de metilo. A sua marca registada é Galben. Benalaxil está descrito na Patente Alemã Nº 2,903,612. Está também descrito em "The Pesticide Manual" Oitava edição (1987) p.660 publicado por The British Crop Protection Council.

Ofurace: Nome comum de um outro representante típico de um fungicida acilalanina tendo o nome químico α -2-Cloro-N-2,6-xilil-gama-butirolactona. Ofurace está descrito em "The Pesticide Manual" Oitava edição (1987) p.9130 publicado por The British Crop Protection Council.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1: Esta figura mostra os mapas de restrição de três clones de cosmídeos, pANTS, pANT9 e pANT10, que complementam o fenótipo ANT⁻ do mutante 2-1. Nesta figura, 'B' indica um sítio de restrição BamHI; 'E' um sítio de restrição EcoRI; e 'H' um sítio de restrição HindIII.

Figura 2: Esta figura mostra a capacidade de subfragmentos de DNA derivados do clone pANT5 de Pseudomonas fluorescens estirpe 915 para complementar o fenótipo ANT⁻ do mutante 2-1 e as estirpes selvagens 914 e 922. O subfragmento marcado 3 é a região de aproximadamente 11 Kb que foi designada fragmento E11.

A mais "+" indica produção de antibiótico.

A menos "-" indica ausência de produção de antibiótico.

"ND" significa não determinado.

Figura 3: Esta Figura indica os resultados das inserções do transposão Tn5 no fragmento E11 da região do gene do antibiótico. Cada uma das inserções Tn5 está representado como uma linha vertical na sua posição aproximada no mapa genético. Os números acima de cada inserção indicam o número de identificação da inserção. O efeito de cada inserção na produção de antibiótico nas estirpes não produtoras tipo selvagem de Pseudomonas fluorescens está indicado acima do mapa genético no caso dos testados. Um menos "-" indica a ausência de produção de antibiótico, um mais "+" indica produção de antibiótico e um mais/menos "±" indica resultados variáveis.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Numa realização do presente invento são proporcionados agentes de biocontrole purificados que são capazes de inibir o crescimento de fungos patogênicos tais como Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. Estes agentes de biocontrole são preferencialmente estirpes bacterianas purificadas e mais preferencialmente estirpes bacterianas gram negativas, tais como pseudomonas. Os mais preferidos como agentes de biocontrole são estirpes das espécies Pseudomonas fluorescens. O presente invento pode também compreender uma mistura de estirpes bacterianas, em que pelo

menos uma das estirpes bacterianas é um agente de biocontrole purificado. Os agentes de biocontrole purificados do presente invento podem também ser conjugados com outras estirpes bacterianas para a transferência da sua actividade antibiótica.

Os agentes de biocontrole podem ser aplicados em qualquer método conhecido para o tratamento de sementes ou solo com estirpes bacterianas. Por exemplo, ver Patentes dos Estados Unidos Nº 4,863,864. Estes métodos podem incluir inoculação do solo, inoculação de plantas derivadas de semente e revestimento de sementes. As estirpes são eficazes no caso de biocontrole mesmo se a bactéria não estiver viva. No entanto, prefere-se a aplicação da bactéria viva.

Uma outra realização do presente invento proporciona métodos de inibição do crescimento de fungos patogénicos incluindo Oomicetes tais como Rhizoctonia solani e Pythium ultimum. Nos métodos do presente invento, os agentes de biocontrole purificados podem ser aplicados de forma conhecida para serem eficazes na inibição de fungos patogénicos, tais como Rhizoctonia solani e Pythium ultimum, resultando numa estirpe de biocontrole eficaz.

O presente invento engloba composições anti-fúngicas e a sua preparação em que o ingrediente activo é uma substância antibiótica produzida pelo agente de biocontrole recombinante do presente invento (detalhes, ver abaixo) ou é a própria estirpe bacteriana de biocontrole purificada. O presente invento inclui composições antifúngicas e a sua preparação em que o ingrediente activo é o metabolito antifúngico ou composto antibiótico produzido pela estirpe bacteriana de biocontrole purificada do presente invento.

Sempre que o ingrediente activo é uma estirpe bacteriana de biocontrole, a preparação de biocontrole pode ser aplicada de forma conhecida para o tratamento de sementes e de solo com estirpes bacterianas. A estirpe bacteriana pode homogeneamente misturada com um ou mais compostos ou grupos de compostos aqui descritos, desde que tal composto seja compatível com estirpes bacterianas. Compostos preferidos são fungicidas acilalanina e veículos aceitáveis em agricultura. O presente invento também está relacionado com métodos para o tratamento de plantas, de preferência plantas de cultivo, os quais se caracterizam pela aplicação da estirpe bacteriana ou da substância antibiótica produzida pela estirpe ou composições fúngicas contendo a estirpe bacteriana ou a substância antibiótica produzida pela estirpe, às plantas.

O ingrediente activo do presente invento pode também ser um metabolito antifúngico, como seja um composto antibiótico, produzido pelos agentes de biocontrole do presente invento. O presente invento também está relacionado com métodos para o tratamento de plantas, o qual compreende a aplicação às plantas de um metabolito antifúngico, como seja um composto antibiótico ou composições antifúngicas contendo o metabolito.

Os ingredientes activos do presente invento incluindo os referidos metabolitos são normalmente aplicados na forma de composições e podem ser aplicados à área de cultura ou planta a ser tratada, simultaneamente ou em sucessão, com outros compostos. Estes compostos podem ser ambos fertilizantes ou dadores de micronutrientes ou outras preparações que influenciem o crescimento das plantas. Podem ser também herbicidas selectivos, insecticidas, fungicidas (de preferência fungicidas acilalanina), bactericidas, nematicidas, moluscidas ou misturas de várias destas preparações, caso se pretenda juntamente com veículos

aceitáveis em agricultura, tensioactivos ou adjuvantes promotores da aplicação normalmente empregues nas formulações. Veículos e adjuvantes adequados podem ser sólidos ou líquidos e correspondem às substâncias normalmente empregues na tecnologia de formulações, e.g. substâncias naturais ou minerais regeneradas, solventes, dispersantes, agentes molhantes, ligantes ou fertilizantes.

Os métodos preferidos de aplicação de um ingrediente activo do presente invento ou de uma composição agroquímica do presente invento que contenha pelo menos um dos metabolitos antifúngicos produzidos pelas estirpes bacterianas do presente invento são de aplicação foliar, revestimento de sementes e aplicação no solo. O número de aplicações e a frequência de aplicações depende da intensidade da infestação pelo correspondente patogénio (tipo de fungos). No entanto, os ingredientes activos podem também penetrar na planta através das raízes via solo (acção sistémica) impregnando o locus da planta com uma composição líquida ou aplicando os compostos na forma sólida no solo, e.g. na forma granular (aplicação no solo). Os ingredientes activos podem também ser aplicados a sementes (revestimento) por impregnação das sementes com uma formulação líquida contendo ingredientes activos ou revestindo-as com uma formulação sólida. Em casos especiais, são também possíveis outros tipos de aplicação, por exemplo, tratamento selectivo dos ramos ou gomos.

Ainda, surpreendentemente encontrou-se que a aplicação combinada de uma ou mais estirpes de controle biológico de Pseudomonas fluorescens ou de um agente de biocontrole purificado obtido a partir de estirpes de Pseudomonas fluorescens juntamente com um ou mais fungicidas acilalanina apresenta uma actividade significativamente aumentada contra patogénios vegetais da ordem Oomicetes (Ficomietes) incluindo espécies de Phytium e Rhizoctonia.

A actividade conseguida pelas referidas combinações é decididamente superior à actividade que se espera da adição das actividades dos componentes individuais (sinergismo).

Assim, o presente invento está ainda relacionado com uma composição fúngica compreendendo uma ou mais estirpes de controle biológico de Pseudomonas fluorescens ou um agente de biocontrole obtido a partir das referidas estirpes e um ou mais fungicidas acilalanina juntamente com um veículo aceitável em agricultura.

Proporções de misturas favoráveis dos dois princípios activos estirpe de Pseudomonas fluorescens (= I) e o fungicida acilalanina (= II) são: I:II = de 100:1 a 1:100, de preferência de 10:1 a 1:10. Um aumento de actividade é já conseguido quando o fungicida químico é usado em concentrações normais e a estirpe bacteriana é adicionada em quantidades que vão de 50 g a 5Kg a.i. por hectare.

Assim, o termo "agente de biocontrole" usado ao longo da presente especificação e das reivindicações engloba estirpes purificadas de Pseudomonas fluorescens de controle biológico de doenças sózinhos ou em combinação com um ou mais fungicidas acilalanina. O termo ainda engloba o princípio activo incluindo metabolitos antifúngicos, tais como compostos antibióticos sózinhos ou em combinação com um ou mais fúngicidas acilalanina. Neste contexto são preferidas as estirpes de Pseudomonas fluorescens CGA 266446, CGA 266447, CGA 267356, CGA 270293, CGA 270294 e CGA 281836. Os fungicidas acilalanina preferidos são metalaxil, furalaxil, oxadixil e ofurace. É especialmente preferida a combinação com metalaxil.

Os ingredientes activos são usados na forma não modificada ou de preferência juntamente com um veículo aceitável em agricultura. Tais veículos são adjuvantes convencionalmente empregues nas formulações agrícolas e são portanto formulados de forma conhecida em concentrados emulsionáveis, pastas de revestimento, soluções que podem ser vaporizadas directamente ou ainda diluídas, emulsões diluídas, pós molháveis, poeiras, granulados e também encapsulações, por exemplo, em polímeros. Tal como a natureza das composições, os métodos de aplicação, como seja vaporização, atomização, pulverização, dispersão ou rega, são escolhidos de acordo com o objectivo pretendido e circunstâncias prevaletentes. As proporções de aplicação vantajosas são normalmente entre 50 e 500 g de ingrediente activo (a.i.) por hectare ("ha", aproximadamente 2,471 acres), de preferência entre 100 g e 2Kg a.i./ha, preferencialmente entre 200 g e 500 g a.i./ha.

As formulações, composições ou preparações contendo os ingredientes activos e, sempre que adequado, um adjuvante sólido ou líquido, são preparadas de forma conhecida, por exemplo através da mistura homogénea e/ou trituração dos ingredientes activos com aditivos, por exemplo solventes, veículos sólidos e, sempre que adequado, compostos tensioactivos.

Os solventes adequados para composições incluindo as que contêm os metabolitos anti-fungicos produzidos pelas estirpes bacterianas de biocontrolo do presente invento incluem hidrocarbonetos aromáticos, de preferência as fracções tendo 6 a 12 átomos de carbono, por exemplo, misturas de xilenos ou naftalenos substituídos, ftalatos tais como dibutilftalato ou dioctilftalato, hidrocarbonetos aromáticos tais como ciclo-hexano ou parafinas, alcoóis e glicóis e seus éteres e ésteres, tais como etanol, etilenoglicol éter monometílico ou monoetilico, cetonas tais como ciclo-hexanona, solventes fortemente polares tais como

N-metil-2-pirrolidona, dimetilsulfóxido ou dimetilformamida, assim como óleos vegetais epoxidados tais como óleo de coco epoxidado ou óleo de soja; ou água.

Os veículos sólidos usados e.g. para poeiras e pós dispersáveis são normalmente agentes de enchimento minerais naturais tais como calcite, talco, caulino, montemorilonite ou atapulgite. Para melhorar as propriedades físicas é também possível adicionar ácido silícico altamente disperso ou polímeros absorventes altamente dispersos. Veículos adsorventes granulados adequados são do tipo poroso, por exemplo pumice, tijolo partido, sepiolite ou bentonite; e veículos não adsorventes adequados são materiais tais como calcite ou areia. Em adição pode usar-se um grande número de materiais pré-granulados de natureza inorgânica ou orgânica, e.g. especialmente dolomite ou resíduos vegetais pulverizados.

Dependendo da natureza do ingrediente activo a ser usado na formulação, compostos tensioactivos adequados são tensioactivos catiónicos e/ou aniónicos tendo boas propriedades emulsionantes, dispersantes e molhantes. O termo "tensioactivos" também será entendido como compreendendo misturas de tensioactivos.

Tensioactivos aniónicos adequados podem ser sabões solúveis em água e compostos tensioactivos sintéticos solúveis em água. São sabões adequados os sais de metais alcalinos, sais de metais alcalinos terrosos ou sais de amónio não substituídos ou substituídos de ácidos gordos superiores (cadeias de 10 a 22 átomos de carbono), por exemplo sais de sódio ou potássio de ácido oleico ou ácido esteárico, ou de misturas de ácidos gordos naturais que podem ser obtidos por exemplo a partir de óleo de

amendoim ou de sebo. Podem ser usados sais de ácido gordo metilaurino.

Mais frequentemente, no entanto, são usados tensioactivos sintéticos, especialmente sulfonatos gordos, sulfatos gordos, derivados sulfonados de benzimidazole ou alquilarilsulfonatos.

Os sulfonatos ou sulfatos gordos são geralmente na forma de sais de metais alcalinos, sais de metais alcalinos terrosos ou sais de amónio não substituídos ou substituídos e têm um radical alquilo de 8 a 22 átomos de carbono que também incluem partes alquilo de radicais alquilo, por exemplo, o sal de cálcio ou sódico do ácido linho-sulfónico, de dodecilsulfato ou de uma mistura de sulfatos de alcoóis gordos obtidos a partir de ácidos gordos naturais. Estes compostos também compreendem os sais de ésteres do ácido sulfúrico e ácidos sulfónicos de álcool gordo/óxido de etileno. Os derivados sulfonados de benzimidazole de preferência contêm 2 grupos de ácido sulfónico e um radical de ácido gordo contendo 8 a 22 átomos de carbono. São exemplos de alquilarilsulfonatos os sais de sódio, cálcio ou trietanolamina do ácido dodecilbenzeno-sulfónico, ácido dibutilnaftaleno-sulfónico ou do produto de condensação ácido anaftaleno-sulfónico/formaldeído. Também são adequados os correspondentes fosfatos, e.g. os sais são preferencialmente na forma de haletos, metilsulfatos ou etilsulfatos, e.g. cloreto de esteariltrimetilamónio ou brometo de benzildi(2-cloroetil)etilamónio ou sais do éster de ácido fosfórico de um aditivo de p-nonilfenol com 4 a 14 moles de óxido de etileno.

Os tensioactivos não iónicos são preferencialmente derivados de éteres de poliglicóis de alcoóis alifáticos ou cicloalifáticos ou ácidos gordos saturados ou insaturados e alquilfenóis, os referidos derivados contendo 3 a 30 grupos éter

de glicol e 8 a 20 átomos de carbono na parte hidrocarboneto (alifático) e a 18 átomos de carbono na parte alquilo dos alquilfenóis.

Outros tensioactivos não iónicos adequados são os aditivos solúveis em água de óxido de polietileno com polipropilenoglicol, etilenodiaminapropilenoglicol e alquilpolipropilenoglicol contendo 1 a 10 átomos de carbono na cadeia alquilo, aditivos esses que contêm 20 a 250 grupos éter de etilenoglicol e 10 a 100 grupos éter de propilenoglicol. Estes compostos geralmente contêm 1 a 5 unidades de etilenoglicol por unidade de propilenoglicol.

Exemplos representativos de tensioactivos não iónicos são nonilfenolpolietoxietanóis, éteres de poliglicóis de óleo de castor, óxido de polipropileno/polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenoglicol e octilfenoxietoxietanol. Também são adequados como tensioactivos não iónicos os ésteres de ácidos gordos de polioxietilenossorbitano e trioleato de polioxietilenossorbitano.

Os tensioactivos catiónicos são preferencialmente sais de amónio quaternários que têm como N-substituinte, pelo menos um radical alquilo C_8-C_{22} e ainda outros substituintes tais como radicais alquilo inferior não substituído ou alquilo halogenado, benzilo ou hidroxialquilo inferior. Os sais são preferencialmente na forma de haletos, metilsulfatos ou etilsulfatos, e.g. cloreto de esteariltrimetilamónio ou brometo de benzildi(2-cloroetil)etilamónio.

Os tensioactivos normalmente empregues no campo das formulações estão descritos por exemplo em "Mc Cutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publishing Corp. Ringwood,

New Jersey, 1979, e Sisely e Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents", Chemical Publishing Co., Inc. New York, 1980.

As composições agroquímicas geralmente contêm entre cerca de 0,1 e cerca de 99%, de preferência cerca de 0,1 a cerca de 95% e mais preferencialmente entre cerca de 3 e cerca de 90% do ingrediente activo, entre cerca de 1 e cerca de 99,9%, de preferência entre cerca de 1 e cerca de 99% e mais preferencialmente entre cerca de 5 e cerca de 95% de um adjuvante sólido ou líquido e entre cerca de 0 e cerca de 25%, de preferência entre cerca de 0,1 e cerca de 25% e mais preferencialmente entre cerca de 0,1 e cerca de 20% de um tensoactivo.

Se bem que os produtos comerciais sejam preferencialmente formulados como concentrados, o utilizador final normalmente emprega formulações diluídas.

Um fragmento de DNA contendo genes codificadores das características necessárias para a biossíntese de um antibiótico que seja eficaz contra o fungo patogénico para plantas Rhizoctonia solani foi clonado e caracterizado. O fragmento de DNA foi derivado de Pseudomonas fluorescens estirpe 915. Esta estirpe foi isolada a partir de raízes de uma planta do algodoeiro e foi identificada como uma estirpe eficaz de biocontrolo do apodrecimento do algodoeiro induzido por Pythium ultimum e Rhizoctonia solani.

O fragmento de DNA contendo estes genes foi transferido para duas estirpes diferentes de P. fluorescens que se sabe não produzem um antibiótico eficaz contra R. solani e que não são agentes de biocontrolo eficazes para o apodrecimento do algodoeiro induzido por R. solani. Em cada um dos casos estirpes de P. fluorescens portadoras do fragmento do gene antibiótico

demonstraram produção de antibiótico in vitro com base na inibição do crescimento de R. solani em placas de agar. Ainda, as estirpes foram testadas na estufa e demonstrou-se serem eficazes como agentes de biocontrole do apodrecimento do algodoeiro induzido por R. solani.

Numa realização do presente invento, obtiveram-se sequências de DNA recombinante que compreendem uma sequência de DNA estrutural que codifica a produção de uma substância antibiótica que inibe o crescimento do fungo Rhizoctonia solani. Esta sequência de DNA pode derivar de agentes de biocontrole que sejam eficazes na inibição do crescimento de Rhizoctonia. De preferência a sequência de DNA pode derivar do clone pANTS, o qual foi isolado a partir de uma estirpe de Pseudomonas fluorescens. Mais preferencialmente a sequência de DNA pode compreender o fragmento E11 de aproximadamente 11 Kb do pANTS. O clone pANTS foi depositado na ATCC e foi designado ATCC número de acesso 40868. Um plasmídeo contendo o fragmento E11 de 11 Kb do pANTS foi depositado na ATCC e foi designado ATCC número de acesso 40869.

As sequências de DNA recombinante do presente invento podem ser quiméricas e podem ser heterólogas ou homólogas. As sequências de DNA recombinante do presente invento podem ainda compreender uma ou mais sequências de DNA reguladoras operacionalmente ligadas à sequência de DNA estrutural atrás. Tais sequências de DNA reguladoras incluem sequências de promotor, sequências líder e outras sequências de DNA que possam afectar a expressão das sequências de DNA reguladoras, assim como os fragmentos de uma sequência de DNA regulador que seja capaz de actuar com tal efeito.

Numa realização do presente invento, são proporcionados agentes de biocontrole que são capazes de inibir o crescimento de

Rhizoctonia solani. Os agentes de biocontrole podem ser bactérias, células vegetais ou células animais, mas preferencialmente estirpes bacterianas e mais preferencialmente estirpes de bactérias gram negativas tais como Pseudomonas. São especialmente preferidos como agentes de biocontrole as estirpes do género Pseudomonas fluorescens.

Uma outra realização do presente invento proporciona métodos de inibição do crescimento do fungo Rhizoctonia solani. Nos métodos do presente invento as sequências de DNA recombinante codificadoras da inibição do patogénio são introduzidas no genoma de um agente de biocontrole, como seja uma estirpe bacteriana que habitualmente não é eficaz como inibidor do patogénio Rhizoctonia solani, resultando numa estirpe de biocontrolé eficaz.

O DNA na forma de plasmídeo pode ser transferido de uma bactéria para outra por um processo sexuado designado conjugação. Os plasmídeos capazes de serem transferidos por conjugação contêm genes que codificam a síntese de pili sexuais. Os pili sexuais são tubos ocos que ligam a bactéria contendo o plasmídeo (dadora) com uma outra bactéria (a recipiente) e através do qual cópias replicadas do plasmídeo passam do dador para o recipiente. Este processo ocorre naturalmente na natureza e é utilizado no laboratório como um método de transferência de genes de uma bactéria para outra. Para algumas estirpes de bactérias, tais como Pseudomonas, a transferência por conjugação do DNA é o método preferido uma vez que estas bactérias não são facilmente transformadas com DNA estranho.

Ainda numa outra realização do presente invento, são proporcionados métodos para obtenção de uma substância antibiótica que seja eficaz na inibição do crescimento do fungo Rhizoctonia solani. Este método compreende a introdução das

sequências de DNA recombinante do presente invento no genoma de um agente de biocontrole para formar um agente de biocontrole transformado, permitindo que o agente de biocontrole transformado produza uma substância antibiótica e extração da substância antibiótica a partir do agente de biocontrole transformado.

Se bem que o presente invento seja descrito abaixo com referência a realizações específicas, será apreciado que são possíveis numerosas variações, modificações e realizações e portanto, todas essas variações, modificações e realizações devem ser encaradas como estando dentro do âmbito do presente invento.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Colheita de amostras de plantas e do solo

As amostras de plantas e do solo foram colhidas a partir de áreas de crescimento activo do algodoeiro no Texas. As amostras de plantas foram retiradas directamente do campo aproximadamente 3 a 4 semanas após a plantação. As amostras de plantas foram colocadas em sacos de plástico e guardadas numa caixa de gelo até voltarem para o laboratório. As amostras de solo foram colocadas em contentores de plástico de cinco galões com tampas e guardadas a 25°C. Sempre que não foi possível obter amostras frescas de plantas, solo dos campos foi semeado com sementes do algodoeiro e incubado na câmara de crescimento para se obter plantas para amostras.

Exemplo 2: Rastreo preliminar de amostras relativamente à actividade de antibiótico

Fizeram-se diluições seriadas dos sistemas radiculares e do solo aderente de plântulas do algodoeiro até 10^{-7} e amostras de 1 ml foram misturadas com 9 ml de agar fundido do seguinte meio: agar de tripticase-soja, agar nutriente, agar de batata-dextrose, agar do meio de King B e agar de extracto de solo. Segmentos lavados dos sistemas radiculares das plântulas foram também semeados directamente nas placas de agar.

Após um período de incubação de três a quatro dias as placas foram inoculadas com farelo de trigo triturado seco e infestado com Rhizoctonia solani ou pedaços de agar de Fythium ultimum. As placas foram observadas periodicamente relativamente à presença de zonas claras no crescimento de fungos à volta das colónias bacterianas. As colónias apresentando actividade

inibidora ou antibiótica foram semeadas e isoladas e colocadas em cultura com os fungos patogénicos para confirmar a sua actividade antibiótica.

Os antagonistas putativos assim identificados foram classificados numa escala de acordo com a sua actividade antibiótica contra R. solani e P. ultimum em agar nutriente (altamente nutritivo) e agar de extracto de solo (pouco nutritivo). As estirpes que apresentaram boa actividade inibidora num ou mais meios foram guardadas em soro fisiológico a 5°C e em culturas de solo estéreis para manter a sua pureza genética.

Exemplo 3: Estudo dos novos isolados

As estirpes inibidoras foram examinadas com base nas características morfológicas, fisiológicas e antibióticas. As estirpes que se encontrou não serem duplicados de outros isolados foram semeadas a partir da solução de soro fisiológico em placas de agar nutritivo e incubadas durante três dias. As bactérias foram então retiradas das três placas por lavagem com 30 ml de água estéril.

O inóculo de R. solani foi preparado por crescimento do fungo em farelo de trigo estéril humedecido ou painço durante aproximadamente uma a duas semanas, seco ao ar durante vários dias, depois triturado o inóculo até 20 mesh com um moinho Wiley.

O inóculo de P. ultimum foi preparado fazendo crescer o fungo em sementes de painço humedecidas estéreis durante uma semana. O material foi então seco ao ar e dividido em sementes individuais. Como alternativa, o inóculo de P. ultimum pode ser cultivado em culturas líquidas de meio de colesterol-sumo V8 durante aproximadamente 10 dias. Os tapetes de micélio foram

retirados e macerados num misturador manual para se obter apenas ósporos.

Uma suspensão de propágulos pode ser misturada no solo na proporção de 2000 ósporos por grama de solo e o solo incubado durante aproximadamente 6 semanas antes de usar, para ultrapassar o factor de dormência associado aos ósporos frescos.

O solo usado nos testes para a eficácia de biocontrole foi Lufkin Fine Sandy Loam com um pH de 5,7. O solo foi passado através de um filtro com um quarto de polegada e ajustado a 15% de humidade. O solo foi infestado com os patogénios misturando o inóculo e o solo num misturador de cimento durante 20 minutos a numa proporção de aproximadamente 0,15 a 0,4 g de inóculo/13,6 Kg de solo para R. solani e 20,4 g de inóculo/13,6 Kg de solo para P. ultimum. Este material pode ser facultativamente usado durante aproximadamente 3 semanas antes de preparar o material fresco.

O solo infestado foi colocado em canecas de plástico de 20 oz. contendo mechas de gaze em algodão de 2" x 10" passadas através de um furo de 5/8" no fundo. A mecha estende-se até à superfície do solo. Cinco buracos de 2 cm de profundidade foram feitos na superfície do solo em cada chávena à volta da mecha e colocada uma semente de algodoeiro da variedade Stoneville 213 em cada buraco.

Como alternativa o solo infestado com R. solani foi colocado em tabuleiros contendo cerca de 13,6 Kg de solo e estes divididos em quatro secções. Em cada secção foram feitas e semeadas quatro filas de dez sementes, cada semente foi tratada com cerca de 0,5 ml de suspensão de bactérias na semente e cerca de 0,5 ml na superfície do solo e os tabuleiros foram incubados a 25°C com um fotoperíodo de 12 horas durante aproximadamente 14

dias. Cada uma das secções foi regada com aproximadamente 250 ml de água desionizada dia sim dia não. No final daquele período fizeram-se contagens das plantas que surgiram e que sobreviveram.

O solo infestado com oósporos de P. ultimum pode ser colocado em lotes de 5 g em tubos de ensaio contendo cerca de 0,75 ml de água ou suspensão bacteriana e e semeada no centro de cada tubo uma semente de algodoeiro. Dez tubos foram tratados com cada uma das estirpes bacterianas e os tubos foram incubados a cerca de 15°C no escuro durante cerca de 7 dias. Os tubos foram então passados para 25°C e um fotoperíodo de 12 horas durante cerca de 3 a 5 dias. Fizeram-se contagens das plantas que surgiram e sobreviveram. As estirpes bacterianas cujo tratamento resulta em 50% ou mais de sobrevivência das plantulas como média de três testes foram guardadas em 0,375 ml de caldo nutritivo e 0,125 ml de glicerol a -70°C. As culturas destas estirpes, identificadas até à espécie, foram sujeitas a outros testes.

O tratamento da semente e solo consiste em colocar 0,5 ml de suspensão de bactérias das estirpes seleccionadas em cada semente, cobrindo a semente com solo infestado, depois dispersando 3 ml da suspensão bacteriana sobre toda a superfície do solo na chávana. A superfície do solo foi então ligeiramente vaporizada com água e a chávana foi coberta com uma única envoltura de plástico de 0,5 ml presa com um elástico, as testemunhas foram tratadas com água.

As chávanas tratadas e testemunha foram colocadas numa câmara de crescimento com 20°C e um fotoperíodo de 12 horas e um período no escuro a 16°C. Após aproximadamente quatro dias sem água suplementar, retirou-se o plástico envolvente e a mecha foi colocada num reservatório de água de 2,5 polegadas abaixo do fundo da chávana. Após mais uma incubação de seis dias,

fizeram-se contagens das plantulas que surgiram e sobreviveram. Os sobreviventes foram retirados do solo e examinados relativamente ao aparecimento da doença ou efeitos de fitotoxicidade no sistema hipocótilo e radicular.

As estirpes cujo tratamento resulta em 65% ou mais de plantas saudáveis foram guardadas e identificadas sempre que possível pela espécie de acordo com descrições morfológicas e fisiológicas proporcionadas em Bergey's Manual of Determinative Bacteriology assim como com a utilização de testes de identificação, tais como Rapid NFT (da API Analytab Products). Este teste mede uma série de características bioquímicas chave que são usadas para classificar as bactérias. Este kit particular destina-se a distinguir bactérias Gram negativas oxidase-positivas entre as quais se encontra Pseudomonas.

Exemplo 4: Identificação de estirpes eficazes no biocontrolo

a) Retiraram-se amostras numa determinada área com base nos diferentes tipos de solo, diferentes variedades de algodoeiro cultivadas e variações na história de colheitas anteriores. Idealmente as amostras foram retiradas quando a planta do algodoeiro estava na fase de plantula, mas pode ser retirada numa fase mais tardia.

No primeiro despiste foram obtidas 22 plantas e amostras de solo de cinco áreas de crescimento diferentes. Das placas de ensaio com diluições feitas a partir destas amostras de acordo com o Exemplo 2. Isolou-se um total de 114 bactérias e 20 actinomicetes que produziam compostos activos contra R. solani e P. ultimum.

Dos números totais de bactérias, 103 estirpes eram activas contra R. solani em agar nutritivo, enquanto 59 estirpes eram activas em agar de extracto de solo. Do último grupo oito são também activas contra R. solani em agar de extracto de solo, mas não em agar nutriente. Isto indica que aproximadamente 50% do número total de estirpes bacterianas isoladas são activas apenas em agar nutriente, enquanto os outros 50% são activos em ambos os meios.

De entre os isolados que apresentaram actividade contra P. ultimum, 79 eram activos em agar nutriente e 53 em agar de extracto de solo. dentro destes dois grupos 39 são activos apenas em agar nutriente, nove são activos apenas em agar de extracto de solo e 84 são activos em ambos os meios.

Num segundo despiste, um total de 135 isolados foi retirado das placas de diluição de amostras e testados in vitro relativamente à actividade contra R. solani e P. ultimum. Destes 35 são activos contra ambos os patogénios.

Um total de 230 estirpes foi testado na câmara de crescimento relativamente à eficácia como agentes de biocontrolo da podridão de plantas do algodoeiro derivadas de sementes induzida por Pythium ou Rhizoctonia. Destes isolados, 29 deram mais de 65% de plantas que sobreviveram em solo infestado com P. ultimum. Uma série destas estirpes suspeita-se serem duplicados de uma outra com base nos testes de actividade antibiótica e de biocontrolo e noutras caracterizações fisiológicas. Seis estirpes de pseudomonas seleccionadas foram tomadas para estudos posteriores juntamente com 10 actinomicetes produtores de antibióticos. Todas as estirpes de pseudomonas foram identificadas como pertencentes a Pseudomonas fluorescens.

c) Num terceiro rastreio, um total de 359 isolados detectados em placas de diluição foram guardados e estabilizados geneticamente para ensaio na câmara de crescimento para a eficácia de biocontrole. 158 destes isolados foram testados relativamente ao biocontrole de Rhizoctonia solani ou Pythium ultimum. Destes, 13 demonstraram bom biocontrole da doença das plantulas induzida por R. solani ou P. ultimum ou ambos. Estes isolados foram identificados até à espécie, guardados em glicerol a -70°C para estudos posteriores.

Exemplo 5: Cultura de bactérias e fungos para ensaios de rastreio

a) Cultura de bactérias

As culturas bacterianas foram guardadas em 50% glicerol a -80°C antes de usar. Uma ansa da cultura guardada foi ressuspensa em 5 ml de Caldo Luria (LB: 10 g Bacto-Tryptone, Difco; 5 g de extracto de levedura, Oxoid; 0,25 g $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$; 8 g de NaCl; e 1 l de água destilada; pH 7) e agitado a 150 rpm e 25°C durante a noite. 100 ml de meio LB foram inoculados com 1 ml da pré-cultura e incubado nas mesmas condições. 10 ml da última cultura foram centrifugados (10 min. a 10000 rpm) e o sedimento ressuspensa em 200 ml de soro fisiológico (0,8% NaCl) dando uma concentração de aproximadamente 10^8 cfu/ml.

Para a determinação exacta preparou-se uma série de diluições e gotas de 10 μl foram colocadas sobre Agar de Luria (LB com 1,5% de Bacto-Agar, Difco) com uma ponta Eppendorf. As cfu foram contadas após 24 horas de incubação a 28°C .

b) Cultura de Rhizoctonia solani

Rhizoctonia solani foi cultivada em Potato Dextrose Agar (PDA, Difco), pH 5,6 numa placa de petri. Um frasco Erlenmeyer de 300 ml com 25 g de painço e 50 ml de água destilada foi autoclavado e incubado com um pedaço de agar (5 mm de diâmetro) de uma cultura PDA de R. solani. Após incubação a 20°C no escuro durante 3 semanas o painço com a cultura crescida foi seco ao ar e triturado num moinho Culatti (crivo 1 mm, 6000 rpm).

c) Cultura de Pythium ultimum

Pythium ultimum foi cultivado em Malt Agar (Oxoid), pH 5,6 numa placa de Petri. Um pedaço de agar (6 mm de diâmetro) desta cultura foi transferido para uma placa de petri com 8 ml de de agar de farinha de aveia (150 g de farinha de aveia, 3 ml 1,5% de cloosterina e 1 l de água destilada) com uma superfície inclinada. Duas horas mais tarde adicionou-se 13 ml de água destilada estéril e as placas foram incubadas durante 10 a 14 dias no escuro. O micélio que cresceu da superfície de agar para a água foi transferido para um misturador e cortado em pedaços pequenos. A concentração dos oósporos foi contada numa câmara de homa e ajustada com água destilada a 2×10^4 /ml.

Exemplo 6: Realização de ensaios de rastreio

a) Pato-sistema R. solani-algodoeiro

Potes de plástico (200 ml) foram cheios primeiro com uma camada de fundo espessa (1 cm) de Vermex F e depois com uma mistura (7:3 v/v) de solo St. Aubin autoclavado mas recolonizado (passado por crivo de 3 mm) e Vermex F. Sementes de algodoeiro com a superfície previamente esterilizada (Cossypium hirsutum,

cv. Delta Pine) foram incubadas em água aquecida na mão durante 30 minutos e semeadas no solo a uma profundidade de 1 a 1,5 cm. No centro do pote a um cm abaixo da superfície colocou-se 5 mg de pó milho painço infestado com R. solani (ver 2.1.2). Todos os potes foram regados com 60 ml de água cada um.

Duas horas mais tarde cada um dos potes foi ensopado com 20 ml de uma suspensão de bactérias (10^8 cfu/ml, ver 2.1.1) de 20 ml Monceren (1mg WP25/ml) resp. resultando em aproximadamente 7×10^6 cfu/ml de solo ou 20 ppm de Monceren resp. Os potes foram dispostos ao acaso e incubados numa câmara de crescimento marcada para 23 °C à luz do dia (14 horas) e 18°C durante a noite (10 horas) e 50% de humidade relativa. O solo foi mantido húmido.

O aparecimento foi registado após 5, 9 e 13 dias. Após 20 dias a incidência da doença foi avaliada classificando a planta em saudável ("1") ou não germinada ou doente (ambas "0"), se a raiz ou hipocotilo aparecer castanha e podre. Para cada pote com 5 sementes as avaliações foram resumidas resultando num número de "0" (todas as plantas doentes ou não germinadas), "1", "2", "3", "4" ou "5" (as 5 plantas saudáveis). Os números dos cinco potes por tratamento são a média. A eficácia do biocontrole de cada tratamento numa experiência está dado em % em comparação com a testemunha sem tratamento e sem patogénio (NT.NP, definido como 100% do biocontrole) e o controle com patogénio apenas (NT.P, definido como 0% biocontrole).

b) Pato-sistema P. ultimum-algodoeiro

O solo e as sementes foram preparados como descrito na parte a) acima, e os potes foram regados com 50 ml de água cada um. Após 1 hora 20 ml de uma suspensão de oósporos (2×10^4 /ml, ver 2.1.3) foram usados para ensopar o solo (aproximadamente 1400

cfu/ml). Após mais duas horas adicionou-se 20 ml de uma suspensão bacteriana (10^8 cfu/ml, ver 2.1.1) ou 20 ml de Ridomil (WP 25, 1 mg/ml) resp. a cada pote resultando em aproximadamente 7×10^6 cfu/ml de solo ou 20 ppm Ridomil resp. Os potes foram incubados nas mesmas condições como descrito atrás e o aparecimento de plantulas e incidência da doença foram registados como mencionado atrás (ver parte a) atrás).

Tabela 2 mostra a eficácia de biocontrole das mesmas estirpes contra *P. ultimum*. A estirpe CGA 266446 mostrou-se a mais eficaz (56% de biocontrole).

c) Pato-sistema *R. solani*-tomateiro

Adicionou-se bactérias (120 ml/6 Kg) a Pro-mix BX autoclavado num tambor mecânico e misturou-se durante 5 minutos. A Pro-mix com bactérias foi deixada em repouso em cestos mal fechados durante três dias antes do inóculo do patogénio (0,02% de grãos de aveia colonizados) ser adicionado. A mistura foi então bem misturada durante mais cinco minutos e colocada em potes. 5 potes foram semeados com 10 sementes de tomateiro (cv. Bonny Best) para cada tratamento. Terraclor (wp 75, 10,3 K ai/ha) foi adicionado como tratamento testemunha sem tratamento bacteriano e adicionou-se por ensopamento imediatamente antes da plantação. Cada tratamento foi repetido 4 vezes. Os potes foram mantidos no escuro durante os 4 primeiros dias após sementeira ($\approx 23^\circ\text{C}$) e depois passados para a estufa durante o resto do ensaio. Após 15 dias o número de plantas saudáveis foi contado. Um tratamento com patogénio mas sem tratamento testemunha com bactérias foi preparado como um tratamento para testar o patogénio.

A Tabela 3 mostra os resultados dos ensaios de quatro estirpes de rizobactérias. CGA 266446 e CGA 267356 reduziram significativamente a doença. CGA 266447 e CGA 270294 são menos eficazes mas também apresentaram efeitos benéficos.

d) Fato-sistema R. solani-pepineiro

O solo foi preparado misturando células bacterianas com terra comercial para vasos na proporção de 1 ml de células numa densidade de aproximadamente 10^7 células/ml por 10 g de solo. Ao mesmo tempo sementes infestadas com Rhizoctonia solani e reduzidas a pó foi misturado com o solo numa proporção de 10 ml/10 g de solo. O solo foi aplicado em tabuleiros comerciais para sementeira, cada um consistindo em 12 potes pequenos de 3 cm quadrados que levam aproximadamente 10 g de solo. Em cada um dos 12 potes do tabuleiro foi colocada uma única semente de pepineiro e três tabuleiros foram preparados para cada tratamento. As testemunhas não infestadas sem patogénios ou bactérias adicionadas ao solo e testemunhas infestadas tendo patogénio mas não tendo bactérias foram incluídas em cada experiência. Os tabuleiros foram colocados numa câmara de crescimento em que foi mantida uma temperatura constante de 28°C e mantidos húmidos regando duas vezes por dia com um aspersor suspenso. Doze dias após plantação registou-se o número de plantas sobreviventes em cada tratamento.

A Tabela 4 mostra os resultados de ensaios de 3 estirpes de rizobactérias. CGA 267356 e CGA 270293 reduziram significativamente a doença. CGA 266447 é menos eficaz.

Exemplo 7: Isolamento e eficácia de estirpes antipatógenicas

a) Pseudomonas fluorescens estirpe 266446

A estirpe CGA 266446 foi identificada como pertencendo à espécie Pseudomonas fluorescens. Esta estirpe foi isolada a partir da rizosfera de uma planta do algodoeiro madura em grada arenosa em Burleson Co. Texas. A colheita anterior tinha sido milho. A estirpe é activa contra Rhizoctonia solani e Pythium ultimum em agar nutriente mas tem pouca actividade em agar com extracto de solo. O tratamento do algodoeiro no solo infestado com R. solani resulta em 71% do controle da doença (Tabela 1). O tratamento de algodoeiro em solo infestado com P. ultimum resulta em 56% de controle da doença (Tabela 2). O tratamento do tomateiro em solo infestado com R. solani resulta em 123% de controle da doença (Tabela 3).

b) Pseudomonas fluorescens estirpe CGA 266447

A estirpe CGA 266447 foi identificada como pertencendo à espécie de Pseudomonas fluorescens. Esta estirpe foi isolada a partir da mesma área da estirpe CGA 266446 e tem actividade semelhante. O tratamento do algodoeiro em solo infestado com R. solani resulta em 70% de controle da doença (Tabela 1). Tratamento de algodoeiro no solo infestado com P. ultimum resulta em 30% de controle da doença (Tabela 2). O tratamento do tomateiro em solo infestado com R. solani resulta em 54% de controle da doença (Tabela 3). O tratamento de pepineiro em solo infestado com R. solani resulta em 10% de controle da doença (Tabela 4).

c) Pseudomonas fluorescens estirpe CGA 267356

A estirpe CGA 267356 foi identificada como pertencendo à espécie Pseudomonas fluorescens. Esta estirpe foi isolada a partir da rizosfera de uma variedade de algodoeiro "GP3774" em solo de terra preta de uma quinta perto de Aquilla, Hill County, Texas. A colheita anterior foi trigo. A estirpe é activa contra Rhizoctonia solani em agar nutriente e em agar de extracto de solo. Ela é activa contra Pythium ultimum apenas em agar nutriente. O tratamento do algodoeiro em solo infestado com R. solani resulta em 80% de controle da doença (Tabela 1). O tratamento do algodoeiro em solo infestado com P. ultimum resulta em 44% de controle da doença (Tabela 2). O tratamento do tomateiro em solo infestado com R. solani resulta em 131% de controle da doença (Tabela 3). A estirpe produz um antibiótico que é eficaz para tratar R. solani e P. ultimum, que está descrito no pedido de patente número de série 570,184, entregue em 20 de Agosto, 1990, a especificação da qual está aqui incluído como referência. O tratamento de pepineiro em solo infestado com R. solani resulta em 67% de controle da doença (Tabela 4).

d) Pseudomonas fluorescens estirpe CGA 270293

A estirpe CGA 270293 foi identificada como pertencendo à espécie Pseudomonas fluorescens. Esta estirpe foi isolada a partir da rizosfera de uma variedade de algodoeiro "Stoneville 213" em greda lodosa Norwood da Texas A&M Research Farm, em Brazos County, Texas. A cultura anterior foi algodoeiro. A estirpe é activa contra Rhizoctonia solani em agar e em agar de extracto de solo. Ela é eficaz contra Pythium ultimum apenas em agar nutriente. O tratamento de algodoeiro em solo infestado com R. solani resulta em 68% de controle da doença (Tabela 1). O tratamento do algodoeiro em solo infestado com P. ultimum resulta

em 33% de controle da doença (Tabela 2). O tratamento do pepineiro em solo infestado com R. solani resulta em 53% de controle da doença (Tabela 4).

e) Pseudomonas fluorescens estirpe CGA 270294

A estirpe CGA 270294 foi identificada como pertencendo a Pseudomonas fluorescens. Esta estirpe foi isolada a partir da rizosfera de uma variedade de algodoeiro "Stoneville 213" em greda arenosa fina de Miles derivada de Chilicothe, Texas. A colheita anterior foi a variedade "Paymaster 145". Esta estirpe era activa contra R. solani em agar nutriente e em agar de extracto de solo e contra P. ultimum em agar nutriente. A estirpe é activa contra R. solani e P. ultimum em solo infestado com R. solani (Tabela 1) e 34% de controle da doença em solo infestado com P. ultimum (Tabela 2). O tratamento de tomateiro em solo infestado com R. solani resulta em 46% de controle da doença (Tabela 3).

f) Pseudomonas fluorescens estirpe CGA 281836

Quando da cultura de uma amostra da estirpe CGA 266447, encontrou-se que estavam presentes duas estirpes distintas de bactérias. A segunda bactéria, designada estirpe CGA 281836, é morfologicamente distinta da CGA 266447 e apresenta boa actividade de biocontrole. CGA 281836 foi identificada como pertencente à espécie Pseudomonas fluorescens. O tratamento do algodoeiro em solo infestado com R. solani resulta em 76% de controle da doença (Tabela 1). O tratamento do algodoeiro em solo infestado com P. ultimum resulta em 39% de controle da doença (Tabela 2).

Exemplo 8: Inibição de Rhizoctonia solani

O metabolito antifúngico activo pode ser extraído do meio de crescimento das estirpes bacterianas que produzem antibióticos inibidores. Por exemplo, usando a estirpe CBA 267356, isto é conseguido por extracção do meio de crescimento com acetona a 80% seguido de remoção da acetona por evaporação e uma segunda extracção com éter dietílico. O éter dietílico foi removido por evaporação e o extracto seco foi ressuspenso num pequeno volume de água. Pequenas quantidades do extracto de antibiótico aplicadas a discos de papel de filtro estéreis pequenos colocados numa placa de agar inibirão o crescimento de R. solani, indicando a presença do composto antibiótico activo. Uma vez que o antibiótico é facilmente extraído com solventes orgânicos, é provável que tenha grupos cíclicos ou aromáticos na sua estrutura como é comum a muitos antibióticos que se sabe serem produzidos por outras pseudomonas.

Exemplo 9: Combinação sinérgica de P. fluorescens com o fungicida acilalanina metalaxilo para controlar a podridão do algodoeiro em solo infestado com Rhizoctonia solani e Pythium ultimum

As estirpes CBA 261836, CBA 267356 e CBA 270293 foram aplicadas individualmente a solo não estéril como um chuveiro a 2×10^6 cfu/ml de solo, enquanto que o fungicida metalaxilo é espalhado como um chuveiro (Ridomil, a 0,02, 0,5 ou 2 ppm) ou usado para revestir sementes (Apron, a 35 g a.i. (100 Kg de semente). P. ultimum foi introduzido como uma suspensão de esporos (1400 esporos/ml de solo). R. solani foi introduzido como um pó sedimentado (5 mg no centro de cada pote) Após incubação durante 19 dias na estufa os hipocótilos das plantulas de algodoeiro foram avaliados relativamente à doença numa escala de

observação. Conseguiu-se controle quase completo da podridão quando a estirpe CGA 267356 foi aplicada com Ridomil a 2 ppm. Usando Apron em vez de Ridomil resulta no mesmo nível de controle. A estirpe CGA 267356 sózinha ainda dá supressão significativa de ambos os patogénios. O fungicida Metalaxil sózinho não consegue controlar o complexo de doenças.

0,02 ppm Ridomil sózinho dá 40% de supressão de P. ultimum. A combinação de 0,02 ppm de Ridomil com a estirpe CGA 267356 aumenta o nível de controle para mais de 60%. A estirpe CGA 281836 dá resultados essencialmente tão bons quanto a estirpe CGA 267356. A estirpe CGA 270293 não suprime significativamente o complexo de doenças das plantulas.

O que foi dito demonstra que a aplicação combinada de estirpes bacterianas de biocontrole com uma proporção reduzida de fungicida metalaxil consegue o controle quase completo do complexo de doenças das plantas em algodoeiro provocado por R. solani e P. ultimum.

Exemplo 10: Isolamento do gene do antibiótico

Pseudomonas fluorescens tipo selvagem estirpe 11c-1-38 (estirpe 915) foi mutagenizada por exposição ao mutagénio N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Aproximadamente duas dúzias de mutantes afectados no antibiótico foram identificados por rastreio de mutantes individuais relativamente à sua capacidade para inibir o crescimento de P. ultimum e R. solani em agar nutriente. A maior parte destes apresentou actividade reduzida ou nenhuma actividade antibiótica contra um dos dois fungos fitopatogénicos, mas não são afectados na sua inibição de outros fungos.

No entanto, um mutante, que designámos 2-1, não possui actividade antibiótica contra ambos os fungos testados. Estes resultados sugerem fortemente que P. fluorescens estirpe 11c-1-38 produz dois antibióticos distintos, um eficaz contra P. ultimum e o outro eficaz contra ambos os fungos.

Uma biblioteca de genes de DNA total isolado a partir da estirpe parental foi construída por digestão parcial com Sall do DNA, fraccionamento por tamanho para dar fragmentos de 20-30 Kilobases e ligação do vector pVK100 cortado com XhoI. Knauf et al., Plasmid 8: 45-54 (1982). A biblioteca de genes foi transferida para o mutante de antibiótico 2-1 por conjugação triparental com E. coli portadora do plasmídeo tra+ pRK2013. Ditta et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:7347-7351 (1980). Os exconjugantes transgénicos foram testados relativamente à produção de antibiótico medindo a inibição do crescimento de P. ultimum e de R. solani. Três clones sobreponíveis foram identificados os quais restauraram a actividade antibiótica contra R. solani, mas não contra P. ultimum, ao mutante 2-1. Os mapas de restrição destes clones foram determinados como se mostra na Figura 1.

Exemplo 11: Caracterização da região do gene do antibiótico

A região genética necessária à complementação funcional da biossíntese de antibiótico no mutante 2-1 foi definida por subclonagem de porções da região maior e testando a sua capacidade para complementar o mutante 2-1 relativamente à actividade de antibiótico (Figura 2). O fragmento mais pequeno que apresentou complementação da mutação é o fragmento HindIII/EcoRI de 4,9 Kb, o qual está indicado como subfragmento 6 na Figura 2 e foi designado subfragmento H/E4.9. Alguns dos subfragmentos de DNA clonados derivados do clone parental do gene do antibiótico, o qual foi designado pANT-5, foram transferidos para duas estirpes

tipo selvagem de P. fluorescens, 11c-33 (estirpe 914) e 11-1-6 (estirpe 922), que normalmente não são capazes de produzir antibiótico contra R. solani.

Os resultados apresentados na Figura 2, indicaram que um subfragmento EcoRI de 11 Kb, o qual está indicado como subfragmento 3 na Figura 2 e foi designado subfragmento E11, confere antibiose activa contra R. solani a ambas as estirpes. Para melhor definir as fronteiras genéticas deste fenómeno, usou-se mapeamento de transposões para se obter um mapa funcional da região do gene antibiótico.

Vinte cinco inserções independentes do transposão Tn5 foram geradas no fragmento EcoRI de 11 Kb (Figura 3). A capacidade da maior parte destes para conferir antibiose activa contra R. solani às duas estirpes dos testes foi determinada e os resultados estão descritos na Figura 3. Os resultados indicam que a maior parte do fragmento HindIII/EcoRI de 4,9 Kb no lado direito do fragmento EcoRI de 11 Kb está envolvido na síntese de antibiótico tal como estão as regiões para a esquerda do sítio HindIII. No entanto, duas inserções Tn5 numa pequena região imediatamente para a direita do sítio HindIII não tem qualquer efeito na síntese do antibiótico. Isto indica que esta região contém DNA que não é necessário para a antibiose.

Exemplo 12: Inibição de Rhizoctonia solani

O composto antibiótico activo pode ser extraído a partir do meio de crescimento da estirpe de P. fluorescens transformada que produz este antibiótico. Isto foi conseguido por extracção do meio com acetona a 80% seguido da remoção da acetona por evaporação e uma segunda extracção com éter dietílico. O éter dietílico foi removido por evaporação e o extracto seco foi

ressuspenso num pequeno volume de água. Pequenas quantidades do extracto de antibiótico aplicadas a pequenos discos de papel de filtro estéreis colocados numa placa de agar inibirão o crescimento de R. solani indicando a presença do composto antibiótico activo. Uma vez que o antibiótico é facilmente extraído com solventes orgânicos, é provável ter grupos cíclicos ou aromáticos na sua estrutura tal como é comum a muitos antibióticos conhecidos produzidos por outras pseudomonas.

Exemplo 13: Formulações de composições antifúngicas empregando composições líquidas

Nos exemplos que se seguem, as percentagens da composição são dadas por peso e o ingrediente activo* é

- a) uma bactéria Pseudomonas fluorescens transformada produtora da substância antibiótica inibidora do patogénio alvo ou
- b) um metabolito antifúngico produzido pela bactéria Pseudomonas fluorescens que é inibidor para o patogénio alvo ou
- c) uma combinação 1:1 das estirpes Pseudomonas fluorescens CGA266446, CGA 266447, CGA 267356, CGA 270293, CGA 270294 ou CGA 281836 e metalaxil.

1. Concentrados emulsionáveis:	a	b	c
Ingrediente activo*	20%	40%	50%
Dodecilbenzenossulfonato cálcio	5%	8%	6%
éter de óleo de castor polietilenoglicol (36 moles de óxido de etileno)	5%	-	-
éter de tributilfenol polietilenoglicol (30 moles de óxido de etileno)	-	12%	4%
Ciclo-hexanona	-	15%	20%
Mistura de xilenos	70%	25%	20%

Emulsões de qualquer concentração necessária podem ser produzidas por diluição com água.

2. Soluções:

	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>
Ingrediente activo*	80%	10%	5%	95%
Éter monometílico de etilenoglicol	20%	-	-	-
Poli-etilenoglicol 400	-	70%	-	-
N-metil-2-pirrolidona	-	20%	-	-
Óleo de coco epoxidado	-	-	1%	5%
Destilado de petróleo (gama de ebulição 160-190°C)	-	-	94%	-

Estas soluções são adequadas para aplicação na forma de microgotas.

3. Granulados:

	<u>a</u>	<u>b</u>
Ingrediente activo*	5%	10%
Caulino	94%	-
Ácido silícico altamente disperso	1%	-
Atapulgite	-	90%

O ingrediente activo foi dissolvido em cloreto de metileno, a solução foi espalhada sobre o veículo e o solvente foi subsequentemente evaporado sob vácuo.

4. Poeiras:

	<u>a</u>	<u>b</u>
Ingrediente activo%	2%	5%
Aido silicico altamente disperso	1%	5%
Talco	97%	-
Caulino	-	90%

As poeiras prontas para usar são obtidas misturando bem os veículos com o ingrediente activo.

Exemplo 14: Formulação de composições antifúngicas empregando composições sólidas

Nos exemplos que se seguem, as percentagens das composições são por peso e o ingrediente activo% pode ser uma ou mais das bactérias Pseudomonas fluorescens transformadas produtoras da substância antibiótica inibidora do patogénio alvo ou um mais dos metabolitos anti-fúngicos produzidos por bactérias Pseudomonas fluorescens que são inibidoras para o patogénio alvo:

1. Pós molháveis:

	a	b	c
Ingrediente activo*	20%	60%	75%
Linhossulfato de sódio	5%	5%	-
Laurilsulfato de sódio	3%	-	5%
Diisobutilnaftalenossulfonato de sódio	-	6%	10%
éter de octilfenol	-	2%	-
polietilenoglicol (7-8 moles de óxido de etileno)	-	-	-
Ácido silícico altamente disperso	5%	27%	10%
Caulino	67%	-	-

O ingrediente activo foi bem misturado com os adjuvantes e a mistura foi bem triturada num moinho adequado, dando pós molháveis que podem ser diluídos com água para dar suspensões das concentrações pretendidas.

2. Concentrado emulsionável:

Ingrediente activo*	10%
éter de octilfenol polietilenoglicol (4-5 moles de óxido de etileno)	3%
Dodecilbenzenossulfonato de cálcio	3%
éter de poliglicol óleo de castor	4% (36 moles de óxido de etileno)
Ciclo-hexanona	30%
Mistura de xilenos	50%

Emulsões de qualquer concentração necessária podem ser obtidas a partir deste concentrado por diluição com água.

3. Poeiras:

	<u>a</u>	<u>b</u>
Ingrediente activo*	5%	8%
Talco	95%	-
Caulino	-	92%

3. Granulado extrudido:

Ingrediente activo%	10%
Linhossulfonato de sódio	2%
Carboximetilcelulose	1%
Caulino	87%

O ingrediente activo foi misturado e triturado com os adjuvantes e a mistura foi subsequentemente humedecida com água. A mistura foi extrudida e depois seca numa corrente de ar.

5. Granulado revestido:

Ingrediente activo%	3%
Poliétilenoglicol 200	3%
Caulino	94%

O ingrediente activo finamente triturado foi aplicado uniformemente num misturador ao caulino humedecido com poliétilenoglicol. Os granulados não pulverulentos revestidos foram assim obtidos.

6. Concentrado em suspensão:

Ingrediente activo*	40%
Etilenoglicol	10%
Nonilfenol polietilenoglicol (15 moles de óxido de etileno)	6%
Linhossulfonato de sódio	10%
Carboximetilcelulose	1%
Solução aquosa de formaldeído a 37%	0,2%
Óleo de silicone em emulsão aquosa a 755	0,6%
Água	32%

O ingrediente activo finamente triturado foi bem misturado com os adjuvantes dando um concentrado em suspensão a partir do qual podem ser obtidas suspensões de qualquer concentração pretendida por diluição com água.

Exemplo 15: Ensaio no campo das estirpes de biocontrolo

As estirpes de biocontrolo foram guardadas em 50% de glicerol a -80°C. Uma ansada da cultura guardada foi ressuspensa em 5 ml de Caldo de Luria (LB: 10g de Bacto-Tryptone, Difco; 5 g de extracto de levedura, Oxoid; 0,25 g de $MgSO_4 \times H_2O$; 8 g de NaCl; e 1 l de água destilada; pH7) e agitada a 150 rpm e 25°C durante 24 horas. 100 ml de LB foi inoculado com 1 ml da pré-cultura e incubado nas mesmas condições. Após 16 horas a cultura foi

centrifugada durante 10 minutos a 10000 rpm e o sedimento res-suspenseo em soro fisiológico (0,8% NaCl) e ajustado a 3×10^7 cfu/ml (DO2). Assim, 100 ml da cultura dão aproximadamente 200-300 ml de suspensão de DO2.

Usou-se um hemocitômetro e/ou espectrofotômetro para ajustar a concentração de bactérias na suspensão para ensopar. Como alternativa uma solução salina padrão de DO conhecida (e.g. Phillips' Milk of MagnesiaTM = $Mg(OH)_2$) pode ser usada para ajustar a DO da suspensão. Se não houver uma centrífuga todo o caldo de cultura pode ser aplicado; um hemocitômetro é então usado para determinar as cfu/ml.

Para determinação exacta, preparou-se uma série de diluições (10^0 a 10^{-8} ; 20 μ l em 190 μ l) numa placa de microtitulação e gotas de 10 μ l são colocadas sobre agar de Luria (LB com 1,5% de Bacto-Agar, Difco) com uma pipeta Eppendorf. As cfu são contadas após 24 horas de incubação a 28°C.

250 ml da suspensão de bactérias por 10^7 (= 1 rep) foram espalhadas como um chuveiro sobre as sementes cobertas (200 sementes por rep). Um vaporizador manual ou regador sem resíduos de pesticidas foi usado para aplicar a suspensão numa banda estreita ou com 1,5 polegadas.

Preparou-se Rhizoctonia solani e Pythium ultimum para inoculação como no Exemplo 5 atrás.

O aparecimento de novas plantas foi registado aos 10 dias após plantação para avaliar podridão antes da germinação. Fizeram-se registos aos 21 dias e 28 dias após plantação para avaliar a podridão após o aparecimento das plantas.

Tabela 1

Actividade de biocontrole em % das estirpes usadas no rastreio contra Rhizoctonia solani em plantas do algodoeiro.

<u>Estirpe</u>	<u>Percentagem média da actividade de biocontrole</u> ¹
CGA 266446	71
CGA 266447	70
CGA 267356	80
CGA 270293	68
CGA 270294	40
CGA 281836	76

1= Testemunha não infestada designada 100% de biocontrole
Testemunha infestada designada 0% de biocontrole.

Tabela 2

Actividade de biocontrolo em % das estirpes usadas no despista contra Pythium ultimum em plantas do algodoeiro.

<u>Estirpe</u>	<u>Percentagem média da actividade de biocontrolo¹</u>
CGA 266446	56
CGA 266447	30
CGA 267356	44
CGA 270293	33
CGA 270294	34
CGA 281836	39

¹= Testemunha não infestada designada 100% de biocontrolo
Testemunha infestada designada 0% de biocontrolo.

Tabela 3

Actividade de biocontrolo em % das estirpes usadas no despistes contra Rhizoctonia solani em tomateiros.

Tratamento	Valores 15 DAP ^a				Média	% Actividade Biocontrolo ¹
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4		
NP.NT ^b	9	10	5	10	8,50	100
P.NT ^c	5	4	6	6	5,25	0
Terraclor	10	10	9	10	9,75	138
CGA 266446	9	9	10	9	9,25	123
CGA 266447	7	5	6	10	7,00	54
CGA 267356	9	10	10	9	9,50	131
CGA 270294	7	6	6	7	6,75	46

a = Dias após plantação

b = Sem patogénios, sem tratamento (testemunha não infestada)

c = Patogénio, sem tratamento (Testemunha infestada)

1 = Testemunha não infestada designada 100% de biocontrolo

Testemunha infestada designada 0% de biocontrolo

Tabela 4

Actividade de biocontrolo em % das estirpes usadas no despistes contra Rhizoctonia solani em tomateiros.

Tratamento	Rep1	Rep2	Valores 12 DAP ^a		% Actividade Biocontrolo ¹
			Rep3	Média	
NP.NT ^b	12	11	12	11,67	100
P.NT ^c	7	10	9	8,67	0
CGA 266447	9	9	9	9,00	10
CGA 267356	10	11	11	10,67	67
CGA 270293	9	11	11	10,33	53

a = Dias após plantação

b = Sem patogénios, sem tratamento (testemunha não infestada)

c = Patogénio, sem tratamento (Testemunha infestada)

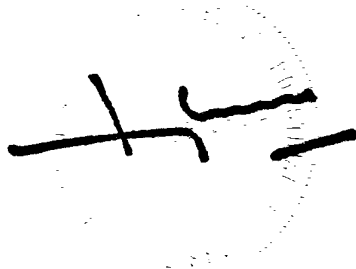
1 = Testemunha não infestada designada 100% de biocontrolo

Testemunha infestada designada 0% de biocontrolo

DEPÓSITOS de acordo com o Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection

O clone pANT5 foi depositado em 17 de Agosto de 1990 na ATCC e foi-lhe dado o número de acesso ATCC 40868. Um plasmídeo contendo o fragmento E11 de 11 Kb do pANT5 foi depositado na mesma data e foi designado ATCC número de acesso 40869.

As estirpes de Pseudomonas fluorescens que se seguem foram depositadas pelo requerente em 24 de Abril, 1991 na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md 20852, de acordo com o Tratado de Budapeste:



CGA 266446 (ATCC NQ de Acesso 55171);
CGA 266447 (ATCC NQ de Acesso 55170);
CGA 267356 (ATCC NQ de Acesso 55169);
CGA 270293 (ATCC NQ de Acesso 55175);
CGA 270294 (ATCC NQ de Acesso 55174); e
CGA 281836 (ATCC NQ de Acesso 55168).

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Agente de biocontrolo purificado eficaz contra patogénios fúngicos, caracterizado por compreender uma quantidade fungicida eficaz de um agente de biocontrolo purificado obtido ou seleccionado a partir de uma das seguintes estirpes de Pseudomonas fluorescens:

CBA 266446 (ATCC Nº de Acesso 55171);
CBA 266447 (ATCC Nº de Acesso 55170);
CBA 267356 (ATCC Nº de Acesso 55169);
CBA 270293 (ATCC Nº de Acesso 55175);
CBA 270294 (ATCC Nº de Acesso 55174); e
CBA 281836 (ATCC Nº de Acesso 55168).

2ª. - Agente de biocontrolo purificado eficaz contra patogénios fúngicos de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os patogénios fúngicos serem seleccionados a partir do grupo constituído por Rhizoctonia solani e Pythium ultimum.

3ª. - Processo para a preparação de uma composição fungicida, caracterizado por se incluir na referida composição (I) uma ou mais estirpes de Pseudomonas fluorescens controladoras de doenças biológicas ou um agente de biocontrolo obtido a partir das referidas estirpes e (II) um ou mais fungicidas acilalanina juntamente com um veículo aceitável em agricultura; sendo as proporções de mistura dos dois princípios activos I:II de desde 100:1 a 1:100, de preferência desde 10:1 a 1:10.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a estirpe de Pseudomonas fluorescens ser seleccionada a partir do grupo constituído pelas estirpes de Pseudomonas fluorescens:

CGA 266446 (ATCC Nº de Acesso 55171);
CGA 266447 (ATCC Nº de Acesso 55170);
CGA 267356 (ATCC Nº de Acesso 55169);
CGA 270293 (ATCC Nº de Acesso 55175);
CGA 270294 (ATCC Nº de Acesso 55174); e
CGA 281836 (ATCC Nº de Acesso 55168).

5a. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 4, caracterizado por o fungicida acilalanina ser seleccionado a partir do grupo constituído por metalaxilo, furalaxilo, oxadixilo, banalaxilo e ofurace.

6a. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado por o agente de biocontrolo ser o da reivindicação 1 ou da reivindicação 2.

7a. - Método para controlar um fungos fitopatogénico, caracterizado por compreender a introdução de uma quantidade fungicida eficaz de um agente de biocontrolo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2 ou de uma composição fungicida de qualquer uma das reivindicações 3 a 6 no ambiente onde se pretende inibir o fungo fitopatogénico; sendo a taxa de aplicação da estirpe bacteriana de 50 g a 5 kg por hectare.

8a. - Método para a obtenção de uma substância antibiótica que inibe eficazmente o crescimento de um patogénio fúngico, caracterizado por compreender a cultura de um agente de biocontrolo purificado de acordo com a reivindicação 1, em condições suficientes para produzir uma substância antibiótica; e a extracção da substância antibiótica por meios convencionais.

9a. - Processo para a obtenção de uma sequência de DNA recombinante que codifica uma ou mais enzimas necessárias à síntese de uma substância antibiótica, em que a referida substância antibiótica inibe o crescimento do fungo Rhizoctonia solani, caracterizado por a referida sequência ser derivada a partir de agentes de biocontrole da reivindicação 1.

10a. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a referida sequência de DNA ser obtida a partir do clone pANTS.

11a. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a referida sequência de DNA compreender o fragmento E11 de aproximadamente 11 kb.

12a. - Agente de biocontrole, caracterizado por compreender uma sequência de DNA recombinante seleccionada a partir do grupo constituído por sequências de DNA obtidas de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11.

13a. - Agente de biocontrol de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser uma estirpe bacteriana.

14a. - Agente de biocontrole de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a estirpe bacteriana ser uma pseudomonas.

15a. - Agente de biocontrole de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a estirpe bacteriana pertencer ao género Pseudomonas fluorescens.

16a. - Método para inibir o crescimento do fungo Rhizoctonia solani caracterizado por compreender:

a) a introdução da sequência de DNA recombinante de qualquer uma das reivindicações 9 a 11 no genoma de um agente de biocontrolo para formar um agente de biocontrolo transformado;

b) a aplicação do agente de biocontrolo transformado no ambiente onde se pretende inibir o fungo Rhizoctonia solani.

17a. - Método para a obtenção de uma substância anti-biótica que é eficaz para inibir o crescimento do fungo Rhizoctonia solani caracterizada por compreender:

a) a introdução da sequência de DNA recombinante obtida de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11 no genoma de um agente de biocontrolo para formar um agente de biocontrolo;

b) o permitir que o agente de biocontrolo transformado produza uma substância antibiótica; e

c) a extração da substância antibiótica do agente de biocontrolo transformado por meios convencionais.

18a. - Pseudomonas fluorescens, caracterizado por ser seleccionada seleccionada a partir do grupo constituído pelas estirpes:

CGA 266446 (ATCC Nº de Acesso 55171);
CGA 266447 (ATCC Nº de Acesso 55170);
CGA 267356 (ATCC Nº de Acesso 55169);
CGA 270293 (ATCC Nº de Acesso 55175);
CGA 270294 (ATCC Nº de Acesso 55174); e
CGA 281836 (ATCC Nº de Acesso 55168).

Lisboa, 19 de Agosto de 1991



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

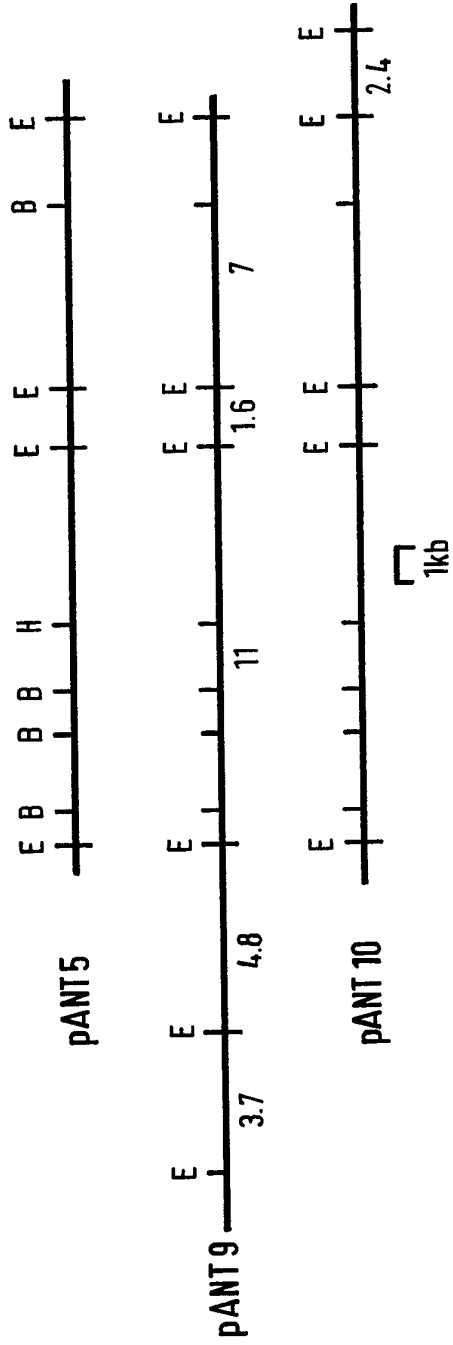
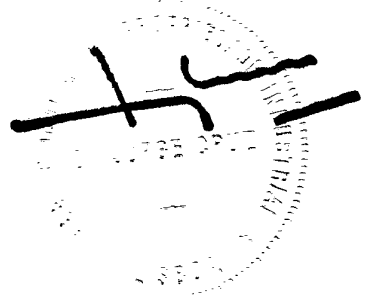
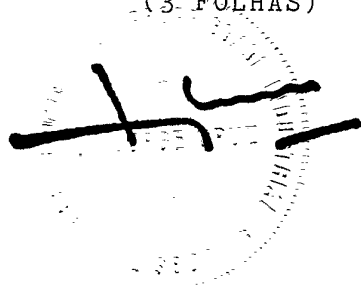


Fig. 1



		2-1	914	922
1	<p>pANT5 1kb</p>	+	+	+
2		+	ND	ND
3		+	+	+
4		+	+	-
5		-	ND	ND
6		+	ND	ND
7		-	ND	ND
8		-	ND	ND
9		-	-	-

Fig. 2

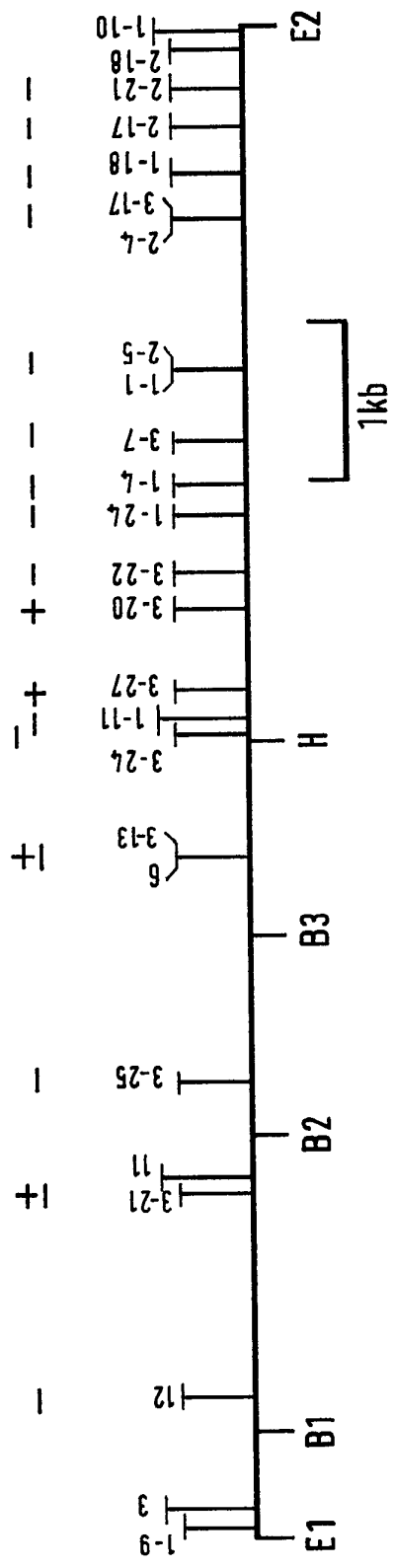
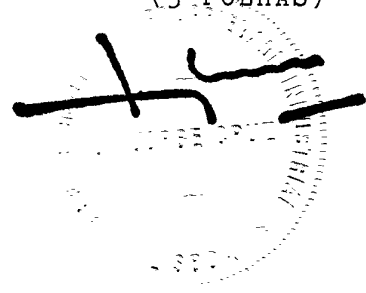


Fig. 3