



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102023023562-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102023023562-0

(22) Data do Depósito: 10/11/2023

(43) Data da Publicação Nacional: 23/09/2025

(51) Classificação Internacional: C07K 14/21; C07K 14/27; C12N 15/82.

(52) Classificação CPC: C07K 14/21; C07K 14/27; C12N 15/8261; C12N 15/8281.

(54) Título: PEPTÍDEO MUTANTE BIOATIVO ELICITOR DE RESPOSTA HIPERSENSÍVEL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ERWINIA OLEAIE, SEU USO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA XV DE NOVEMBRO, 1299, CENTRO, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80060-000, Brasileira

(72) Inventor: NAYARA COSTA DE CARVALHO SOUSA OKUMOTO; CARLOS RICARDO SOCCOL; VANETE THOMAZ SOCCOL.

Código de Controle: 389F5AD884A0B588 CFA35BE48CC20825

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 10/11/2023, observadas as condições legais

Expedida em: 09/06/2026

Assinado digitalmente por:
Gisela Aparecida Silva Nogueira
Diretora de Patentes Substituta

RELATÓRIO DESCRITIVO

PEPTÍDEO MUTANTE BIOATIVO ELICITOR DE RESPOSTA HIPERSENSÍVEL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *ERWINIA OLEAIE*, SEU USO

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção reivindica os peptídeos mutantes sintetizados quimicamente SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3 (P1 e P2), e seu uso para induzir respostas ativas das plantas como resistência a doenças, e seu uso antimicrobiano no controle de bactérias patogênicas de planta. Trata-se de peptídeos mutantes com potencial elicitor de resposta hipersensível e atividade antimicrobiana.

[002]. A invenção proposta insere-se no campo de alternativa a agrotóxicos para controle de doenças em plantas de uso agrícola que podem ser adicionados, de forma não limitada, tanto como tratamento de sementes, com aplicação em pulverização, e uso como molécula para plantas formação de transgênicas, com ênfase na mitigação do uso de agrotóxicos.

Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica

[003]. No Brasil e no mundo observa-se um crescimento no interesse de uma agricultura mais sustentável. Este cenário é decorrente de fatores como clima, uso da terra e alimentação mais limpa, como o movimento de consumo de alimentos sem agrotóxicos.

[004]. Na agricultura as plantas cultiváveis estão expostas a ataque de agentes patogênicos a todo tempo, sejam fungos, bactérias, vírus e nematoides. Muitos dos agrotóxicos registrados para controles de doenças em plantas são direcionadas aos fungicidas, quase não há registro de bactericidas para plantas. Com tudo, mesmo com o uso de agrotóxicos os agentes patogênicos acabam se tornando resistentes aos

princípios ativos dos mesmos, dificultando o controle ou necessitando de aumento da dose.

[005]. Logo, alternativas para proteção das culturas é necessária, plantas com mais resistência a doenças podem expressar todo o seu potencial em rendimento e qualidade das sementes e frutos, trazendo uma vantagem econômica ao agricultor.

[006]. Uma alternativa é o uso de peptídeos bioativos que conferem resposta hipersensível em plantas (HR) e peptídeos com ação antimicrobiana, chamados "peptídeos indutores de resistência PIRs e peptídeos antimicrobianos AMPs" que são sequências derivadas de proteínas chave, presente em diferentes microrganismos.

[007]. As interações entre patógenos bacterianos e seus hospedeiros vegetais geralmente se enquadram em duas categorias: (1) compatível (hospedeiro-patógeno), levando ao crescimento bacteriano intercelular, ao desenvolvimento de sintomas e ao desenvolvimento de doenças na planta hospedeira; e (2) incompatível (patógeno-não hospedeiro), resultando na resposta hipersensível, ocorrendo interação incompatível, sem sintomas progressivos da doença. Durante interações compatíveis nas plantas hospedeiras, as populações bacterianas ou fúngicas aumentam dramaticamente e ocorrem sintomas progressivos. Durante interações incompatíveis, as populações bacterianas ou fungos não aumentam e os sintomas progressivos não ocorrem.

[008]. A resposta de hipersensibilidade ("HR") é uma necrose rápida e localizada que está associada à defesa ativa das plantas contra muitos patógenos, para que isso ocorra precisa do ataque do patógeno e a ativação da resistência sistêmica adquirida SAR que deixa uma marca no sistema "imunológico" da planta dando a ela a capacidade de se proteger contra outros patógenos. No entanto com o uso de peptídeos bioativos elicitores de resistência é capaz de conferir esta memória na planta sem a expor a ataques de patógenos, assim tornando a uma

planta resistente. Já o peptídeo bioativo com ação antimicrobiana de bactérias trabalha com a lise celular, tendo assim um efeito inibitório do crescimento bacteriano, na agricultura pode ser usado como bactericida em forma de pulverização para controle de lavouras sem plantas resistentes a esses patógenos.

[009]. Já o peptídeo bioativo com ação antimicrobiana de bactérias trabalha com a lise celular, tendo assim um efeito inibitório do crescimento bacteriano, na agricultura pode ser usado como bactericida em forma de pulverização para controle de lavouras sem plantas resistentes a esses patógenos.

[010]. Nos últimos anos houve um direcionamento às pesquisas e patentes relacionadas uso de peptídeos ativos para indução de resistência, promotores de crescimento, controle de nematoides, em plantas transgênicas. Mesmo assim as sequências já patenteadas não suprem a necessidade do mercado por uma agricultura com menos agrotóxicos. As doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos representam uma das principais ameaças à produção agrícola global, resultando em perdas significativas de colheitas e impactos econômicos consideráveis.

[011]. Tradicionalmente, o controle dessas doenças tem se baseado no uso extensivo de agrotóxicos químicos, no entanto, essa abordagem apresenta desafios substanciais, como a resistência dos patógenos a esses produtos e os potenciais efeitos negativos na saúde humana e no meio ambiente. Com tudo, a pesquisa em busca de métodos alternativos e sustentáveis de manejo de doenças tem se concentrado no desenvolvimento e aplicação de compostos biológicos, como os peptídeos bioativos.

[012]. Os peptídeos bioativos são moléculas curtas de aminoácidos que desempenham uma variedade de funções biológicas em organismos vivos. Na agricultura, eles têm atraído a atenção dos

pesquisadores devido à sua capacidade de atuar como ativadores de respostas de defesa nas plantas, induzindo mecanismos de resistência que tornam os cultivos mais robustos contra agentes patogênicos. Nesse contexto, os peptídeos bioativos, emergiram como uma classe promissora de moléculas capazes de desempenhar um papel fundamental no controle de doenças em lavouras.

[013]. Algumas das referências do uso de peptídeos bioativos na agricultura são: The hypersensitive response ("HR") is a rapid, localized necrosis that is associated with the active defense of plants against many pathogens (Kirally, Z., "Defenses Triggered by the Invader: Hypersensitivity," pages 201-224 in: Plant Disease. An Advanced Treatise, Vol. 5, J. G. Horsfall and E. B. Cowling, ed. Academic Press New York (1980); Klement, Z., "Hypersensitivity," pages 149-177 in: Phytopathogenic Prokaryotes, Vol. 2, M. S. Mount and G. H. Lacy, ed. Academic Press, New York (1982). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. (Chen, y.; Guarnieri, m. T.; Vasil, a. I.; Vasil, m. L.; Mant, c. T.; Hodges, R. S. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 51, n. 4, p. 1398-1406, 2007. Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. Kim JG, Jeon E, Oh J, Moon JS, Hwang I.)

[014]. Recentemente, o documento de patente BR112019024647- 9 A2, relatam o uso de peptídeos elicitor de resposta hipersensível em plantas como indução de resistência a doenças, intensificação de cultivo, resistência a pragas e resistência a estresse. A presente invenção difere da patente citada por usar peptídeo mutante ainda não registrado, para indução de resistencia em plantas e ação antimicrobiana, para uso em pulverização, ainda não usados com peptídeos, da família de proteínas efetoras tipo 3 de AvrE [*Erwinia oleae*], uso somente para doenças da soja, sendo assim um potencial produto específico.

[015]. O documento de patente US 6228644 B1 descreveu o uso de peptídeo bioativo para promotor de crescimento, indutor de resistência a doenças, controle de insetos. A presente invenção difere da patente citada por usar peptídeo mutante ainda não registrado, para indução de resistência em plantas e ação antimicrobiana, para uso em pulverização, ainda não usados com peptídeos, da família de proteínas efetoras tipo 3 de AvrE [*Erwinia oleae*], uso somente para doenças da soja, sendo assim um potencial produto específico.

[016]. Por último o documento de patente BR112014022195-2 A2 relatou o uso de peptídeos tóxicos expressa em plantas, formação de plantas transgênicas, voltado para controle de insetos. A presente invenção difere da patente citada por usar peptídeo mutante ainda não registrado, para indução de resistência em plantas e ação antimicrobiana, para uso em pulverização, ainda não usados com peptídeos, da família de proteínas efetoras tipo 3 de AvrE [*Erwinia oleae*], uso somente para doenças da soja, sendo assim um potencial produto específico.

[017]. Não foram reportados na literatura, seja em artigos científicos ou patentes, a sequência sintética aqui reivindicada como uma nova molécula para uso de indutor de resistência em plantas contra doenças e sua atividade antimicrobiana.

[018]. Desta forma, o objetivo da presente invenção é oferecer ao mercado uma nova molécula biológica sintética de controle de doenças em plantas.

Sumário da invenção

[019]. Esta invenção descreve a forma que o peptídeo selecionado foi mutado a partir da sequência nativa da proteína do microrganismo *Erwinia Oleae*. Tais como os testes efetuados para confirmar suas funções como elicitor de respostas de hipersensibilidade em planta de soja *Glycine max* (L.) Merr e sua atividade antimicrobiana, ambos os testes

foram realizados contra dez patógenos da cultura da soja *Glycine max* (L.) Merr, sendo sete fungos e três bactérias, sendo estes, as principais doenças bacterianas da soja são: o crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*); fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*); mancha bacteriana marrom (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*); pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). As doenças fungicas testadas foram, antracnose (*Colletotrichum truncatum*); mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*); podridão radicular de *Phytophthora* (*Phytophthora sojae*); crestamento foliar e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*); Mancha-alvo (*Corynespora cassicola*); Podridão-de-carvão (*Macrophomina phaseolina*); Podridão vermelha da raiz (*Fusarium brasiliense*, *F. tucumaniae*, *F. crassistipitatum*).

Descrição da abordagem do problema técnico

[020]. Segundo previsões da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), em 2050 o mundo terá mais de 9 bilhões de habitantes, o que exigirá aumento de cerca de 70% no volume de produção de grãos, frutas, verduras, cereais, de modo que supra a demanda por alimentos em todos os países. Neste cenário, o Brasil tem um papel importante na subsistência da população mundial. De acordo com FAO-STAT, no período de 2000 a 2020, com destaque no último ano, o Brasil foi classificado como o quarto maior produtor de grãos (arroz, cevada, soja, milho e trigo) do mundo, representando 7,8% da produção mundial, e no âmbito da exportação o Brasil é o segundo no ranking mundial, com 19% do mercado internacional.

[021]. Em paralelo à demanda de alimentos, cresce a necessidade de que haja uma produção sustentável, com a preocupação mundial em relação ao impacto da agricultura no meio ambiente. Este novo tipo de demanda qualificada traz a necessidade de criação de novas

tecnologias que auxiliem na agricultura com baixo impacto ambiental (KOMÁREK et al., 2010; BUARQUE, 2011).

[022]. A busca por práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes tem despertado a um crescente interesse na pesquisa de produtos biológicos para o manejo de doenças e pragas na agricultura mundial (KOMÁREK et al., 2010; BUARQUE, 2011). A preocupação com os impactos ambientais denominado movimento verde, visa reduzir os riscos associados ao uso indiscriminado de produtos químicos e outras práticas agrícolas nocivas ao ambiente. Este movimento tem impulsionado a pesquisa, que vem buscando alternativas inovadoras que possam garantir o futuro agrícola com mais sustentabilidade e saúde (VILASBÔAS, 2009). Pensando em proporcionar uma agricultura sustentável, o mercado vem criando tecnologias denominadas Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (T.I.M.P), que não têm efeito residual para o ambiente, tornando-as mais interessantes pois essa técnica trabalha com alvos individuais para cada objetivo (NBT PLATAFORM; 2019).

[023]. Nesse contexto, os peptídeos bioativos, particularmente as proteínas *harpin*, emergiram como uma classe promissora de moléculas capazes de desempenhar papel fundamental no controle de doenças em lavouras (REDDY et al., 2004; HOLASKOVA et al., 2015). Os dois peptídeos mutantes são inovadores e possuem atividade antimicrobiana e potencial elicitor de resposta hipersensível, ajudando o Brasil a entrar numa nova etapa biotecnológica da agricultura. A inovação desta invenção se refere a sequências de peptídeos inéditos que possuem a capacidade de promover respostas ativas na planta como resposta hipersensível. A indução de resposta hipersensível envolve a modulação de sinalização bioquímicas das plantas.

[024]. Os dois peptídeos mutantes são inovadores e possuem atividade antimicrobiana e potencial elicitor de resposta hipersensível, ajudando o Brasil a entrar numa nova etapa biotecnológica da

agricultura. O efeito surpreendente é sua possibilidade de ser sintetizado quimicamente ou por via recombinante.

Descrição detalhada da Invenção

[025].A invenção se iniciou com a escolha da proteína base para a formação dos peptídeos, foi selecionado através do banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), a proteína selecionada foi a da família **secretion system effector type III de** [*Erwinia oleae*]. Após a escolha, a proteína foi cortada em programa de bioinformática que caracteriza formação de bobina enrolada, posteriormente a sequência nativa dada pelo programa foi mutada em duas variantes SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3 (P1 e P2), presentes na reivindicação 1 ou 2.

[026].As mutações e inserções de aminoácidos nas sequências peptídicas conforme a reivindicação 1 ou 2, caracterizada na sessão “3” e “4”, não alteram materialmente as seguintes propriedades: (i) a capacidade de o peptídeo induzir a resposta ativa em plantas, (ii) a capacidade antimicrobiana contra doenças de plantas, (iii) solubilidade do peptídeo em água ou solução aquosa. Os peptídeos foram sintetizados em Fase Sólida-Líquida, posteriormente diluídos para iniciação de fase de testes.

[026]. Em suma, para a estabilidade do peptídeo e diluição, para conferir seu efeito indutor de resistência contra doenças em plantas e atividade antimicrobiana. As sequências foram diluídas em concentrações 30 μ M, 15 μ M, 5 μ M, usando Tris-HCL 20 mM pH 8. Primeiramente os peptídeos são dissolvidos para uma solução estoque de concentração de 300 μ M, posteriormente feito alíquotas de solução trabalho em suas respectivas concentrações, presentes na reivindicação 3 ou 4.

[027].Uma propriedade de um peptídeo para elicitar uma resposta hipersensível em planta, mediante a aplicação ou infiltração do

peptídeo no tecido da planta, pode ser medida em forma de solução. A taxa de infiltração inclui aplicar de 1 a 500 mg/mL, em concentrações de 500 ug/ml segundo Wei, Science 257:85-88 (1992), que compõe a lista de referências deste presente documento. As folhas podem ser esfregadas levemente e infiltradas logo após as plantas podem ser pontuadas e observadas ao longo de 48 h seguintes quanto á murcha e escurecimento, lesões típicas da morte celular programada. As plantas são consideradas positivas para HR (HR+) se exibirem morte celular macroscópicas visível a olho nu, acompanhado do escurecimento e murcha do tecido inoculado. Já as plantas consideradas negativas para HR (HR-), são as que não apresentaram morte celular e murcha. Para a validação de eficiência do peptídeo contra doença, é feito o tratamento de semente com duração de 2 min com a solução peptídica diluído em respectiva concentração, se cultiva semente a semente, quando estiver em estágio vegetativo, é feito um leve esfregaço na folha e ao invés de ser inoculada com peptídeo é inoculada com o patógeno de interesse onde, fungos diluídos em meio PDB contendo 2×10^4 esporos/mL, as bactérias foram feitas suspensão de salina contendo 2×10^8 UFC/mL. Após a inoculação é feita a avaliação das plantas para verificar se houve morte celular e murcha dentro das 48 h posteriores. As plantas são consideradas positivas para HR (HR+) se exibirem morte celular macroscópicas visível a olho nu, acompanhado do escurecimento e murcha do tecido inoculado. Já as plantas consideradas negativas para HR (HR-), são as que não apresentaram morte celular e murcha ou apresentaram sintomas da doença inoculada.

[028].Uma propriedade de um peptídeo ser antimicrobiano é a sua capacidade de penetrar a membrana do patógeno causando a lise, logo o fator principal a sua função antimicrobiana são suas conformidades como são comumente classificados com base em sua estrutura secundária em α -helicoidal, folha β ou peptídeos com estrutura

de bobina estendida/aleatória. Os peptídeos antimicrobianos exibem uma atividade antimicrobiana direta e rápida, causando ruptura da integridade física da membrana microbiana e/ou transcolando-se através da membrana para o citoplasma de bactérias para atuar em alvos intracelulares. É amplamente aceito que a interação da membrana é um fator chave para a atividade antimicrobiana direta dos AMPs, tanto quando a própria membrana é alvo quanto quando um alvo intracelular deve ser alcançado por meio de translocação, como refere Mahlapuu M (2016), que compõe a lista de referências deste documento. Para confirmar a atividade antimicrobiana do peptídeo é feito primeiramente a análise em programa de bioinformática que mostra a estrutura 3D do peptídeo e logo após testado *in silico* para a translocação em membrana. Após a confirmação, são feitos testes de inibição, que podem ser por medida de densidade óptica ou por Halo de inibição, onde consiste na cultura do microrganismo de interesse a ser inibido, posteriormente colocado em contato com o agente controlador no caso peptídeo diluído em sua respectiva concentração, de é em placa por halo de inibição é analisado em presença ou não de halo, podendo também fazer medida da circunferência do halo. Se é por densidade óptica, é feito em meio líquido e precisasse de uma curva padrão de crescimento do microrganismo, logo depois coleta em vários horários para contar o quanto o microrganismo cresceu no meio contendo o agente inibitório o peptídeo.

[029]. O método para conferir resistência a patógenos a planta de soja em conformidade com a presente invenção, os peptídeos são úteis para conferir resistência a uma ampla variedade de patógeno que são: (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*); (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*); (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*); (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). (*Colletotrichum truncatum*); (*Sclerotinia sclerotiorum*); (*Phytophthora sojae*); (*Cercospora kikuchii*);

(*Corynespora cassicola*); (*Macrophomina phaseolina*); Podridão vermelha da raiz (*Fusarium brasiliense*, *F. tucumaniae*, *F. crassistipitatum*).

[030]. O método para atividade antimicrobiana em conformidade com a presente invenção, os peptídeos são úteis para conferir resistência a uma ampla variedade de patógeno que são: (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*); (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*); (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*); (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*).

Exemplos

Exemplo 1 - SELEÇÃO DE PEPTÍDEO BIOATIVO

[031]. A prospecção iniciou com a pesquisa em bancos de dados genômicos e proteômicos de organismos de interesse, como plantas, microrganismos contendo a proteína *harpinas*. As sequências de proteínas selecionadas foram obtidas em bancos de dados: The Universal Protein Resource, UniProt e National Center for Biotechnology Information (NCBI). Foram realizadas buscas e avaliadas sequências da família ***secretion system effector type III***.

[032]. Pesquisas detalhadas da Biblioteca de peptídeos foram realizadas visando descartar possíveis peptídeos já patenteados nas proteínas escolhidas. Para isto foram feitas buscas usando o software BLAST das sequências selecionadas e busca de anterioridade no site Orbit e Google patentes.

[033]. As sequências de proteínas obtidas em banco de dados que foram selecionadas, foram analisadas em programas de bioinformática para identificar sequências peptídicas candidatas usando parâmetros específicos, como: sequências de aminoácidos ricos em resíduos carregados positivamente, presença de domínios funcionais conhecidos ou a expressão em tecidos relevantes.

[034]. As sequências de peptídeos foram submetidas ao algoritmo Protein BLAST no banco de dados Patented protein sequences (pataa),

localizado no NCBI. O alinhamento local foi realizado contra cada sequência disponível nos seguintes depósitos de patentes a fim de tornar o projeto assertivo.

[035]. As sequências de proteínas escolhidas no banco de dados no NCBI foram submetidas ao Software **facilities to analyse NPS@'s data: AnTheProt and MPSA**, para a obtenção das sequências de peptídeos.

[036]. As proteínas candidatas foram analisadas para observar suas estruturas tridimensionais, obtendo percepções positivas para geração de peptídeos bioativos. Além disso, a função das proteínas foi explorada para determinar seu potencial na produção de peptídeos com atividades desejadas. Para a modelagem e visualização das estruturas 3D dos peptídeos selecionados, foi utilizado o programa SWISS-MODEL e PEP-FOLD3. Em tais programas as sequências foram modeladas e comparadas com outros modelos já existentes de sequências patenteadas no banco de dados do google patentes. Para análise físico-química foi utilizado o site PepCalc.com - Peptide property calculator, para análise de membrana foi usado a interface Mol* 3D Viewer data: BCSB-PDB protein data bank.

EXEMPLO 2 MUTAÇÕES REALIZADAS

[037]. Através da seleção da proteína mãe, usando o banco de dados do NCBI, foi selecionada a proteína WP_034950511.1 Efetor do sistema de secreção tipo 3 da família AvrE [*Erwinia oleae*], após a seleção a proteína foi trabalhada no programa de corte e predição de bobina enrolada (Coiled-coil prediction (Lupas et al., 1991),), que é feita com o algoritmo de Lupas et al. A probabilidade de um resíduo numa proteína fazer parte de uma estrutura em espiral foi avaliada por comparação das suas sequências flanqueadoras com sequências de proteínas em espiral conhecidas. Pós a análise do programa o gráfico mostrando fragmentos de 14 a 28 resíduos de aminoácidos com uma faixa de 1 a 9, onde 1 são

sequências mais fracas em bobina enrolada, mas ainda possui, e 9 onde 100% do resíduo é composto por bobina enrolada. De acordo com estudos propostos por diferentes autores, o formato de Coiled-coil (bobina enrolada) é fundamental para que o peptídeo exerça a atividade antimicrobiana e indutora de resistência em plantas (Ji ZL, Yu MH, Ding YY, Li J, Zhu F, He JX, Yang LN. Coiled-Coil N21 of Hpa1 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Promotes Plant Growth, Disease Resistance and Drought Tolerance in Non-Hosts via Eliciting HR and Regulation of Multiple Defense Response Genes. Int J Mol Sci. 2020 Dec 28;22(1):203. doi: 10.3390/ijms22010203. PMID: 33379173; PMCID: PMC7795061.) resultados do programa na (FIGURAS 1 e 2):

[038].Sequência Mãe (NATIVA) selecionada: DQIKQLRQQFDTLREK, SEQ ID NO: 1, foi feita busca de anterioridade, foi constatado que a sequência possui patente (Sequência 2 da patente US 6228644 B1 com Status legal: Expirado) de 100% da sequência nativa, para o uso de: (Elicitor de resposta hipersensível de *Erwinia amylovora*, seu uso e gene codificador), com essa patente pode usar os resultados de controle e extrapolar para a avaliação do peptídeo que será mutado em cima desta sequência nativa, padrões físico químicos da sequência nativa foram avaliados como sua estrutura 3D foram avaliados, com base nestas análises a sequência foi mutada manualmente, para seguir um padrão destes pré valores, tabela 1, a sequência mutante compreende os aminoácidos: EQIKTLWKDHCLKSTFPSREK, denominada P1 SEQ ID NO: 2 mutação da sequência nativa SEQ ID NO: 1, sofreu com a inserção de domínios E.X.X.X.T.X.W.K.D.H.C.X.K.S.T.F.P.S.X.X.X essenciais para a função antimicrobiana e indutora de resistência em plantas contra doenças, onde X representa aminoácidos não mutados. E foi avaliada nos mesmos programas para determinar seu padrão. Para a segunda sequência mutante, compreende os aminoácidos: EQIRTLDKWNQLKSSFETREK, denominada P2 SEQ ID NO: 3, mutação da sequência nativa SEQ ID NO:

1, sofreu com a inserção de domínios E.X.X.R.T.X.D.K.W.N.Q.X.K.S.S.F.E.T.X.X.X essenciais para a permanência de função antimicrobiana e indutora de resistência em plantas contra doenças, onde X representa aminoácidos não mutados. E foi avaliada nos mesmos programas para determinar seu padrão (FIGURAS 1 e 2).

TABELA 1: DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS PEPTÍDEOS NATIVO, P1 E P2 (Seq. ID. Nº1 E 2 E 3)

Nome sequências	SEQ ID NO:	Sequências para Síntese	Número de resíduos	Ponto isoelétrico	Solubilidade	Massa molar	Faixa de pH 7	Coefficiente de extinção
NATIVO - <i>Erwinia oleae</i>	1	DQIKQLRQQFDTLREK	16	pH 9.95	Solúvel	2045.29 g/mol	1	0 M ⁻¹ cm ⁻¹
P2 mutante - <i>Erwinia oleae</i>	2	EQIKTLWKDCHCLKSTFPSREK	21	pH 9.81	Solúvel	2636.91 g/mol	1	5690 M ⁻¹ cm ⁻¹
P3 mutante - <i>Erwinia oleae</i>	3	EQIRTLKWNQLKSSFETREK	21	pH 9.75	Solúvel	2574.95 g/mol	2	5690 M ⁻¹ cm ⁻¹

[039].A sequência nativa Seq. ID. Nº 1 tem um padrão de:

[040].**D Q I K Q L R Q Q F D T L R E K**

[041].Asp-Gln-Lie-Lys- Gln-Leu-Arg- Gln- Gln-Phe- Asp-Thr-Leu-Arg- Glu-Lys :16 resíduos

[042]. (D- Aspartato – polar carga negativa: ácido)- (Q- Glutamina – polar sem carga: neutro)-(I- Isoleucina - apolar hidrofóbico: anfipático)-(K- Lisina-polar com carga positiva: basico)- (Q- Glutamina – polar sem carga: neutro)-(L- Leucina-apolar hidrofóbico: anfipático)-(R- Argenina-polar carga positiva: basico)- (Q- Glutamina – polar sem carga: neutro)-(Q- Glutamina – polar sem carga: neutro)-(F- Fenilalanina-apolar hidrofóbico: aromático)- (D- Ácido Aspartato – polar carga negativa: ácido)-(T- Tionina-polar sem carga: neutro)-(L- Leucina-apolar hidrofóbico: anfipático)-(R- Argenina- polar carga positiva: basico)-(E- Ácido Glutaminico- polar carga negativa: ácido)-(K- Lisina- polar com carga positiva: basico).

[043].**Logo o padrão da sequência é:** acido-neutro-anfipático-basico-neutro-basico-neutro-neutro-aromático-acido-neutro-anfipático-basico-acido-basico.

[044].As mutações seguiram o mesmo padrão de sequência com a diferença de acréscimo de aminoácidos:

[045].Sequência 1: P1 mutante SEQ ID NO: 2

[046]. P1: EQIKTLWKDHCLKSTFPSREK - Glu-Gln-Ile-Lys-Trh-Leu- Trp- Lys- Asp-His-Cys-Leu-Lys-Ser-Trh-Phe-Pro- Ser-Arg- Glu-Lys

[047].E.X.X.X.T.X.W.K.D.H.C.X.K.S.T.F.P.S.X.X.X

[048]. (E- Ácido Glutaminico- polar carga negativa: ácido)- (Q- Glutamina – polar sem carga: neutro)- (I- Isoleucina - apolar hidrofóbico: anfipático)- (K- Lisina-polar com carga positiva: basico)- (T- Treonina-polar sem carga: neutro)- (L- Leucina-apolar hidrofóbico: anfipático)- (W- Triptofano- hidrofóbico: aromático)- (K- Lisina-polar com carga positiva: basico)- (D- Ácido Aspartato – polar carga negativa: ácido)- (H- Histidina – polar carga positiva: basico)- (C-Cisteina – polar sem carga: neutro)- (L- Leucina-apolar hidrofóbico: anfipático)-)-(K- Lisina-polar com carga positiva: basico)- (S- Serina-polar sem carga: neutro)- (T- Treonina-polar sem carga: neutro)- (F- Fenilalanina-apolar hidrofóbico: aromático)- (P- Prolina-apolar hidrofóbico))-(S- Serina-polar sem carga: neutro)- (R- Argenina- polar carga positiva: basico) (E- Ácido Glutaminico- polar carga negativa: ácido)-)-(K- Lisina-polar com carga positiva: basico).

[049].**Logo o padrão da sequência é:** Acido-neutro-anfipático-basico-neutro-anfipático-aromático-basico-acido-basico-neutro-anfipático-basico-neutro-neutro-aromático-hidrofóbico-neutro-basico-acido-basico.

[050].Sequência 2: P2 mutante SEQ ID NO: 3

[051].EQIRTLDKWNQLKSSFETREK - Glu-Gln-Ile-Arg-Trh-Leu-Asp-Lys-Trp-Asn- Gln- Leu- Trh- Ser- Ser-Phe-Glu-Thr-Arg- Glu- Lys

[052].E.X.X.R.T.X.D.K.W.N.Q.X.K.S.S.F.E.T.X.X.X

[053]. (E- Ácido Glutaminico- polar carga negativa: ácido)- (Q- Glutamina – polar sem carga: neutro)-(I- Isoleucina - apolar hidrofóbico: anfipático)-)-(R- Argenina- polar carga positiva: basico)-)-(T- Treonina- polar sem carga: neutro)- (L- Leucina-apolar hidrofóbico: anfipático)- (D- Ácido Aspartato – polar carga negativa: ácido)-)-(K- Lisina-polar com carga positiva: basico))-(W- Triptofano- hidrofóbico: aromático)-(N- Asparagina-polar sem carga: neutro)- (Q- Glutamina – polar sem carga: neutro)-(I- Isoleucina - apolar hidrofóbico: anfipático)-(K- Lisina-polar com carga positiva: basico)-)-(S- Serina-polar sem carga: neutro))-(S- Serina-polar sem carga: neutro))-(F- Fenilalanina-apolar hidrofóbico: aromático)-(E- Ácido Glutaminico- polar carga negativa: ácido)-)-(T- Treonina-polar sem carga: neutro)-()-(R- Argenina- polar carga positiva: basico)- (E- Ácido Glutaminico- polar carga negativa: ácido))-(K- Lisina-polar com carga positiva: basico).

[054].Logo o padrão é: acido-neutro-anfipatico-basico-neutro-anfipatico-acido-basico-aromatico-neutro-neutro-anfipatico-basico-neutro-neutro-aromatico-acido-neutro-basico-acido-basico.

[055].Após as mutações as duas sequências foram comparadas com a sequência nativa, mostrou parâmetros similares, então foram mandadas para a síntese e posteriormente testadas conforme mostrado na TABELA 1, (FIGURAS 1 e 2.)

[056].Os peptídeos exemplificados que satisfazem a estrutura consenso P1 E P2 (SEQ ID NO: 2 E SEQ ID NO: 3) são identificadas na tabela

2 abaixo:

TABELA 2: VARIANTES PEPTÍDEO DO PEPTÍDEO NATIVO (SEQ ID NO: 1)

Nome do peptídeo	Sequência	SEQ ID NO:
Sequência nativa ou selvagem	DQIKQLRQQFDLREK	1
P1	EQIKTLWKDHLKSTFPSREK	2
P2	EQIRLDKWNQLKSSFETREK	3

EXEMPLO 3 - SÍNTESE DO PEPTÍDEO PROSPECTADO EM FASE SOLIDA-LÍQUIDA

[057]. Os peptídeos selecionados têm característica solúvel. Isso foi sintetizado em escala de 10 μ mol no sintetizador automatizado ResPep SL (Intavis®). Os aminoácidos foram pesados diluídos em NMP, ativados com uma solução 1:1 de Oxyma Pure e dissopropilcarbodiimida (DIC 17,033%). Em seguida, os aminoácidos ativados foram incorporados às resinas TentaGel (Intavis). A desproteção da Fmoc foi realizada repetidamente até que a síntese de cada peptídeo fosse completada utilizando 4-Methylpiperidine 25% (25% v/v em DMF). Os peptídeos foram então extraídos da resina usando tratamento com uma solução contendo Trifluoroacetic (92,5%), água (2,5%), Triispropylsilane (2,5%) e Beta-mercaptoethanol (2,5%) em três horas, sob agitação. Os peptídeos foram precipitados com uma solução fria de metil-terc-butil e liofilizados, o grau de pureza ficou em torno de 95-98%.

[058]. Após a liofilização foi feita a diluição em Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), para solução estoque e posteriormente os peptídeos foram diluídos em três concentrações 5; 15; 30 μ M (KIM JG, 2004).

EXEMPLO 4 - AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO

[059]. Ensaio de inibição por Densidade Ótica (D.O 600).

[060]. Os ensaios antimicrobianos foram feitos de acordo com HÖNG K al. et (2021). Os organismos testados foram: *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea* (CMES 2406), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*: (CMES 1652), *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* (CMES 2162). As bactérias foram cultivadas em 5 mL de meio líquido Mueller Hinton durante a noite a 20°C. As culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 7000 rpm e suspensas novamente em triptona a 1%. As bactérias foram diluídas para uma OD 600 de 0,05 em 1% de triptona antes de usá-las para o teste. Os peptídeos, nas concentrações 5; 15; 30 µM, foram pipetados em 100 µL em uma placa de 96 poços (PS, TC, F-bottom com tampa, Greiner Bio-One) e adicionados 100 µL de cultura bacteriana. Para o controle positivo foram pipetados 100 µL de salina e 100 µL de cultura bacteriana. Para o branco foram pipetados 100 µL de salina e 100 µL de meio sem bactérias.

[061]. A absorbância (OD 600) foi medida em um leitor de microplacas. As microplacas foram incubadas no escuro a 30°C e medidas novamente após 1 h até completarem 13 h. Posteriormente foram feitas medidas em 20 h e 24 h. A percentagem de inibição do crescimento foi calculada $[(\text{absorbância controle positivo} - \text{absorbância com tratamento}) / \text{absorbância controle positivo}] \times 100$, todas as avaliações foram feitas em triplicatas, para cada patógeno e respectivas concentrações de peptídeos gerado um total de

[062]. Foi observado efeito inibitório em todos os microrganismos testados em todos os tratamento com peptídeos e concentrações. Um peptídeo comercial, com o fim de uso para indução de resistência, foi usado como controle positivo, foi usado como base comparativa dos testes este faz parte da patente BR112019024647- 9 A2, e pode ser

encontrado na normativa de liberação de uso do produto de numero: licenciamento do produto na Resolução-RE nº2.514, DE 24/0621 (DOU de 26/06/21) .

[063]. Para o peptídeo mutante P1, SEQ ID NO: 2. Os testes realizados nas três concentrações na avaliação de atividade antimicrobiana , mostraram inibição acima de 65% para a bactéria 2406, nas três concentrações testadas. Para a bactéria 1652 nas três concentrações e avaliando atividade antimicrobiana , mostraram inibição acima de 65% para as concentrações 30 μ M e 5 μ M, e de 62% em 15 μ M, esta variação pode ser explicada por erro de pipetagem ou leitura imprecisa do aparelho. Para a bactéria 2152 nas três concentrações e avaliando atividade antimicrobiana , mostraram inibição de 77% para concentração 30 μ M, 69% para 15 μ M e de 61% para 5 μ M, para uso como produto comercial no controle de bactérias na agricultura, a concentração 5 μ M não foi satisfatória. Para o peptídeo mutante P2 SEQ ID NO: 3, as três concentrações 30, 15, e 5 μ M apresentou inibição acima de 75% para a bactéria 2406. Para a bactéria 1652, as três concentrações 30, 15, e 5 μ M apresentaram inibição acima de 70%. Já para a bactéria 2152, três concentrações 30, 15, e 5 μ M para as três bactérias apresentaram inibição acima de 70%, (FIGURA 5).

[064]. Desta forma foram obtidas inibição acima de 65% para todas as bacterias na concentração 30 μ M. O que mostra o potencial do peptídeo para o controle das doenças causadas por bacterias na soja. Os dados de cada teste em suas respectivas bactérias foram analisados no programa de estatística do excel StarPlus com nivel de significância de 95%. Para a bactéria 2406 a ANOVA, confirma que houve variação no fator 1 concentração com $P < 0.02$ e para o fator 2 peptídeo $P < 0.01$. Para a bactéria 1652 a ANOVA, confirma que não houve variação no fator 1 (concentração) com $P > 0.05$. Para a bactéria 2152 a ANOVA, confirma

que houve variação no fator 1 concentração com $P < 0.02$ e para o fator 2 peptídeos $P < 0.01$.

[065]. O estudo da curva de crescimento das bactérias *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea* 2406, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* 1652; *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* 2162, foi realizado por leitura de densidade ótica DO 600. Nesta metodologia os dados de inibição que se torna atrativo para fins agrícolas é a partir de 65% de inibição (EMBRAPA, 2023), comparando os tratamento com e sem peptídeo, afim de avaliar se houve inibição no crescimento das bactérias.

Avaliação por Halo de Inibição

[066]. O teste de halo de inibição foi realizado em placas descartáveis estéreis, com meio Mueller Hinton Ágar, onde foi repicado com 100 µL de solução bacteriana, para cada uma das três bactérias testadas, contendo 2×10^8 UFC/mL. Nas placas de cada uma das cepas testadas, foram dispostos seis discos de papel Germes estéreis, por placa, após a disposição dos discos, foram pipetados 100 µL das soluções dos peptídeos em suas respectivas concentrações, cada placa conteve somente 1 peptídeo e feitas em triplicata, tanto para cada bactéria quando para cada peptídeo.

[067]. O peptídeo P1 e P2 SEQ ID NO: 2 E SEQ ID NO: 3, sintetizados quimicamente foi submetido a testes de inibição em placa com os microrganismos: *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea* 2406, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* 1652; *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* 2162. Em todos os testes houve formação de halo de inibição, independente da concentração usada, validando em segunda etapa o teste de inibição feito por DO₆₀₀ como mostrado na TABELA 3. Os dados de cada teste em suas respectivas bactérias foram analisados no programa de estatística do excel StarPlus com nível de

significancia de 95%. Para a bactéria 2406 a ANOVA, confirma não que houve variação no fator 1 concentração com $P>0.05$ e para o fator 2 peptídeos $P>0.05$. Para a bactéria 1652 a ANOVA, confirma que houve variação no fator 1 concentração dos peptídeos com $P<0.02$ e no fator 2 peptídeos $P<0.02$. Para a bactéria 2152 a ANOVA, confirma que não houve variação no fator 1 concentração com $P>0.05$ e para o fator 2 peptídeos $P>0.05$ (FIGURAS 3 e 4).

TABELA 3 – SENSIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS FRENTE AOS PEPTÍDEOS TESTADOS

Bactérias		2406; 1652; 2162					
Horas		12			24		
		5			5		
□	30 uM	15 uM	uM		30 uM	15 uM	uM
Peptídeos							
P1	+	+	+		+	+	+
P2	+	+	+		+	+	+

EXEMPLO 5- ANÁLISE DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS

[068]. Após a germinação das sementes elas foram transplantadas para vasos de 5 x 7 cm, conforme descrito no item 4.4.3. A Inoculação das plantas aconteceu em estágio V2 e V3, simultaneamente com os 10 microrganismos patogênicos, o procedimento de inoculação foram feitos de cordo com WANG et al. (2007). Foram feitos esfregaço nas folhas de forma suave com hastes flexíveis de algodão estéril nas pontas, posteriormente inoculadas com gotículas de suspensão dos microrganismos testados. Esses foram preparados do seguinte modo: fungos diluídos em meio PDB contendo 2×10^4 esporos/mL, as bactérias foram feitas suspensão de salina contendo 2×10^8 UFC/ML. As plantas inoculadas foram mantidas a 25-30°C na BOD. O desenvolvimento dos sinais, tanto em plantas tratadas e não tratadas foram avaliadas em 24 h e quatro dias após a inoculação para identifica a formação de cancro, morte celular, que mostra o HR, suas folhas foram destacadas para

análise. Todos os testes foram feitos em quintuplicata para cada uma das três concentrações de cada peptídeo (FIGURA 4) (WANG et al. 2007).

[069]. Para a inoculação os patógenos foram preparados: fungos diluídos em meio PDB contendo 2×10^4 esporos/mL, bactérias foram feitas suspensão de salina contendo 2×10^8 UFC/mL.

[070]. O peptídeo P1 e P2 SEQ ID NO: 2 E SEQ ID NO: 3. se destacou por sua capacidade de indução de HR em soja. Este, inicialmente e, de forma geral, comparativamente ao controle positivo, obteve 100% de resposta HR, para todos os patógenos testados em todas as concentrações, e, apresentou formação de lesões bem definidas e uniformes, com áreas de amputação foliar no local da lesão, independente da concentração usada, isso se justifica pela rapidez do sinal emitido pelo peptídeo na planta, pois a reação de HR iniciou nas primeiras 12 h após a inoculação. As plantas tratadas com o peptídeo mutante P3, obtiveram 100% de HR, como mostra a formação de lesões circulares-ovaladas e algumas com amputação foliar no local das lesões, que mostra como a indução de resistência foi eficiente contra todos os patógenos testados e em todas as concentrações conforme descrito por (WANG et al. 2007) (FIGURA 6 e 7 e 8) (TABELA 4).

TABELA 4 – OCORRÊNCIA DE REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE (HR) EM FOLHAS DE SOJA PARA DIFERENTES PATÓGENOS

PLANTA	Soja						
PEPTÍDEOS	P1	P1	P1	P2	P2	P2	PST
	30uM	15uM	5uM	30uM	15uM	5uM	-
Patógenos							
Salina	B	B	B	B	B	B	S
1623	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1494	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1080	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1871	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
25	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
2392	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
526	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
2406	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1652	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
2162	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S

[071].A tabela representa ocorrência de reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de soja para um dos diferentes patógenos, S para as plantas suscetíveis a doença, B para o local de inoculação sem patógeno. O peptídeo P1 e P2, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3 na avaliação da capacidade de indução de HR em soja, Obtiveram 100% de resposta HR em oito replicatas, para todos os patógenos testados em todas as concentrações, apresentou formação de lesões bem definidas e uniformes, com áreas de amputação foliar no local da lesão, independente da concentração usada, isso se justifica pela rapidez do sinal emitido pelo peptídeo na planta, pois a reação de HR iniciou nas primeiras 12 h após a inoculação.

Descrição das Figuras

[072]. Figura 1 – Descreve a análise in silico das três sequências de peptídeos neste documento lista, P1 (SEQ ID NO: 2), P2 (SEQ ID NO: 3), Nativo (SEQ ID NO: 1). Imagem: A e B e I- representa a estrutura helicoidal do peptídeo P1 e P2 e Nativo. Imagem: C e D e J- Representa a estrutura secundária do peptídeo P1 e P2 e Nativo. Imagem: E e F e K- E o gráfico

que corresponde as probabilidades de cada Alfabeto Estrutural (SA) - letras SA correspondem a fragmentos de comprimento de 4 resíduos, dos peptídeos P1 e P2 e Nativo. As representações foram feitas no programa PEP-FOLD3. Imagem: G e H e L- Representação da membrana interação com o peptídeo, os peptídeos ultrapassa a membrana P1 e P2 e Nativo, Mol* 3D Viewer data: BCSB-PDB protein data bank.

[073]. Figura 2 - Demonstra o gráfico de RAMACHANDRAN, cujos resultados das imagens A e C e E- representa os pontos de aminoácidos dentro das áreas circuladas em amarelo indicam: conformações sem impedimento estérico e são denominadas de regiões favorecidas; as regiões circuladas em azul indicam conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e a região em preto indica estruturas pouco flexíveis, feito no programa Swiss-PdbViewer, na orde, P1 (SEQ ID NO: 2), P2 (SEQ ID NO: 3), Nativo (SEQ ID NO: 1). Imagens B e D e F- representa o diagrama em hélice mostra a distribuição de resíduos de aminoácidos por posição ao longo de uma estrutura helicoidal. A codificação de cores indica as características dos aminoácidos: hidrofóbicos (amarelo e verde), polar sem carga (rosa e roxo), aminoácidos especiais (cinza), aminoácidos ácidos (vermelho), aminoácidos básicos (azul) pelo servidor heliquest na orde, P1 (SEQ ID NO: 2), P2 (SEQ ID NO: 3), Nativo (SEQ ID NO: 1).

[074]. Figura 3 – Representa as medidas de halo de inibição, para os peptídeos, P1 (SEQ ID NO: 2), P2 (SEQ ID NO: 3), nas bactérias 2604, 1652, 2152, nas três concentrações de peptídeos 30uM, 15uM, com suas medidas nas horas 12h e 24h.

[075]. Figura 4 – Representa os gráficos de medidas dos halos de inibição nas 12h e 24h para os peptídeos, P1 (SEQ ID NO: 2), P2 (SEQ ID NO: 3). Em todos os testes houve formação de halo de inibição, independentemente da concentração usada, validando em segunda

etapa o teste de inibição feito por DO600. Os dados de cada teste em suas respectivas bactérias foram analisados no programa de estatística do excel StarPlus com nível de significância de 95%. Para a bactéria 2406 a ANOVA confirma não que houve variação no fator 1 concentração com $P>0.05$ e para o fator 2 peptídeos $P>0.05$. Para a bactéria 1652 a ANOVA confirma que houve variação no fator 1 concentração dos peptídeos com $P<0.02$ e no fator 2 peptídeos $P<0.02$. Para a bactéria 2152 a ANOVA confirma que não houve variação no fator 1 concentração com $P>0.05$ e para o fator 2 peptídeos $P>0.05$.

[076]. Figura 5 – Representa o gráfico de análise de inibição por DO600 das atividades antimicrobianas sobre as três bactérias causadoras de doenças em soja. Os teste realizados para o peptídeo mutante P1 (SEQ ID NO: 2), nas três concentrações 30uM, 15uM, 5uM para as três bactérias, obtiveram inibição acima de 70%. Para o peptídeo mutante P2 (SEQ ID NO: 3), nas três concentrações 30 , 15, e 5 μ M para as três bacterias, obtiveram inibição acima de 65%.

[077]. Figura 6 – Representa a localização nas folas onde foram inoculados os patógenos, ao lado seus respectivos números, nomes e registros, (1-Salina/branco; 2-1643/ *Cercospora* spp; 3-1494/ *Corynespora cassicola*; 4-1080/ *Colletotrichum truncatum*; 5-1871/ *Macrophomina faseolina*; 6-25/ *Neocosmospora phaseoli*; 7-2392/ *Sclerotinia sclerotiorum*; 8-526/ *Phytophthora sojae*; 9-1652/ *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*; 10-2406/ *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea*; 11-2162/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*). Para a inoculação os patógenos foram preparados da seguinte maneira: fungos diluídos em meio PDB contendo 2×10^4 esporos/ml, as bactérias foram feitas suspensão de salina contendo 2×10^8 UFC/ml.

[078]. Figura 7 – Representa as plantas de soja destacadas após 24h a inoculação, e a avaliação de como a planta se recuperou da

interação com o patógeno. Imagem 1 plantas sem inoculação e sem tratamento com peptídeo, imagem 2, planta sem tratamento e com inoculação dos patógenos, apresentou morte, Imagem 3- planta com tratamento com o peptídeo P1 (SEQ ID NO: 2) e inoculação com os patógenos se mostrou saudável e com formação de cancos na folha mostrando o efeito positivo de HR, Imagem 4- planta com tratamento com o peptídeo P2 (SEQ ID NO: 3), e inoculação com os patógenos se mostrou saudável e com formação de cancos na folha mostrando o efeito positivo de HR.

[079]. Figura 8 - Representa as folhas destacadas de soja após 24h a inoculação, e a avaliação da formação de cancro, que são o sintoma de indução de resistência e controle das doenças. Imagem 1 folha sem inoculação e sem tratamento com peptídeo. Imagem 2, folha sem tratamento e com inoculação dos patógenos, apresentou morte, Imagem 3 e 4 e 5- folha com tratamento com o peptídeo P1 (SEQ ID NO: 2), e inoculação com os patógenos se mostrou saudável e com formação de cancos na folha mostrando o efeito positivo de HR, Imagem 6 e 7 e 8- planta com tratamento com o peptídeo P2 (SEQ ID NO: 3), e inoculação com os patógenos se mostrou saudável e com formação de cancos na folha mostrando o efeito positivo de HR.

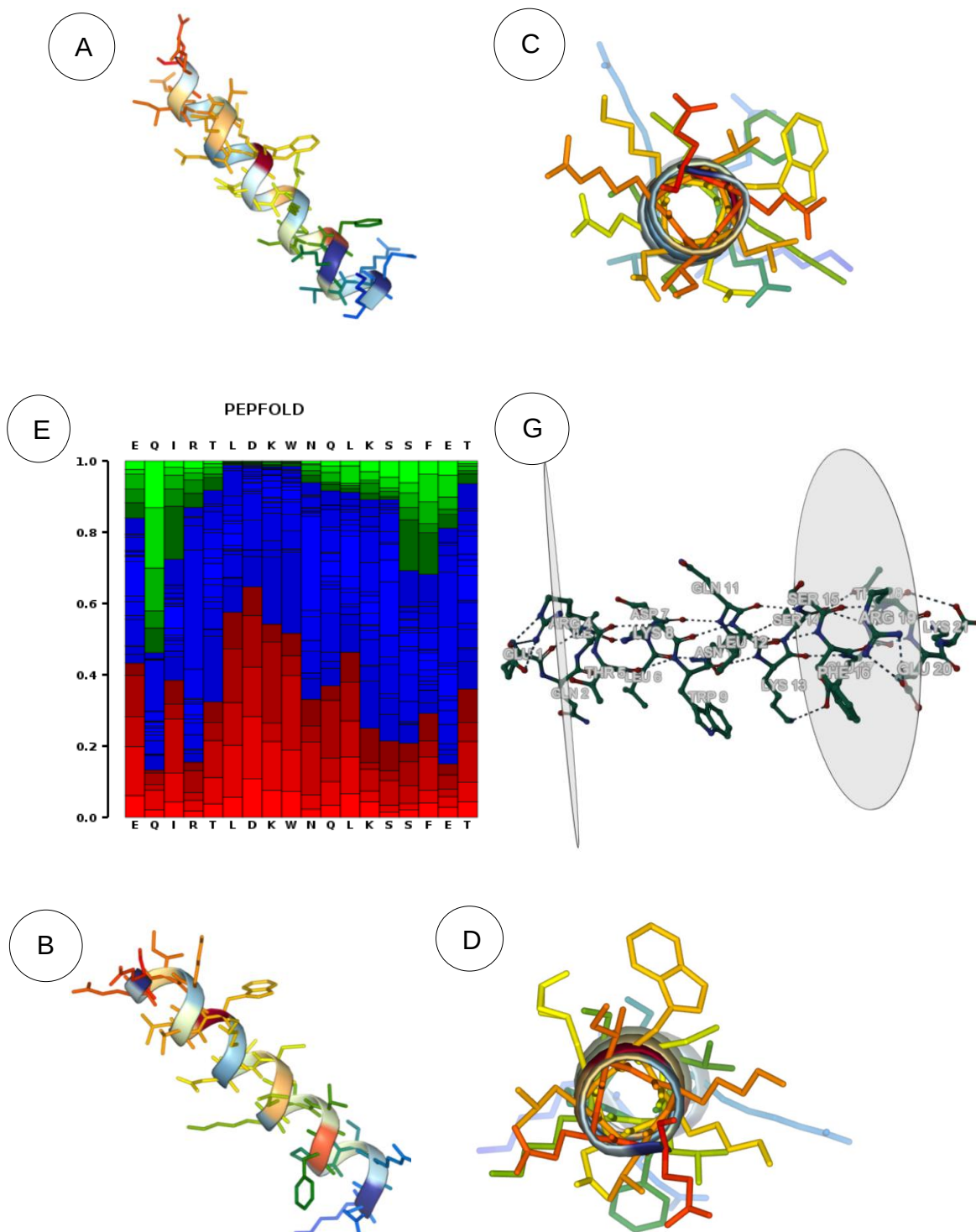
REIVINDICAÇÕES

PEPTÍDEO MUTANTE BIOATIVO ELICITOR DE RESPOSTA HIPERSENSÍVEL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ERWINIA OLEAIE, SEU USO

1. PEPTÍDEO MUTANTE BIOATIVO ELICITOR caracterizado por compreender a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3 que representam variações obtidas a partir da proteína do sistema de secreção do tipo 3 da família AvrE de *Erwinia oleae* WP_034950511.
2. PEPTÍDEO MUTANTE de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser solúvel em água, ter ponto isoelétrico entre 9.75 e 9.81 e massa molar entre 2574.95 e 2636.91 g/mol.
3. PEPTÍDEO MUTANTE de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser para ativação do sistema de resistência da planta a doenças e ação antimicrobiana.
4. USO DO PEPTÍDEO, caracterizado pela aplicação em sementes em concentração de 5 a 30 μM .

DESENHOS

Figura 1



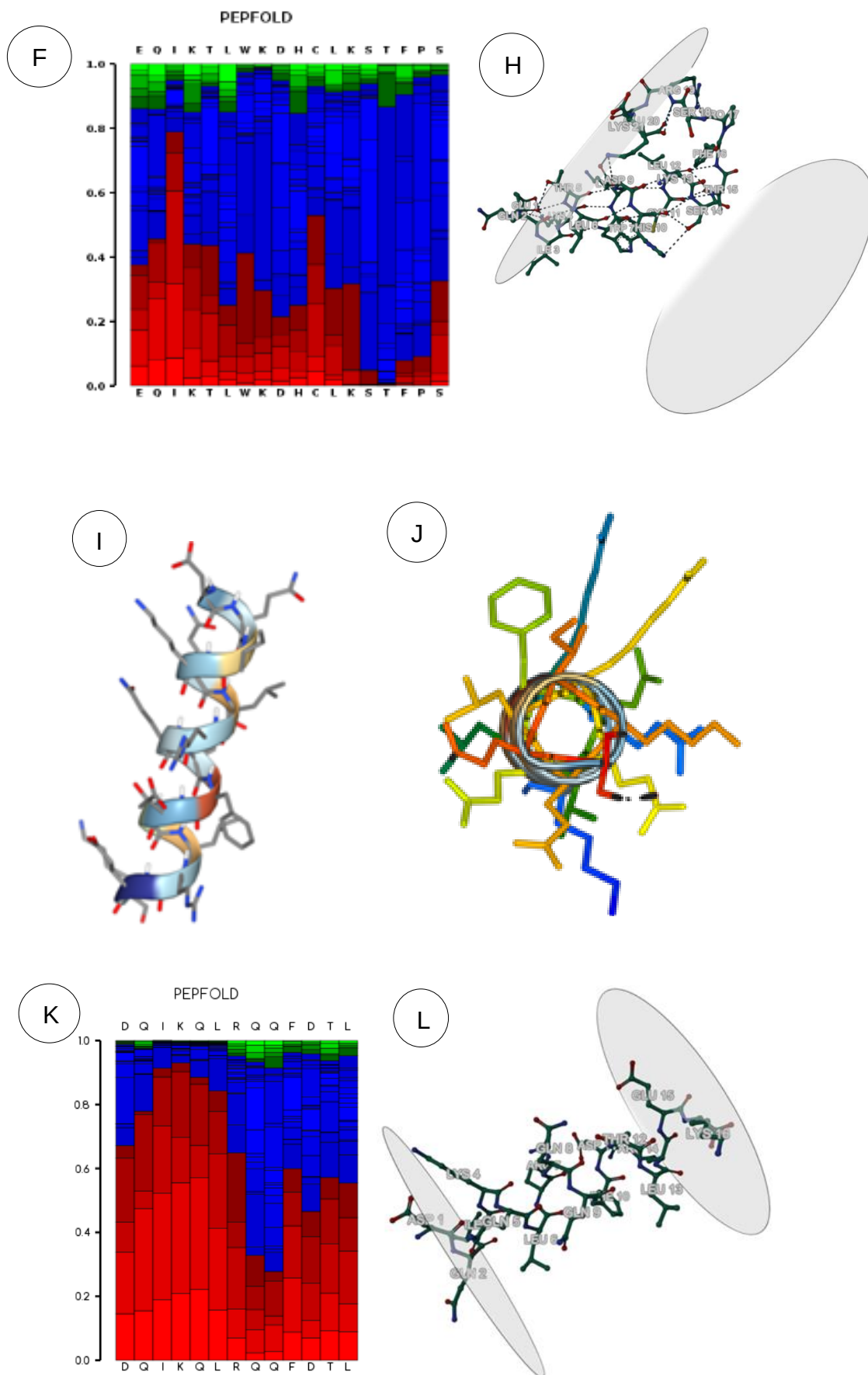


Figura 2

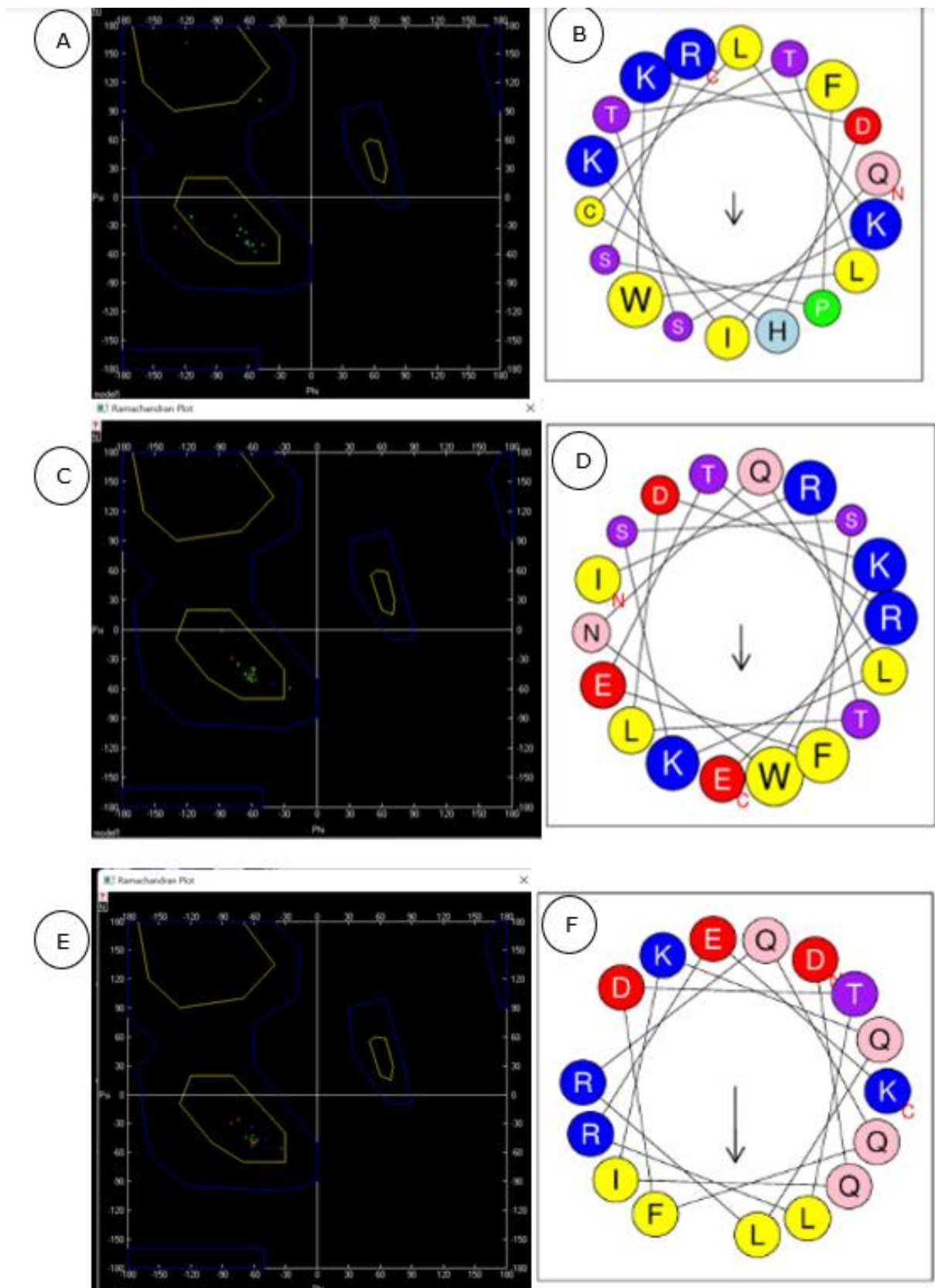


Figura 3

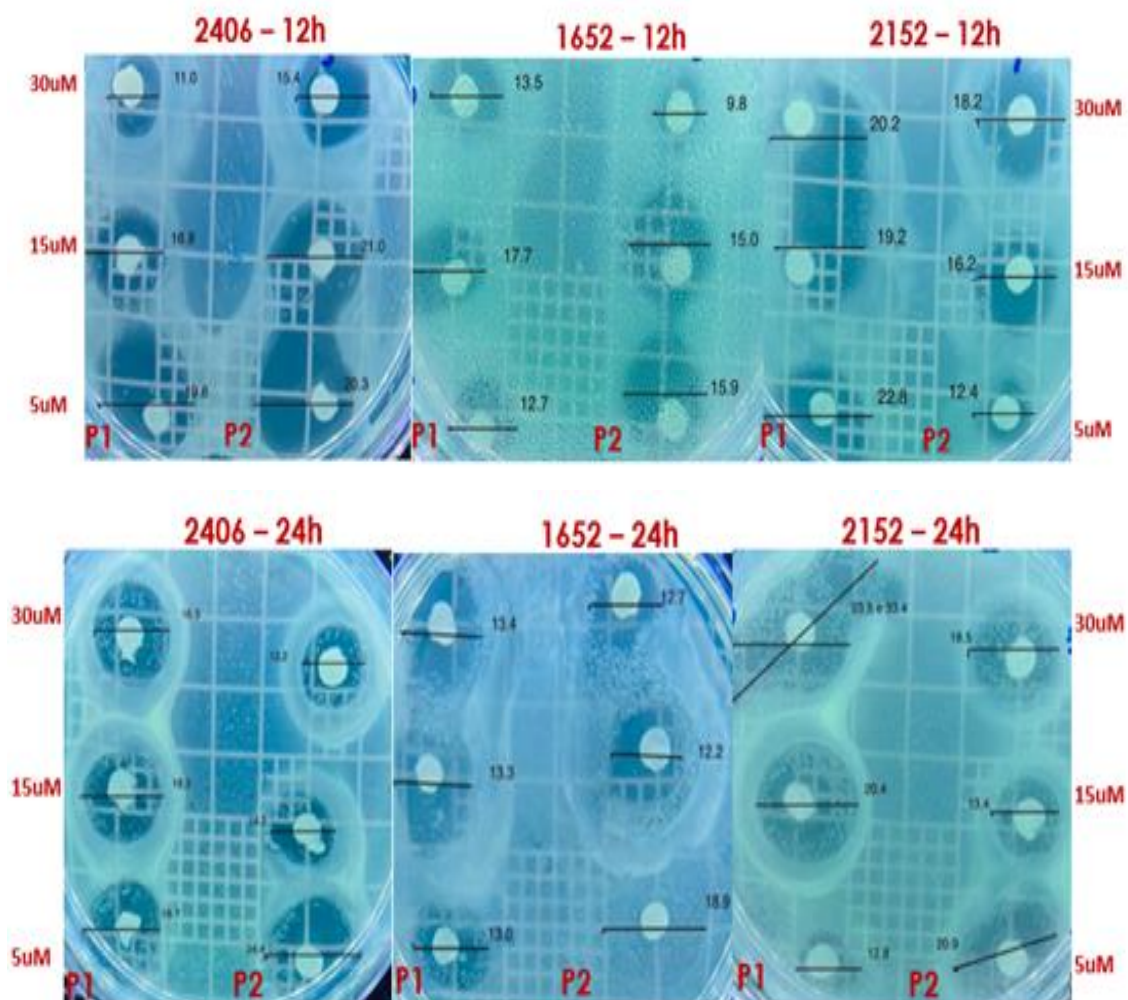


Figura 4

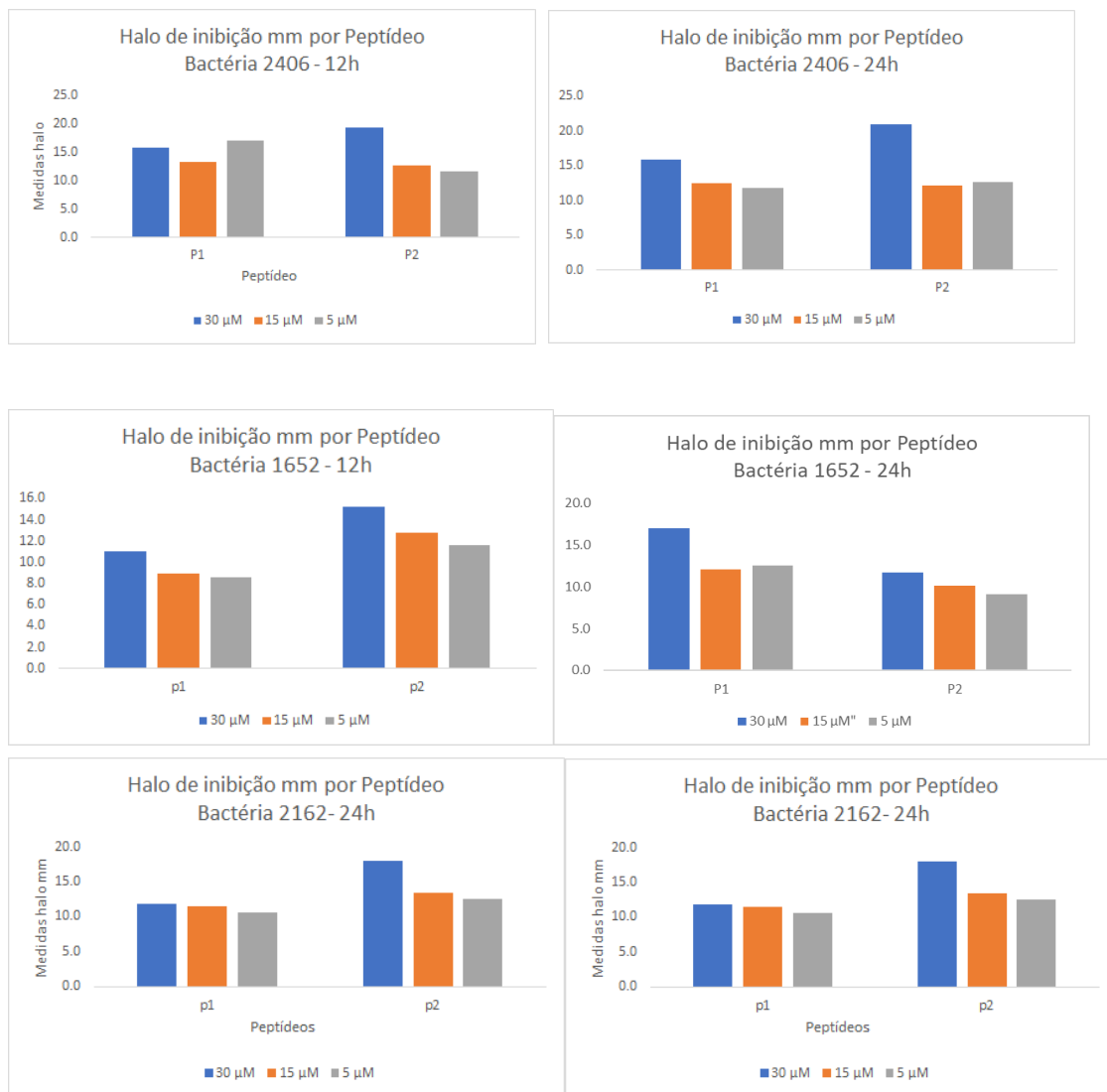


Figura 5

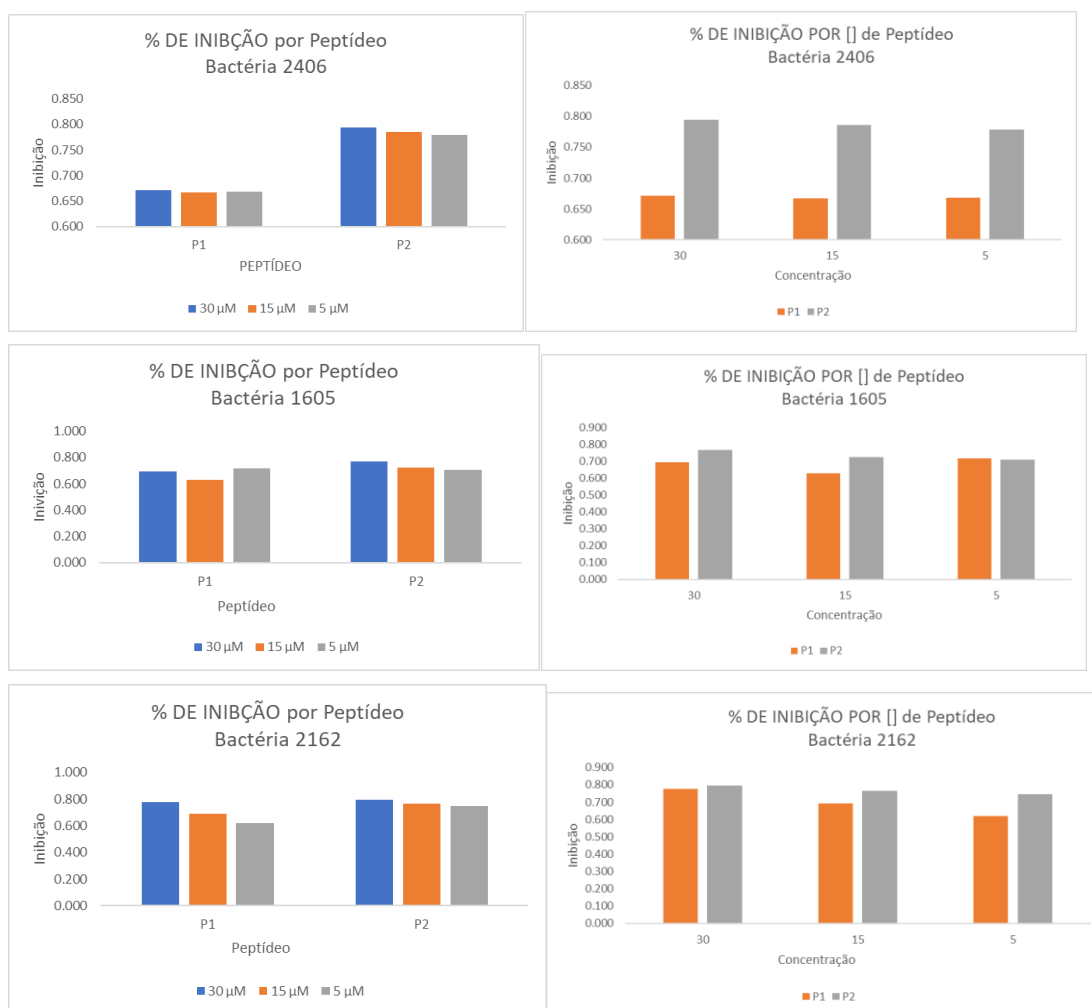


Figura 6



Figura 7



Figura 8

