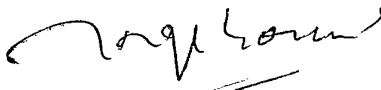




Modalidade e n.º (11) 100.203 Y	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
Requerente (71): RHÔNE-POULENC AGROCHIMIE, francesa, industrial, com sede em 14-20 Rue Pierre Baizet, 69009 Lyon, França			
Inventores (72): Georges Freyssinet e Alain Sailland			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
05.03.1991	FR	91 02874	
Epigrafe: (54) "Produção de plantas resistentes aos ataques de sclerotinia sclerotiorum por introdução de um gene que codi- fica para uma oxalato-oxidase"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) 1) A invenção refere-se a uma sequência de ADN co- dificadora para uma oxalato-oxidase. 2) Essa proteína é utilizável para proporcionar às plantas uma resistência às doenças provocadas por sclerotinia sp. Pode ser transportada por um gene quimé- rico e por um vector que contenha a sequência codificado- ra.			



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
Resumo (continuação) (57)			
<p>3) Pode ser utilizável para proporcionar às plantas uma maior resistência às doenças provocadas por sclerotinia sp.</p>			
<p>(Dr.  (Dr. Jorge Garin)</p>			

4.

**"PRODUÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES AOS ATAQUES DE SCLEROTINIA
SCLEROTIUM POR INTRODUÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA PARA
UMA OXALATO-OXIDASE"**

X

A presente invenção tem como objectivo proporcionar um gene codificador para uma oxalato oxidase, proporcionar também a proteína codificada por esse gene, os genes quiméricos que incorporam esse gene e a sua utilização para a transformação com a finalidade de lhes conferir resistência às doenças fúngicas.

A esclerotiniose é uma doença fúngica importante que afecta um grande número de dicotiledóneas. O responsável por essa doença, Sclerotinia sclerotiorum, é um fungo polífago que apresenta pouca especificidade do hospedeiro.

Esse fungo pode atacar a planta quer directamente ao nível do caule, quer ao nível das folhas alcançando depois o caule, quer ainda ao nível do capítulo floral. Nos dois primeiros casos, a planta definha por falta de alimentação. No último caso, a flor definha comprometendo a colheita.

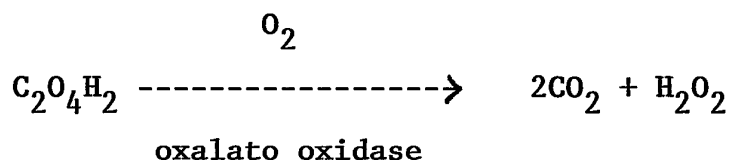
O fungo produz enzimas líticos que degradam a membrana celular do vegetal infectado e que facilitam o seu

4.

desenvolvimento na planta. Estes enzimas desempenham uma função importante na patogenicidade mas admite-se que não sejam suficientes. O fungo produz também ácido oxálico (Godov et al., 1990). Este ácido oxálico provoca uma diminuição do valor do pH nos tecidos infectados facilitando a hidrólise da membrana celular provocada pelos enzimas líticos. Uma redução de produção do ácido oxálico ou uma degradação deste ácido oxálico deve permitir um abrandamento ou mesmo uma inibição do desenvolvimento do fungo.

Para se desenvolver uma planta resistente ao "nos" é possível utilizar a estratégia de desintoxicação do ácido oxálico. A degradação deste ácido limitará a diminuição do valor do pH intercelular do tecido vegetal atacado, pelo que os enzimas líticos funcionarão então bastante longe dos valores óptimos de pH que lhes permitam ser realmente activos e eficazes. Daí resulta uma diminuição da patogenicidade do fungo.

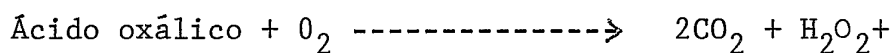
Para se conseguir esse objectivo, é possível utilizar a oxalato oxidase que catalisa a reacção seguinte :



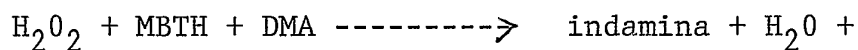
O enzima oxalato oxidase é isolado a partir de

4.

plantas diferentes, geralmente monocotiledóneas (Pieta et al., 1982): por exemplo, é possível purificar a proteína da cevada recorrendo a técnicas de cromatografia clássicas (geles de filtração Superdex G75 e de permuta de iões MonoQ, Pharmacia), seguindo-se a actividade enzimática de acordo com o protocolo colorimétrico adiante descrito (Obzansky e Richardson, 1983):



oxalato oxidase



peroxidase

MBTH = 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona

DMA = N,N-dimetilalinina

Esta técnica permitiu purificar uma proteína a qual, sobre gel de acilamida em condições desnaturantes, possui uma massa molecular correspondente a 26000 daltons. Uma parte do enzima oxalato oxidase purificado foi utilizada para obter anticorpos anti-oxalato oxidase de coelho; a parte restante da proteína foi utilizada para fazer a sequenciação da proteína nativa (N-terminal), ou, após clivagem com brometo de cianogénio, para fazer a sequenciação de alguns péptidos internos. Os resultados obtidos são os seguintes:

N-terminal : TDPDPLQDF-VADLDGKAVSVNGH

S

Péptido interno Nº 2 : HFQFNVGKTEAY

L'ADNc

4.

A comparação das sequências peptídicas anteriormente descritas com os dados contidos no banco proteico Swiss-Prot permitiu identificar uma proteína de trigo designada por "Germina" e revelada em publicação de 1989 por Dratewka-kos et al.. Foram efectuadas experiências que nos permitiram determinar que o ADNc publicado pelos autores é codificador para uma proteína de 201 aminoácidos e que apresenta uma actividade oxalato oxidase. Para o acompanhamento da descrição das experiências apresentadas na presente invenção, referir-nos-emos à numeração dos nucleótidos da figura 2 do artigo dos autores publicado em "J. Biol. Chem."; 264; 4896-4900.

A sequência deste ADNc possui um comprimento de 1075 nucleótidos com uma extremidade 5' não traduzida de 85 resíduos, uma fase de leitura aberta de 672 nucleótidos (desde a posição 86 até à posição 757) e depois uma extremidade 3' não traduzida de 318 resíduos.

A comparação da sequência proteica deduzida da sequência do ADNc com a sequência que se obtém por sequenciação da proteína nativa mostra que o ADNc é codificador não só para a oxalato oxidase madura mas também para um péptido sinal de 23 aminoácidos na parte N-terminal. Em consequência, o enzima oxalato oxidase é sintetizado sob a forma de uma proteína (péptido sinal mais péptido maduro) que é amadurecida por eliminação do péptido sinal para libertar o enzima activo maduro.



Em consequência, utilizaremos tanto a parte que é codificadora para a pré-proteína (nucleótidos 86 a 757), quer apenas a parte que é codificadora para a proteína madura (desde a posição 155 até à posição 757). Neste último caso, torna-se necessário colocar um codão AUG (que é codificador para uma metionina) em frente do codão ACC (que é codificador para a teonina, primeiro aminoácido da proteína madura).

Os ataques às plantas provocados por Sclerotinia sclerotiorum fazem-se essencialmente pelo caule ou pela planta, sendo interessante poder exprimir a oxalato oxidase tanto nos tecidos clorofílicos podendo por isso utilizar-se o promotor da pequena sub-unidade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase do *Helianthus annuus* (PSUHa, Waksman et al., 1987), como nos diferentes tecidos do vegetal, motivo pelo qual utilizaremos o promotor ubiquitário do ARN 355 do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S), tendo sido duplicada uma sua parte que foi designada por "duplo CaMV".

Os genes quiméricos, de acordo com a presente invenção, podem ser construídos, por exemplo, a partir dos elementos seguintes :

- A. Promotor duplo CaMV seguindo da parte do ADNc da oxalato oxidase que é codificadora para a pré-proteína (péptido sinal mais péptido

maduro) e do terminador "nos" obtido a partir do gene da nopalina sintase de pTi 37 (Bevân et al., 1983).

- B. Promotor duplo CaMV seguido da parte do ADNc da oxalato oxidase que é codificadora apenas para a proteína madura seguida do terminador "nos".
- C. Gene idêntico a "A" mas com o promotor da pequena sub-unidade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase do girassol (PSUHa) no lugar do duplo CaMV.
- D. Gene idêntico a "B" mas com o promotor da PSUHa no lugar do duplo CaMV.

Cada gene quimérico é introduzido na célula vegetal por um sistema que utiliza *Agrobacterium* ou recorrendo-se a qualquer outro sistema de alguma forma conhecido para transformar as células vegetais. As plantas são regeneradas a partir das células transformadas. Estas plantas apresentam uma tolerância acrescida à *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.

EXEMPLO 1 : **Preparação de duas sequências codificadoras :**

- A. Pré-proteína: obtém-se a partir do ADNc anteriormente descrito digerido por Hind III (na posição 66). A extremidade coesiva obtida é libertada por tratamento com polimerase de Klenow. Este ADN é seguidamente digerido por Nhe I (na posição 811).

Paralelamente, o plasmido pUC 19 (Yanisch-Perron et al., 1985) é digerido por Sac I.

A extremidade coesiva obtida é libertada por tratamento com polimerase de Klenow. Seguidamente o plasmido é digerido por Xba I (compatível com Nhe I).

O fragmento do ADNc e o plasmido anteriormente preparados são depois unidos. O novo plasmido assim obtido é designado por pRPA-oxo-01 e a figura 1 representa o cartograma correspondente.

- B. Proteína madura: obtém-se a partir do ADNc anteriormente descrito após digestão por BstN I (na posição 173). O fragmento obtido e o ligante que possui a sequência :

5' 3'

ATGACCGACCCAGACCCTCTCC

TACTGGCTGGGTCTGGGAGAGGT

3' 5'

são depois unidos. Isto proporciona uma modificação da sequência N-terminal da proteína madura que passa de TDPDPLQ para MTDPDPLQ.

Este fragmento de ADNc é depois digerido por Nhe I (na posição 811) para ser depois unido com o plasmídeo pUC 19 preparado conforme descrito no parágrafo anterior.

O novo plasmídeo assim constituído é designado por pRPA-oxo-02 e a figura 1 representa o correspondente cartograma.

EXEMPLO 2 : Preparação dos genes quiméricos :

A. Preparação de vetores constituídos pelo promotor e pelo terminador "nos" :

-Exemplo do duplo CaMV: obtém-se este vector a partir do plasmido pRPA-BL-410 obtido do modo a seguir descrito :

4.

Fusão "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho/gêne AroA" :

O péptido de trânsito da PSU do gene da RuBisCO de milho é obtido a partir de um fragmento EcoRI-SphI de 192pb; deriva do ADNc correspondente ao gene da PSU do gene da RuBisCO de milho descrito por Lebrun et al. (1987) possuindo um sítio NcoI que se sobrepõe ao codão iniciador da tradução e um sítio SphI que corresponde ao sítio de clivagem do péptido de trânsito.

Ao efectuar-se o tratamento da extremidade SphI com a polimerase do bacteriófago T4 e ao uni-la com a extremidade NcoI, tratada com um polimerase de Klenow, do gene AroA de pRPA-BL 104 e recortado por EcoRI, obtém-se a fusão traducional entre o péptido de trânsito proveniente de milho e o gene da EPSPS bacteriana.

Fusão "péptido de trânsito de PSU da RuBisCO de milho/sequência de 22 aminoácidos da parte madura da PSU da RuBisCO de milho/ /gene AroA :

Por um processo idêntico uniu-se um fragmento EcoRI-HindII de 228bp de ADNc da PSU do gene da RuBisCO de milho com a extremidade NcoI, tratada com polimerase de Klenow, do gene AroA de pRPA-BL 104 e recortado por EcoRI. Obtém-se uma

4.

fusão traducional entre o péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho, os 22 aminoácidos da parte madura da PSU da RuBisCO de milho e o gène da EPSPS bacteriana.

Péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de Girassol :

O fragmento deriva do ADNc isolado por Waksman e Freyssinet (1987). Cria-se um sítio SphI em conformidade com o método de Zoller e Smith (1984) no sítio de clivagem do péptido de trânsito. O péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol assim obtido é um fragmento EcoRI-SphI de 171 pb.

Fusão "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/sequência de 22 aminoácidos da parte madura da PSU da RuBisCO de milho/gène AroA :

A construção contendo a fusão péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho/sequência de 22 aminoácidos da PSU da RuBisCO de milho da parte madura do gène de milho foi recortada por EcoRI-SphI de 171 pb correspondente ao péptido de trânsito da PSU do gène da RuBisCO de girassol. Uma construção resultante apresenta uma substituição dos fragmentos EcoRI-SphI e é uma fusão traducional "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/sequência de 22 aminoácidos da parte madura da PSU da RuBisCO de milho/gène AroA".

4.

Uniu-se o fragmento EcoRI-SalI com o fragmento SalI-SstI contendo a sequência "nos 3'" e a orla direita do ADN-T. O fragmento EcoRI-SstI resultante constituído pelo "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/sequência de 22 aminoácidos da parte madura da PSU da RuBisCO de milho/gêne AroA/nos 3'/orla direita do ADN-T" é substituído no fragmento EcoRI-SstI contendo a orla direita do ADN-T do plasmido 150 A alfa 2 contendo o promotor duplo CaMV. A fusão transcricional "duplo CaMV/péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/ /sequência de 22 aminoácidos da parte madura da PSU da RuBisCO de milho/gêne AroA/nos 3' no vector 150 A alfa 2 foi designada por pRPA-BL 294.

Fusão "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/ /sequência de 22 aminoácidos da PSU da RuBisCO de milho/péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho/gêne AroA" :

A construção referida antes foi recortada por NcoI-HindIII libertando o gêne AroA. Depois uniu-se com um fragmento NcoI-HindIII de 1,5 kpb contendo a fusão "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho/gêne AroA". Uma construção resultante apresenta uma substituição dos fragmentos NcoI-HindIII e uma fusão traducional "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/sequência de 22 aminoácidos da PSU da RuBisCO da parte madura do gene milho/péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho/gêne AroA".

4.

O fragmento EcoRI-SalI foi unido com o fragmento SalI-SstI contendo a sequência "nos 3'" e a orla direita do ADN-T. O fragmento EcoRI-SstI resultante constituído pelo "péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/ /sequência de 22 aminoácidos da PSU da RuBisCO da parte madura do gene de milho/péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho/gene AroA/ /nos 3'/orla direita do ADN-T" é substituído no fragmento EcoRI-SstI contendo a orla direita do ADN-T do plasmido 150 A alfa 2 contendo o promotor duplo CaMV. A fusão transcricional "duplo CaMV/péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de girassol/sequência de 22 aminoácidos da PSU da RuBisCO da parte madura do gene de milho/péptido de trânsito da PSU da RuBisCO de milho/gene AroA/nos 3'" no vector 150 A alfa 2 foi designado por pRPA-BL 410.

Este plasmido é digerido com EcoRI e SalI para retirar o gene de estrutura "péptido de trânsito optimizado-zona codificadora para a EPSPS madura", pRPA-BL-410 digerido (ver a figura 1).

- Exemplo do PSUHa: obtém-se este vector a partir do plasmido pRPA-BL-207 (descrito no



pedido de patente de invenção europeia Nº 0337899) o qual é digerido com EcoRI e HindIII para retirar a zona codificadora para a nitrilase, pRPA-BL-207 digerido (ver a figura 1).

b. Construção dos genes quiméricos :

pRPA-oxo-03: é obtido fazendo digerir pRPA-oxo-01 por EcoRI e SalI. O fragmento obtido que é codificador para a pré-proteína é depois inserido entre os sítios EcoRI e SalI respectivamente a jusante do duplo CaMV e a montante do terminador "nos".

pRPA-oxo-04: é obtido fazendo digerir pRPA-oxo-02 por Eco RI e Sal I. O fragmento obtido que é codificador para a proteína madura é depois inserido entre os sítios EcoRI e SalI respectivamente a jusante do duplo CaMV e a montante do terminador "nos".

pRPA-oxo-05: é obtido fazendo digerir pRPA-oxo-01 por EcoRI e HindIII. O fragmento obtido que é codificador para pré-proteína é depois inserido nos sítios EcoRI e HindIII respectivamente a jusante do duplo PSUHa e a montante do terminador "nos".



pRPA-oxo-06: é obtido fazendo digerir pRPA-oxo-02 por EcoRI e HindIII. O fragmento obtido que é codificador para a proteína madura é depois inserido entre os sítios EcoRI e HindIII respectivamente a jusante do promotor PSUHa e a montante do terminador "nos".

QUADRO 1 : Representação esquemática dos quatro genes químicos :

Identificação	Promotor	Zona codificadora oxalato oxidase	Terminador
pRPA-oxo-03	dCaMV	pré-proteína	nos
pRPA-oxo-04	dCaMV	madura	nos
pRPA-oxo-05	PSUHa	pré-proteína	nos
pRPA-oxo-06	PSUHa	madura	nos

EXEMPLO 3 : Obtenção de Colzas transgênicas :

a. Transformação

Cada vector, tal como descrito antes, é introduzido na estirpe não oncogênea do

4.

Agrobacterium tumefaciens EHA 101 (Hood et al., 1987) portadora do cosmido pTVK 291 (Komari et al., 1986).

A técnica de transformação da Colza, variedade Westar, processa-se essencialmente em conformidade com o método descrito por Boulter et al. (1990), utilizando uma concentração de bactérias correspondente a $2,5 \times 10^9$ por ml (DO 600 nm = 1).

b. Regeneração

A técnica de regeneração processa-se essencialmente em conformidade com o método descrito por Boulter et al. (1990). As plantas são enraizadas em meio de De Block et al. (1989). Depois são colocadas em estufa e aguarda-se a floração.

EXEMPLO 4 : Medição da resistência da Colza à *Sclerotinia sclerotiorum* :

In vitro :

- Discos foliares: mede-se a resistência determinando a massa de três discos foliares decorridos 11 dias de crescimento em meio de

4.

Murashige e Skoog (MS) contendo hormonas e enriquecido com 1 mM de ácido oxálico.

Nestas condições, verifica-se que para os discos foliares obtidos a partir de Colzas modificadas com um dos genes quiméricos pRPA-oxo-03, pRPA-oxo-04, pRPA-oxo-05 e pRPA-oxo-06, a massa dos discos foliares aumenta nitidamente ao passo que no caso dos discos foliares obtidos a partir de colzas não modificadas a massa fica estagnada ou eventualmente diminui.

- Elongação radicular: mede-se também a resistência in vitro através da medição da elongação radicular decorridos dois dias de crescimento em água enriquecida com ácido oxálico 5 mM. Nestas condições, verificou-se que as raízes das plantas de colza modificada com um dos genes quiméricos pRPA-oxo-03, pRPA-oxo-04, são capazes de crescer e de se alongar ao passo que as raízes das plantas de colza não modificada não apresentam, nas mesmas condições, nenhum crescimento.

4.

In vivo :

Mede-se a resistência in vivo numa estufa após a contaminação de plantas de colza provenientes da regeneração, desde o aparecimento das primeiras flores, quer por deposição de esporos de *S. sclerotiorum* sobre as pétalas, ocorrendo então a infecção das folhas naturalmente no momento da desfloração, quer por deposição directa sobre as folhas deomicélio ou de uma pétala impregnada de micélio. As plantas modificadas por um dos genes quiméricos pRPA-oxo-03, pRPA-oxo-04, pRPA-oxo-05 e pRPA-oxo-06 não permitem o desenvolvimento do fungo e não apresentam nenhum sintoma de podridão característico da esclerotiniose, ao passo que as plantas não modificadas são rapidamente afectadas pela podridão característica do desenvolvimento de Sclerotinia sclerotiorum.

4.

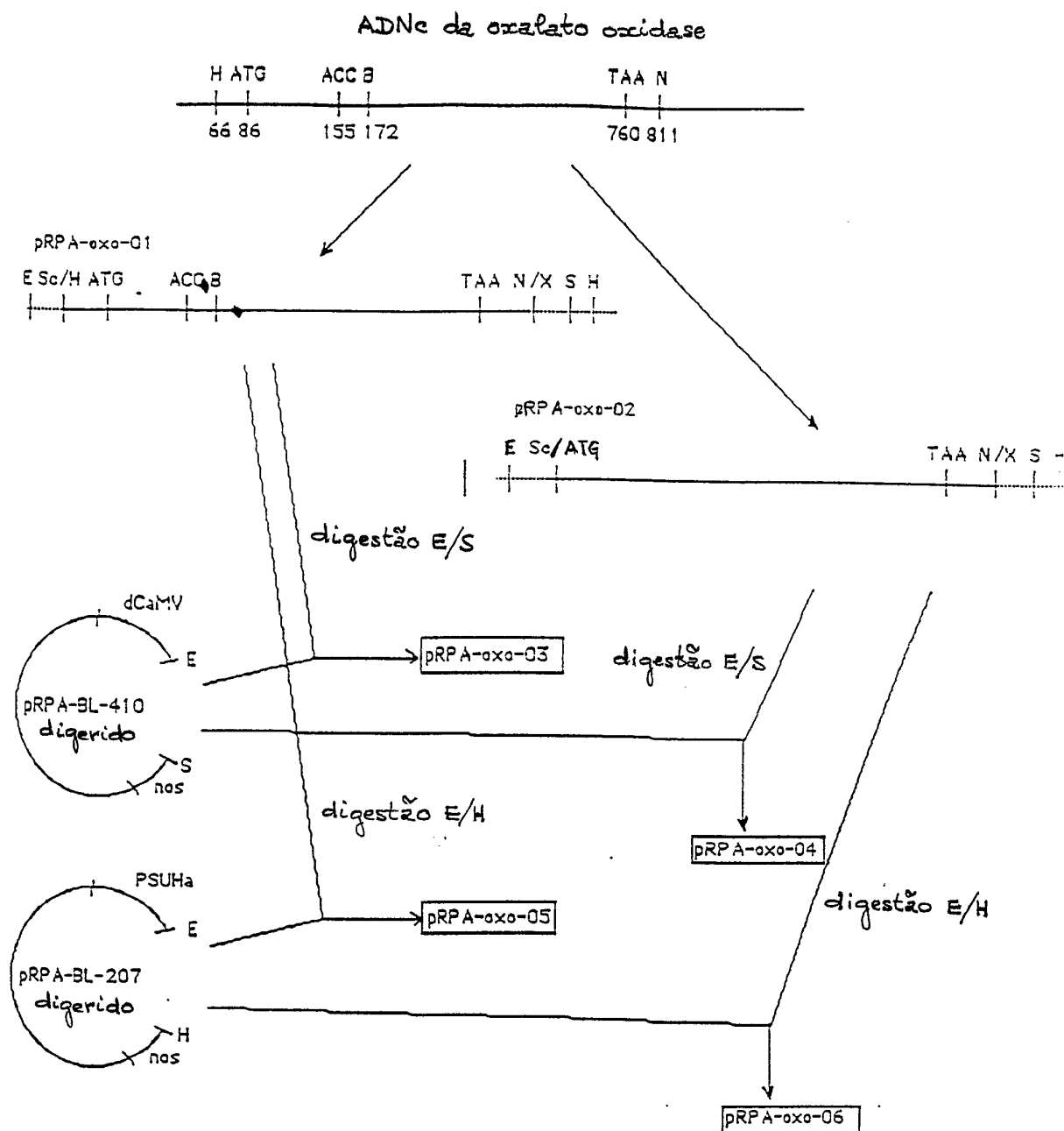


Figura 1: Procedimento de obtenção dos quatro genes quiméricos a partir dos dois genes de estrutura, pRPA-oxo-01 e pRPA-oxo-02. H, Hind III; B, BstN I; N, Nhe I; E, Eco RI, Sc, Sac I; S, Sal I e X, Xba I.

4.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Sequência de ADN, caracterizada pelo facto de codificar para uma oxalato-oxidase.

2.- Proteína oxalato-oxidase, caracterizada pelo facto de ser utilizável para proporcionar às plantas resistência às doenças provocadas pela sclerotinia sp.

3.- Gene quimérico, caracterizado pelo facto de incorporar como sequência codificadora um ADN em conformidade com a reivindicação 1.

4.- Vector para a transformação de plantas, caracterizado pelo facto de compreender um gene quimérico em conformidade com a reivindicação 3.

5.- Célula vegetal transformada, caracterizada pelo facto de conter um vector em conformidade com a reivindicação 4.

6.- Planta transformada, caracterizada pelo facto de

4.

ser proveniente de uma célula em conformidade com a reivindicação 5.

7.- Planta de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo facto de ser uma dicotiledónea.

8.- Planta de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo facto de ser colza.

Agente Oficial da Propriedade Industrial

M. J. Pereira

4.

R E S U M O

"Produção de plantas resistentes aos ataques de sclerotinia sclerotiorum por introdução de um gene que codifica para uma oxalato-oxidase"

1) A invenção refere-se a uma sequência de ADN codificadora para uma oxalato-oxidase.

2) Essa proteína é utilizável para proporcionar às plantas uma resistência às doenças provocadas por sclerotinia sp. Pode ser transportada por um gene quimérico e por um vector que contenha a sequência codificadora.

3) Pode ser utilizável para proporcionar às plantas uma maior resistência às doenças provocadas por sclerotinia sp.

