



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e do Comércio
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 9806477-0 A**

(22) Data de Depósito: 23/06/1998

(43) Data de Publicação: 24/10/2000

(RPI 1555)

(51) Int. Cl⁷ .:

C12N 15/11

C12N 15/77

C12P 19/34

C12Q 1/68

C12Q 1/16

C12R 1/01

(54) Título: **FRAGMENTO DE DNA DE FITA ÚNICA, PROVA DE HIBRIDIZAÇÃO, REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA, PROCESSO DE DETECÇÃO DE C.F. FLACCUMFACIENS E CONJUNTO PARA DIAGNÓSTICO**

(71) Depositante(s): Embrapa-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (BR/DF)

(72) Inventor(es): Patrícia Messenberg Guimarães e Maria de Fatima Grossi de Sá

(74) Procurador: Suely Conceição da Silva

(57) Resumo: Patente de Invenção "FRAGMENTO DE DNA DE FITA ÚNICA, PROVA DE HIBRIDIZAÇÃO, REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA, PROCESSO DE DETECÇÃO DE C.F. FLACCUMFACIENS E CONJUNTO PARA DIAGNÓSTICO". São apresentados novos métodos pelos quais é atingido um processo rápido, específico e sensível para detecção e identificação de C.f. flaccumfaciens, patógeno de sementes de feijoeiro. A detecção é baseada em fragmentos de DNA específicos utilizados em processos de hibridização (radioativo ou não-radioativos) para detecção do patógeno em experimentos de hibridização de colônias ou de extrato de DNA ou como primers de PCR em reações de polimerização em cadeia (PCR). A alta sensibilidade e especificidade destes ensaios e a facilidade com que eles podem ser realizados permitem seu uso para análises de rotina de sementes ou plantas infectadas de feijoeiro.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção:

“Fragmento de DNA de fita única, prova de hibridização, reação de polimerização em cadeia, processo de detecção de *C. f. flaccumfaciens* e conjunto para diagnóstico”.

5 O presente invento consiste de um fragmento de DNA de fita única, isolado a partir de uma biblioteca genômica de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* que apresenta alta especificidade na detecção do patógeno em experimentos de hibridização.

10 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é o agente causal da murcha bacteriana do feijoeiro (Bradbury, 1986). O patógeno é transmitido por semente, a qual representa a fonte primária de disseminação do inóculo a curta e longa distâncias, causando danos econômicos em lavouras de feijoeiro nos EUA e Europa (EPPO/CABI, 1992). A bactéria é de importância quarentenária para o Brasil e outros países da América Latina e a comprovação da ausência do patógeno em
15 lote de sementes é obrigatória na certificação de sementes nos EUA.

O longo período de latência da doença antes de seu desenvolvimento, o crescimento relativamente lento do patógeno em meio de cultura, sua natureza endofítica e ocorrência em baixos níveis, tem dificultado a sua diagnose, especialmente em programas de certificação de sementes e inspeção quarentenária de
20 produtos importados.

Diferentes métodos tem sido utilizados na classificação, identificação e detecção de corinebactérias fitopatogênicas, como *C. f.* pv. *flaccumfaciens*, tais como: sorologia (Lazar, 1968; Calzolari *et al.*, 1987; Diatlof *et al.*,

1993), composição de aminoácidos da parede celular (Yamada & Komagata, 1972), homologia de DNA (Starr *et al.*, 1975) e análise de lipídios (Collins & Jones, 1980). Coletivamente, estes métodos tem demonstrado seu valor como importantes ferramentas na diferenciação destes organismos a nível de gênero e espécie. No entanto, o risco de existência de isolados serologicamente não relacionados e a baixa sensibilidade do método ainda são problemas a serem superados (Calzolari *et al.*, 1987). Além disso, o uso de testes bioquímicos, análise de lipídios e teste de patogenicidade, apesar de altamente específicos, demandam equipamento sofisticado ou são muito laboriosos (Vidaver & Starr, 1981). Desta forma, até o presente momento, a nível de subespécie, a única forma segura de classificação destes organismos é o teste em hospedeira, os quais são trabalhosos e demorados (Vidaver & Starr, 1981).

Os atuais procedimentos para diagnose de *C. f. pv. flaccumfaciens* incluem exame visual de sintomas em sementes e testes serológicos de aglutinação e imunofluorescência (OEPP/EPPO, 1982; Calzolari *et al.*, 1987). No entanto, nenhum destes procedimentos tem demonstrado ser totalmente eficiente, já que o exame visual não permite a detecção de infecções latentes, antissoros policlonais apresentam reações cruzadas além de não serem efetivos contra todos os isolados do patógeno e a utilização de monoclonais exigiria a utilização de um grande número de antissoros a serem testados. Por conseguinte, o desenvolvimento de um método que acrescente especificidade, sensibilidade e rapidez na diagnose da murcha do feijoeiro tornou-se necessário.

A utilização de sondas de DNA visando um aumento na especificidade, sensibilidade e rapidez na detecção e identificação de microrganismos, tem sido amplamente aplicado tanto na área médica como fitopatológica, produzindo

resultados amplamente satisfatório na diagnose de importantes organismos como *Chlamydia trachomatis*, *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* entre outras (Rasmussen & Reeves, 1992). Além de alta sensibilidade, as sondas de DNA apresentam outras vantagens sobre os ensaios imunológicos, já que apresentam uma estrutura relativamente mais consistente, enquanto os antígenos podem diferir com os strains do patógeno, diferentes estágios de desenvolvimento ou ter sua expressão modificada por efeitos ambientais.

O presente invento consiste de um fragmento de DNA de fita única, isolado a partir de uma biblioteca genômica de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* que apresenta alta especificidade na detecção do patógeno em experimentos de hibridização (Fig. 1). Este fragmento pode ser utilizado em experimentos de hibridização como sonda através de marcação radioativa (ex. P₃₂) ou marcação não radioativa (ex. dUTP-Digoxigenina). A partir do sequenciamento deste fragmento de DNA, foram construídos primers de Polymerase Chain Reaction (PCR) (Fig. 2), os quais amplificam a região do DNA específica ao patógeno. Estes primers se anelam especificamente a região do DNA alvo promovendo a sua amplificação. A técnica de PCR consiste de ciclos repetitivos compostos de 3 fases térmicas que promovem a desnaturação do DNA, o anelamento de uma sequencia de nucleotídeos complementar (primers) ao DNA de fita simples e o enlogamento da fita complementar de DNA através da ação de uma polimerase termoestável. Durante cada ciclo, a fita de DNA complementar é copiada através da extensão dos dois primers, que se anelam em posições opostas em regiões que flanqueiam o segmento de DNA de interesse. Teoricamente, cada fita recém-sintetizada funcionará como um molde na reação seguinte, resultando no acúmulo exponencial do DNA de fita dupla flanqueado

pelos dois primers (Xu & Larsul, 1991). Esta metodologia tem sido utilizada na
diagnose de bactérias fitopatogênicas como *Clavibacter michiganensis*
subsp. epedonicus e *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* possibilitando a
detecção de infecções latentes e de baixos níveis de infecção (100 cfu/ml) (Hu *et al.*,
5 1995).

No caso da sonda desenvolvida para *C. f. flaccumfaciens*,
o fragmento de 220 bp pode ser marcado com P32 ou digoxigenina (dUTP) de acordo
com instruções do fabricante do kit de marcação. A análise das amostras bacterianas
poderá ser realizada através de diferentes tipos de ensaios, como o de hibridização de
10 colônias (colony-blot) ou de extrato de DNA (dot-blot).

Para elaboração do ensaio de hibridização de extrato de
DNA, o ácido nucleico é extraído das amostras bacterianas, diluído para uma
concentração de 100ng/μl, e desnaturado a 95° C por 10 min. O mesmo volume de 20X
SSC (3M NaCl, 0.3M Na₃ citrate) é adicionado às amostras e as mesmas são aplicadas
15 diretamente sobre suporte sólido (membrana de Nylon) pré-embebidas em 10X SSC. As
membranas são então incubadas em solução desnaturante por 5 min (0.5 M NaOH,
1.5M NaCl) e solução neutralizante por 1 min. Os filtros são então secos ao ar e o
DNA fixado aos mesmos a 80° C por 2 horas. Para confecção da hibridização de
colônias, os isolados bacterianos são crescidos diretamente sobre os filtros e colocados
20 sobre placas contendo meio CPG sólido por 16 horas a 28° C. As membranas são então
lavadas em solução desnaturante por 7 min e duas vezes em solução neutralizante
(3min). As membranas são então lavadas em 2X SSC, secas ao ar e fixadas a 80° C por
2 horas. A hibridização das membranas contendo o DNA dos isolados a serem testados
e a sonda é feita como a seguir: As membranas são colocadas em uma caixa de
25 hibridização contendo 25 ml de solução de pré-hibridização (5X SSC, 5X Denhardt's

(0.002mg/ml bovine serum albumine, 0.002mg/ml Ficoll, 0.002mg/ml polyvinylpyrrolidone), 5µg/ml SDS) e 0.5 ml de uma solução 1 mg/ml de DNA de esperma de salmão. A pré-hibridização foi conduzida em banho-maria com agitação por 1 hora a 65° C. A sonda é então desnaturada por 5 min a 100° C e adicionada a solução anterior por 12 horas a 65° C. As membranas são então lavadas por duas vezes em solução de lavagem 1 (2X SSC, 1µg/ml SDS) por 10 min a temperatura ambiente, e uma vez, com solução de lavagem 2 (0.1X SSC, 1µg/ml SDS) por 15 min a 65° C. As membranas são então envoltas em filme plástico e expostas em filme de raio X por 48 horas a -80° C e após revelação do filme observados os sinais de hibridização.

Os primers de PCR construídos a partir da sequencia nucleotídica da sonda são utilizados para a amplificação específica dos isolados de *C. f. flaccumfaciens* em termociclador utilizando-se as seguintes condições: 94° C por 3 min., 62° C por 45 seg., 72° C por 90 seg., 94° C por 60 seg. com uma extensão final de 72° C por 5 min. As reações são realizadas em 50µl utilizando-se primers 1.25µM de primers, 20 mM de DNTP's, 25 mM de MgCl₂, 1X *Taq* buffer e 0.25U de *Taq* polimerase. Após a reação, os fragmentos de DNA amplificados são separados em gel de agarose 1.5% e corados com brometo de etídio (0.5µg/ml).

O referido fragmento de DNA pode ser utilizado como sonda, quando marcado com radioisótopos ou substâncias não-radioativas, na hibridização de colônias, o que permite uma rápida e específica detecção de *C. f. pv. flaccumfaciens*. Esta metodologia tem o potencial de ser utilizada na identificação de colônias isoladas diretamente de plantas e detritos de feijoeiro e também pode ser aplicada na diagnose de plantas com infecção latente. Além disso, a hibridização de colônias pode ser facilmente incorporada ao processo de isolamento rotineiro para detecção de bactérias fitopatogénicas, sendo mais sensível que o plaqueamento direto

em meio de cultura. Outras vantagens do método incluem rapidez e a possibilidade do mesmo ser aplicado a um grande número de amostras simultaneamente. Depois do cultivo da bactéria em meio sólido durante dois dias, a hibridização pode ser completada em até 24 horas, com os resultados observados após 4 horas quando da utilização de sondas radioativas, ou 12 horas quando utiliza-se sondas não-radioativas.

Outra aplicação da sonda é sua utilização com extratos de DNA, onde o DNA da amostra a ser testada é extraído, imobilizado em suporte sólido (membrana de nitrocelulose ou nylon) e então diretamente testado com a sonda em experimentos de hibridização. A sensibilidade deste método é bastante grande (100 ng de DNA) e os ensaios podem ser realizados em até 24-36 horas. Esta sonda também pode ser utilizada em experimentos conhecidos como "squash-blot", onde o extrato da planta é diretamente aplicado em suportes sólidos, e a presença do patógeno verificada através de experimentos de hibridização. Este método é extremamente rápido, já que não necessita que o DNA da amostra seja extraído ou que as colônias bacterianas sejam crescidas em meio de cultura, mas apresenta menor sensibilidade que os anteriores.

Primers de PCR específicos para *C. f. pv. flaccumfaciens* (Fig. 2) podem ser utilizados na detecção do patógeno em sementes e plantas de feijoeiro possibilitando um acréscimo substancial na sensibilidade do método. As reações de PCR podem ser realizadas utilizando-se DNA extraído das amostras, ou o extrato da planta ou da semente diretamente. Devido a alta sensibilidade do método, o mesmo apresenta-se como ideal para detecção de plantas com infecções latentes.

No caso de inspeções fitossanitárias para certificação de sementes ou para fins quarentenários, a estratégia de testar amostras compostas através de PCR com simultâneo plaqueamento dos extratos vegetais em meio de cultura, permite o teste rápido e sensível de um grande número de amostras. Neste caso, a

reação de PCR a maioria das amostras seriam eliminadas, e o plaqueamento forneceria um isolado para aquelas amostras com resultado positivo.

REIVINDICAÇÕES

1- Fragmento de DNA de fita única (pPMP-26D),
 caracterizado por ter a sequência dada abaixo:

AATTCGGTACCCCGGGTTCGAAATCGATAAGCTTGGATCGCACAGCCACCTA
 5 CATGCCGATCAGCGCCGATCAGGCCGCCCGGCAGCTTCCAACCTGCAGAAGG
 TCAGCGCCAAGACCCCGGGTGGCTGCTCAGGACCTCACCTCGAGCGCCACTG
 CAACCGGCGCCGAGCTCGGACTCCCGATC ou sua fita complementar ou suas
 variantes hibridizáveis.

2- Fragmentos de DNA de acordo com a reivindicação 1,
 10 caracterizados por serem maiores que 10 pares de base de comprimento, e
 particularmente, CAGCCACCTACATGCC, AACCTGCGCCTCTGTC,
 TCGATAACCTGCGCC, CACAGCCACCTACATGC, GATCGGGAGTCCGAG,
 utilizados como sondas de oligonucleotídeos ou primers de PCR.

3-Prova de hibridização, caracterizada por compreender
 15 um fragmento de DNA como definido nas reações 1 e 2.

4-Prova de Reação de polimerização em cadeia (PCR)
 caracterizada por compreender um fragmento de DNA como definido nas reações 1 e 2.

5-Prova de hibridização, de acordo com a reivindicação 3,
 caracterizada por ser rotulada com um grupo capaz de detecção colorimétrica ou por
 20 radioisótopos (digoxigeneína ou P32).

6-Conjunto para diagnóstico para detecção de uma dada
 sequência de nucleotídeos, caracterizado por se basear nos processos de acordo com as
 reivindicações 1 a 6.

(57) Resumo: Patente de Invenção "FRAGMENTO DE DNA DE FITA ÚNICA, PROVA DE HIDRIDIZAÇÃO, REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA, PROCESSO DE DETECÇÃO DE C.F FLACCUMFACIENS E CONJUNTO PARA DIAGNÓSTICO". São apresentados novos métodos pelos quais é atingido um processo rápido, específico e sensível para detecção e identificação de C.f. flaccumfaciens, patógeno de sementes de feijoeiro. A detecção é baseada em fragmentos de DNA específicos utilizados em processos de hibridização (radioativo ou não-radioativos) para detecção do patógeno em experimentos de hibridização de colônias ou de extrato de DNA ou como primers de PCR em reações de polimerização em cadeia (PCR). A alta sensibilidade e especificidade destes ensaios e a facilidade com que eles podem ser realizados permitem seu uso para análises de rotina de sementes ou plantas infectadas de feijoeiro.

Listagem de Seqüências Biológicas**(I) Dados do requerente:**

- a) Nome: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa
 b) Endereço Completo: SAIN – Parque Rural – (Final da Av. W/3 Norte) CEP.: 70770-901

5 **(II) Dados da Prioridade Unionista: não há**

(III) Título da Invenção:

" Fragmento de DNA de fita única, prova de hibridização, primers de PCR, processo para detecção de *C. f. flaccumfaciens* e conjunto para diagnóstico."

(IV) Número de seqüências constantes do pedido: 06

10 **(V) Formato para Leitura em computador:**

- a) Meio: magnético- disquete de computador
 b) Computador utilizado: PC- Pentium.
 c) Sistema operacional: Windows 95

Número identificador das Seqüências:

15 CF0, CF1, CF2, CF3, CF4, CF5

Características das Seqüências:

20 a) Tamanho: CF0- 185 bp.
 CF1- 16 bp.
 CF2- 16 bp.
 CF3- 15 bp.
 CF4- 17 bp.
 CF5- 15 bp.

b) Tipo: DNA

c) Conformação da fita: fita única

25 d) Topologia: desconhecida

e) Características da molécula sequenciada:
 tipo: DNA
 nome: desconhecido
 produto do gene: desconhecido

30 f) Descrição das Seqüências:

CF0:

1AATTCGGTACCCCGGGTTCGAAATCGATAAGCTTGGATCGCACAGCCACCT52
 ACATGCCGATCAGCGCCGATCAGGCCGCCCGGCAGCTTCCAACCTGCAGAA104
 5 GGTCAGCGCCAAGACCCCGGGTGGCTGCTCAGGACCTCACCTCGAGCGCCA156
 CTGCAACCGGCGCCGAGCTCGGACTCCCGATC 185

CF1:

1 CAGCCACCTACATGCC 16

CF2: (reverse)

1 AACCTGCGCCTCTGTC 16

10

CF3: (reverse)

1 TCGATAACCTGCGCC 15

CF4:

1 CACAGCCACCTACATGC 17

CF5: (reverse)

15 1 GATCGGGAGTCCGAG 15

Descrição de aminoácidos:

CF0:

1 AAT TCG GTA CCC CGG GTT CGA AAT CGA TAA GCT TGG ATC GCA CAG
 Asn Ser Val Pro Arg Val Arg Asn Arg * Ala Trp Ile Ala Gln
CCT ACA TGC CGA TCA GCG CCG ATC AGG CCG CCC GGC AGC TTC CAA CCT
 Pro Thr Cys Arg Ser Ala Pro Ile Arg Pro Pro Gly Ser Phe Gln Pro
 20 GCA GAA GGT CAG CGC CAA GAC CCC GGG TGG CTG CTC AGG ACC TCA CCT
 Ala Glu Gly Gln Arg Gln Asp Pro Gly Trp Leu Leu Arg Thr Ser Pro
CGA GCG CCA CTG CAA CCG GCG CCG AGC TCG GAC TCC CGA TC 185
 Arg Ala Pro Leu Gln Pro Ala Pro Ser Ser Asp Ser Arg