



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

(11) PI 0613746-6 B1

(22) Data do Depósito: 13/07/2006

(45) Data de Concessão: 07/11/2017



(54) Título: UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRAÍDA DE PLANTAS DO GÊNERO LUPINUS COMO PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E COMO AGENTE ANT I-FUGICO OU ANTI-OOMICETO

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

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

(73) Titular(es): RICARDO MANUEL DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA. VIRGÍLIO BORGES LOUREIRO. ARTUR RICARDO NASCIMENTO TEIXEIRA. SARA ALEXANDRA VALADAS DA SILVA MONTEIRO. INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

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

**UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRAÍDA DE PLANTAS DO GÊNERO
LUPINUS COMO PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E COMO
AGENTE ANTI-FÚNGICO OU ANTI-OOMICETO**

ÁREA DA INVENÇÃO

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

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

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

 A presente invenção também descreve a seqüência de
25 nucleotídeos do DNA correspondente ao fragmento genético que codifica o polipeptídeo de *Lupinus*, bem como a sua seqüência de resíduos de aminoácidos, microorganismos transformados com o fragmento genético que codifica o polipeptídeo de *Lupinus* e métodos para a sua aplicação como
30 fungicida, inseticida, promotor do crescimento de plantas

ou fertilizante ou como suplemento em nutrição humana ou animal.

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

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

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

30 Adicionalmente, o número de patógenos microbianos que

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

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

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

25 Na literatura disponível são descritas várias metodologias relativas à utilização de proteínas antifúngicas, extraídas de plantas ou microorganismos, quer para aplicação direta nos agentes patogênicos quer em plantas transgênicas que expressam essas proteínas. As
30 proteínas antifúngicas mais frequentemente utilizadas

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Em conclusão, torna-se imperativo a identificação e purificação de novos compostos de origem biológica que exibem propriedades antipatogênicas na luta contra os patógenos que afetam plantas. Deve ser dada importância particular aos compostos que são eficazes numa gama larga
30 de patógenos e que mantêm a atividade biológica em

condições *in vivo*.

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

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

níveis de proteínas e óleo comparáveis aos da soja, por outro lado, as suas espécies estão bem adaptadas a solos pobres e a condições de baixa disponibilidade de água. Por estes motivos, os tremoceiros têm sido considerados, por 5 vezes, os "parentes pobres" da soja.

O nível elevado de alcalóides que são tóxicos para animais e que estão naturalmente presentes em tremoços tradicionais do tipo selvagem tem atrasado, desde há muito, a cultura generalizada de espécies de *Lupinus* e a 10 utilização das suas sementes para consumo animal e humano. Este é o principal motivo por que a cultura do tremoço tem ficado muito aquém da cultura da soja. Em Portugal, por exemplo, o consumo tradicional de tremoços tem estado associado, desde há muito tempo, à ingestão de cerveja. 15 Estas sementes são primeiramente fervidas em água (o aquecimento a 100°C destrói a capacidade de germinação das sementes mas não bloqueia o processo de imbibição) e depois são imersas em água corrente durante alguns dias, para remover os alcalóides tóxicos. No entanto, a aplicação 20 recente de técnicas de cultura permitiu o desenvolvimento das denominadas variedades de tremoceiros doces, caracterizadas por conterem um baixo teor de alcalóides nas sementes ($< 0,004\%$ p/p), em oposição às culturas amargas tradicionais (teor de alcalóides $> 0,004\%$ p/p). Por este 25 motivo, os tremoços de variedades de tremoceiros doces podem ser utilizados com segurança na alimentação humana e animal.

Em consequência, é previsível um desenvolvimento crescente de produtos alimentícios derivados de tremoceiros 30 para nutrição humana e animal, como aconteceu algumas

décadas atrás com a soja. Isto é particularmente importante no caso de proteínas dos tremçoos, albuminas ou globulinas.

RESUMO DA INVENÇÃO

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

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

Em consequência, o primeiro aspecto da presente invenção refere-se ao polipeptídeo com a sequência B (5'KIRVLER FDQRTNRLN LQNYRIVEFQ SKPNTLILPK HSDADYVLVV LNGRATITIV NPDRRQAYNL EYGDALRIPA GSTSYILNPD DNQKLRVVKL AIPINNPgyf YDFYPSSTKD QQSYFSGFSR NTLEATFNTR YEEIQRIILG NED 3').

Um segundo aspecto da presente invenção diz respeito a

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

10 DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

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

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

Figura 3 - Observações em microscópio metalúrgico de folhas de videira. (A) Folhas saudáveis; (B) folhas infectadas com oídio; (C) folhas infectadas com oídio 12

horas após pulverização com a proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus*. A ampliação utilizada está especificada em cada fotografia.

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

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

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

25 Figura 7 - Perfil típico da insolubilidade das globulinas de plantas do gênero *Lupinus* em função das concentrações de cálcio e magnésio. Este perfil é exemplificado para o efeito destes cátions na auto-agregação da proteína nativa que contém o polipeptídeo
30 extraído de *Lupinus* (■) e de β-conglutina de *Lupinus* (○).

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

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

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

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

5'CGTAGACAAAGGAACCCTTATCACTTCAGCTCTCAAAGATTCCAAACTCTTTACAAA
 AATAGGAATGGCAAAATCCGTGTGCTCGAGAGGTTTGACCAAAGAACCAATAGACTTGA
 GAATCTCCAAAACTACCGCATTGTTGAGTTCCAATCAAAACCTAACACTCTCATTCTCC
 CTAAACACTCTGATGCTGACTACGTCCTCGTTGTACTCAATGGTAGAGCCACAATCACG
 5 ATAGTAAACCCTGATAGAAGACAAGCATATAACCTTGAGTATGGCGATGCTCTCAGAAT
 CCCAGCTGGCTCAACTTCATATATCCTTAACCCGGATGACAACCAGAAGCTTAGAGTAG
 TCAAGCTCGCAATACCCATCAACAATCCTGGCTACTTTTATGATTTCTATCCATCGAGT
 ACTAAAGACCAACAATCCTACTTCAGTGGCTTCAGCAGGAACACTTTAGAGGCCACCTT
 CAATACTCGTTATGAAGAGATACAAAGGATTATTTTAGGGAATGAGGAT3'

10 **(B)**

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

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

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

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

- (1) Atividade antifúngica e anti-Oomicetes potente, que confere ao polipeptídeo grande potencialidade como fungicida,
- (2) Forte atividade promotora do crescimento de plantas, particularmente notória em plantas doentes ou naturalmente enfraquecidas,
- (3) Resistência extrema à desnaturação, que permite a utilização do polipeptídeo em condições de campo,
- (4) Grande susceptibilidade ao ataque proteolítico,

que o torna inócuo para o ambiente e não tóxico para o homem, e

(5) Composição de aminoácidos bem equilibrada.

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

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

Outro aspecto da presente invenção diz respeito à metodologia utilizada para a produção recombinante do polipeptídeo de *Lupinus* em bactérias, com a finalidade de expressá-lo de forma constitutiva em plantas geneticamente modificadas. Estas plantas acabarão por exibir um nível

elevado de resistência a fungos patogênicos, especialmente no que se refere aos fungos difíceis de controlar (como é o caso dos fungos responsáveis pelas denominadas doenças do lenho), contra os quais os fungicidas tradicionais de aplicação exógena são completamente ineficazes.

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

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

A sequenciação N-terminal do polipeptídeo extraído de *Lupinus* foi feita por degradação de Edman. A sequência obtida de resíduos de aminoácidos foi utilizada para conceber "primers" degenerados. Extraíu-se mRNA total de sementes de *Lupinus albus* em desenvolvimento numa fase em que ocorre a síntese máxima do precursor β conglutina. Extraíu-se o mRNA utilizando protocolos/kits para a purificação de mRNA de material de plantas. O cDNA

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

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

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

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

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

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

Para transformar plantas com o fragmento genético que codifica o polipeptídeo de *Lupinus*, o método selecionado foi transformação via *Agrobacterium* (Fraley et al., 1983), utilizando um vetor de expressão adequado que contém uma
30 região codificadora para o gene de interesse associada a um

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

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

Outro aspecto da presente invenção está relacionado com os níveis frequentemente reduzidos de proteínas/polipeptídeos de plantas das dietas humana e animal e, alguns casos, com a baixa digestibilidade das proteínas e uma composição de aminoácidos desequilibrada. De fato, preparações em bruto que contêm o polipeptídeo de *Lupinus* possuem não só uma globulina importante (a proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo objetivo da presente invenção) mas também uma variedade de albuminas que estão naturalmente presentes no material da planta utilizado na extração da proteína. Em consequência, estas

preparações brutas do polipeptídeo de *Lupinus* são particularmente ricas em proteínas e podem ser utilizadas como suplemento protéico em nutrição animal ou humana, na forma de tofu (após precipitação de globulinas com cálcio e magnésio) ou na forma de requeijão (após precipitação das albuminas pelo calor).

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

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

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

EXEMPLOS PRÁTICOS

Exemplos 1 e 2 - Efeito da pulverização da proteína
nativa que contém o polipeptídeo de *Lupinus* na superfície
de folhas de videira infectadas com o fungo *Uncinula*
30 *necator* (o agente causador do oídio na videira).

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

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

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

Removeram-se esporos do fungo *Uncinula necator* da superfície de folhas de videira infectadas, tendo sido inoculados em agar água 0,6% (p/v) que continha 200 µg da proteína nativa pura que contém o polipeptídeo de *Lupinus* por mL ou 200 µg da fração protéica total de uvas maduras (que continha proteínas PR) por mL. A germinação dos esporos e desenvolvimento dos tubos germinativos foram monitorizados por microscopia óptica, utilizando o sistema de lente de fase de contraste, durante 24 e 48 horas. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 2, mostram que ocorreu uma redução acentuada na presença do meio que

continha o polipeptídeo de *Lupinus*, não só do número de esporos germinados mas também do comprimento dos tubos germinativos. Este efeito é notório quando comparado com o resultado observado na presença das proteínas PR.

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

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

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

 Purificou-se o polipeptídeo recombinante de *Lupinus*, expresso em bactérias, e testou-se a sua atividade antifúngica. Estes ensaios foram realizados como
25 previamente descrito nos exemplos 2 e 3. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 4, mostram que o polipeptídeo recombinante exibiu propriedades antifúngicas idênticas as observadas para o polipeptídeo extraído de plantas *Lupinus*. Após um período de incubação de 48 horas
30 na presença do polipeptídeo recombinante de *Lupinus*

observou-se destruição das paredes celulares dos esporos.

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

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

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

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

Exemplo 8 - Efeito da pulverização da proteína nativa que contém o polipeptídeo extraído de *Lupinus* em plantas de
30 melancia de viveiro.

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

polipeptídeo/mL.

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

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

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

A composição de aminoácidos bem equilibrada da proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo, bem como a sua excelente digestibilidade (o polipeptídeo é facilmente hidrolisado nos seus aminoácidos componentes por ação das proteases do trato digestivo humano), salientam o grande potencial nutritivo do concentrado do polipeptídeo de *Lupinus* preparado após precipitação, com cálcio +

magnésio 5 mM, das globulinas presentes numa preparação bruta da proteína nativa de *Lupinus* que contém o polipeptídeo (ver figura 7).

REFERÊNCIAS

- 5 Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffman, N. L., & Woo, S. C. (1983). "Expression of bacterial genes in plant cells". *Proceedings of the*
10 *National Academy of Sciences U.S.A.*, **80**, 4801-4807.
- Ferreira, R. B., Franco, E., & Teixeira, A. R. (1999). "Calcium- and magnesium-dependent aggregation of legume seed storage proteins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3009-3015.
- 15 Ferreira, R. B., Freitas, R. L., & Teixeira, A. R. (2003). "Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is eletrostatic in nature, rather than lectin-mediated". *FEBS Letters*, **534**, 106-110.

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma proteína de SEQ ID NO: 1, **caracterizada** pelo fato de ser como um promotor do crescimento de plantas.

5 2. Utilização de uma proteína de SEQ ID NO: 1, **caracterizada** pelo fato de ser na agricultura como um agente anti-fúngico ou anti-oomiceto através da aplicação da referida proteína a uma planta.

10 3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a referida proteína foi glicosilada, fosforilada, alquilada e/ou prenilada.

4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de estar na forma de uma formulação, ou uma preparação bruta , ou é
15 recuperada a partir de uma cultura ou extrato de células transformadas.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, **caraterizada** pelo fato de que a proteína é purificada a partir de cotilédones extraídos de plântulas germinadas do
20 gênero Lupinus.

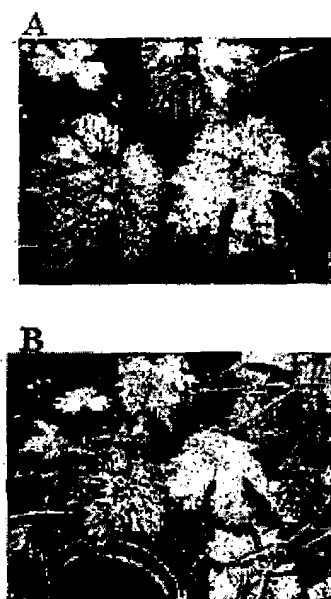


Fig. 1

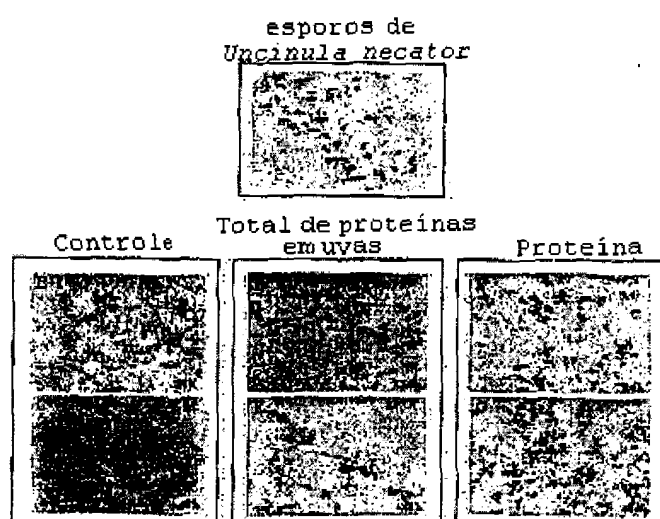


Fig. 2

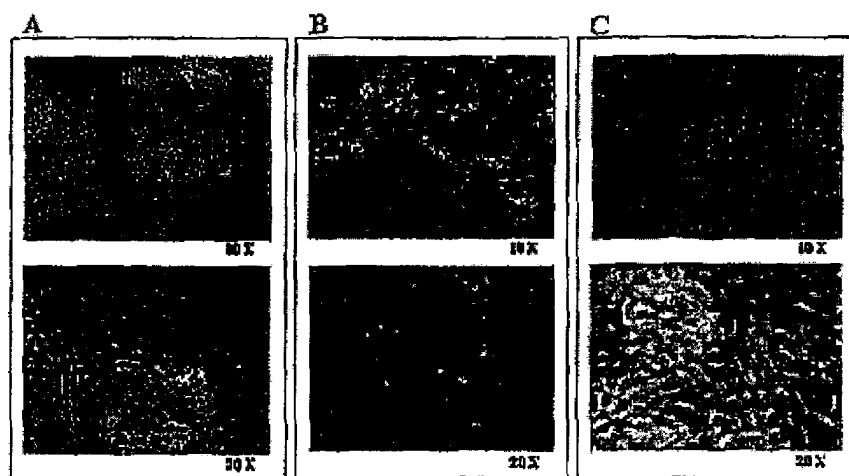


Fig. 3

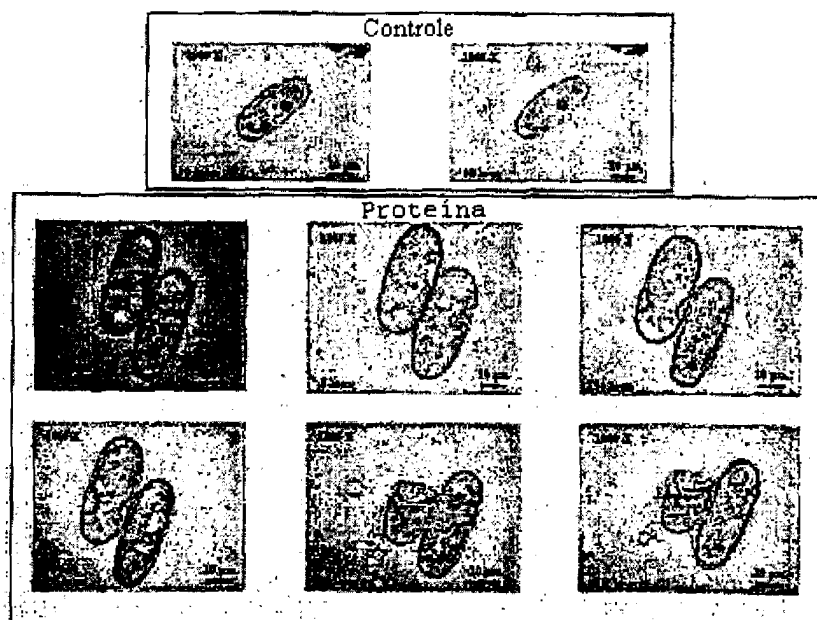


Fig. 4



Fig. 5

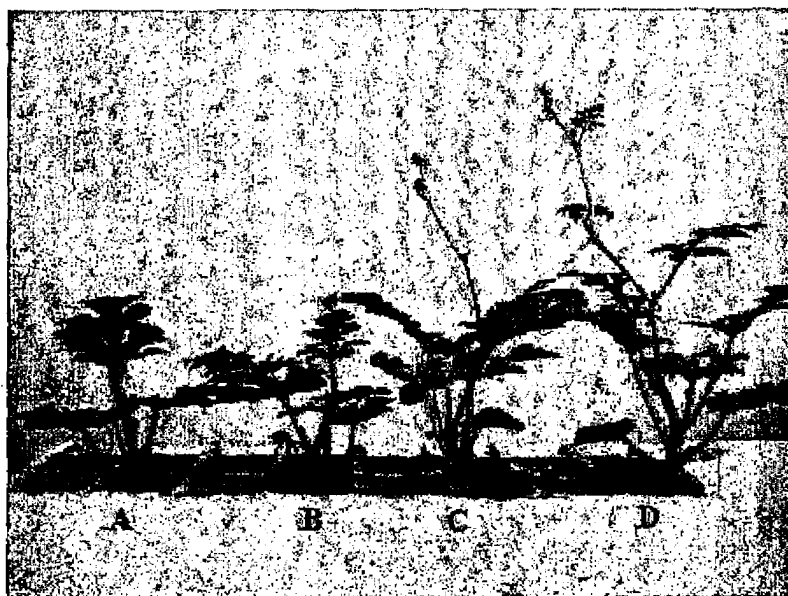


Fig. 6

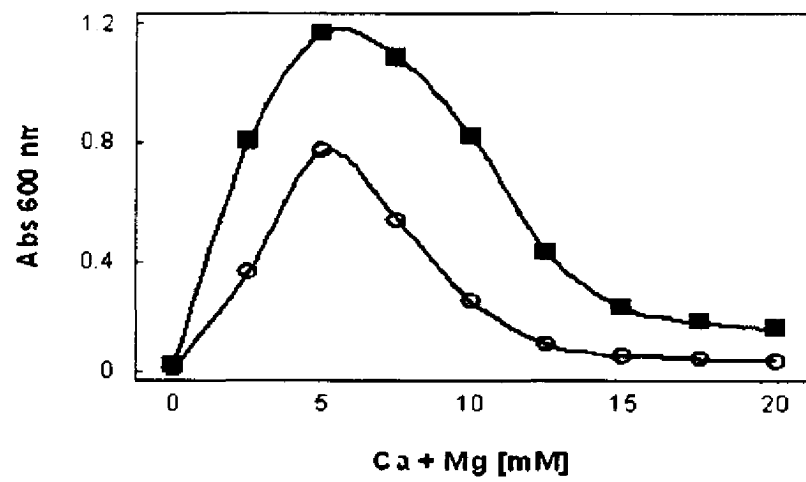


Fig. 7