



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

(21) **PI 0911418-1 A2**

(22) Data de Depósito: 22/12/2009
(43) Data da Publicação: 17/01/2012
(RPI 2141)



(51) *Int.Cl.:*
A01N 63/04
A01P 13/00
C07K 14/375
C07K 14/37

(54) Título: COMPOSIÇÃO HERBICIDA SELETIVA PARA DICOTILEDÔNEA, E MÉTODO DE APLICAÇÃO DA REFERIDA COMPOSIÇÃO

(73) Titular(es): Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

(72) Inventor(es): Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Gustavo Henrique Alcalá Zaparoli, Mario Ramos de Oliveira Barsottini, Odalys Garcia Cabrera

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO HERBICIDA SELETIVA PARA DICOTILEDÔNEA, E MÉTODO DE APLICAÇÃO DA REFERIDA COMPOSIÇÃO. Herbicidas são produtos utilizados na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas. Os mais utilizados pela indústria agrícola são os herbicidas químicos, porém, diversos problemas decorrentes da utilização desse tipo de herbicida precisam ser evitados ou minimizados, dentre eles a contaminação ambiental e a toxicidade a animais. Assim, os herbicidas químicos vêm sendo substituídos pelos herbicidas naturais, os quais compreendem em sua formulação substâncias biologicamente ativas. A presente invenção refere-se à composição herbicida que compreende proteínas com ação sinérgica Cerato-Plataninas (CP), obtida do fungo *Moniliophthora perniciosa*, patógeno que causa a doença Vassoura-de-Bruca no cacauzeiro (*Theobroma cacao*) e das indutoras de necrose e etileno (NEP) e referido uso para ação seletiva para plantas dicotiledôneas.

**“COMPOSIÇÃO HERBICIDA SELETIVA PARA
DICOTILEDÔNEA, E MÉTODO DE APLICAÇÃO DA REFERIDA
COMPOSIÇÃO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a uma composição herbicida que compreende uma ou mais proteínas da família das Cerato-Plataninas (CP), obtida do fungo *Moniliophthora perniciosa*, patógeno que causa a doença Vassoura-de-Bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*) e das indutoras de necrose e etileno (NEP) e
10 referido uso para ação seletiva para plantas dicotiledôneas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

GLOSSÁRIO

• Clonagem e expressão gênica: Refere-se à técnica mediante a qual um gene é inserido em vetor de expressão para a
15 obtenção de DNA recombinante, permitindo a transcrição e tradução desse gene em proteína.

• Cotilédone: são as primeiras folhas que surgem dos embriões das Angiospermas, irrompendo durante a germinação das sementes. São estruturas de reserva, nutrindo as plantas em
20 desenvolvimento até que essas possam conseguir nutrientes pela fotossíntese.

• Elicitor: Moléculas do patógeno que são reconhecidas pelo hospedeiro desencadeando respostas de defesa como a hipersensibilidade necrótica, podendo levar à resistência sistêmica
25 adquirida. São de natureza química diversa: proteínas, lipídeos e oligossacarídeos.

• Fitotoxicidade: No caso da presente invenção refere-se à capacidade de indução de morte celular causada nos tecidos das plantas após o contato com a(s) proteína(s) objeto da invenção.

5 • Gene: Refere-se a fragmento de DNA que é transcrito em molécula de RNA e que codifica para uma proteína.

• Herbicida: Produto químico utilizado na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas, arbustos ou outras plantas indesejáveis.

10 • Herbicida seletivo: é o herbicida que tem a especificidade na sua ação, ou seja, quando aplicado na área de plantio, não afeta de forma danosa a cultura principal, embora controle eficientemente plantas indesejáveis.

15 • Inoculação de proteínas em plantas: Procedimento mediante o qual se coloca a(s) proteína(s) em contato com superfícies e células da planta

20 • Morte celular programada: é um tipo de "auto-destruição celular" que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução. Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas pode também ser causada por um estímulo patológico.

25 • Necrose: Refere-se ao desenvolvimento de lesões em células ou tecidos de plantas após o contato com a(s) proteína(s) indutora(s) de acordo com a invenção. A necrose torna-se visível quando um número suficiente de células morre após o contato com a(s) proteína(s).

- PCD: Termo em inglês para Morte Celular Programada (Programmed Cell Death)

- Pfam: É uma base de dados de família de proteínas que inclui anotações e o suas múltiplas sequências de alinhamento baseado no modelo oculto de Markov (HMM). Cada Pfam HMM representa uma família de proteína ou domínio.

- Plantas dicotiledôneas: Plantas pertencentes ao grupo das Angiospermas que apresentam dois cotilédones. Possuem geralmente pétalas em número de 4 ou 5 (ou múltiplos), nervuras dispostas de forma reticular e crescimento variável, podendo atingir um porte herbáceo, arbustivo ou arbóreo.

- Plantas monocotiledôneas: Plantas pertencentes ao grupo das Angiospermas (plantas com flores) que apresentam um cotilédone. Geralmente possuem um número de três pétalas ou múltiplos deste (6, 9...), também possuem as nervuras das folhas dispostas de forma paralela e em geral têm porte herbáceo.

- Proteína recombinante: Proteína obtida mediante a expressão de um gene clonado em vetor de expressão.

- Resistência sistêmica adquirida: Resposta de resistência da planta que ocorre após exposição a moléculas produzidas por um agente patogênico, geralmente aqueles que causam necrose. Plantas sensibilizadas por essas moléculas se tornam mais resistentes a ataques de patógenos (Djonovic et al., 2006).

- Surfactantes: moléculas usadas como adjuvantes em composições de herbicidas que diminuem a tensão superficial de

ambientes aquosos, facilitando a penetração da formulação nos tecidos da planta, tanto via estômatos quanto pela cutícula. Este efeito garante uma maior eficácia ao herbicida.

• Vetor de expressão: Molécula de DNA que consta com regiões regulatórias, em particular um promotor induzível, permitindo a expressão de um gene inserido *downstream* mediante técnicas de DNA recombinante.

Herbicidas são produtos utilizados na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas. Os mais utilizados pela indústria agrícola são os herbicidas químicos, porém, diversos problemas decorrentes da utilização desse tipo de herbicida precisam ser evitados ou minimizados, dentre eles a contaminação ambiental e a toxicidade a animais.

Assim, os herbicidas químicos vêm sendo substituídos pelos herbicidas naturais, os quais compreendem em sua formulação substâncias biologicamente ativas. Contudo, o surgimento de ervas resistentes a esse tipo de formulações tem sido um problema a ser superado.

Atualmente, a escolha por um herbicida seletivo e adequado a uma determinada cultura depende muito das diferenças entre a planta cultivada e as espécies daninhas. O uso de um herbicida em concentração adequada para eliminar as espécies daninhas não deve ser prejudicial à cultura cultivada. Um importante fator a ser considerado quando da escolha do herbicida, consiste no seu modo de ação e a forma pela qual é metabolizado pelas plantas.

Os herbicidas têm diferentes mecanismos de ação, por exemplo:

- a) Inibidores mitóticos da raiz: São compostos capazes de bloquear a divisão celular. Exemplos: Trifluralin e Pendimethalin.
5 Causam inibição do desenvolvimento radicular levando ao nanismo da planta.
- b) Inibidores de pigmentos: Contribui à destruição da clorofila. Exemplos: Clomazone e Norflurazon. Causam clorose das folhas.
- c) Inibidores de brotamentos: Afetam crescimento e divisão
10 celular. Exemplos: Alachlor e Metachlor. Provocam retardo no crescimento de plantas e brotos.
- d) Inibidores da fotossíntese: Interferem na fotossíntese mediante o bloqueio do transporte de elétrons, provocando danos nas membranas celulares e a morte. Exemplos: Atrazine e
15 Cyanazine.
- e) Herbicidas tipo auxinas: Afetam o crescimento de novos caules e folhas mediante a alteração da síntese de proteínas e da divisão normal das células. Exemplos: 2,4-D e 2,4-DB. Produzem raquitismo e mudas malformadas.
- f) Inibidores da enzima acetolactato liase (ALS): Bloqueiam a
20 atividade normal da ALS inibindo o metabolismo e a mitose. Exemplos: Imazethapyr e Nicosulfuron. Inibem o crescimento normal da planta causando nanismo.
- g) Inibidores meristemáticos: Bloqueiam a formação de lipídeos
25 em meristemas e raízes de gramíneas. Exemplos: Sethoxydim e Quizalofop. Provocam crescimento lento levando ao nanismo.

h) Disruptores de membranas: Provocam ruptura de membranas internas da célula. Exemplos: Acifluorfen e Lactofen.

Dentre os herbicidas não seletivos que atuam na via biossintética de aminoácidos encontra-se o glifosato (N-(fosfometil) glicina, $C_3H_8NO_5P$). O glifosato é um dos herbicidas sistêmicos mais efetivos para inibir o crescimento tanto de ervas daninhas, tais como as perenes, como das plantas cultivadas.

Um herbicida para ser efetivo deve ser absorvido pela planta alvo e translocado para o sítio de ação molecular. Neste âmbito de atuação, os estudos relacionados variam de acordo com a espécie de planta estudada, mas também, referidos processos são influenciados por determinadas condições ambientais, tais como: temperatura, umidade e luz.

As vantagens procuradas na utilização de herbicidas são: rapidez de ação, especificidade a plantas indesejadas, custo reduzido, baixo efeito residual e não revolvimento do solo.

Herbicidas com especificidade a diferentes tipos de plantas existem, mas são menos comuns do que os genéricos. Existem herbicidas específicos a plantas dicotiledôneas que não agredem uma cultura de monocotiledôneas, como os feitos à base de auxina sintética, sendo o produto 2,4D o mais comum e mais utilizado. O produto 2,4D age nas plantas como um mimetizador de auxinas. Embora estudos farmacológicos demonstrem que ele não é acumulado no corpo humano, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou o 2,4-D como moderadamente tóxico (classe II) e

recomendou o uso de uma concentração máxima dissolvida em água de abastecimento de 30µg/L.

Visando superar todos os inconvenientes da técnica, a presente invenção visa suprir a deficiência de um herbicida seletivo e não tóxico para ervas daninhas através da utilização de substâncias biologicamente ativas proveniente do fungo *Moniliophthora perniciosa* para substituir os herbicidas químicos.

Moniliophthora perniciosa é um fungo basidiomiceto hemibiotrófico [Purdy & Schmidt, 1996] que causa a doença Vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. Existe considerável variação nos sintomas da Vassoura-de-bruxa em dependência do cultivar, do tipo de tecido infectado e da etapa de desenvolvimento do tecido [Pereira, 2000]. *M. perniciosa* invade tecidos meristemáticos do hospedeiro provocando inchaço da parte afetada. Esse sintoma é produto da rápida divisão celular (hipertrofia) e incremento do tamanho das células (hiperplasia) que aparece acompanhado da proliferação de superbrotamentos devido à perda de dominância apical. Formam-se estruturas de folhas grandes, curvadas e retorcidas com aparência de vassouras, que dão o nome à doença [Griffith *et al.*, 2003]. Quando jovens, as vassouras são de coloração verde intenso (vassoura verde), mas morrem em 1-2 meses dando uma cor marrom à copa das árvores infectadas (vassoura seca).

Devido à complexidade da doença Vassoura-de-bruxa, o Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia da Unicamp começou no ano 2001 o projeto genoma de *M. perniciosa* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>), com o objetivo de

identificar genes que codifiquem proteínas potencialmente relacionadas com o desenvolvimento da doença. O *survey* do genoma foi publicado por Mondego e colaboradores (2008) na revista BMC Genomics [Mondego *et al.*, 2008].

5 Análises do genoma de *M. pernicioso* mostraram a existência de genes codificadores para proteínas com capacidade de induzir necrose nos tecidos da planta. Foram identificadas, especificamente, seqüências com similaridade a genes que codificam proteínas pertencentes a duas famílias de elicitores:
10 Cerato-platanina [Zaparoli *et al.*, 2008] e Proteínas indutoras de Necrose e Etileno (NEPs) [García *et al.*, 2007]. Genes representativos de cada família de elicitores produzidos por *M. pernicioso*, tanto NEPs (MpNEP1 e MpNEP2) quanto Cerato-platanina (MpCP1, MpCP2 e MpCP3), foram clonados e expressos
15 utilizando-se *E. coli* como sistema de expressão. As proteínas produzidas de ambas as famílias foram capazes de induzir necrose em folhas de plantas de cacau e tabaco [García *et al.*, 2007; Zaparoli *et al.*, 2008].

 A proteína NEP1, precursora da família das NEPs foi
20 descoberta em 1995 a partir de filtrado de cultura de um isolado patogênico do fungo *Fusarium oxysporum* [Bailey, 1995]. Com o desenvolvimento dos métodos de análises da genômica e proteômica, têm sido descritas proteínas semelhantes a Nep1 em grande variedade de organismos, expandindo rapidamente esta
25 família de proteínas tanto em tamanho quanto em distribuição –

bactérias, oomicetos e fungos [Gijzen & Nurnberger, 2006; García *et al.*, 2007].

Todas as NEPs descritas se caracterizam por apresentar um domínio NPP1 (Necrosis-inducing Phytophthora Protein) [Fellbrich *et al.*, 2002] com dois ou quatro resíduos de cisteína conservados, e uma seqüência conservada de sete aminoácidos (GHRHDWE) localizada na região central da proteína. Uma importante característica das NEPs é a capacidade de ativar respostas de defesa nas plantas como a morte celular programada e indução de genes relacionados com patogenicidade [Jennings *et al.*, 2001; Veit *et al.*, 2001; Fellbrich *et al.*, 2002; Keates *et al.*, 2003; Verica *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2005]. Proteínas da família NEP são capazes de induzir necrose unicamente em plantas dicotiledôneas [Qutob *et al.*, 2006].

As proteínas da família NEP podem ser utilizadas como composto ativo de herbicidas específicos para plantas dicotiledôneas (Bailey *ET al.*, 2000). No documento WO2006068481, os inventores reivindicaram a utilização das proteínas indutoras de necrose e etileno (NEP) de espécies do gênero *Botrytis*, entre outras finalidades, como componentes de herbicidas.

Cerato-platanina constitui uma família de proteínas descrita pela primeira vez em 1999 em extrato de proteínas totais do fungo ascomiceto *Ceratocystis fimbriata* f.sp. platani, causador do Mal-do-facão em cacauzeiros [Pazzagli *et al.*, 1999]. Atualmente (07/2009) a família das Cerato-plataninas possui 70 entradas no

InterPro (IPR010829). Esta família é caracterizada por proteínas secretadas de baixo peso molecular, com alta similaridade de seqüências de aminoácidos e a presença de quatro cisteínas conservadas que podem formar duas pontes dissulfeto. Todas as
5 proteínas descritas da família são secretadas por fungos e em alguns casos, como a Cerato-platanina de *Ceratocystis fimbriata*, foi demonstrado experimentalmente que a proteína é capaz de induzir a produção de fitoalexinas e a morte celular em plantas hospedeiras e não hospedeiras do patógeno, agindo como um provável elicitor
10 de respostas de defesa em plantas [Pazzagli *et al.*, 1999].

Além da indução de necrose e morte celular, é descrita outra função para proteínas da família das Cerato-plataninas. A proteína Sm1 de *Trichoderma spp* induz resistência sistêmica a patógenos após ser aplicada em plantas (hospedeiras ou não)
15 através da ativação de mecanismos de defesa das plantas [Djonovic *et al.*, 2006; Djonovic *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2008].

Há indícios de uma possível relação entre o estado de agregação das proteínas da família cerato-platanina com a atividade biológica (indução de necrose e resistência sistêmica).
20 Tanto Sm1 quanto Epl1, ambas pertencentes à família das cerato-plataninas expressas e secretadas por *Trichoderma*, quando presentes em forma de monômeros são capazes de induzir resistência sistêmica, mas não induzem necrose. Entretanto, as formas diméricas destas proteínas causam necrose e não induzem
25 respostas de resistência em plantas [Vargas *et al.*, 2008].

Zaparoli e colaboradores (2008) mostraram que uma proteína da família Cerato-platanina de *M. pernicioso* (MpCP1) está presente em forma de dímero e é capaz de induzir necrose em plantas dicotiledôneas. A necrose produzida, entretanto, não é proporcional ao aumento da concentração de proteína inoculada, sendo que a indução dos sintomas só se verifica em concentrações superiores ou iguais a 0.5 mg/mL. Em concentrações subnecróticas de cerato-platanina, a planta é capaz de expressar genes relacionados à resistência a patógenos (Djonovic et al., 2006, Djonovic et al., 2007).

A inoculação da proteína MpCP1 (Seq. 6) em plantas de cacau e tabaco em conjunto com uma proteína de *M. pernicioso* com similaridade a NEP, MpNEP2 (Seq. 4), mostrou um aumento na intensidade dos sintomas de necrose observados, sugerindo uma sinergia entre estas duas proteínas. Tanto a proteína MpCP1 como MpNEP2 mostraram-se resistentes a altas temperaturas mantendo a atividade biológica mesmo após estresse de temperatura (30 minutos a 100°C) [García et al., 2007; Zaparoli et al., 2008].

O uso de proteínas produzidas por seres vivos como princípios ativos ou adjuvantes em produtos industriais, com a finalidade de aumentar sua eficiência, vem sendo cada vez mais empregado. Produtos como sabões em pó utilizam em suas formulações diferentes enzimas, ou conjuntos enzimáticos, a fim de aumentar seu efeito de limpeza. Estas enzimas são produzidas artificialmente, e adicionadas à formulação.

Os principais tipos de enzimas utilizadas na indústria de detergentes incluem: a) amilases, que degradam amido e outros carboidratos; b) proteases, que degradam ligações peptídicas; c) lipases, que degradam lipídeos; d) celulases, que degradam
5 celulose (Bom, 1995). Os sabões em pó em sua maioria são adicionados de enzimas que vão degradar a matéria orgânica, de acordo com sua afinidade pelo substrato, presente nas manchas das roupas. Este é um claro exemplo da viabilidade de utilizar proteínas como princípios ativos de compostos em escala industrial.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Os herbicidas hoje utilizados na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas apresentam diversos problemas como a contaminação ambiental e a toxicidade. Frente a este problema, os herbicidas químicos vêm sendo substituídos
15 pelos naturais, os quais compreendem em sua formulação substâncias biologicamente ativas.

A presente invenção refere-se à composição herbicida com componentes biologicamente ativos, especificamente uma ou mais proteínas indutoras de necrose do grupo da Cerato-plataninas e das NEPs, com ação sinérgica de modo a causar necrose
20 especificamente em plantas dicotiledôneas, mais eficientemente do que se aplicados separadamente. A composição pode ser utilizada em adição com outras composição utilizadas na agroindústria como por exemplo as bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas,
25 nematicidas, condicionantes do solo, fertilizantes, ou outros aditivos

já empregados para ao aumento do rendimento da cultura de interesse.

A presente invenção, por apresentar um efeito sinérgico das proteínas as proteínas CP e NEP, possibilita um controle eficiente e específico, pré ou pós-emergente, de ervas daninhas e plantas dicotiledôneas. Tais características permitem o uso de herbicidas químicos em menores concentrações, diminuindo seu efeito tóxico, o impacto ambiental e o prejuízo às culturas monocotiledôneas. A composição pode conter, além das referidas proteínas e herbicidas, um veículo líquido (como água, álcool ou compostos apolares) ou veículo sólido (como argila, talco ou minerais inorgânicos), emulsificantes, tampões de pH, estabilizantes, anti-congelantes, surfactantes, gelificantes, agentes dispersivos, agentes adesivos ou outros aditivos, empregados dependentemente de condições da cultura a ser protegida, da praga a ser combatida, climáticas, do solo, do método de utilização e aplicação, etc.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção compreende as proteínas pertencentes à família das cerato-plataninas (CP) do fungo *Moniliophthora pernicioso* MpCP1 [EU250339], MpCP2, [EU250341], MpCP3 [EU250343] ou qualquer outra proteína homóloga pertencente a esta família – (pfam). Uma composição herbicida pode compreender uma única proteína na formulação ou uma associação com outras proteínas indutoras de necrose. Dentre as combinações possíveis estão proteínas da classe das NLPs

(NEP1 like proteins), entre outras. A associação CP:NEP de *M. pernicioso* mostra um aumento na intensidade da necrose em comparação à aplicação separada das mesmas, acelerando a morte da folha [Zaparoli *et al.*, 2008].

5 A presente invenção compreende proteínas indutoras de necrose em plantas, pertencentes à família das Ceratoplataninas e das NEPs, em combinação, atuando sinergicamente para causar necrose especificamente em plantas do grupo das dicotiledôneas, em uma composição, permitindo assim o controle pré- ou pós-
10 emergente de plantas desse grupo, sem prejuízo a plantas do grupo das monocotiledôneas. Dessa maneira, torna-se possível uma menor utilização de herbicidas químicos inespecíficos para uma erva - daninha a ser combatida e/ou tóxicos para o homem e outros animais e o meio-ambiente, graças à característica das proteínas
15 CP e NEP de causar necrose especificamente em plantas dicotiledôneas, sem prejudicar as plantações monocotiledôneas. Como exemplos de plantas monocotiledôneas, têm-se culturas de trigo, arroz, milho e cana de açúcar.

 As referidas proteínas podem ser adicionadas a
20 qualquer formulação já existente e utilizada na agroindústria, incluindo bactericidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, condicionantes do solo ou fertilizantes, conferindo ou aumentando características de eficiência e especificidade de combate contra plantas dicotiledôneas, impedindo ou retardando seu crescimento,
25 diminuindo a necessidade do uso de herbicidas químicos.

É necessário também garantir que, uma vez aplicada a composição em questão, ela permaneça em contato com a erva daninha o maior tempo possível, garantindo uma maior eficácia. Isso pode ser conseguido através de aditivos, tais como agentes adesivos, substâncias que inibam a evaporação da composição (como compostos apolares de alta pressão de vapor), emulsificantes, substâncias que impeçam a lixiviação da composição [dióis, trióis ou polióis capeados com isocianato (BR951012) ou outros polímeros, ou umectantes para composições em veículo sólido.

As proteínas selecionadas para a combinação da presente invenção, apresentam resistência a altas temperaturas, de maneira a manter a atividade de indução e necrose em plantas dicotiledôneas mesmo depois de confrontadas com elevadas temperaturas - mesmo após meia hora em água fervendo, as proteínas MpCP1 (Cerato-platanina) e MpNEP2 (NLPs) preservam a sua atividade [García *et al.*, 2007; Zaparoli *et al.*, 2008]. Essa característica indica uma excelente propriedade para a manutenção da estabilidade do proposto princípio ativo do herbicida em solução. Ainda assim, podem ser empregados estabilizantes ou anti-congelantes às formulações herbicidas, permitindo que sejam preservadas por mais tempo, garantindo sua eficácia após algum período de armazenamento, ou em concentrações mais elevadas, úteis para economia durante o transporte e de espaço e esforço durante o manuseio das composições em questão. Esses podem

ser tampões de pH, como Tris-HCl, estabilizantes, glicerol, etilenoglicol ou propilenoglicol (anti-congelantes).

Outros aditivos opcionais incluem anti-espumantes (p.e. baseados em silicone ou estearato de magnésio), umectantes e corantes, etc.

A composição herbicida pode ser convertida em solução, suspensão, emulsão, polvilho, pó, pasta ou grânulo, podendo estes ser ainda diluídos, ressuspensionados, emulsionados, sempre tendo em vista uma melhor aplicação e eficiência do produto final, dependendo de características da planta a ser protegida, da praga a ser combatida, climáticas, de solo, etc.

O contato proteína(s)-células da planta pode ser realizado tanto no tecido foliar mediante aplicação direta na superfície da folha (aspersão foliar, etc.), como no tecido radicular (aplicação direta no solo, mistura com adubos ou condicionantes do solo, etc). As composições podem, por exemplo, ser diluídas ou ressuspensionadas no sistema de irrigação da planta.

Em dependência do método utilizado para favorecer o contato da solução de proteínas com as células da planta, pode variar a formulação (concentração de proteínas e aditivos) a ser utilizada, uma vez que a penetrabilidade da mistura de proteínas nos tecidos vai influenciar diretamente a extensão da lesão.

O grau de penetrabilidade (absorção) vai depender não só do método de inoculação utilizado como também das características do tecido (exemplo, número de estômatos na superfície da folha) e de fatores ambientais como a umidade presente no momento da

inoculação. Para facilitar a penetrabilidade das proteínas nos tecidos da planta, a aplicação pode ocorrer com o clima úmido, após um período de chuva ou irrigação, por exemplo.

Uma formulação que seja capaz de penetrar pela superfície das plantas-alvo é desejada a fim de colocar as proteínas no interior das folhas e/ou raízes, aumentando assim a quantidade de proteínas causadoras de necrose que atingem seu alvo – as células vegetais –, diminuindo a concentração efetiva/real necessária no produto final.

A melhor maneira para realização dessa tarefa é mediante a adição de organosulfactantes à formulação do herbicida. A aplicação de organosulfactantes juntamente com as proteínas, mostra um aumento da eficiência do produto final, uma vez que auxilia a penetração das proteínas pelos estômatos e a cutícula da planta, atingindo assim mais facilmente o alvo – as células. Um grupo de surfactantes amplamente usado em herbicidas comerciais são as organossiliconas como, por exemplo, o Silwet L-77 (1,1,1,3,5,5,5-heptamethyltrisiloxanyl propyl-methoxy-poly[ethylene oxide]), porém outros podem ser empregados desde que não reduzam drasticamente a atividade das proteínas CP e NEP.

A compatibilidade das proteínas NEPs com herbicidas químicos (glifosato e 2,4D) já foi testada segundo Bailey e colaboradores (2000). Esse trabalho mostrou que NEP1 não interfere na ação desses herbicidas químicos e vice-versa, enquanto que a utilização da proteína acelerou o processo de necrose. Esses estudos serviram de base para a proposta de

utilização das proteínas ora selecionadas em combinação com herbicidas químicos conhecidos.

Incluem-se no escopo desta invenção combinações da composição herbicida com outros agroquímicos já empregados na agroindústria, tais como bactericidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, fertilizantes, condicionantes do solo, etc.

A composição herbicida necessita de um veículo para ser aplicada às plantações, o qual pode ser líquido (água, álcool, cetonas, ésteres, parafinas, hidrocarbonetos, compostos aromáticos ou mistura desses, p.e.) ou sólido (argilas, talcos ou minerais inorgânicos, como sílica, p.e.).

EXEMPLOS

Os exemplos abaixo descritos têm o intuito somente de exemplificar algumas das inúmeras maneiras de realizar a invenção, contudo sem limitar o escopo ou escalonamento da mesma.

EXEMPLO 1

As proteínas CP e NEP, presentes de 5 ug/mL a 500 ug/mL, preferencialmente 100 a 200 ug/mL, são adicionadas a um fertilizante empregado no solo ou um condicionante do solo, os quais são aplicados antes da plantação da cultura monocotiledônea desejada. Dessa maneira, ervas - daninhas dicotiledôneas que entram em contato, sofrem o processo necrótico, o qual causa o retardamento ou impedimento do crescimento, contudo, sem causar danos à plantação de monocotiledôneas.

EXEMPLO 2

As proteínas CP e NEP, presentes de 5 ug/mL a 500 ug/mL, preferencialmente 100 a 200 ug/mL, são adicionadas a um nematicida aplicado no solo de uma plantação de plantas monocotiledôneas. Assim, além do controle de nematóides, 5 prejudiciais à plantação, haverá o controle das ervas daninhas dicotiledôneas em pré- ou pós-emergência.

EXEMPLO 3

As proteínas CP e NEP, presentes de 5 ug/mL a 500 ug/mL, preferencialmente 100 a 200 ug/mL, são adicionadas a um 10 fungicida foliar aplicado por aspersão na plantação monocotiledônea. Dessa maneira se obtém uma composição que, além de combater fungos, auxilia no controle de plantas dicotiledôneas indesejadas.

EXEMPLO 4

15 Formulações herbicidas (2,4D ou glifosato, p.e.) contendo as proteínas CP e NEP, presentes de 5 ug/mL a 500 ug/mL, preferencialmente 100 a 200 ug/mL. A característica de causar necrose em tecidos vegetais de CP e NEP especificamente em plantas dicotiledôneas permite que sejam utilizadas menores 20 quantidades ou concentrações de tais herbicidas químicos no combate a essas pragas, bem como minimizando sua toxicidade e os impactos causados no meio ambiente e na plantação monocotiledônea de interesse. Tais formulações são dependentes da plantação a ser protegida, da praga a ser combatida, o estágio 25 de desenvolvimento da praga a ser combatida (pré- ou pós-emergente), características climáticas, do solo, etc.

REFERÊNCIAS

Bailey, B. A. (1995). "Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium-Oxysporum* That Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum-Coca*." Phytopathology **85**(10): 1250-1255.

Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Antunez de Mayolo, G., Guiltinan, M. J., Verica, J. A., Maximova, S. N. Bowers, J. H. (2005). "Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*." Plant Physiol Biochem **43**(6): 611-22.

Bailey, B. A., Collins, R. Anderson, J. D. (2000). "Factors influencing the herbicidal activity of Nep1, a fungal protein that induces the hypersensitive response in *Centaurea maculosa*." Weed Science **48**: 776-785.

Djonovic, S., Pozo, M. J. Kenerley, C. M. (2006). "Tv-bgn3, a {beta}-1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens* is Involved in Mycoparasitism and Control of *Pythium ultimum*." Appl Environ Microbiol.

Djonovic, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. K., Horndeski, M., Wiest, A. Kenerley, C. M. (2007). "A Proteinaceous Elicitor Sm1 from the Beneficial Fungus *Trichoderma virens* Is Required for Induced Systemic Resistance in Maize." Plant Physiol.

Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M.

Nurnberger, T. (2002). "NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis." Plant J **32**(3): 375-90.

García, O., Macedo, J. C., Tibúrcio, R., Zaparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L. M., Ceita, G. O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A. C., Schiavinato, M. A., Medrano, F. J., Meinhardt, L., Pereira, G. A. G. Cascardo, J. (2007). "Characterization of Necrosis and Ethylene inducing Proteins (NEP) in the Basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the Causal Agent of Witches' Broom in *Theobroma cacao*." Mycological Research **111**(Pt4): 443-455.

10 Gijzen, M. Nurnberger, T. (2006). "Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa." Phytochemistry **67**(16): 1800-7.

Griffith, G. W., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, R. N. Hedger, J. N. (2003). "Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao." New Zealand Journal of Botany **41**(3): 423-435.

Jennings, J. C., Apel-Birkhold, P. C., Mock, N. M., Baker, C. J., Anderson, J. D. Bailey, B. A. (2001). "Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*." Plant Science **161**(5): 891-899.

Keates, S. E., Kostman, T. A., Anderson, J. D. Bailey, B. A. (2003). "Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis." Plant Physiol **132**(3): 1610-22.

25 Mondego, J. M. C., Carazzolle, M. F., Costa, G. G. L., Formighieri, E. F., Parizzi, L. P., Rincones, J., Cotomacci, C.,

Carraro, D. M., Cunha, A. F., Carrer, H., Vidal, R. O., Estrela, R. C.,
 García, O., Thomazella, D. P. T., Oliveira, B. V., Pires, A. B. L., Rio,
 M. C. S., Araújo, M. R. R., Castro, L. A. B., Gramacho, K. P.,
 Gonçalves, M. S., Góes Neto, A., Barbosa, L. V., Guiltinan, M. J.,
 5 Bailey, B. A., Meinhardt, L. W., Cascardo, J. C. M. & Pereira, G. A.
 G. (2008). "A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives
 new insights into Witches' Broom Disease of cacao." Aceito para
 publicação em BMC Genomics.

Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A.
 10 Scala, A. (1999). "Purification, characterization, and amino acid
 sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from
Ceratocystis fimbriata f. sp. *platani*." J Biol Chem **274**(35): 24959-64.

Pereira, J. L. (2000). "Management of Witches' Broom disease
 of cocoa: a contemporary retrospective." Cocoa Produces's
 15 Alliance, Lagos, Nigeria: 41p.

Purdy, L. H. Schmidt, R. A. (1996). "Status of cacao Witches'
 Broom: biology, epidemiology, and management." Annu Rev
Phytopathol **34**: 573-94.

Qutob, D., Tedman-Jones, J. Gijzen, M. (2006). "Effector-
 20 triggered immunity by the plant pathogen *Phytophthora*." Trends
Microbiol **14**(11): 470-3.

Schouten, A. Van Kan, J. A. L. (2006). NOVEL NECROSIS
 AND ETHYLENE INDUCING PROTEINS FROM BOTRYTIS. US.
WO/2006/068481.

Syngenta (<http://www.syngenta.com.br/website/produtos-e-marcas/protecao-de-cultivos/produtos/produto/default.aspx?IdProduto=242>).

5 Vargas, W. A., Djonovic, S., Serenella, S. A. Kenerley, S. M. (2008). "Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants." J Biol Chem.

10 Veit, S., Worle, J. M., Nurnberger, T., Koch, W. Seitz, H. U. (2001). "A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco." Plant Physiol **127**(3): 832-41.

Verica, J. A., Maximova, S. N., Strem, M. D., Carlson, J. E., Bailey, B. A. Gultinan, M. J. (2004). "Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response." Plant Cell Reports **23**(6): 404-413.

15 Zaparoli, G., García, O. G., Medrano, F. J., Tiburcio, R., Lacerda, G. Pereira, G. A. G. (2008). "Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom disease in cacao, encoding necrosis inducing proteins similar to cerato-platanins." Mycol. Res. Submetido à publicação.

20

REIVINDICAÇÕES

1. Composição herbicida, **caracterizado** por compreender em quantidades efetivas os componentes (A) e (B) com efeito sinérgico seletivo para plantas dicotiledôneas, onde:

5 (A) representa uma ou mais proteínas selecionadas da família Cerato-Platanina;

(B) representa uma ou mais proteínas selecionadas da família Indutora de necrose e etileno (NEP).

2. Composição herbicida, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela proteína da família Cerato Platanina ser preferencialmente MpCP1.

3. Composição herbicida, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela proteína da família Indutora de Necrose e Etileno ser preferencialmente MpNEP2.

15 4. Composição herbicida, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender adicionalmente um ou mais componentes selecionados do grupo de compostos ativos agroquimicamente, formulações auxiliares e aditivos convencionalmente utilizados em atividades agrícolas e de
20 jardinagem.

5. Método de controle de plantas daninhas dicotiledôneas, **caracterizado** pela aplicação da composição conforme descrita nas reivindicações anteriores, ser realizada em conjunto ou separadamente, pré-emergente, pós-emergente, ou pré
25 e pós-emergente, nas partes das plantas, sementes ou na área na qual a planta cresce.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pela aplicação da composição descrita nas reivindicações de 1 a 3, para controle de plantas daninhas dicotiledôneas em uma cultura monocotiledônea.

5 7. Método de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pela aplicação da composição ocorrer em plantas previamente umedecidas.

FIGURAS

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Proteínas NEPs: Proteínas extracelulares produzidas por microorganismos capazes de induzir necrose em plantas. Proteínas com similaridade ao domínio conservado (CD) NPP1 (pfam 05630) com a presença de dois ou quatro resíduos de cisteína característicos.

No genoma de *M. perniciosa* os genes codificadores das NEPs estão localizados no cromossomo 6 (García, et al. 2007).

10 **1. MpNEP 1:**

DNA:

ATGCTATACAGCAGCCTCCTCATCGTTGTTCTCTTCATCGTCACTCGTTCCATGTCGGCTCC
 ACATCAGCTTCCACATGACCAGATTGCCAAGTTCCCAAGTCTGGTGGACCCCTCGAAACA
 CAATACCAACCCGCGCTCCACATTGGCAATGGCTGCCACTCCTACCCCGCCGTCGATGTC
 15 GATGGCAATTGGTCTGGTGGCCTCAAACCTACCGGCGCCCCAGCGCTGCATGCAAGGA
 CACCTCCAAGGCCAGACGTATGTTTCGCTCTGCCACATTCCAAGGCAAGACTGCTCTGGT
 CTACGCCTGGTACATGCCCAAGGACGAGATCTCCACAGGAATCGGACACAGGCACGATTG
 GGAAGGTGCTGTTGTCTTCTCAACAGCGATACTCAGCAAATCGACGGAGTTGCCGCTTCT
 GCGCACGGAAAGTGGCGTAAATACCCGAACCCAGGCGGGGCAATATCGATGATACACAT
 20 GTGAAGCTCCAGTACTCGGCAGAGCCAGTTATCAACTCGCACGCTCTCGACCTTACCGATA
 AAGGCGGCGATCTTCCAACACTCGCTTCTTGGGAAGGTATGGGCGCTGATGCTCGTGACG
 CTATCAATGAAAGGAGCCATTGGGGTGACGCTAATCCACCCATTGCGGATTCGCTCATTGA
 CTCGAGCTTGTCGGGGGCTTGGATGTGGTAG

25 **2. MpNEP1**

Proteína:

MLYSSLLIVLFIIVTRSMSAPHQLPHDQIAKFPKSGGPLETQYQPALHIGNGCHSYPAVDVDGN
 WSGGLKPTGAPSAACKDTSKAQTYVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRHDWEGAVV
 FLNSDTQQIDGVAASAHGKWRKYPNPGGANIDDTHVKLQYSAEPVINSHALDLTDKGGDLPTL
 30 ASWEGMGADARAANERSHWGDANPPIADSLIDSSLGAWMW

Peso molecular: 24,86 kDa

3. MpNEP 2:

35 DNA:

ATGCAGCTCCAAAACCTTCTTTCCATCGTCCTTCTCGTCGTCTCAGGAGCCATTGCCGGCA
 CCGTCATGGACCATGACAAAATTGCCAACTCCCGCCTCCGGTAGTCTCTCGAGACCA
 AGTTCCAACCGCAACTTCACATCGGCAACGGCTGCCACTCCTACCCCGCCGTTGACGCC
 AGGGCAATTGGTCTGGTGGCCTCAAACCTACCGGCGCCCCAGCGCTGCATGCAAGGAC

5 ACCTCCAAGGCCAGACGTATGTTTCGCTCTGCCACATTCCAAGGCAAGACTGCTCTGGTCT
 ACGCCTGGTACATGCCCAAGGACGAGATCTCCACAGGAATCGGACACAGGCACGATTGGG
 AAGGTGCTGTTGTCTTCTCAACAGCGATACTCAGCAAATCGACGGAGTTGCCGCTTCTGC
 GCACGGAAAGTGGCGTAAATACCCGAACCCAGGCGGGGCCAATATCGATGATACACATGT
 GAAGCTCCAGTACTCGGCAGAGCCAGTTATCAACTCGCACGCTCTCGACCTTACCGATAAA
 GGCGGCGATCTTCCAACACTCGCTTCTTGGGAAGGTATGGGCGCTGATGCTCGTGCAGCT
 ATCAATGAAAGGAGCCATTGGGGTGACGCTAATCCACCCATTGCGGATTCGCTCATTGGCT
 CGAGCTTGTCGGGGGCTTGGATGTGGTAG

10 **4. MpNEP2**

Proteína:

15 MQLQNFLSIVLLVSGAIAGTVMHDHDKIAKLPASGSPLETKFQPQLHIGNGCHSYPAVDAQGNW
 SGGLKPTGAPSAACKDTSKAQTYVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRHDWEGAVVF
 LNSDTQQIDGVAASAHGKWRKYPNPGGANIDDTHTVVKLQYSAEPVINSHALDLTDKGGDLPTLA
 SWEGMGADARAAINERSHWGDANPPIADSLIGSSLSGAWMW

Peso molecular: 24,47 kDa

20 **Cerato-plataninas**: Proteínas secretadas por microorganismos com
 similaridade a CP de *Ceratocystis fimbriata* (GI:121624696) com 4
 resíduos de cisteína característicos. Provável função: indução de
 morte celular e ativação das respostas de defesa de plantas.

25 **5. MpCP1**

DNA:

30 ATGAAATCCATCGCCATCTTCACTCCAATCCTCATCCTCCTCACAATCTCTGCAGGAGCTGT
 GAAACTCAGCTACGACGAGGCTTACGACAATCCCAGTAGCTCTCTTGTCCGTTACCTGC
 TCCGATGGAGAGAACGGCCTGTACCCCAAATACCGCACCTTCGGCGACCTTCCCGGGTTC
 CCTTGCATTGGTGGCTCGAGCGACATTGCTGGGTACAATTCCCAAAGCATCTACATGGTGGCGATTGA
 ACCAGTTGACGTATTCCTCTGCGCATACCACCCGAAAAGCATCTACATGGTGGCGATTGA
 TCGCAGCGCAGAAGGCTTTACTGCTTCCAAGCAGGCTATGGATGACTTGACCAACAAACG
 AGCAGAGGAGCTGGGTACAGTCAATGTAGACGTTAGGAAAGTTGATTTTTCAAGGTGCGAA
 CGCAAGTCGTAA

35 **6. MpCP1**

Proteína:

40 MKSIAIFTPILILLISAGAVKLSYDEAYDNPSSSLLSVTCSDGENGLYPKYRTFGDLPGFPCIGGS
 SDIAGYNPNCGSCYQLTYSSAHTPKSIYMVAIDRSAEGFTASKQAMDDLTKRAEELGTVNV
 DVRKVDVFSRCERKS

Peso molecular: 15,65 kDa

7. MpCP2

DNA:

5 ATGAAGTTCACCACTACCATCATCGCTCTTGCTCTCGCTGCCTCCACCGGTGCTGTCCAAC
 TCCGATTTCGACAACACCTACGACAATGCCAGTGGTAGCATGAACACTGTTCGCCTGTTCTAC
 TGGTGCAAACGGCCTTTCACAACGATTCCCAACCTTTGGTTCCGTTCCCACGTTCCCTCAC
 ATTGGAGCATCATCCGATATTGGTGGTTTCAACTCACCGGCTTGTGGAAACTGCAAGTATC
 TFACTCTGTTACGAGGAAATTGGACTAATGGGATCTGTTCTACAGGTTACACTATCAGTTTC
 10 ACCTTCCAAGGTGTTACGAGGAGCATCAATCTTGTGCTATCGACCACGCTGGAAATGGGT
 TTAATGTTGCGCAAGCTGCGATG

8. MpCP2

Proteína:

15 MKFTTTIIALALAASTGAVQLRFDNTYDNASGSMNTVACSTGANGLSQRFPFTFGSVPTFFHIGA
 SSDIGGFNSPACGNCTISFTFQGVTRSINLVAIDHAGNGFNVAQAAM

Peso Molecular: 11,51 kDa

9. MpCP3

DNA:

20 CDsATGAAATTCATCGCAGCCGTCGCACTCCTCGCCACCTCAGCTGTTGCTGTCCAGCTCC
 AATACGATCCAGTCTACGACAACGCCGACCAATCCTTCGGGACCGTAGCATGCTCTGACG
 GCCCAACGGTATGCTACCAAGGGCTACAGCACATTCGGCTCGGTGCCCAGCTACGTCCG
 GTGCAGTAGACACCATCACCGGCTGGAATTCGGAATCCTGCGGTACATGCTACCAAATTAC
 TTGGAGCGGGACTGGAAAGACTATCCATGTCGTCGGTGTGATGTCGCTGGGAATGGGTT
 25 CAATGTGGGACAGAGGGCTATGGATGATTTGACGAATGGACAGGCGGTTCGCTTTGGGAAA
 TATTGATGTTACGGCGACGCTGGTTGACAAGTCGGCTTGCAGACTCTAA

10. MpCP3

Proteína:

30 MKFIAAVALLATSAVAVQLQYDPVYDNADQSFGTVACSDGPNMMLTKGYSTFGSVPSYVGAV
 DTITGWNSESCGTCYQITWSGTGKTIHVVGVDVAGNGFNVGQRAMDDLNGQAVLGNIDVT
 ATLVDKSACRL

Peso Molecular: 13,93 kDa

RESUMO

“COMPOSIÇÃO HERBICIDA SELETIVA PARA DICOTILEDÔNEA, E MÉTODO DE APLICAÇÃO DA REFERIDA COMPOSIÇÃO”

5 Herbicidas são produtos utilizados na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas. Os mais utilizados pela indústria agrícola são os herbicidas químicos, porém, diversos problemas decorrentes da utilização desse tipo de herbicida precisam ser evitados ou minimizados, dentre eles a contaminação ambiental e a toxicidade a animais.

10 Assim, os herbicidas químicos vêm sendo substituídos pelos herbicidas naturais, os quais compreendem em sua formulação substâncias biologicamente ativas.

15 A presente invenção refere-se à composição herbicida que compreende proteínas com ação sinérgica Cerato-Plataninas (CP), obtida do fungo *Moniliophthora perniciosa*, patógeno que causa a doença Vassoura-de-Bruxa no cacauzeiro (*Theobroma cacao*) e das indutoras de necrose e etileno (NEP) e referido uso para ação seletiva para plantas dicotiledôneas.