

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

(21) **PI0802664-5 A2**



(22) Data de Depósito: 13/08/2008
(43) Data da Publicação: 11/05/2010
(RPI 2053)

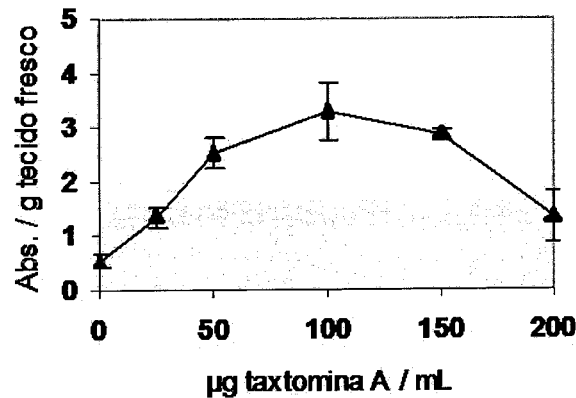
(51) *Int.Cl.:*
A01N 63/02 (2010.01)
A01P 15/00 (2010.01)

(54) Título: **COMPOSIÇÃO CONTENDO FITOTOXINAS OBTIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES SPP E SEU USO COMO ELICIADOR NA INDUÇÃO EM RESISTÊNCIA DE PLANTAS**

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): Ely Oliveira Garcia, Sérgio Florentino Pascholati

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO CONTENDO FITOTOXINAS OBTIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES SPP E SEU USO COMO ELICIADOR NA INDUÇÃO EM RESISTÊNCIA DE PLANTAS. A presente invenção provê uma composição contendo fitotoxinas, em doses adequadas, particularmente, da classe das taxtominas, sendo que as fitotoxinas são obtidas a partir culturas de *Streptomyces* spp. patogênicas. Adicionalmente, o presente pedido destina-se ao uso da dita composição como eliciador na indução em resistência de plantas.





**“COMPOSIÇÃO CONTENDO FITOTOXINAS OBTIDAS A PARTIR DE
STREPTOMYCES SPP E SEU USO COMO ELICIADOR NA INDUÇÃO
EM RESISTÊNCIA DE PLANTAS”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção provê uma composição contendo
fitotoxinas, em doses adequadas, particularmente, da classe das
taxtominas, sendo que as fitotoxinas são obtidas a partir culturas de
Streptomyces spp. patogênicas. Adicionalmente, o presente pedido
destina-se ao uso da dita composição como eliciador na indução em
10 resistência de plantas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Atualmente, a demanda de indutores de resistência e a
tendência da redução do uso excessivo de defensivos em hortaliças no
Brasil têm crescido (PASCHOLATI, S.F.; CIA, P.; BENATO, E.A.; CAMILI,
15 E.C. O fenômeno da indução de resistência e o controle de doenças em
pós-colheita. In: Anais da Reunião brasileira sobre indução de
resistência em plantas, 2º Simpósio de controle de doenças de plantas,
Lavras, 2004. Resumos UFLA. p.2-6, 2004).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos
20 de defesa latentes existente nas plantas em resposta ao tratamento com
agentes bióticos ou abióticos. Os agentes indutores de origem biótica ou
abiótica, capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência
nas plantas são chamados de elicitores (VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN,
E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and
25 comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular
Plant Pathology*, London, v. 55, p. 85-97, 1999; WIRTH, S.J.; WOLF,
G.A. Micro-plate colorimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase,

chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 24, p.511-519, 1992), podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra a não
5 existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; (Ed.) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. São Paulo, Agronômica Ceres, 1995, 365-392).

10 Atualmente já foram isoladas várias moléculas de *Streptomyces* spp. no qual resultaram em produtos comerciais. Um exemplo clássico é a abamectina, isolada de *Streptomyces avermectilis*, que é o princípio ativo do Vertimec®, amplamente utilizado na agricultura (BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN,
15 P.E. The Merck Index – an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Rahway, NJ, Merck & Co., Inc., 1989).

Também, tem-se o conhecimento de mais de 500 diferentes antibióticos que são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*. Sendo que, no mínimo, mais de 60 destes antibióticos exibem aplicação
20 prática na medicina, veterinária, agricultura e indústria (MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10 ed São Paulo, Pendice Hall, 2004, 608p).

Fitotoxinas são moléculas de origem microbiana que podem interferir em passos metabólicos essenciais da planta e/ou desencadear
25 mecanismos de defesa da mesma (PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; (Ed.) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. São

Paulo, Agronômica Ceres, 1995, 365-392). Ainda, as fitotoxinas também podem apresentar características eliciadoras provocando a ativação gênica. Estas geralmente são oligopeptídeos que são facilmente absorvidas e assimiladas pelas plantas. Fitotoxinas estão envolvidas na

5 agressividade de diversos patógenos bacterianos. Por sua vez, especulações a respeito da possível produção de fitotoxinas por bactérias do gênero *Streptomyces* datam do início do século passado (FELLOWS, H. Relation of growth in the potato scab disease. *Journal of Agricultural Research* 32.757-781, 1926). Porém, a confirmação dessa

10 hipótese somente concretizou-se com o trabalho de Russel King e colaboradores (KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CLARK, M.C. & CALHOUN, L.A. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Chemical Community* v.13, p.849-850, 1989), que isolaram e caracterizaram uma fitotoxina produzida por *S.*

15 *scabies*. A fitotoxina teve a sua estrutura definida como sendo uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2,5-dioxopiperazina. Esta fitotoxina passou a ser chamada de "Taxtomina" em homenagem ao pesquisador Roland Thaxter (KING, R.R.; LAWRENCE, C.H. Characterization of new thaxtomin A analogues generated in vitro by

20 *Streptomyces scabies*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Davis, v. 44, p. 1108-1110, 1996; KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CALHOUN, L.A. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, causal organism of potato common scab. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Davis, v. 13, p. 849-850, 1992).

25 As taxtominas são fitotoxinas do tipo não seletiva, uma vez que em baixas concentrações (0,1 μ M) interferem no crescimento de plantas de diferentes famílias botânicas, sejam estas mono ou

dicotiledôneas (LEINER, R.H.; FRY, B.A.; CARLING, D.E.; & LORIA, R. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* v. 86, p.709-713, 1996). Ensaios demonstraram que a aplicação de taxtominas em baixas concentrações
5 pode causar hipertrofia em tecidos vegetais (LORIA, R.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A. & KING, R.R. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* v.81, p.836-846, 1997; LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 44, p. 469-487, 2006).

10 Segundo Loria e seus colaboradores, (LORIA, R.; BUKHALID, R.A.; CREATH, R.A.; LEINER, R.H.; OLIVIER, M.; STEFFENS, J.C. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. *Phytopathology*, St Paul, v. 85, p. 537-541, 1995) as taxtominas podem ser produzidas pela bactéria tanto em
15 secções de tubérculos de batata quanto em meio de cultivo *in vitro*. Estes autores quantificaram a produção de taxtomina A, a partir do cultivo do patógeno em diferentes meios de cultura e observaram que o caldo obtido a partir da cocção de grãos de aveia em água proporcionou os resultados mais reprodutíveis para diferentes isolados da bactéria.

20 A Taxtomina A é a principal toxina produzida por *Streptomyces scabies*, sendo um dipeptídeo composto pelo aminoácido alanina com um radical fenil e um aminoácido triptofano nitrado (KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CALHOUN, L.A. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, causal organism of
25 potato common scab. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Davis, v. 13, p. 849-850, 1992).

S. scabies é o principal agente causal da sarna comum, uma doença caracterizada por lesões corticosas superficiais, elevadas ou profundas em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) (GOYER GOYER, C.; VACHON, J.; BEAULIEU, C. Pathogenicity of *Streptomyces* *scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* v. 88, p. 442-445, 1998). Várias moléculas ou princípios ativos de antibióticos e defensivos agrícolas como Vertimerc® (abamectina) foram isoladas a partir de diferentes isolados de *Streptomyces* spp.

O avanço nas pesquisas envolvendo a resistência induzida em plantas é acompanhado pelo surgimento de novos produtos comerciais com maior eficácia, maior estabilidade e menor impacto ao ambiente (HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001; IRITI, M.; FAORO, F. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean. *Journal of Plant Pathology*, Bari, v. 85, n. 4(special issue), p. 265-270, 2003; KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases-regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, Wroclaw, v. 8, p. 809-824, 2003; CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124). Produtos estes que podem propiciar em alguns casos, além da redução de perdas ocasionadas por patógenos, incrementos no desenvolvimento vegetativo, propiciando melhora na produtividade. O surgimento do acibenzolar-S-metil (Bion®; ASM) na década de 1990, e de vários outros produtos

como Messenger®, Elexa®, Oxycom®, fosfitos e silicatos representa uma nova geração de defensivos, os quais exploram de maneira geral a capacidade de ativação de diferentes mecanismos de defesa nas plantas, com alto potencial para uso em programas de manejo integrado de doenças (RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; SANTOS, S.F.; MIRANDA, J.F. Ativadores de resistência disponíveis no mercado. In: Anais da Reunião brasileira sobre indução de resistência em plantas, 2° Simpósio de controle de doenças de plantas, Lavras, 2004. Resumos UFLA. p.2-6, 2004).

10 Recentemente a indução de resistência passou a ser bastante estudada também em pós-colheita, avaliando-se os mecanismos de resistência ativados no tecido vegetal, representados por β -1,3 glucanases, quitinases e fitoalexinas. Estes estudos representam um avanço nos métodos de controle nesta fase, podendo reduzir a
15 utilização de defensivos agrícolas (PASCHOLATI, S.F.; CIA, P.; BENATO, E.A.; CAMILI, E.C. O fenômeno da indução de resistência e o controle de doenças em pós-colheita. In: Anais da Reunião brasileira sobre indução de resistência em plantas, 2° Simpósio de controle de doenças de plantas, Lavras, 2004. Resumos UFLA. p.2-6, 2004).

20 Provavelmente, a resistência induzida contra doenças através do uso de ativadores químicos, como acibenzolar-S-metil e Messenger®, por exemplo, ou por outros meios, como rizobactérias promotoras de crescimento ou elicitores oriundos de fungos e bactérias, se torne um componente importante dos programas de manejo de
25 doenças (CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.;

RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.). Essa importância deve ser evidente, particularmente nos casos onde os métodos atuais de controle mostram-se pouco efetivos

5 (HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease control*, Boca Raton: CRC-Lewis Publishers, 1997. p. 177-199), bem como no controle de doenças de pós-colheita envolvendo frutas e hortaliças (HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K.

10 Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease control*, Boca Raton: CRC-Lewis Publishers, 1997. p. 177-199).

Um produto microbiano obtido a partir de uma bactéria fitopatogênica, como indutor de resistência, já existe no mercado

15 internacional com o nome comercial de Messenger®, o qual apresenta 3% de harpina em sua composição. As proteínas harpinas foram extraídas inicialmente de uma bactéria fitopatogênica, *Erwinia amylovora*, e podem produzir uma resposta de hipersensibilidade de forma análoga as fitotoxinas de *Streptomyces* spp.

20 As harpinas são proteínas que induzem a resistência sistêmica contra várias doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, e também contra alguns insetos herbívoros (CAPDEVILLE, G. De; BEER, S.V.; WATKINS, C.B.; WILSON, C.L.; TEDECHI, L.O.; AIST, J.R. Pre- and post-harvest Harpin treatments of apple induce resistance to

25 blue mold. *Plant Disease*, Sant Paul, v. 87, n. 1, p. 34-44, 2003). Ainda, demonstrou-se que a harpina induz resposta de hipersensibilidade em plantas e também acelera o desenvolvimento vegetal (aumento da

biomassa radicular e foliar, antecipação da maturação de frutos e aumento do número de frutos) e afeta processos fisiológicos básicos importantes para o crescimento vegetal, incluindo o aumento da atividade fotossintética e absorção de nutrientes.

5 O produto comercial Messenger® é facilmente degradado devido à radiação solar ou à atividade metabólica de diferentes organismos, não sendo acumulado no ambiente e não deixando resíduos nas plantas e seus produtos (EDEN BIOSCIENCE. Disponível em:<<http://www.edenbio.com>>. Acesso em: 10 jan. 2008).

10 A fitotoxina, taxtomina A, é produzida por diferentes espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Esta toxina em baixas concentrações pode provocar hipertrofia em tecidos de diversas espécies vegetais. Atualmente, tem crescido a utilização de indutores de resistência na agricultura, os quais podem provocar
15 redução de produtividade devido a gastos energéticos pelas plantas. Desta forma, o mercado mundial necessita de produtos eficientes no controle de doenças e que sejam ao mesmo tempo bioativadores, estimulando também o desenvolvimento da plantas.

A patente americana US 6.277.814 refere-se a um método
20 de crescimento de plantas através da aplicação de um polipeptídeo ou proteína eliciadora, em forma não-patogênica, a uma planta ou semente.

O pedido de patente americano US 2007/0237755 trata do uso de geldanamicina, produzida por *Streptomyces* spp, a qual é
25 utilizada no controle da sarna comum da batata e o controle *in vitro* (efeito direto sobre o patógeno) do agente causal, *Streptomyces scabies*.

A patente americana US 5.958.490 pleiteia o uso de fumigantes no controle de doenças de pós-colheita.

Já a patente americana US 6.074.638 provê o uso de espécies e isolados de *Streptomyces* spp. avirulentos, isto é espécies que não causam doença em plantas, no controle da sarna comum da batata, cujo agente causal é *Streptomyces scabies*. Nesta patente usa-se o próprio microrganismo para o controle. Isto é o princípio de controle é a competição no solo da espécie aplicada (não patogênica) com a espécie patogênica de plantas (*Streptomyces scabies*).

A patente canadense CA 2.205.976 descreve o controle da sarna comum, causada por *Streptomyces scabies* utilizando isolados bacterianos não patogênicos que competem com os patogênicos e que degradam a taxtomina A, principal toxina de *Streptomyces scabies* e adicionalmente, utilizam-no como fonte de nitrogênio.

Dessa forma, a Depositante de forma inesperada desenvolveu uma composição a base de fitotoxinas e sua aplicação como eliciador de indução de defesa em plantas.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo tratados com diferentes concentrações de taxtomina A, correspondente a primeira repetição no tempo.

A figura 2 apresenta o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo tratados com diferentes concentrações de taxtomina A, correspondente a segunda repetição, feita após 20 dias.

A figura 3 mostra o gráfico de severidade (% doença) de antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em plântulas tratadas de pepino tratadas com solução de taxtomina A (0, 10, 20 µg / mL), extrato do

meio de cultivo da *Streptomyces* spp. (meio de aveia), solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a. L⁻¹). Em avaliação realizada após 5 dias de inoculação.

5 A figura 4 mostra o gráfico de severidade (% doença) de antracnose (*Colletotrichum sublineolum*) em plântulas de sorgo tratadas com solução de taxtomina A (0, 10; 50; 100 µg / mL), extrato do meio de cultivo da *Streptomyces* spp. (meio de aveia), solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a. L⁻¹). Em avaliação realizada após 5 dias de inoculação.

10 A figura 5 apresenta a atividade de quitinase em plantas de (A) pepino e (B) sorgo em função dos tratamentos com diferentes concentrações de solução de taxtomina A (0, 25, 50, 100 µg/mL).

15 A figura 6 mostra a atividade de β-1,3-glucanase em plantas de (A) pepino e (B) sorgo em função dos tratamentos com diferentes concentrações de solução de taxtomina A (0, 25, 50, 100 µg/mL).

A figura 7 revela a atividade de peroxidase em plantas de (A) pepino e (B) sorgo em função dos tratamentos com diferentes concentrações de solução de taxtomina A (0, 25, 50, 100 µg/mL).

20 A figura 8 revela a atividade de fenil alanina-amoniliase em plantas de (A) pepino e (B) sorgo em função dos tratamentos com diferentes concentrações de solução de taxtomina A (0, 25, 50, 100 µg/mL). Barras indicam a média ± desvio padrão.

25 A figura 9 descreve o teor de clorofilas A e B em plantas de (A) pepino e (B) sorgo em função dos tratamentos com diferentes concentrações de solução de taxtomina A (0, 25, 50, 100 µg/mL), sendo • clorofila A e ■ clorofila B. Barras indicam a média ± desvio padrão.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê uma composição contendo fitotoxinas, em doses adequadas, particularmente, da classe das taxtominas, sendo que as fitotoxinas são obtidas a partir culturas de
5 *Streptomyces* spp. patogênicas. Adicionalmente, o presente pedido destina-se ao uso da dita composição como eliciador na indução de resistência de plantas.

Em uma primeira realização o presente pedido se refere a uma composição, contendo fitotoxinas, em particular taxtominas do
10 tipo A e seus análogos B, C, E, entre outras. Ademais, a taxtomina A apresenta uma estrutura molecular pequena, ou seja, refere-se a um dipeptídeo de rápida absorção, dispensando o uso de aditivos na solução aplicada, por exemplo, uma solução aquosa.

As fitotoxinas da presente invenção são obtidas a partir de
15 bactérias fitopatogênicas do gênero *Streptomyces* spp.

No caso da taxtomina A, produzida por *Streptomyces* spp., a mesma atua na permeabilidade seletiva de membranas e provoca deposição irregular de celulose em células vegetais do hospedeiro, o que é claramente observada em cortes histológicos. O acúmulo de
20 fitoalexinas indica que o potencial eliciador da toxina pode ser explorado e que doses mínimas da toxina podem estimular os mecanismos de defesa das plantas.

A composição, da presente invenção, apresenta concentrações de fitotoxina em faixas que podem variar de 0,01 a 200
25 µg/mL, sem demonstrar ação fitotóxica.

Em uma segunda realização, o presente pedido de patente, provê o uso da composição como eliciador na indução de resistência em plantas. Em especial, resistência a fungos, bactérias e vírus.

Particularmente, a aplicação da composição da presente invenção, pode ser realizada de forma direta e/ou indireta nos organismos.

EXEMPLOS

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DA FITOTOXINA.

Os isolados, preservados por liofilização, são re-suspensos em solução salina (NaCl 0,85%) previamente esterilizada por autoclavagem, e semeados na superfície de meio extrato de aveia ágar por 20 dias em temperatura de 28°C.

Para a caracterização da produção de taxtomina A dos isolados, os mesmos são cultivados em meio de cultura de extrato de aveia líquido, contido em Erlenmeyers de 250 mL. O referido meio é obtido pela cocção de 40 g de aveia por 20 min em água, sendo posteriormente filtrado em gaze, o volume completado para 100 mL com água destilada e o pH ajustado em 7,2 através da adição de solução de NaOH 1M. Cada Erlenmeyer recebe 3 discos de micélio (1cm de diâmetro), obtidos com furador de rolha, de regiões uniformes e intensamente esporuladas das respectivas colônias de cada isolado, cultivadas em meio extrato de aveia ágar em placas de petri (28°C; 20 dias).

Cada isolado é cultivado em triplicata sob agitação orbital (150 rpm) em temperatura de 28°C por 4 dias, quando o conteúdo de cada Erlenmeyer é filtrado através papel Whatmann nº 1. De cada repetição, 15 mL do filtrado é transferido para funil de separação onde é

submetido a extração da toxina com 25 mL de acetato de etila. Coletada a fração referente ao acetato de etila o filtrado é submetido novamente à extração em mais 25 mL do solvente. As duas fases de acetato de etila, contendo a taxtomina A, são combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro, e o solvente evaporado sob vácuo. O pó resultante é re-suspenso em 2 mL de metanol e armazenado a -20°C para posterior purificação da taxtomina A e realização dos ensaios.

IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FITOTOXINA

A taxtomina A é identificada por cromatografia de camada delgada-TLC (TLC= *Thin layer chromatography*), conforme técnica tradicional. Para tanto, os extratos provenientes dos diferentes isolados são aplicados em placas de TLC, contendo sílica gel 60 em espessura de 250 µm. O solvente usado é uma mistura de clorofórmio/metanol na proporção de 9:1. A taxtomina A é identificada pelo coeficiente relativo de retenção- R_f ($R_f = \text{Retention factor}$) das amostras e da Taxtomina A purificada.

A taxtomina A é recuperada através da raspagem da banda com o mesmo R_f da taxtomina A purificada. O pó resultante é re-suspenso em 2 mL de metanol e armazenado a -20°C para a realização dos ensaios de indução de resistência em pepino.

QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TAXTOMINA A

A concentração de taxtomina A, anteriormente purificada em TLC, é determinada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC- *High performance liquid chromatography*). Utiliza-se uma coluna C18, medindo 3,9 mm x 300 mm contendo sílica com partículas de 10 µm. A amostra é eluída isocraticamente em acetonitrila e água Mili-Q (25 / 75%) por 20 min em fluxo de 1,3 mL.min⁻¹, monitorada a 380 nm

usando um detector equipado com luz ultravioleta. Uma curva padrão é estabelecida, usando-se concentrações conhecidas de taxtomina A purificada. Desta forma, concentrações conhecidas de taxtomina A são utilizadas para a realização dos ensaios de acúmulo de fitoalexinas em 5 sorgo, indução de resistência em pepino e na avaliação do efeito *in vitro* sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum lagenarium* e *C. sublineolum*.

Testes preliminares em sorgo demonstraram características eliciadoras da taxtomina A (provenientes de *Streptomyces* spp), 10 provocando acúmulos de fitoalexinas (compostos de defesa das plantas contra fitopatógenos). O presente pedido avaliou o potencial de utilização da taxtomina A como indutor de resistência utilizando como padrão os patossistema pepino (*Cucumber sativus*) – *Colletotrichum lagenarium* e sorgo (*Sorghum bicolor*) – *Colletotrichum lagenarium*.

15 Plântulas de pepino com 7 dias foram tratadas com diferentes soluções de taxtomina A. Água destilada esterilizada foi utilizada como controle negativo e ASM (Acibenzolar-S Metil) (50 ppm), utilizado como padrão positivo de indução de resistência. Após 3 dias, as plântulas foram inoculadas com suspensão de esporos de *C. 20 lagenarium* (2×10^4 esporos/mL) e acondicionadas em câmara úmida por 24 horas e mantidas em incubadora (25°C; 12 h de fotoperíodo). Após 4 dias, o efeito protetor da toxina foi avaliado através da severidade da doença. Os resultados demonstraram redução da doença.

Análises bioquímicas do tecido foliar de plantas tratadas 25 com taxtomina A e não inoculadas revelaram aumento nos teores de clorofilas A e B, e na atividade das enzimas de defesa de plantas peroxidases, quitinase e β -1,3-glucanase.

Ensaio recentes realizados também no controle de viroses, como o mosaico do fumo, concluiu que a fitotoxina taxtomina A, em doses adequadas, pode ser utilizada no controle de mosaico em plantas de fumo, sem demonstrar ação fitotóxica.

5

RESULTADOS

Os resultados dos bioensaios com mesocótilos de sorgo demonstraram o seu claro efeito na indução de fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas (figura 1 e 2).

Nos dois ensaios observou-se um maior acúmulo de fitoalexinas na concentração 100 µg taxtomina A/mL de água, conforme apresentado-o nas figuras 1 e 2. Desta forma, pode-se afirmar que a taxtomina A apresentou características eliciadoras, induzindo os mecanismos de defesa das plântulas de sorgo.

10

ALTERAÇÕES METABÓLICAS PROVOCADAS PELA TAXTOMINA A EM

MESOCÓTILOS DE SORGO

Para os bioensaios envolvendo fitoalexinas (compostos de defesa da planta contra fitopatógenos), clorofilas e alterações no crescimento, as sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], cultivar BRS-501, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% (15 min), lavadas em água destilada e embebidas em água, sob temperatura ambiente por 12 horas. Após este período foram enroladas em folhas de papel de germinação umedecidas e incubadas no escuro a 28°C por 7 dias. As plântulas formadas foram individualmente medidas e cortadas, sendo utilizado apenas 4 cm dos mesocótilos para os bioensaios, medindo-se a partir do ápice dos mesmos e descartando-se a parte inferior e raízes. Estes mesocótilos foram colocados em tubos de ensaios de 1 cm de diâmetro, contendo 300 µL de solução de taxtomina A, nas

20
25

concentrações 0, 25, 50, 100, 150, 200 µg taxtomina A/ mL de água Mili-Q. Fez-se também um controle com o extrato do meio de aveia, utilizado para o cultivo da bactéria. No interior de cada tubo foram colocados 3 mesocótilos, sendo feitos 4 tubos para cada concentração de taxtomina A. (Cada tubo correspondendo a uma repetição). Posteriormente, os tubos foram fechados com filme plástico e incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. (28°C; 12 h de fotoperíodo) por 7 dias. Desta maneira, foram obtidas plântulas com diferentes níveis de sintomas e adequadas para os bioensaios de produção de fitoalexinas.

No ensaio de produção de fitoalexinas, os mesocótilos previamente tratados com taxtomina A, (3 mesocótilos por repetição e 5 repetições por tratamento), foram cortados e uma porção de 2,5 cm pesada, cortada em pequenos segmentos e colocados em tubo tipo eppendorf, contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v). Os segmentos de mesocótilos foram mantidos a 4°C no metanol por 96 h para extração dos pigmentos e a absorbância foi determinada a 480 nm. Os dados foram expressos em absorbância a 480 nm por grama de tecido fresco (Abs (480 nm)/g.t.f.).

PROTEÇÃO DE PLÂNTULAS DE PEPINO A COLLETOTRICHUM LAGENARIUM EM

20

CÂMARA DE CRESCIMENTO

Sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.) da cultivar Caipira foram plantadas em bandejas contendo substrato agrícola Plantmax® (Eucatex) e mantidas em casa-de-vegetação sob condição ambiental. Cinco dias após a semeadura as plântulas foram retiradas das bandejas e transferidas para vasos contendo terra autoclavada como substrato. Cinco dias após o plantio em vasos, as plântulas foram tratadas com o indutor taxtomina A nas concentrações (0, 10, 20 µg/mL) e mantidas

em câmara de crescimento sob regime de 12h luz (lâmpadas fluorescentes) e 12h escuro a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, até o final do experimento. Após três dias do tratamento elicitor, as plântulas foram inoculadas por aspersão com suspensão de conídios mantida em câmara úmida por
5 24h. A concentração da suspensão de esporos de *C. lagenarium* foi de 2×10^4 esporos/mL e os ensaios foram conduzidos com seis repetições e cada repetição foi composta por um vaso contendo quatro plantas, mantidos em uma mesma linha do suporte de tubos, cada qual com 1 plântula.

10 Água destilada esterilizada foi utilizada como controle negativo e ASM (50 ppm) utilizado como padrão positivo de indução de resistência. A avaliação dos sintomas foi realizada de 5 dias após a inoculação, em função do surgimento das lesões no tratamento controle negativo (água), sendo a severidade de antracnose determinada
15 utilizando o Software Quant.

PROTEÇÃO DE PLANTAS DE SORGO A COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM EM

CÂMARA DE CRESCIMENTO

Sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), plantas da cultivar BRS-501 foram plantadas em bandejas contendo substrato agrícola
20 Plantmax® (Eucatex) e mantidas em casa-de-vegetação sob condição ambiental. Quinze dias após a semeadura as plântulas foram retiradas das bandejas e transferidas para vasos contendo terra autoclavada como substrato. Cinco dias após o plantio em vasos, as plântulas foram
25 tratadas com o indutor taxtomina A em diferentes concentrações (50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidas em câmara de crescimento sob regime de 12h luz (lâmpadas fluorescentes) e 12h escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, até o final do experimento. O tratamento se deu pela pulverização sobre a área

completa da segunda e terceira folha das plantas de sorgo. Após três dias do tratamento com taxtomina A, as plântulas foram inoculadas por aspersão com suspensão de conídios e mantidas em câmara úmida por 24h. A concentração da suspensão de esporos de *C. sublineolum* foi de 1 x 10⁵ conídios/mL e as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas. Após este período, as plantas foram removidas da câmara úmida e mantidas em incubadora tipo B.O.D. (12h escuro a 25 ± 2°C).

Água destilada esterilizada foi utilizada como controle negativo e ASM (50 ppm) utilizado como padrão positivo de indução de resistência. A avaliação dos sintomas foi realizada 7 dias após a inoculação, em função do surgimento das lesões no tratamento controle negativo (água), sendo a severidade de antracnose determinada utilizando a escala conforme a figura 1.

A avaliação dos sintomas foi realizada 7 dias após a inoculação com base nos parâmetros de severidade da doença nas folhas. Avaliou-se a severidade de doença somente no terço médio do comprimento da terceira e segunda folhas das plantas de sorgo.

Os ensaios foram conduzidos com seis repetições e cada repetição foi composta por um vaso contendo quatro plantas distribuídas dentro da incubadora tipo B.O.D., de forma inteiramente ao acaso.

PROTEÇÃO DE PLÂNTULAS DE PEPINO E SORGO CONTRA ANTRACNOSE EM

CÂMARA DE CRESCIMENTO

Após 4 dias da inoculação, o efeito protetor da toxina taxtomina A foi avaliado através da severidade da doença. Os resultados foram nítidos na tocante ao controle da antracnose. Plântulas de pepino

tratadas com taxtomina A obtiveram redução da doença de 79% e 84% para as concentrações 10 e 20 µg taxtomina A/mL, respectivamente.

As lesões de antracnose chegavam a ocorrer nos cotilédones de pepino e nas folhas de sorgo tratados com taxtomina A, porém estas não evoluíam a lesões, grandes e não formavam halos amarelos ao redor das lesões como nos tratamentos controle. Isto demonstrou que a taxtomina A induziu os mecanismos bioquímicos de defesa da planta, mas não impediu a infecção do *C. lagenarium*.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE PEPINO E SORGO

10

TRATADAS COM TAXTOMINA A

Os resultados das análises bioquímicas dos tecidos de plântulas tratadas com taxtomina A e não inoculadas revelaram aumento na atividade das enzimas ligadas a indução de resistência contra fitopatógenos, quitinase e β -1,3-glucanase e peroxidases. O nível de atividade da enzima fenil alanina-amoniliase se manteve inalterado. Este aumento destas PR – proteínas (quitinase e β -1,3-glucanase) e peroxidases indica o potencial eliciador da taxtomina A, desencadeando os mecanismos bioquímicos de defesa de plântulas de pepino e sorgo.

De forma adicional, o tratamento com a taxtomina A provocou aumento dos teores de clorofilas A e B em plantas de sorgo, e pepino.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE PEPINO E SORGO

TRATADAS COM TAXTOMINA A

Para as análises bioquímicas, plantas de pepino com sete dias de idade e plantas de sorgo com vinte dias de idade, foram tratadas com solução de taxtomina A nas concentrações (0, 25, 50, 100 µg/mL) e mantidas em câmara de crescimento sob regime de 12h luz (lâmpadas

fluorescentes) e 12h escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por cinco dias. O tratamento se deu pela pulverização completa dos cotilédones de pepino e das segunda e terceira folhas das plântulas sorgo. Água destilada esterilizada foi utilizada como controle negativo e ASM (50 ppm) utilizado como padrão positivo de indução de resistência. Foram feitos cinco repetições onde cada repetição foi composta de 5 plantas por vaso.

Após 3 dias do tratamento, foram feitas individualmente a amostragem de plântulas de sorgo e pepino para a realização das análises bioquímicas. Para tanto, foram coletados somente os cotilédones das plantas de pepino de cada repetição (vaso) e para as plântulas de sorgo, foram coletadas apenas a segunda e terceira folhas das plântulas.

Amostras de tecido vegetal constituídas 0,5 de peso fresco de cada repetição foram homogeneizadas em 4,0 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) (tampão de extração) e submetidas a centrifugação a 20.000 g (25 min, 4°C). Os sobrenadantes foram utilizados para se avaliar a atividade enzimática de peroxidase, quitinase, β -1,3-glucanase, fenilalanina amônia-liase, e também o teor de proteínas.

ATIVIDADE DE PEROXIDASE

A atividade da peroxidase foi determinada à 30°C , através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm. A mistura da reação continha 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 μL de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 250 μL

de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína).

ATIVIDADE DE FENILALANINA AMÔNIA-LIASE

5 A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico, liberado do substrato fenilalanina. A mistura da reação, incubada a 40°C por 2h, continha 100 μl do extrato protéico, 400 μL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μl de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM,
10 pH 8,8). A absorvância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (esse controle corresponde a uma mistura 100 μL do extrato protéico e 900 μL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). As leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão para o ácido *trans*-
15 cinâmico e a atividade enzimática expressa em μg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

ATIVIDADE DE QUITINASE

A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de
20 quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV 4 mg mL^{-1} , Loewe Biochemica GmbH). Para isto, 200 μL do extrato protéico foi misturado com 600 μL do mesmo tampão de extração e 200 μL de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg mL^{-1}). Após incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 μL de
25 solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g / 5 min. A absorvância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os

resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, descontando-se os valores de absorvância do controle (800 μL de tampão de extração + 200 μL de “CM-chitin-RBV”).

ATIVIDADE DE β -1,3-GLUCANASE

5 Para a determinação espectrofotométrica da atividade de β -1,3-glucanases nos extratos foi utilizado como substrato uma solução de carboximetilcurdlan-remazol brilhante azul (CM-Curdlan-RBB 4 mg mL^{-1} , Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia tradicional. Para tanto, 200 μL do extrato protéico foi misturado com 600 μL do
10 mesmo tampão de extração e 200 μL de CM-curdlan-RBB (4,0 mg mL^{-1}). Após incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 μL de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo por 10 min e centrifugação a 10.000g por 5 min. A absorvância a 600 nm do sobrenadante foi determinado tendo-se tampão de extração
15 na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$, descontando-se os valores de absorvância do controle (800 μL de tampão de extração + 200 μL de “CM-curdlan-RBB”).

QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS A E B

20 Amostras de cotilédones de plântulas de pepino e de tecido foliar de sorgo tratados ou não com diferentes concentrações de taxtomina A foram cortadas e coletadas apenas 1 g para cada repetição. Estas amostras de tecido vegetal foram colocadas em tubos tipo eppendorf, contendo 2 mL de acetona 80%, utilizada sempre a 4°C,
25 sendo todo o procedimento realizado protegendo-se as amostras da luz. Em seguida, estas foram maceradas em almofariz e filtradas através de papel de filtro Whatman n° 1, sendo o volume completado para 4 mL

com acetona 80%. Determinou-se a absorvância das amostras a 663 nm para a determinação da clorofila A e 645 nm para a clorofila B em espectrofotômetro, sendo o conteúdo de clorofilas de cada amostra expresso em mg de clorofila/g.t.f.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de compreender fitotoxinas obtidas a partir de bactérias do gênero *Streptomyces* spp fitopatogênicas.
- 5 2. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato das fitotoxinas compreenderem, particularmente, as fitotoxinas da classe das taxtominas.
3. COMPOSIÇÃO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada pelo fato das classes das taxtominas compreenderem
10 preferencialmente, a taxtomina A, B, C, E, entre outras.
4. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato das classes das taxtominas compreenderem preferencialmente, a taxtomina A.
5. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 5,
15 caracterizada pelo fato da taxtomina A compreender um dipeptídeo.
6. COMPOSIÇÃO, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato da composição ser isenta de componentes aditivos.
7. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 6,
20 caracterizada pelo fato da composição compreender uma solução aquosa.
8. COMPOSIÇÃO, de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato da composição compreender concentrações de fitotoxina de 0,01 a 200 µg/mL.
- 25 9. USO DA COMPOSIÇÃO, caracterizado pelo fato de ser aplicado como eliciador na indução de resistência em plantas.

10. USO DA COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato da atividade eliciadora de resistência ser contra fungos, bactérias e vírus.

5 11. USO DA COMPOSIÇÃO, de acordo com as reivindicações 9 e 10, caracterizado pelo fato da composição ser aplicada de forma direta e/ou indireta nos organismos.

FIGURA 1

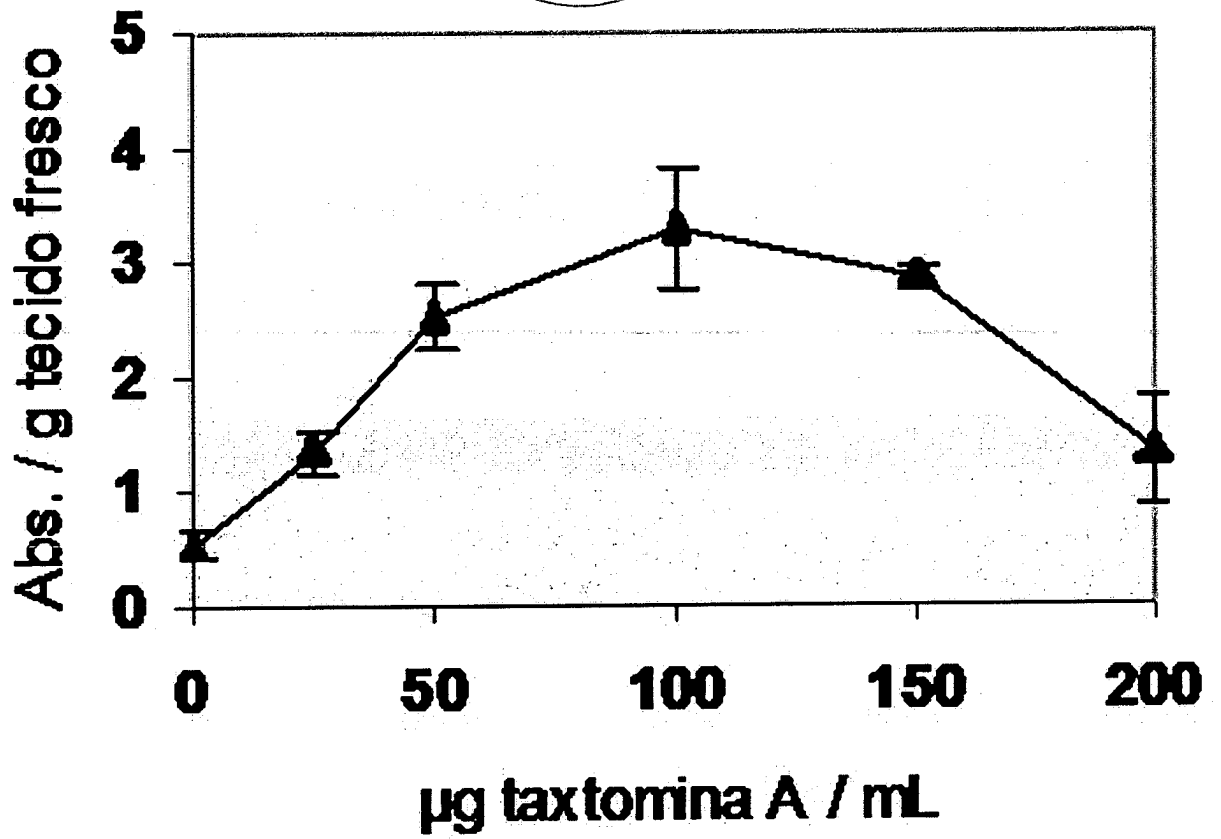


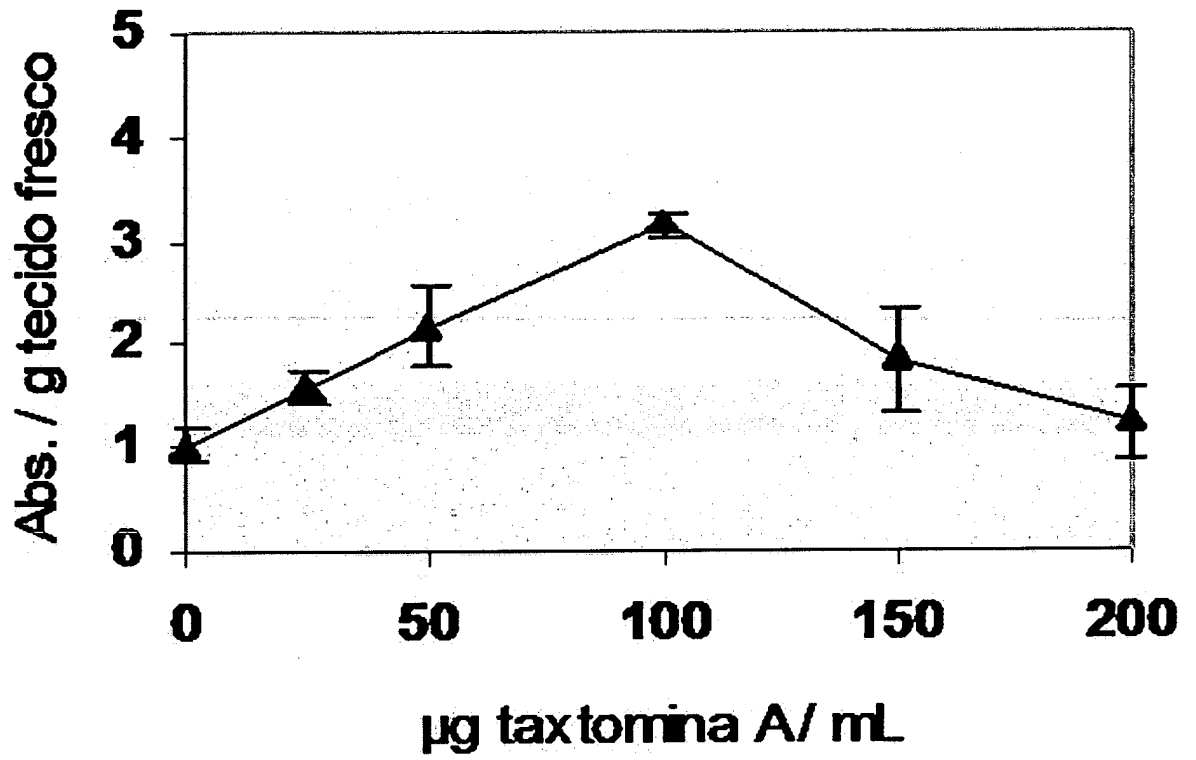
FIGURA 2

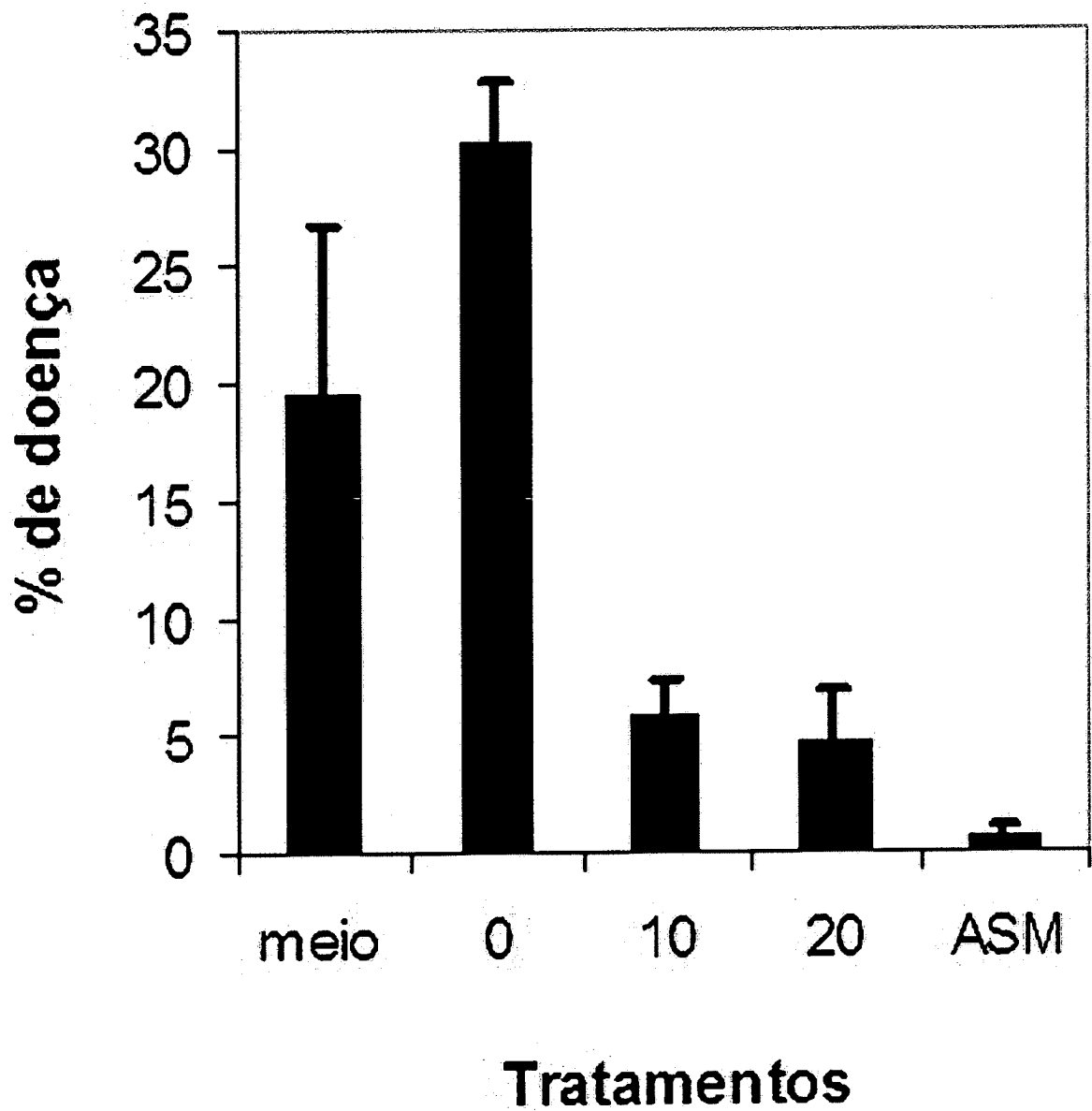
FIGURA 3

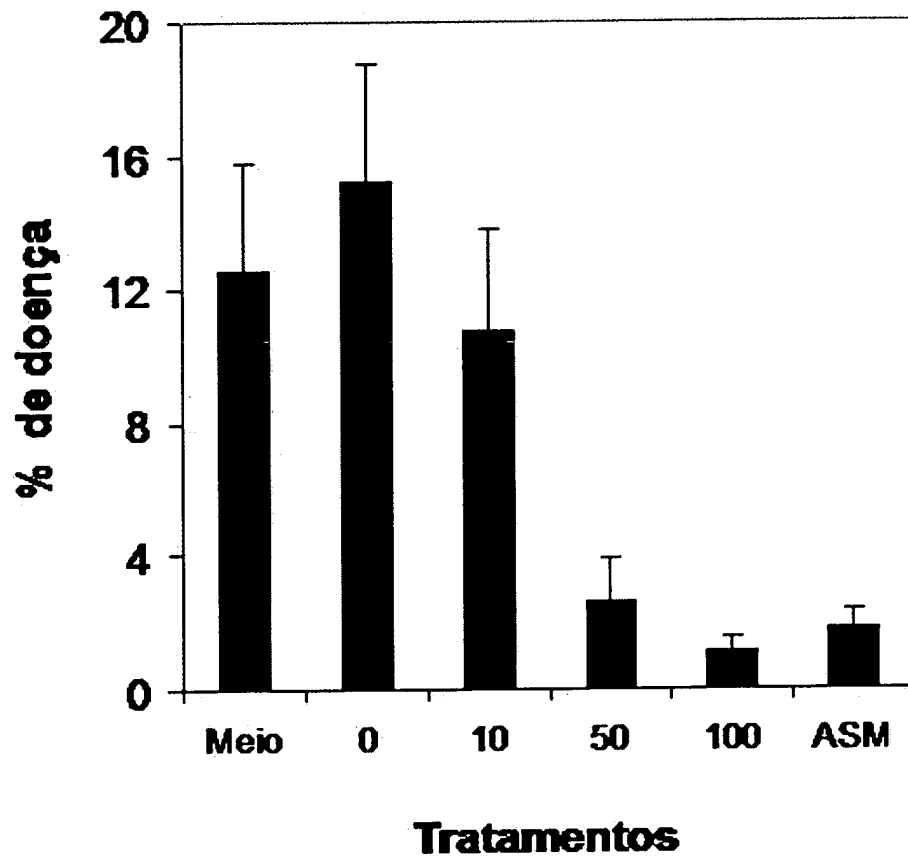
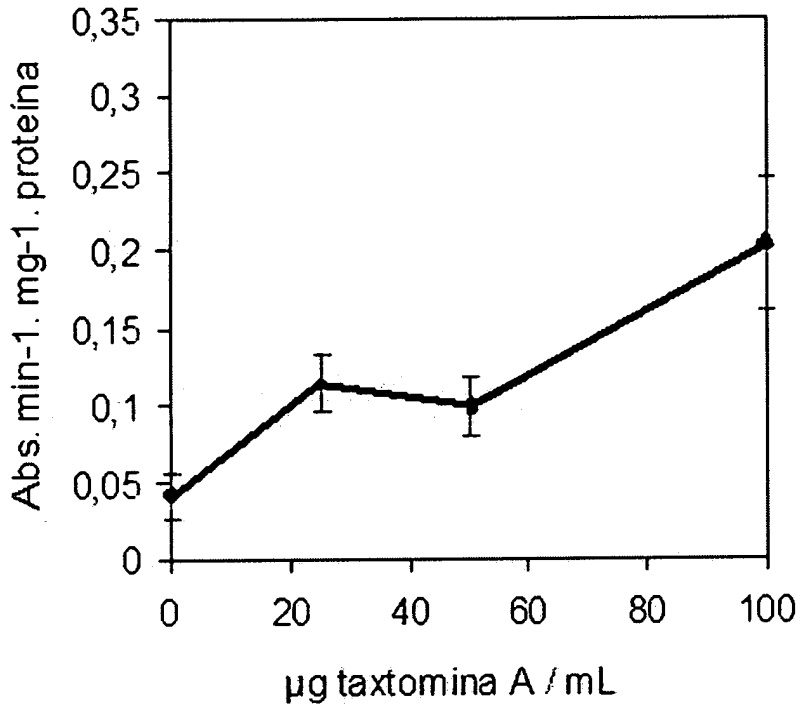
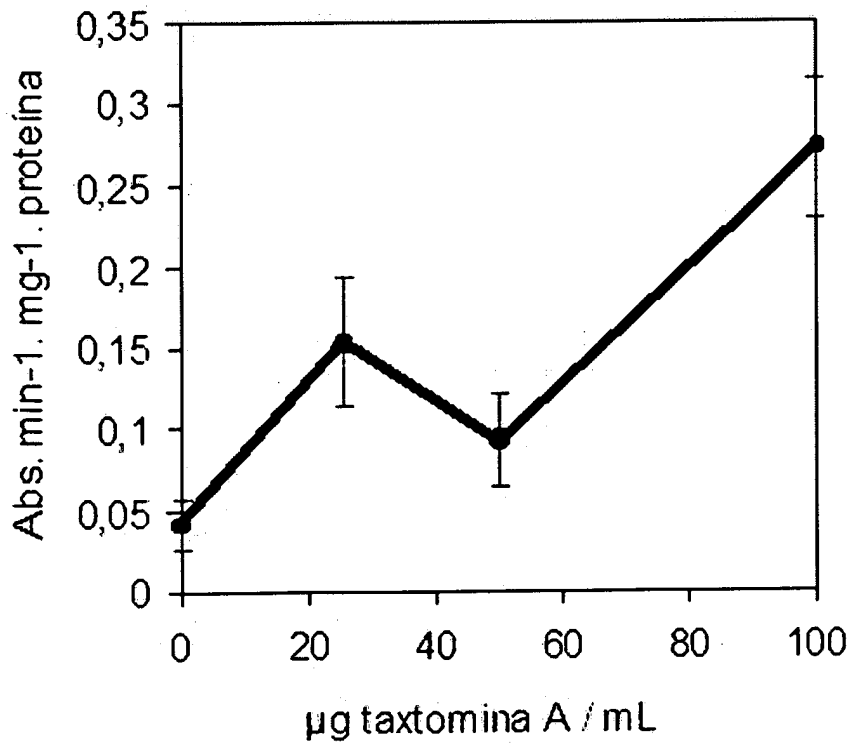
FIGURA 4

FIGURA 5A



A

FIGURA 5B



B

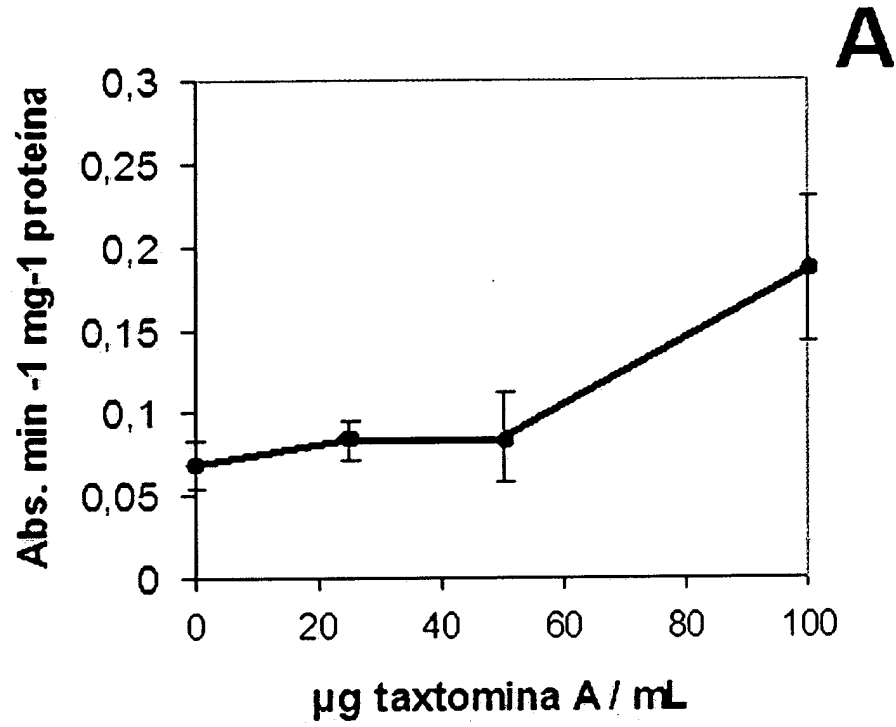
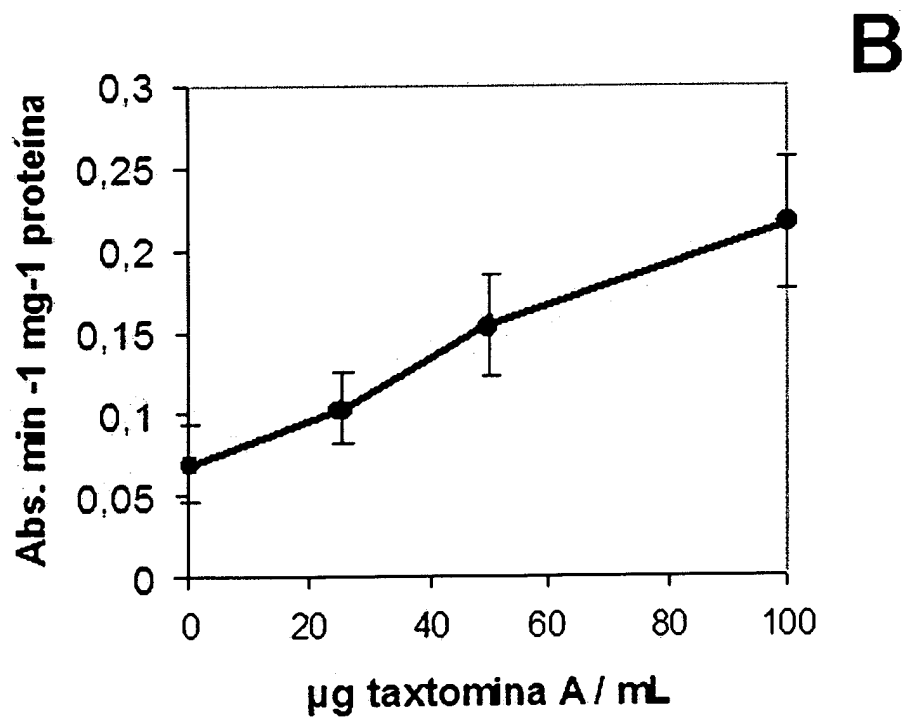
FIGURA 6A**FIGURA 6B**

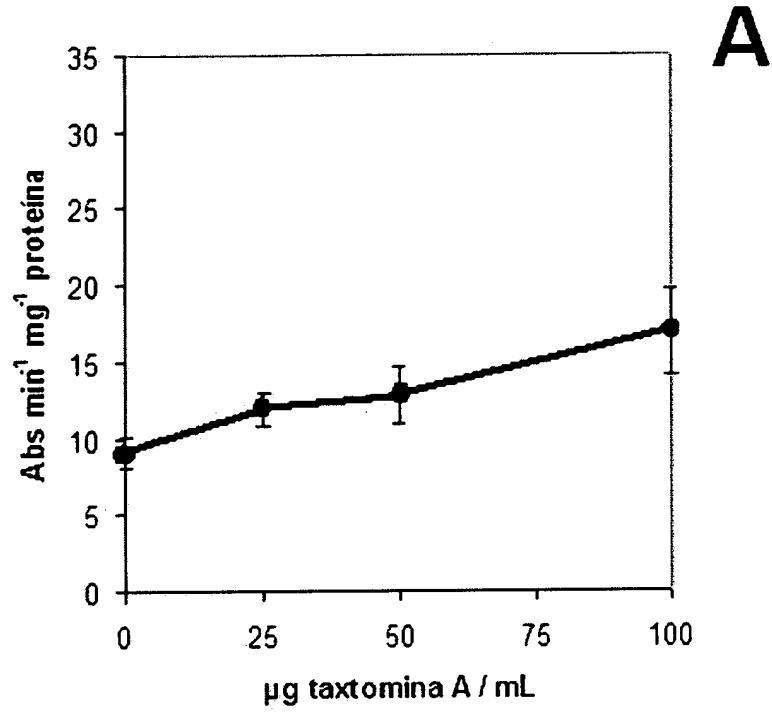
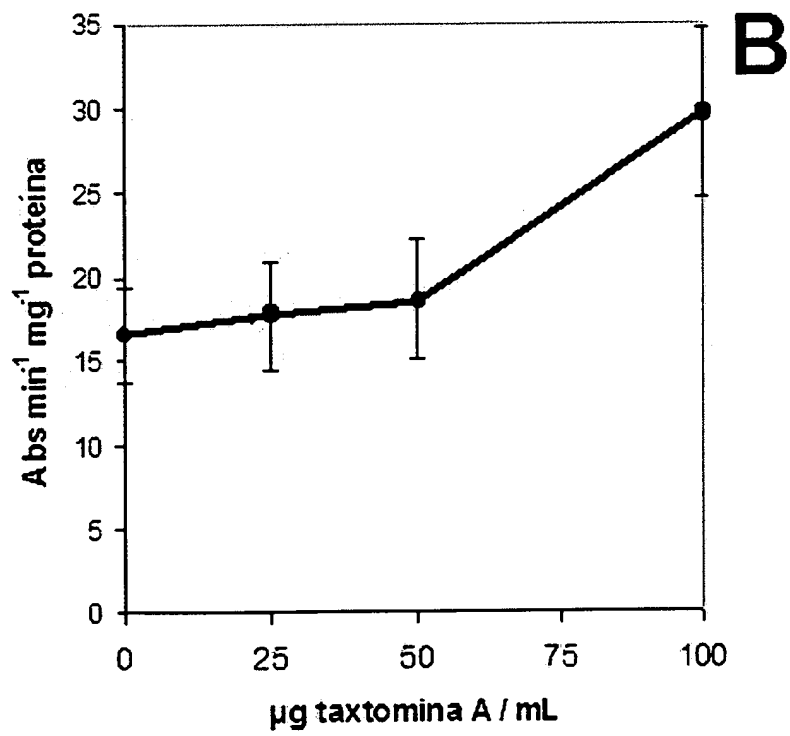
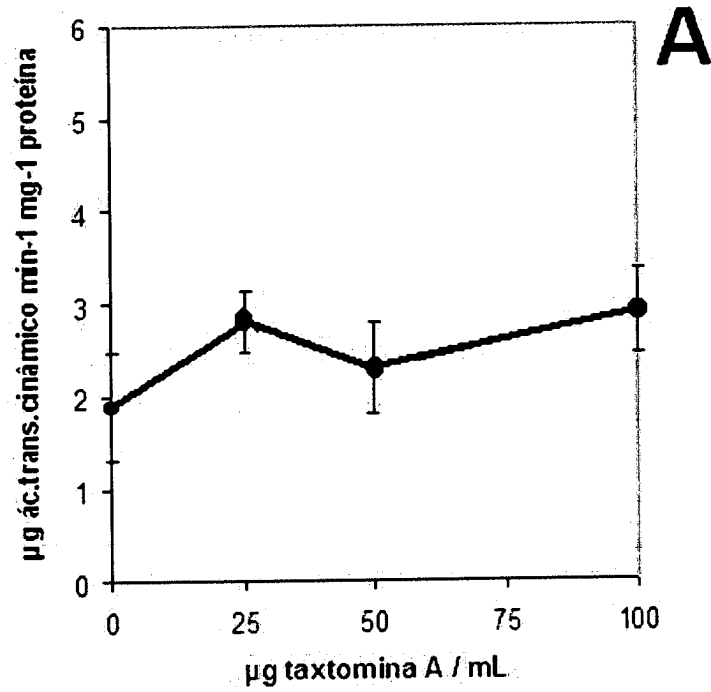
FIGURA 7A**FIGURA 7B**

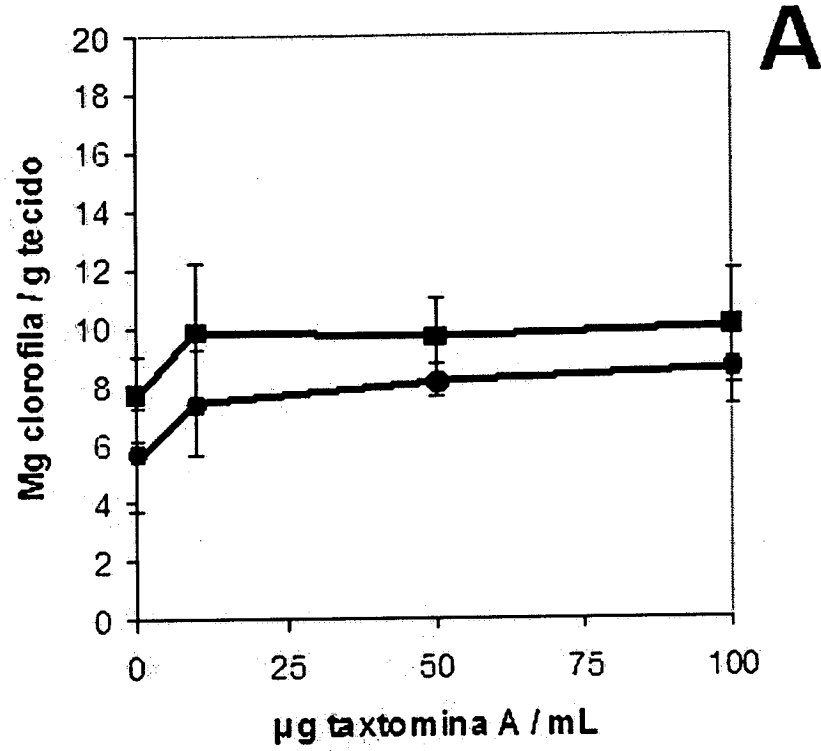
FIGURA 8A**FIGURA 8B**

B

µg ácido trans. cinámico min⁻¹ mg⁻¹ proteína

µg taxotomina A / mL

µg taxotomina A / mL	µg ácido trans. cinámico min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína
0	3.5
25	3.8
50	5.2
100	4.7

FIGURA 9A**FIGURA 9B**

B

Mg chlorofila / g tecido

µg taxtomina A / mL

µg taxtomina A / mL	Mg chlorofila / g tecido (Square)	Mg chlorofila / g tecido (Circle)
0	6.5	4.8
10	15.0	10.5
50	16.0	14.5
100	14.5	12.0

RESUMO**“COMPOSIÇÃO CONTENDO FITOTOXINAS OBTIDAS A PARTIR DE
STREPTOMYCES SPP E SEU USO COMO ELICIADOR NA INDUÇÃO
EM RESISTÊNCIA DE PLANTAS”**

5 A presente invenção provê uma composição contendo
fitotoxinas, em doses adequadas, particularmente, da classe das
taxtominas, sendo que as fitotoxinas são obtidas a partir culturas de
Streptomyces spp. patogênicas. Adicionalmente, o presente pedido
destina-se ao uso da dita composição como eliciador na indução em
10 resistência de plantas.