



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0910421-6 B1

(22) Data do Depósito: 27/03/2009

(45) Data de Concessão: 11/07/2023

(54) Título: MÉTODO PARA AUMENTAR RESISTÊNCIA A DOENÇAS DE PLANTAS, POLIPEPTÍDEO, BEM COMO COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA CONTROLAR AGENTES PATOGÊNICOS DE PLANTAS

(51) Int.Cl.: C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 28/03/2008 CU 2008-0045.

(73) Titular(es): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA.

(72) Inventor(es): ORLANDO BORRAS HIDALGO; ROXANA CARIDADE PORTIELES ÁLVAREZ; MERARDO PUJOL FERRER; GIL ALBERTO ENRIQUEZ OBREGON; ERNESTO MANUEL GONZÁLES RAMOS; CAMILO AYRA PARDO; CARLOS GUILLERMO BORROTO NORDELO.

(86) Pedido PCT: PCT CU2009000003 de 27/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/117975 de 01/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/09/2010

(57) Resumo: ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODO PARA AUMENTAR RESISTÊNCIA A DOENÇAS DE PLANTAS, POLIPEPTÍDEO, BEM COMO BIOPRODUTO E MÉTODO PARA CONTROLAR AGENTES PATOGÊNICOS DE PLANTAS. A presente invenção refere-se a uma sequência de ácido nucleico derivada de *Nicotiana megalosiphon* que codifica uma proteína antipatogênica. A invenção também refere-se ao uso desta molécula de ácido nucleico na obtenção de plantas transgênicas de interesse agrícola, que apresentam resistência a patógenos. A invenção refere-se ainda a um bioproduto contendo esta proteína antipatogênica para o controle de patógenos de plantas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA AUMENTAR RESISTÊNCIA A DOENÇAS DE PLANTAS, POLI-PEPTÍDEO, BEM COMO COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA CONTROLAR AGENTES PATOGÊNICOS DE PLANTAS"**.

5 Campo da técnica

A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia agropecuária, especificamente com a utilização de uma proteína antipatogênica no controle de agentes patogênicos. Quando a proteína antipatogênica é aplicada, ou seja, mediante a expressão desta em plantas geneticamente modificadas, assim como mediante um bioproduto, são obtidos altos níveis de controle de doenças produzidas por agentes patogênicos de plantas.

Estado da técnica anterior

As proteínas antipatogênicas de plantas foram isoladas de folhas, vagens, raízes, tubérculos, talos, frutos e flores, de cultivos tais como rabanete, cebola, alfalfa, pimenta (ají), batata e soja. As proteínas antipatogênicas já foram estudadas tanto no nível bioquímico como estrutural, e assim sabemos que são peptídios pequenos, de aproximadamente 5 KDa, compostos de 45 a 54 aminoácidos, ricos em cisteínas, altamente básicos, e que se encontram carregados positivamente. A família das proteínas antipatogênicas de plantas é diversificada em termos da composição de aminoácidos, já que somente as oito cisteínas que estabilizam a estrutura parecem ser conservadas. Esta característica reflete as diversas atividades biológicas exibidas pelas diferentes proteínas antipatogênicas de plantas (Broekaert *et al.* (1995) Plant Physiol. 108:1353-8).

As proteínas antipatogênicas de plantas podem ser divididas em dois grupos, de acordo com a estrutura da proteína precursora; no primeiro grupo a proteína precursora é composta por um peptídio de sinal procedente do retículo endoplasmático e um domínio de proteína madura. Esta proteína entra em vias secretoras e não tem sinais óbvios para os processos pós-transcricionais. No segundo grupo a proteína antipatogênica é formada por um precursor comprido que contém, além do peptídio de sinal e do domínio maduro, um pré-domínio C-terminal de 33 aminoácidos aproximadamente. Até o momento estas proteínas antipatogênicas só foram encontradas em

espécies de solanáceas (Lay e Anderson (2005) Curr Protein Pept Sci. 6:85-101). Nem todas as proteínas antipatogênicas de plantas possuem o mesmo modo de ação, algumas apresentam uma potente atividade *in vitro* contra um amplo espectro de fungos filamentosos, ainda que em concentrações micromolares, outras não inibem o crescimento fúngico, mas inibem a atividade da α -amilase e de proteínas de síntese (Colilla *et al.* (1990) FEBS Lett. 270: 191-194).

O modelo que explica a atividade da maioria das proteínas antipatogênicas é o Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang, que explica a interação do peptídeo com a membrana plasmática seguida por um deslocamento lipídico, o que provoca a formação de poros multiméricos dentro da membrana plasmática devido à inserção da proteína carregada positivamente na membrana celular depois de produzida a interação deste com os fosfolipídios negativamente carregados da superfície da célula. Estes poros multiméricos constituem canais permeáveis a íons dependentes da voltagem (Thomma *et al.* (2002) Planta 216:193-202). Outro modelo baseia-se na teoria de que muitas proteínas antipatogênicas exercem sua ação não só mediante a permeabilização da membrana citoplasmática mas também mediante canais citoplasmáticos, estas proteínas uma vez dentro da célula afetam a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) e proteínas. Isto sugere que a capacidade das proteínas catiônicas de causar permeabilização da membrana citoplasmática pode não ser a causa principal do modo de ação, mas sim uma via de busca de um alvo intracelular (Thomma *et al.* (2003) Curr Drug Targets Infect Disord. 3:1-8).

Até o momento já foram identificados e caracterizados muitos tipos de proteínas antimicrobianas, cujas possíveis aplicações são diversas, uma vez que a engenharia genética oferece uma estratégia de resistência a doenças nas plantas através de ferramentas celulares e moleculares (Thomma *et al.* (2003) Curr Drug Targets Infect Disord. 3:1-8). Já foi demonstrado que a expressão constitutiva de proteínas antipatogênicas de rabanete aumenta a resistência de plantas de tabaco ao fungo patogênico de folhas *Alternaria longipes*, (Terra *et al.* (1995) Plant Cell 7: 573-588), e o

mesmo ocorre no tomate com *Alternaria solani*. Também, a expressão constitutiva de proteínas antipatogênicas de alfalfa proporcionam uma alta resistência ao fungo de grande importância agronômica *Verticillium dahliae* no cultivo de batata pelo menos em condições de campo (Gao *et al.* (2000) Nat.

5 Biotechnol. 18: 1307-1310).

Por outro lado, plantas de arroz que expressaram constitutivamente os genes de proteínas antipatogênicas das espécies *Brassica oleracea* e *B. campestris* foram modificadas para substituir aminoácidos em diferentes posições, e foram introduzidas individualmente em plantas de arroz
10 em busca de resistência ao fungo *Magnapotha grisea* e à bactéria *Xanthomonas oryzae*, doenças de grande importância em países subtropicais e tropicais. Estas proteínas antipatogênicas conferiram uma resistência eficaz a ambas as doenças e a modificação dos genes destas proteínas levou a um aumento da resistência de amplo espectro em arroz transgênico (Kawata
15 *et al.* (2003) JARQ 37: 71 - 76).

A aplicação das proteínas antipatogênicas de plantas como alternativa para reduzir a perda de colheitas devido ao ataque de fungos patogênicos constitui uma vantagem em relação à aplicação de fungicidas químicos. Primeiro: proteínas antipatogênicas de plantas são derivadas de se-
20 mentes, raízes e tubérculos, e com isso constituem produtos naturais que não são tóxicos para a planta hospedeira e tampouco para as pessoas que consomem os produtos dessas plantas. Segundo: como qualquer outra proteína, as proteínas antipatogênicas como produtos naturais degradam rapidamente, sem deixar qualquer resíduo depois de expirada sua eficácia
25 (Thomma *et al.* (2003) Curr Drug Targets Infect Disord. 3:1-8). As proteínas antipatogênicas de plantas também podem ser usadas para o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos, pois o controle de patógenos eucariotas sempre foi um dos maiores problemas na medicina, aumentando nas últimas décadas com o aumento de pacientes imunodeprimidos devido a
30 doenças tais como AIDS, câncer e transplantes de órgãos, além do surgimento de cepas multirresistentes a drogas e ao aparecimento de novas espécies tanto de fungos filamentosos como de leveduras que são conhecidos

como patógenos oportunistas (Thomma *et al.* (2003) *Curr Drug Targets Infect Disord.* 3:1-8).

Devido à similaridade entre as células dos mamíferos e as células dos patógenos, os compostos antifúngicos devem ser voltados para as moléculas que não estão presentes ou que raramente estão presentes em células de mamíferos, como podem ser componentes da parede celular e de fatores de virulência, e além disso devem ser produtos tão naturais quanto possível, com um amplo espectro de ação, fáceis de produzir e que não induzam resistência (Walsh *et al.* (2000) *Medical Mycology*, 38: 335-347). Por outro lado, as membranas celulares fúngicas são bons alvos para o desenvolvimento desses agentes, porque os componentes da membrana fúngica assim como os lipídios são estruturalmente diferentes nas células de mamíferos. As proteínas antipatogênicas de planta não têm como alvo a biossíntese dos lipídios, uma vez que agem totalmente ao contrário já que seu alvo é constituído pelos próprios lipídios provocando com sua ação a permeabilização da membrana fúngica. Isto proporciona uma alta seletividade e portanto, perspectivas interessantes para o tratamento de infecções fúngicas. Já foram encontradas algumas proteínas antipatogênicas de plantas como: Dm-AMPI, Hs-AFPI e Rs-AFP2 que são ativas a concentrações micromolares contra *Candida albicans*, um patógeno de grande interesse clínico em humanos, o que constitui um exemplo do potencial deste tipo de proteínas de plantas para o desenvolvimento de produtos terapêuticos (Thomma *et al.* (2003) *Curr Drug Targets Infect Disord.* 3:1-8).

Um importante problema a ser solucionado é a obtenção de produtos antipatogênicos de caráter proteico capazes de controlar eficientemente uma ampla gama de fungos e bactérias patogênicos, aspecto de grande importância na agricultura e na medicina.

Descrição da Invenção

Esta invenção propõe-se a resolver o problema acima mencionado, oferecendo tanto a sequência nucleotídica codificante (ácido nucleico da SEQ ID N°: 1) como a sequência de aminoácidos (SEQ ID N°: 6) de uma

nova proteína antipatogênica isolada de *Nicotiana megalosiphon*. A sequência nucleotídica da invenção codifica a proteína pequena rica em cisteínas, que possui um efeito acentuado sobre vários agentes patogênicos.

Constitui também um objetivo da presente invenção um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende a) a sequência de aminoácidos identificada como SEQ ID N°: 6, ou b) uma sequência de aminoácidos onde um ou vários resíduos aminoácidos foram deletados, substituídos e acrescentados à sequência de aminoácidos identificada como SEQ ID N°: 6, e que mantém suas propriedades de controlar uma infecção por agentes patogênicos.

Em uma modalidade da invenção, o gene que codifica a proteína antipatogênica da presente invenção é usado para melhorar os níveis de resistência e defesa das plantas contra vários agentes patogênicos. Portanto, a presente invenção inclui um método para aumentar a resistência a doenças de plantas produzidas por agentes patogênicos, mediante a transformação genética da planta com uma sequência de ácido nucleico que compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID N°: 1, que leva à expressão constitutiva ou induzida da proteína antipatogênica que compreende a SEQ ID N°: 6.

A molécula de ácido nucleico objeto da presente invenção pode ser usada para a transformação de plantas. Em uma modalidade preferida, a sequência de DNA que codifica a proteína antipatogênica pode ser usada para a transformação das seguintes espécies de plantas: *Zea mays*, *Brassica sp.*, *Medicago sativa*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Pennisetum glaucum*, *Helianthus annuus*, *Triticum aestivum*, *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas*, *Manihot esculenta*, *Coffea spp.*, *Cocos nucifera*, *Ananas comosus*, *Citrus spp.*, *Theobroma cacao*, *Camellia sinensis*, *Musa spp.*, *Persea americana*, *Ficus casica*, *Psidium guajava*, *Mangifera indica*, *Carica papaya*, *Beta vulgaris*, *Saccharum spp.*, *Lycopersicon esculentum*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Hibiscus rosasanensis*, *Rosa spp.*, *Tulipa spp.*, *Pinus taeda*, *Pinus elliotii*, *Pinus ponderosa*, *Pinus contorta*, *Pinus radiata*.

A presente invenção pode ser usada em uma variedade de métodos que permitam a obtenção de plantas de interesse agrícola que expressem a proteína antipatogênica. Assim sendo, a sequência de ácido nucleico (SEQ ID No. 1) que codifica a proteína antipatogênica pode ser usada em combinação com um promotor que é introduzido em uma planta de interesse agrícola. Podemos utilizar um promotor constitutivo que expresse níveis altos e produza níveis elevados de expressão da proteína antipatogênica. Em outras formas, a sequência que codifica a proteína antipatogênica pode ser manipulada e unida a um promotor tecido específico para dirigir a expressão a um tecido particular de uma planta suscetível a um patógeno. Outro objetivo da invenção é um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos identificada como SEQ ID N°: 6 ou SEQ ID N°: 7. Qualquer um desses polipeptídios tem atividade biológica contra agentes patogênicos, e por isso nesta invenção são denominados proteínas antipatogênicas. Outro objetivo da invenção é um polipeptídeo que compreende em sua cadeia polipeptídica uma sequência de aminoácidos com pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID N°: 6.

Em uma modalidade preferida os polipeptídios ou proteínas antipatogênicas da invenção são obtidos por via recombinante ou por síntese química. As proteínas antipatogênicas da invenção podem ser expressas por meio da tecnologia de DNA recombinante em diferentes sistemas hospedeiros, e serem isoladas a partir dos mesmos. Em uma modalidade da invenção a proteína antipatogênica pode ser expressa em leveduras. Em uma modalidade preferida, a expressão por meio de DNA recombinante é feita em *Pichia pastoris*, de preferência no sobrenadante de cultura. A partir dos hospedeiros, os polipeptídios da invenção podem ser obtidos por aplicação das técnicas de isolamento de proteínas. O processo de purificação pode ser realizado usando-se técnicas imunoenzimáticas, cromatográficas, de lavagem do precipitado celular, e outras técnicas conhecidas no estado da técnica.

Variantes de sequências de aminoácidos que resultem da sequência SEQ ID N°: 6 com peptídios estabilizadores ou que dirijam a ex-

pressão a determinados compartimentos do hospedeiro, e que mantenham a atividade biológica demonstrada para essa molécula também constituem um objetivo da presente invenção. Um exemplo destas é a proteína de fusão cuja sequência é mostrada como SEQ ID N°: 7. Também constituem um
5 objetivo da presente invenção fragmentos da proteína antipatogênica, como aqueles identificados na Listagem de Sequências como SEQ ID N°: 8 e SEQ ID N°: 9, que retenham a atividade de controle sobre agentes patogênicos.

Outro aspecto da presente invenção é um bioproduto para controle de agentes patogênicos que compreende o polipeptídio identificado
10 como SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7 ou um polipeptídio com pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID N°: 6. No contexto da presente invenção, bioproduto é um produto que é proveniente de um organismo vivo.

Nesta invenção estas proteínas antipatogênicas são usadas, pela primeira vez, em bioprodutos que conferem altos níveis de proteção contra as principais doenças produzidas por agentes patogênicos, com alta estabilidade e baixos índices de contaminação, e por conseguinte, sua utilização apresenta melhor aceitação pública e menos exigências regulamentares. O bioproduto que contém a proteína antipatogênica da presente invenção produz
15 altos níveis de proteção contra fungos e bactérias, não reportados anteriormente. Para obtenção do bioproduto, a proteína antipatogênica pode ser formulada como uma suspensão, solução, emulsão, pó, grânulo, concentrado emulsificável, aerossol, grânulo impregnado, adjuvante, pasta ou como encapsulações. Em uma modalidade da invenção, o bioproduto contém o polipeptídio purificado a partir de um hospedeiro transformado geneticamente, ou é usado
20 diretamente do sobrenadante de uma cultura do referido hospedeiro. Em uma modalidade preferida o hospedeiro é *P. pastoris*.

Em uma modalidade da invenção, as proteínas antipatogênicas cujas sequências são reivindicadas, podem ser empregadas, assim como os bioprodutos contendo as mesmas, pela primeira, para o controle de ampla
30 variedade de patógenos como: *Aspergillus*, *Penicilium*, *Alternaria* (*Alternaria brassicola*; *Alternaria solani*; *Alternaria alternata*); *Bipolaris sacchari*; *Botrytis cinerea*; *Cercospora* (*Cercospora kikuchii*; *Cercospora zaea-maydis*; *Cer-*

cospora medicaginis; *Cercospora sojina*; *Cercospora sorghi*); *Cladosporium fulvum*; *Colletotrichum* (*Colletotrichum lindemuthianum*; *Colletotrichum dematium*; *Colletotrichum graminicola*), *Diplodia maydis*; *Erysiphe* (*Erysiphe graminis f.sp. graminis*; *Erysiphe graminis f.sp. hordei*); *Fusarium* (*Fusarium nivale*; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium graminearum*; *Fusarium culmorum*; *Fusarium solani*; *Fusarium moniliforme*; *Fusarium roseum*); *Helminthosporium* (*Helminthosporium turcicum*; *Helminthosporium carbonum*; *Helminthosporium maydis*); *Maganaporthe grisea*; *Mycosphaerella figensis*; *Peronospora* (*Peronospora manshurica*; *Peronospora tabacina*); *Phoma betae*; *Phytophthora* (*Phytophthora cinnamomi*; *Phytophthora cactorum*; *Phytophthora phaseoli*; *Phytophthora parasitica*; *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora megasperma f.sp. soyae*; *Phytophthora infestans*), *Puccinia* (*Puccinia sorghi*; *Puccinia striiformis*; *Puccinia graminis f.sp. tritici*; *Puccinia asparagi*; *Puccinia recondita*; *Puccinia arachidis*; *Puccinia melanocephala*), *Pythium* (*Pythium aphanidermatum*; *Pythium ultimum*); *Pyricularia oryzae*; *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*; *Rhizoctonia cerealis*); *Sclerotium rolfsii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Septoria* (*Septoria lycopersici*; *Septoria glycines*; *Septoria nodorum*; *Septoria tritici*); *Thielaviopsis basicola*; *Ustilago* (*Ustilago maydis*; *Ustilago scitaminea*); *Verticillium* (*Verticillium dahliae*; *Verticillium albo-atrum*); *Pseudomonas syringae p.v. glycinea*; *Xanthomonas campestris p.v. phaseoli*; *Xanthomonas campestris p.v. alfalfae*; *Xanthomonas campestris p.v. translucens*; *Pseudomonas syringae p.v. syringae*; *Erwinia carotovorum p.v. carotovora*; *Erwinia stewartii*; *Clavibacter michiganense subsp. Nebraskense*; *Pseudomonas avenae*; *Erwinia chrysanthemi p.v. zea*; *Erwinia carotovora*; *Xanthomonas campestris p.v. holcicola*, *Pseudomonas andropogonis* e *Pseudomonas avenae*.
 Em uma modalidade preferida o bioproduto é útil para o controle de fungos fitopatogênicos. Em uma modalidade da invenção o polipeptídio incluído no bioproduto está presente na faixa de concentração entre 1 e 9 µg / ml.

Também faz parte da presente invenção um método para o controle de agentes patogênicos de plantas caracterizado pela aplicação às plantas do bioproduto que compreende um polipeptídio identificado como SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7 ou um polipeptídio com pelo menos 60% de

homologia com a SEQ ID N°: 6.

Em outra modalidade da invenção, o método para o controle de agentes patogênicos de plantas caracteriza-se pela aplicação do bioproduto da invenção associado a biopesticidas.

- 5 Plantas modificadas geneticamente com a sequência de ácido nucleico da SEQ ID N°: 1, ou com uma sequência de ácido nucleico que compreende a SEQ ID N°: 1 (plantas transgênicas), para aumentar sua resistência a doenças de plantas produzidas por agentes patogênicos, também fazem parte da presente invenção.

10 Breve Descrição das Figuras

Figura 1. Estratégia de clonagem da proteína antipatogênica de interesse em vetores de expressão em plantas (figura 1A) e em levedura (figura 1 B).

- 15 Figura 2. Expressão da proteína antipatogênica em *Pichia pastoris*, através do vetor pPIC9K, associada ao peptídeo de sinal do fator alfa de *Saccharomyces cerevisiae*. Produção da proteína antipatogênica no sobrenadante de *P. pastoris* (A) e fração resultante da purificação (B).

- 20 Figura 3. Experiência de expressão constitutiva da proteína antipatogênica em plantas transgênicas e avaliação da resistência a doenças. O gráfico representa a percentagem de folhas e talos com sintomas das doenças nas amostras de controle e os clones transgênicos expressando a proteína antipatogênica. (Figura 3A) Efeito de *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* em folhas de tabaco. (figura 3B) Efeito de *Alternaria solani* em folhas de batata. (Figura 3C) Efeito de *Phytophthora parasitica* em talos de tabaco. (Figura 3D) Efeito de *Phytophthora infestans* em folhas de batata. Nas figuras as barras representam: a. controle inoculado, b. controle não inoculado, c. clone 1.1, d. clone 1.2, e. clone 1.3.

- 30 Figura 4. Experiência de atividade da proteína antipatogênica contra vários patógenos de plantas em diferentes concentrações. O gráfico representa a percentagem de inibição do crescimento em meio líquido dos patógenos tratados em diferentes concentrações da proteína antipatogênica associada ao peptídeo de sinal do fator alfa (A) e sintetizada sem o peptídeo

de sinal (B). Legenda da figura 4B: □ efeito da proteína associada ao peptídeo de sinal do fator alfa em *Phytophthora infestans*, ♦ efeito da proteína sem o peptídeo de sinal do fator alfa em *Phytophthora infestans*, ■ controle.

5 Figura 5. Experiência do efeito de controle em fungos do solo (A) e aéreos (B) da formulação da proteína antipatogênica NmDef-02. Na figura as barras representam: ■ plantas controles, □ plantas tratadas com fungicidas, ♦ plantas tratadas com a formulação da proteína antipatogênica.

Figura 6. Atividade biológica de fragmentos da proteína antipatogênica NmDef-02 em *Phytophthora infestans*. □ efeito do peptídeo de SEQ ID N°: 8 em *Phytophthora infestans*, ♦ efeito do peptídeo de SEQ ID N°: 9 em *Phytophthora infestans*.

Descrição detalhada de modos de realização / Exemplos de realização

Exemplo 1. Preparação do material vegetal, isolamento e clonagem do DNA que codifica a proteína antipatogênica NmDef-02 de *Nicotiana megalosiphon*.

A espécie *N. megalosiphon* foi cultivada em vasos de 6 polegadas que continham turfa e casca de arroz na proporção (4:1) e estes foram mantidos em uma estufa a 23°C. Um isolado de *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* colhido de uma plantação de tabaco em Havana foi usado para as inoculações. As inoculações foram feitas em plantas desta espécie, de 6 semanas de idade, colocando-se várias gotas de 10 µl com 5×10^3 esporos por ml (determinado por um hemocítômetro). As plantas foram colocadas em sacos plásticos pretos com alto teor de umidade (a umidade foi obtido por atomização de água no interior dos sacos) durante um período de 12 horas, para promover a infecção.

O RNA total foi extraído de folhas de plantas de *N. megalosiphon* inoculadas 6 dias depois, utilizando-se o sistema de extração de RNA total por centrifugação (Promega, Madison, WI, USA). Finalmente o DNA complementar de cadeia dupla (cDNA) foi sintetizado, utilizando-se o sistema de síntese de cDNA do laboratório Promega.

A biblioteca de cDNA foi construída por hibridização subtrativa usando o sistema de hibridização subtrativa com a reação em cadeia de po-

limerase (do inglês Polymerase Chain Reaction, abreviado PCR) seletiva (Clontech, Palo Alto, AC, EUA). O cDNA obtido de plantas de *N. megalosiphon* inoculadas com *P. hyoscyami* e colhidas 6 dias depois da inoculação foi usado como amostra para a subtração. A biblioteca subtraída foi clonada no vetor pGEM - T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

O sequenciamento dos cDNA foi feito utilizando-se um sequenciador automático. Depois de análise das sequências foi selecionada uma sequência de DNA que apresentava níveis baixos de homologia com proteínas descritas em bancos de dados, e que foi usada nas experiências posteriores.

Exemplo 2. Transformação de plantas com o gene da proteína antipatogênica NmDef-02.

Produção de plantas transgênicas de tabaco: construção de vetores binários.

Neste ensaio o cDNA completo do gene que codifica a proteína antipatogênica foi isolado com os oligonucleotídeos de SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 3 e clonado no vetor de transformação pCambia 2300 nos sítios de restrição Hind III / Pst I (figura 1A). a transformação genética de plantas de *Nicotiana tabacum* foi efetuada pelo método de Zambryski *et al.* (1983) EMBO Journal, 2: 2143-2150. Para tanto a cepa AT 2260 de *Agrobacterium tumefaciens* foi transformada pelo método do nitrogênio líquido (Hofgen e Willmitzer (1988) Nucl. Acids Res. 16: 9877) com o plasmídeo binário desenvolvido. Discos de folhas de plantas de *N. tabacum* da variedade Petit Havana SR 1, cultivadas *in vitro*, foram transformados. Canamicina (100 mg/L) foi usada como marcador de seleção do evento de transformação. Os discos de folhas foram cocultivados com a bactéria recombinante *Agrobacterium* por 48 horas em meio Murashige e Skoog (MS) líquido. A regeneração dos brotos de tabaco (4 a 6 semanas) foi feita no meio MS que continha: sacarose 25 g/L, 6-Benzil amino purina (BAP) 1 mg/L, ácido naftalenoacético (ANA) 0.1 mg/L, canamicina 100 mg/L e claforán (Claf) 500 mg/L. O enraizamento dos brotos (1 a 3 semanas) foi feito em meio MS que conti-

nha: sacarose 30 g/L, canamicina 100 mg/L e Claf 500 mg/L.

Produção de plantas transgênicas de batata: construção dos vetores binários.

Neste ensaio o cDNA completo do gene que codifica a proteína antipatogênica foi isolado com os oligonucleotídeos de SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 3 e clonado no vetor de transformação pCambia 3300 nos sítios de restrição Hind III / Pst I (figura 1A). O material vegetal que foi utilizado nas experiências de cultura de tecidos e transformação foi retirado de plântulas *in vitro* do cultivar de batata "Désirée". As plantas cresceram em tubos de ensaio em meio MS. O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,7. Foram usadas plantas de quatro semanas de cultivo, mantidas em quartos a 25°C e uma iluminação de 2000 Lux. Os meios de cultura que serviram de base para as experiências de regeneração e transformação foram SC (Sales MS, vitamina B1 0,4 mg/L, myo- inositol 100 mg/L, sacarose 20 g/L, BAP 3,5 mg/L, ANA 0,01 mg/L, fitoágar 6 g/L), SB (Sales MS, myo-inositol 100 mg/L, sacarose 20 g/L, AG33,5 mg/L, fitoágar 6 g/L) e PP (Sales MS, vitamina B1 0,4mg/L, myo-inositol 100 mg/L, pantotenato de cálcio 2 mg/L, sacarose 30g/L, fitoágar 6g/L, carvão ativado 5g/L e nitrato de prata-tiosulfato de sódio 1mg/L (STS).

Para a transformação foram usadas as cepas de *Agrobacterium* At2260 e LBA 4404. A bactéria foi cultivada em um meio com extrato de levedura 1 g/L, bacto-peptona 1 g/L, sacarose 5 g/L e Lab-lemco em pó 5 g/L, a 28°C no escuro até atingir uma densidade ótica (DO)₆₂₀ de 0,7 a 0,9.

O procedimento de transformação regeneração foi efetuado em duas etapas, da seguinte forma: segmentos de talos de plantas *in vitro* de 4 semanas de cultivo foram incubados em meio MS durante 12 a 16 horas a 25°C no escuro, e logo em seguida a infecção com *A. tumefaciens* foi feita por incubação dos explantes durante 7 minutos com 1 mL de suspensão bacteriana para cada 20ml de MS, os explantes foram cocultivados por 48 horas em meio SC a 22°C no escuro e foram colocados sobre um papel-filtro estéril. Lavagem dos explantes em meio MS e secagem com papel-filtro estéril foram realizadas com cuidado. Em uma primeira etapa eles foram

cultivados durante 15 dias à luz em meio seletivo SC, 500mg/L de claforán e 5 mg/L de fosfotricina (PPT) e em uma segunda etapa eles foram cultivados em meio seletivo SB, 500mg/L de claforán e 5mg/L de PPT. Finalmente os brotos foram individualizados em meio seletivo PP, com 500mg/L de claforán e selecionados em 5mg/L de PPT.

Exemplo 3. Avaliação do efeito da proteína antipatogênica Nm-Def-02 na resistência a doenças.

Ensaio de resistência a Peronospora hyoscyami f. sp. tabacina em tabaco.

Plantas enraizadas com resistência ao antibiótico canamicina e com o gene da proteína antipatogênica, foram transplantadas em vasos para sua adaptação em estufas durante 45 dias. Depois desse período um grupo de 100 clones transgênicos de 6 semanas de idade foram inoculados com *P. hyoscyami f. sp. tabacina* colocando-se várias gotas de 10 µl com 5×10^3 esporos / ml. As plantas foram colocadas em sacos plásticos pretos e úmidos durante um período de 12 horas, para promover a infecção. A avaliação da suscetibilidade foi efetuada medindo-se a percentagem de folhas com sintomas da doença uma semana depois (figura 3A). Como pode ser visto na figura a figura foram obtidos altos níveis de resistência a este patógeno, quando comparamos a percentagem de folhas com sintomas entre o controle inoculado e os diferentes clones, o que mostra a utilidade da proteína antipatogênica usada para controle deste importante patógeno.

Ensaio de resistência a Phytophthora parasitica em tabaco.

Plantas enraizadas com resistência ao antibiótico canamicina e com o gene da proteína antipatogênica, foram transplantadas em vasos para sua adaptação em estufas durante 45 dias. Um grupo de 100 clones transgênicos foram inoculados com *P. parasitica* e a percentagem de talos com sintomas da doença foi avaliada um mês depois. Para o procedimento de avaliação o fungo *P. parasitica* foi cultivado em um placa de petri que continha o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a uma concentração de 39 g/L. O mesmo foi incubado a uma temperatura de 27°C, durante um período de 10 dias. Para a inoculação das plantas de tabaco foi colocado um disco (de

diâmetro: 1 cm) de BDA, que continha o fungo na base do talo e o mesmo foi incubado a uma temperatura de 28°C, com alto teor de umidade (figura 3B). Como se pode observar na figura os clones expressando a proteína antipatogênica obtiveram altos níveis de resistência nunca antes vistos contra este patógeno do solo que causa grandes perdas na fase de viveiro desta cultura. Este resultado demonstra que é possível usar esta proteína para o controle deste fungo.

Ensaio de resistência a Phytophthora infestans em batatas.

Esta prova consistiu em inocular o fungo *Phytophthora infestans* em plantas de batata transgênicas de 5 semanas de idade em condições controladas de luz, temperatura e umidade relativa. 100 clones de 5 semanas, que expressam a proteína antipatogênica, foram borrifados com uma suspensão de 10^6 zoósporos /ml. Os clones foram mantidos em condições controladas com uma umidade relativa entre 85 a 95% e uma temperatura de 23°C. A percentagem de folhas com sintomas foi usada como medida de suscetibilidade ao patógeno uma semana depois das inoculações (figura 3C). Este foi um resultado inesperado, já que este patógeno é extremamente difícil de controlar. Como se pode ver na figura, os clones expressando a proteína antipatogênica mostraram altos níveis de resistência, ao serem comparados com os controles utilizados. Este resultado indica o potencial de uso desta proteína no controle deste patógeno em particular, por sua importância em nível mundial.

Ensaio de resistência a Alternaria solani em batatas.

O fungo *Alternaria solani* foi inoculado em 100 plantas de batata transgênicas de 5 semanas de idade em condições controladas de luz, temperatura e umidade relativa. Os clones foram borrifados com uma suspensão de 10^6 esporos/ml. Os clones foram mantidos em condições controladas com uma umidade relativa entre 85 a 95 % e uma temperatura de 20°C. A percentagem de folhas com sintomas foi usada como medida de suscetibilidade ao patógeno uma semana depois das inoculações (figura 3D). Os três clones analisados mostraram altos níveis de resistência a este patógeno oferecendo pela primeira vez um potencial para o uso desta proteína para

seu controle.

Exemplo 4. Construção do vetor para a expressão da proteína antipatogênica NmDef-02, de forma extracelular, no sobrenadante de cultura de *Pichia pastoris*.

- 5 O gene que codifica a proteína antipatogênica de *N. megalosiphon* foi isolado utilizando-se oligonucleotídeos específicos correspondentes às SEQ ID N°: 4 e SEQ ID N°: 5 para obter a sequência completa do gene que codifica a proteína antipatogênica NmDef-02, com os sítios de restrição enzimática Xho I / EcoR I, necessários para sua clonagem no vetor de expressão pPIC9k. Esta estratégia de clonagem adiciona à proteína de interesse no amino-terminal extremo o peptídio de sinal do fator alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1B), e com isso a proteína resultante corresponde à SEQ ID N°: 7. O plasmídeo foi linearizado com Bgl II antes da transformação da cepa GS115 de *P. pastoris*. A transformação foi realizada por eletroporação. A cepa GS115 é um mutante auxotrófico his3 que adquire um fenótipo HiS⁺ depois da transformação. Os transformantes HiS⁺ foram selecionados em meio mínimo com dextrose, os clones foram cultivados em meio mínimo com glicerol e induzidos com metanol durante 126 horas a 28°C.
- 20 Os clones transformantes foram identificados por Dot Blot. Utilizando-se a técnica da mancha do sul determinados em quais clones a integração havia ocorrido por substituição do gene AOX1 de *P. pastoris* pelo cassete de expressão do plasmídeo recombinante, que corresponde a um fenótipo Mut^s (com baixa utilização de metanol) e HiS⁺. *P. pastoris* secreta
- 25 baixos níveis de proteínas próprias e seu meio de cultura não precisa de suplementos proteicos, e com isso pode-se esperar que uma proteína heteróloga que é secretada no meio extracelular, constitua a maior parte do total de proteínas no sobrenadante de cultura (mais de 80%) (Tschopp *et al.* (1987) Bio/Technology 5:1305-1308). A expressão da proteína antipatogênica em *P. pastoris* foi realizada em fermentadores de 5 litros pela adição de
- 30 metanol ao meio de cultura. A expressão da proteína antipatogênica recombinante e sua integridade foram verificadas por espectrometria de massas.

Exemplo 5. Purificação e ensaio da atividade biológica da proteína antipatogênica.

A proteína antipatogênica associada ao peptídeo de sinal do fator alfa (NmDef-Plus) foi purificada a partir do sobrenadante da cultura, por diálise em 25 mM de acetato de sódio pH 4,5; o produto da diálise foi passado através de uma resina de troca catiônica CM-Sepharose Fast-flow equilibrada com 25 mM de acetato de sódio, pH 4,5; e as proteínas foram eluídas com 1 M de cloreto de sódio, 50 mM de Tris pH 7,6. As frações que continha a proteína foram coletadas e concentradas utilizando-se um sistema de ultracentrifugação com uma membrana com um tamanho de poros (cut-off) de 3 kDa. Para a detecção foi empregado um comprimento de onda de 254 nm. A purificação foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (abreviado SDS-PAGE, do inglês Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Tris-Glicina) a 15% e as proteínas foram visualizadas por tintura com prata (figura 2).

A atividade antifúngica da proteína antipatogênica foi quantificada pelo método espectrofotométrico e por análise do micélio por tintura com lactofenol azul através de microscopia ótica (Térras *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301- 15309). A avaliação foi efetuada em placas de 96 compartimentos, aos quais foram adicionados 50 µL de meio líquido batata-dextrose, 50 µL da suspensão de esporos dos fungos patogênicos e 20 µL da proteína antipatogênica parcialmente purificada.

A percentagem de inibição do crescimento (PIC) dos patógenos foi determinada de maneira já reportada (Térras *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301- 15309), por meio da seguinte equação:

$$PIC = \frac{DO_{595 \text{ nm}} \text{ controle} - DO_{595 \text{ nm}} \text{ tratamento}}{DO_{595 \text{ nm}} \text{ controle}} \times 100$$

A relação entre as percentagens de inibição é proveniente da aplicação da equação anterior às leituras realizadas (a 595 nm) dos controles e das amostras tratadas, 48 horas depois de iniciado o ensaio (figura 4A).

A proteína antipatogênica sem o peptídio de sinal do fator alfa foi sintetizada quimicamente, e seu efeito no fungo *P. infestans* foi avaliado em diferentes concentrações segundo mencionado anteriormente (Térras *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301-15309) (figura 4B). Como se pode observar nas figuras 4A e 4B, a proteína antipatogênica obteve altos níveis de inibição do crescimento contra fungos fitopatogênicos de plantas, seja associada ao peptídio de sinal do fator alfa ou sintetizada quimicamente sem o peptídio. Foi muito interessante observar, pela primeira vez, como é obtida a inibição de importantes patógenos das plantas, resultado não obtido até o momento por outras proteínas antifúngicas descritas até o momento.

Outro resultado não esperado e que permite o uso desta proteína antipatogênica com um amplo espectro de ação, foram os altos níveis de inibição mostrados contra bactérias fitopatogênicas (tabela 1).

Tabela 1. Efeito da proteína antipatogênica NmDef-02 em bactérias fitopatogênicas.

Espécie de bactérias	IC ₅₀ (µM)
<i>Xanthomonas campestris</i> p.v. <i>phaseoli</i>	40 ± 3
<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>syringae</i>	26 ± 6
<i>Erwinia carotovorum</i> p.v. <i>carotovora</i>	86 ± 8
<i>Pseudomonas avenae</i>	17 ± 5
<i>Erwinia chrysanthemi</i> p.v. <i>zea</i>	11 ± 8

IC₅₀: concentração de NmDef-02 no qual o crescimento da bactéria é inibido em 50 %. ± Desvio padrão médio.

Exemplo 6. Demonstração do controle de uma formulação da proteína antipatogênica NmDef-02 sobre fungos do solo e aéreos.

Sementes da espécie *N. tabacum* foram tratadas com a formulação da proteína antipatogênica (9 µg / ml) e alginato de sódio a 5 %, e depois cultivadas em vasos de 6 polegadas que continham turfa e casca de arroz na proporção (4:1) e estes foram mantidos em uma estufa a 23°C. Como controles foram usados tratamentos com hipoclorito de sódio a 10 % e outras sem qualquer tipo de tratamento. As avaliações foram efetuadas depois de 30 dias e a percentagem de plantas mortas como produto de in-

fecção natural (figura 5A) foi determinada.

Por outro lado, 100 plantas em estufas foram borrifadas com a formulação da proteína antipatogênica a uma concentração de 5 µg / ml de princípio ativo e alginato de sódio a 5 %. Como controles foram usadas aspersões com o fungicida Benomila a uma concentração de 40 g / L e água. A percentagem de folhas com sintomas, produto de infecção natural, foi avaliada 45 dias depois de aplicados os tratamentos (figura 5B).

Como se pode observar nas figuras 5A e 5B a formulação da proteína antipatogênica obteve o controle de fungos de solo e de folhas em comparação com os controles utilizados, resultados não reportados até o momento, o que permite o uso desta proteína como um bioproduto no controle de patógenos de plantas.

Exemplo 7. Atividade biológica de fragmentos da proteína antipatogênica NmDef-02.

Fragmentos da proteína antipatogênica NmDef-02 foram obtidos por síntese química (SEQ ID N°: 8 e SEQ ID N°: 9). O efeito no fungo *P. infestans* foi avaliado em diferentes concentrações segundo já reportado (Térras *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301-15309), o que está mostrado na figura 6. O resultado obtido permite o uso de frações da proteína para obter controle ou inibição de patógenos sobretudo quando se usa a fração da proteína de SEQ ID N°: 9.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a resistência a doenças de plantas produzidas por agentes patogênicos, caracterizado pelo fato de que compreende a transformação genética da planta com uma sequência de
5 ácido nucleico compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID N°: 1, que leva à expressão constitutiva ou induzida da proteína antipatogênica compreendendo a SEQ ID N°: 6.

2. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos identificada como SEQ ID N°: 7.

10 3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que é obtido por via recombinante ou por síntese química.

4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a expressão por meio de DNA recombinante é realizada em *Pichia pastoris*, de preferência no sobrenadante da cultura.

15 5. Composição para controle de agentes patogênicos, caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo identificado como SEQ ID N°: 6 ou SEQ ID N°: 7, em que o polipeptídeo está em uma faixa de concentração de 1 a 9 µg/ml e em que a composição compreende ainda 5% de alginato de sódio.

20 6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é purificado a partir de um hospedeiro transformado geneticamente.

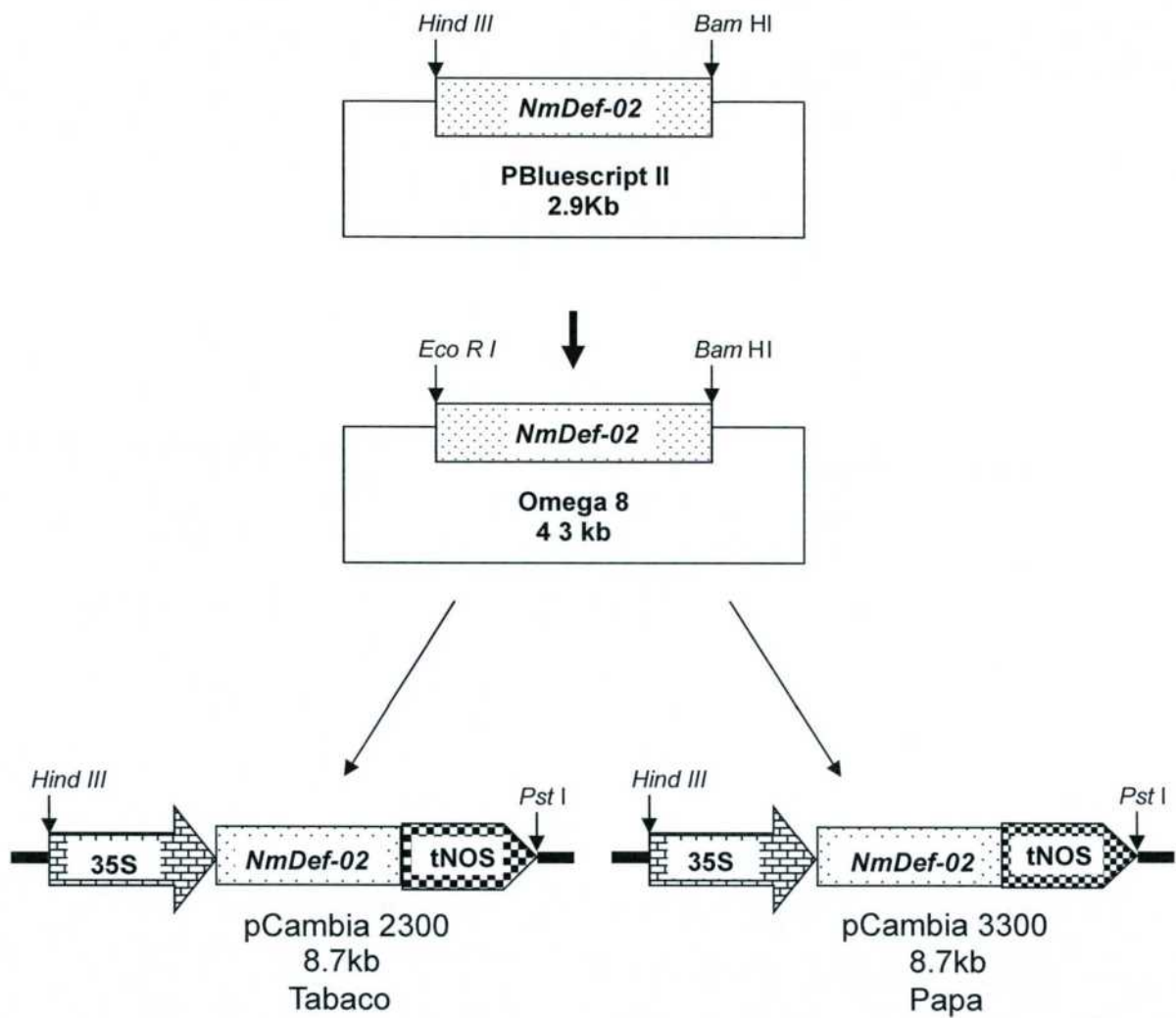
7. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o agente patogênico é um fungo fitopatogênico.

25 8. Método para o controle de agentes patogênicos de plantas, caracterizado pelo fato de que compreende a aplicação de uma composição, como definida na reivindicação 5, às plantas.

9. Método para o controle de agentes patogênicos de plantas, caracterizado pelo fato de que compreende a aplicação de uma composição,
30 como definida na reivindicação 5, misturado com biopesticidas.

Fig. 1

(A)



(B)

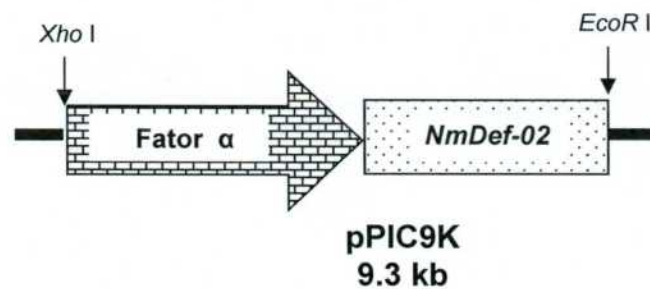
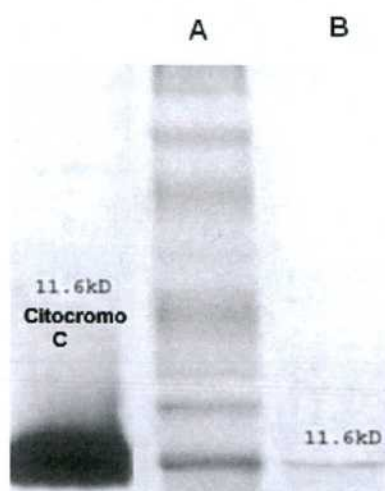
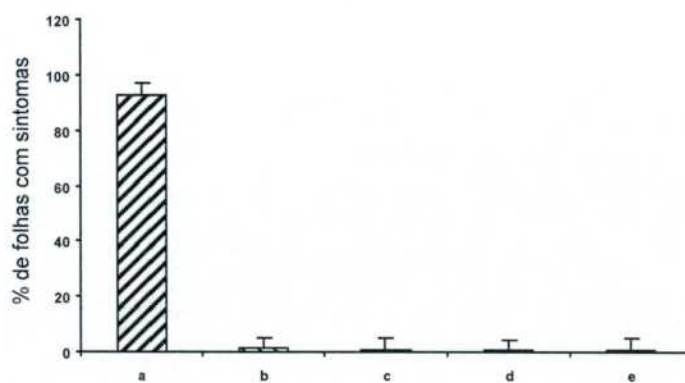
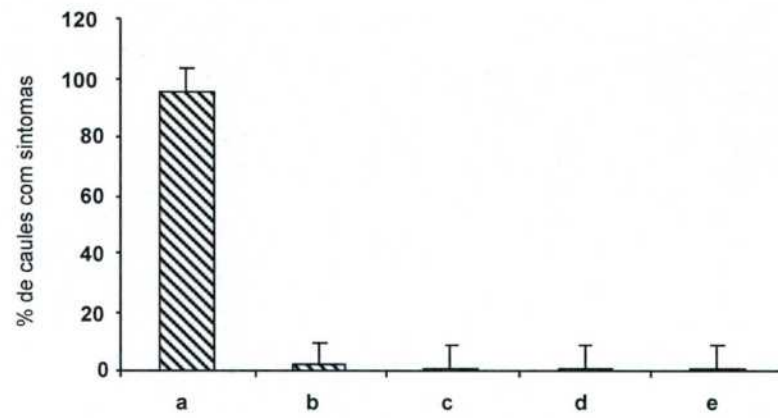


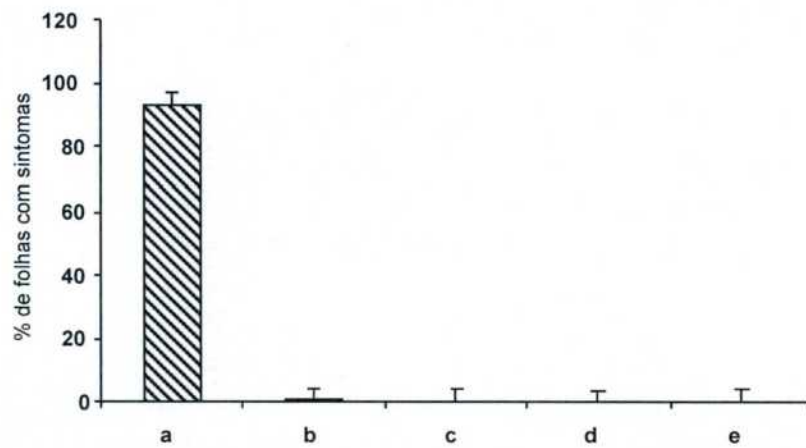
Fig. 2

Fig. 3
(A)

(B)



(C)



(D)

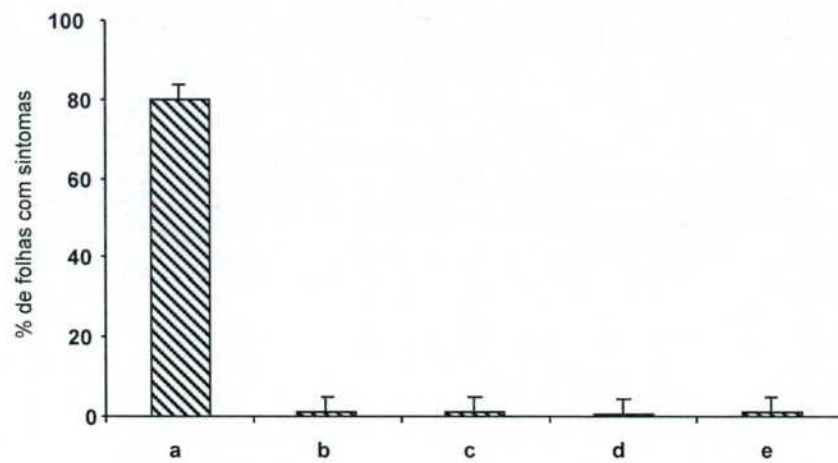
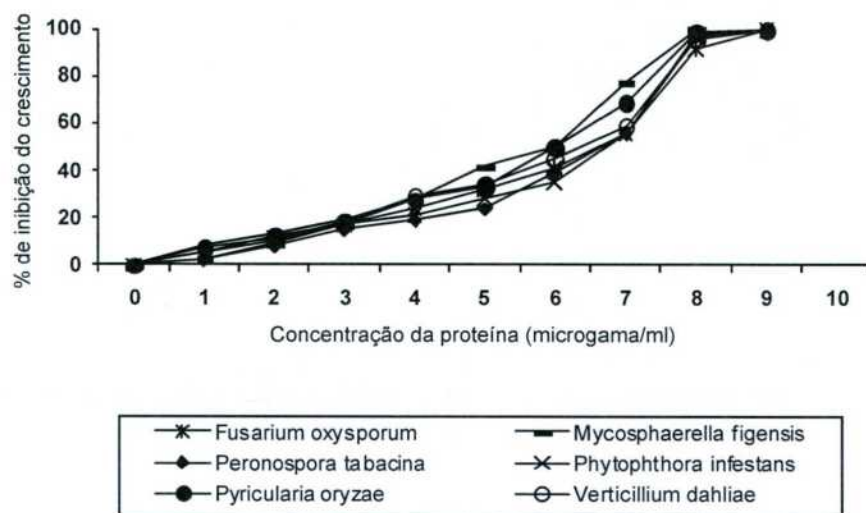


Fig. 4

(A)



(B)

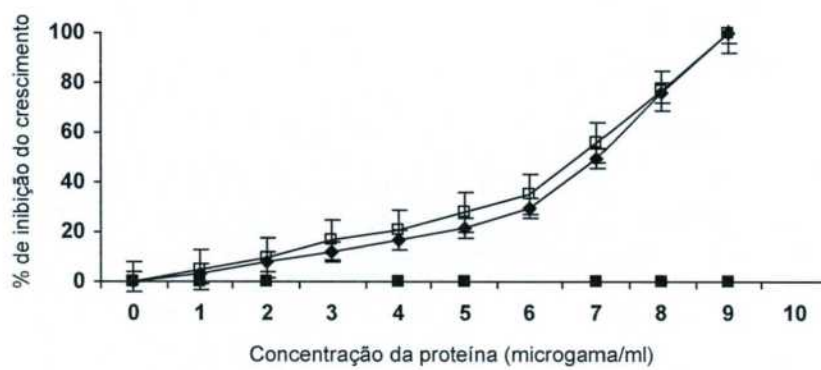
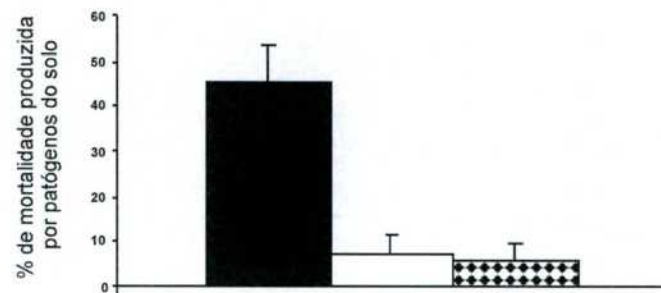


Fig. 5

(A)



(B)

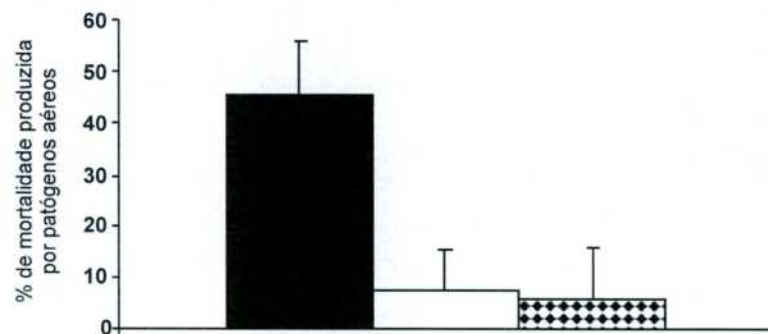


Fig. 6

