

TÍTULO DE PATENTE No. 358193

Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Domicilio: Lascurain de Retana No. 5, Zona Centro, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO
Denominación: MÉTODO PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN MASIVA DE CONIDOS DEL ENTOMOPATÓGENO METARHIZIUM ANISOPLIAE.
Clasificación: CIP: C12N15/113; A01N63/04; C12N15/04; C12N15/68; C12N15/80
 CPC: C12N15/1136; A01N63/04; C12N15/04; C12N15/68; C12N15/80
Inventor(es): JUAN CARLOS TORRES GUZMÁN; GLORIA ANGÉLICA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ; EDUARDO SALAZAR SOLÍS; MANUEL DARÍO SALAS; ALFONSO ORTIZ MEZA; ADRIANA GARCÍA TAPIA; PAOLA IVONNE LÓPEZ MACÍAS

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2013/014692	13 de Diciembre de 2013	11:27

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 13 de diciembre de 2033

Fecha de Expedición: 28 de junio de 2018

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012, 09/04/2012, 01/06/2016 y 13/03/2018); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES



Cadena Original:
 NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695||MX/2018/70129|MX/a/2013/014692|Titulo de patente normal|1223|GAGV|Pág(s) 1|oSfoei|SPjCWvLSmXHC5fU5atQ=

Sello Digital:
 fRYifQdip240x8BuznMeSF3VkdX+4UwLN6zcuKfk6UglBOP0Ee6kFuEdTCWNXYCGorFPsuAr612dVKxQ5/K7+/37rt
 tikY+Hk9xL3WLSuFivRE1XloneWLLtdF4eNv1+J3tgOeD2RiKUef/Nr8qznaNx3E0w1kuBo0gdRkqtq068GHgMfL5w
 B0mJGQ8zNb6S6ZjbxhiuW3oouxZEuz8r8E/leCsEXyrthLobmNQ6jN1kskB0P/mQaJnCnDWOiJWMIJUC5/kFE+PT/e
 SRKn7nurE9vd/6ymC+yp3ax1//KD66/HYYkzwZdm+GemJk0wV6M5GwEut4AUNc+v87aWF/mA==





**MÉTODO PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN MASIVA DE CONIDIOS DEL
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae***

DESCRIPCIÓN

5

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca dentro de la Ingeniería Genética y particularmente está relacionada con células y/o cepas transformadas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* con capacidad de conidiación en menor tiempo en fase sólida y con mayor rendimiento de producción de conidios en comparación con la cepa tipo silvestre C4.

10

ANTECEDENTES

15 La producción de células u organismos transformados, es un campo muy interesante dentro de la Ingeniería Genética, la cual permite que una cantidad innumerable de características deseables, puedan ser incorporados en organismos que son directa o indirectamente benéficos al hombre. En la técnica actual, los métodos utilizados para controlar insectos plaga en la agricultura moderna, implican el uso de grandes cantidades de insecticidas químicos, los cuales permiten la selección de cepas resistentes a éstos, provocando que su empleo sea inútil en el futuro, además de permanecer en el suelo por tiempos prolongados, pudiendo resultar tóxicos tanto para humanos, como para otras especies animales y vegetales.

20

Una alternativa potencialmente viable, es la aplicación de enemigos naturales de los insectos plaga a controlar, existentes en la naturaleza. Definiendo entonces al control biológico de plagas como la utilización dirigida y premeditada de organismos patógenos específicos con el objeto de mantener bajo control a las plagas (Hajek, 2004).

25

Aproximadamente 750 especies de hongos entomopatógenos representan los principales géneros de *Eumycota* capaces de infectar artrópodos que a su vez infestan plantas, suelos y

ambientes acuáticos. Cerca de 25 de estas especies de hongos atacan plagas de importancia agronómica, identificándolos como controladores naturales (Desphande, 1999).

En las últimas décadas, el control biológico realizado por organismos entomopatógenos y el manejo integrado de plagas se ha incrementado y adquirido gran importancia, ya que representa una alternativa eficaz y ecológicamente amable, respecto a los pesticidas químicos, en el control de plagas en la agricultura en distintas partes del mundo. Los organismos utilizados en control biológico, o potenciales controladores biológicos, tienen la ventaja de ser específicos sobre su huésped, y a diferencia de los pesticidas químicos, no lo eliminan totalmente, sino que bajan la población a niveles que no representan un problema para la producción agrícola; lo que favorece la conservación de la biodiversidad en los sitios en que son aplicados. Otra de sus grandes ventajas es su costo, menor que los pesticidas químicos.

Los hongos presentan características, que los hacen únicos entre los organismos entomopatógenos, ya que más que destruir a su hospedero por la acción de una toxina, invaden el insecto de manera directa a través del tegumento, introduciendo el tubo germinativo de un conidio. Es por ello que la infección no se limita a insectos masticadores sino también afectan homópteros y otros artrópodos chupadores. La capacidad de las esporas o conidios de los hongos para persistir en el suelo por ciertos periodos de tiempo e infectar insectos, independientemente del estadio de desarrollo de los mismos, les proporciona una ventaja sobre los pesticidas químicos que contaminan el agua, suelos, plantas y otras formas de vida (Clarkson y Charnley, 1996).

De los más de 750 especies de hongos entomopatógenos identificados, sólo unos cuantos se usan comercialmente en el control de plagas, entre ellos; *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria* spp., *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus*.

Un requisito importante para el uso de un microorganismo como agente de control es su producción masiva a bajo costo. Existen tres métodos principales para la producción comercial de esporas fúngicas: la fermentación en sustrato sólido utilizando granos como el arroz, la fermentación en cultivo sumergido en fermentadores, y la producción bifásica en la cual la biomasa (micelio) se produce en cultivo líquido transfiriéndose posteriormente al sustrato sólido para que ocurra la formación de esporas o conidios (conidiación).

En sustratos sólidos los hongos forman conidios a partir de hifas aéreas. Este método de producción masiva de conidios mediante cultivos en fase sólida (SSF) suele ser el mejor método para obtener esporas fúngicas de hifas aéreas. Esta clase de esporas son más resistentes a la desecación, tienen una vida de anaquel mayor que las esporas producidas en cultivo sumergido y persisten por más tiempo en ambientes naturales. También muestran diferencias morfológicas, funcionales y bioquímicas comparadas con las producidas en cultivos sumergidos. Las esporas fúngicas usadas en el control biológico de entomopatógenos como el propio *M. anisopliae* con un rendimiento promedio de hasta 5×10^7 conidios (Soundarapandian y Chandra, 2007), *Beauveria bassiana* alcanzando un rendimiento de hasta 2×10^{10} conidios (Dhar y Kaur, 2011) y *Lecanicillium lecanii* obteniendo hasta 2×10^7 conidios (Machado *et al.* 2010), esporas fúngicas de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Deshpande 1999; de Vrije *et al.*, 2001; Viccini *et al.* 2007); todas ellos son producidas preferencialmente en SSF, debido a las ventajas ya mencionadas. Las esporas de *Penicillium oxalicum* obtenidas por SSF tuvieron mayor hidrofobicidad, mejor sobrevivencia después de 27 semanas de almacenamiento y sufrieron menos daño por secado en frío (freeze-drying). Además, el SSF, produjo esporas más patogénicas sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Pascual *et al.* 2000). Las esporas de hongos usadas en la industria de alimentos han sido producidas en SSF debido a mejores rendimientos de esporas homogéneas y puras (Hölker *et al.* 2004). Por ejemplo *Penicillium roquefortii*, *P. camemberti* y *P. nalgiovensis* usadas en la producción de queso azul y salami.

A nivel laboratorio, *Metarhizium anisopliae* *in vitro* e *in insecta*, tiene un tiempo de conidiación completa de alrededor de 11 días (Sun *et al.* 2002) e incluso hasta 14 días (Soundarapandian y Chandra, 2007). El escalamiento del proceso es difícil por factores asociados como el tiempo que se toma la producción a nivel semi-industrial e industrial de conidios, la esterilización del sustrato, el intercambio gaseoso, el control de temperatura, el mantenimiento de cultivos axénicos y la recolección del producto para la producción de microorganismos usados en el control biológico; para la reproducción masiva de microorganismos silvestres y microorganismos modificados genéticamente se han empleado desde bolsas de polipapel hasta bio-reactores. En cuanto a la producción de

conidios a escala semi-industrial e industrial, generalmente ésta suele realizarse mediante cultivos monofásicos, es decir se inoculan conidios en el arroz en el ~~cual es propagado el~~ hongo, obteniéndose nuevos conidios en aproximadamente 23 días. A nivel semi industrial e industrial, para producir masivamente conidios de *Metarhizium anisopliae* (aislado Ma-002, Barajas *et al*, 2010) o *Lecanicillium lecani* (Machado *et al*, 2010) en menor tiempo, se usan también los cultivos bifásicos; es decir, los conidios se inoculan en medio de cultivo líquido para obtener micelio y posteriormente este micelio es usado para inocular el arroz (en el caso de *Metarhizium*) o medios compuestos (en el caso de *Lecanicillium*) para su propagación obteniendo nuevos conidios, este proceso toma alrededor 15-21 días.

10 Existen diversas patentes relacionadas con la producción de *Metarhizium* para ser usado en el control de insectos. Desde aquellas que describen el uso y/o diseño de cámaras de infección con el hongo; el uso de aislados o cepas específicas del hongo para atacar ciertas plagas o para dar protección directa a los cultivares; hasta el diseño de fermentadores para la producción masiva del hongo o de sus productos, entre otros ejemplos.

15 Entre ellas está el documento de patente WO93/24013 A3 en el cual se describe un método de cámara para empacar cultivos fúngicos y conidios de *Metarhizium* adicionado con un atrayente para los insectos que serán infectados con el biopesticida. El documento de patente WO92/003055 A1 describe el diseño de una cámara de infección y aplicación de altas dosis de conidios de *Metarhizium* para el control y exterminación de plagas de moscas y cucarachas; *Blatella germanica* (cucaracha alemana), *Periplaneta americana* (cucaracha americana), *Fannia canicularis* (mosca pequeña casera) y *Musca domestica* (mosca casera). Y en el documento de patente WO90/010389 A1 describe el empleo de *Metarhizium* y *Beauveria* en cámaras diseñadas *ex profeso* para asegurar la contaminación de cucarachas con estos hongos para su control.

25 Para el control de diferentes tipos de plagas se han patentado diferentes cepas de hongos patógenos. Por ejemplo, está el documento de patente WO03/038065 A1 el cual describe el empleo de una nueva cepa de *Metarhizium* (cepa *Metarhizium anisopliae* HY-2) para el control de plagas de suelo (escarabajos). En los documentos de patente WO 2007/112257 A2, WO94/004034 A1 y WO93/009672 A1 se describe el uso de varias cepas de

30 *Metarhizium* para el control de termitas. Aislados específicos de *Metarhizium* y/o

Beauveria bassiana se emplean en el control de *Delia floralis* (mosca de la col) y *Delia radicum* (mosca de la raíz de la col) como se indica en el documento de patente WO91/009527 A1. También se ha descrito el uso de una cepa particular de *Metarhizium* para el control de insectos plagas en jardines e invernaderos como se indica en el documento de patente WO02/087344 A1. También se describe el uso de *Metarhizium* como “fertilizante” el cual actúa como protector contra daño y plagas mejorando el crecimiento de las plantas de acuerdo al documento de patente WO00/064837 A1. No solo se han patentado usos y métodos para el control de insectos mediada por *Metarhizium*, también se ha patentado equipo de fermentación sólida para la producción masiva de conidios de *Metarhizium* a nivel industrial como se describe en el documento de patente TWI226369 B, o la producción de enzimas generadas por *Metarhizium*, por ejemplo Quitinasas, para el control de plagas de suelo como se describe en el documento de patente WO03/038081 A1. Estas son solo algunas de las patentes relacionadas con el empleo de *Metarhizium* para el control de insectos plagas.

15

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Considerando que, de los estadios morfológicos dentro del ciclo de vida del hongo *Metarhizium spp*, el conidio es la estructura de propagación y resistencia por excelencia, y es capaz de iniciar la infección del insecto blanco; una modalidad de la presente invención es la obtención de cepas de *Metarhizium anisopliae* con características mejoradas en su capacidad de conidiación por medio de la transformación con un plásmido que contiene el gen CIE1, sin afectar el crecimiento ni la capacidad de infección, de modo que crece e infecta igual que la cepa silvestre C4 empleada en el control del complejo gallina ciega (*Phyllophaga sp*).

25

Una segunda modalidad de la presente invención se relaciona con proveer métodos para la obtención de transformantes de *Metarhizium anisopliae*, en su capacidad de formar conidios para ser usados como agentes de control biológico, que porten el gen CIE1, integrado de manera estable en su genoma, que produzcan el RNA complementario del gen CIE1 en dirección antisentido, dando como consecuencia una conidiación 3-23 veces

30



mayor que la cepa silvestre C4 o que otras cepas silvestres de *Metarhizium anisopliae* (Wang *et al* 2002), por tanto un rendimiento promedio de alrededor de 30×10^8 conidios por placa.

El DNA de cualquier gen está constituido por dos cadenas de DNA complementarias entre ellas y antiparalelas: la cadena codificante y la cadena sin sentido. La cadena codificante es quien establece el extremo 5' y 3' del gen, y su secuencia es igual al RNA mensajero (RNAm) quien es traducido a la proteína funcional; y en caso de que se genere el RNA complementario antisentido (RNA AS) mediante manipulación genética, su secuencia sería igual al de la cadena de DNA sin sentido y éste si diera lugar a un péptido, no es funcional, sin embargo este RNA AS es capaz de alinearse con su respectivo RNAm gracias a su complementariedad de 100 % induciendo la inactivación y degradación del RNAm. De modo que, el RNA complementario antisentido RNA AS ha sido utilizado para disminuir la expresión de genes en hongos y levaduras con la finalidad de estudiar la función biológica de dichos genes (Wang y col, 2008; Castelnuovo y col, 2013).

Una tercera modalidad de la presente invención se relaciona con la obtención de transformantes de *Metarhizium anisopliae*, con producción de conidios a los 5-8 días de incubación en arroz o en medio mínimo MM constituido por sal nitrogenada, glucosa y oligoelementos, en comparación con 10 a 21 días para la conidiación de la cepa silvestre C4 en medio mínimo MM constituido por sal nitrogenada glucosa y oligoelementos o en arroz.

Una cuarta modalidad de la presente invención se relaciona con el uso de las transformantes de *Metarhizium anisopliae*, que portan el gen CIE1, integrados de manera estable en su genoma, que produzcan el RNA complementario antisentido del gen CIE1; como agentes de control biológico de plagas susceptibles a la infección por *Metarhizium anisopliae* tales como el complejo gallina ciega (*Phyllophaga* sp) o plagas de follaje como *Plutella xylostella*.

La cepa de la presente invención *Metarhizium anisopliae*, ha sido depositada en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)**, cepa **C4p375**, con número de acceso **CECT20777** atribuido el 23 de marzo de 2011 por la Autoridad Internacional del Depósito. Esta cepa fue obtenida por transformación con el plásmido integrativo pGG375, conteniendo por tanto en su genoma una copia del gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* en dirección antisentido; produciendo el RNA en dirección antisentido de CIE1 y produce

alrededor de 30×10^8 conidios por placa en un tiempo de incubación de 5 días. Su relación principal con su empleo en el control de plagas agrícolas, tales como *Phyllophaga sp* (complejo gallina ciega); o entre otras susceptibles a la infección por *Metarhizium spp*, tales como las antes descritas.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los aspectos novedosos que se consideran característicos de la presente invención, se establecerán con particularidad en las reivindicaciones anexas. Sin embargo, la invención misma, tanto por su organización como por su método de operación, conjuntamente con otros objetos y ventajas de la misma, se comprenderá mejor en la siguiente descripción detallada de las figuras que se acompañan, de las cuales:

La **Figura 1** muestra el mapa del plásmido pGG375 que contiene los elementos necesarios para la selección de transformantes de *Metarhizium anisopliae* con la secuencia nucleotídica del gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* (número de acceso en la base de datos FN666606) como se muestra en SEQ ID No.1; entre los que se incluyen los siguientes: el gen **amp** de resistencia a ampicilina, como marcador de selección en *E. coli*; el gen **bar** de resistencia a glufosinato, como marcador de selección en *Metarhizium anisopliae*; el promotor del gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans* (p *gpdA*); el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans* (t *trpC*); y el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae*, el cual se encuentra en dirección antisentido (as CIE1) bajo el control del promotor *gpdA* y del terminador *trpC*. Esta construcción al ser introducida a *Metarhizium* producirá el RNA complementario del gen CIE1 (antisentido).

La **Figura 2** muestra la producción de conidios de la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* cuando son crecidas en medio mínimo a temperatura constante (28 °C) durante 8 días.

La **Figura 3** muestra la producción de conidios de la transformante de *Metarhizium anisopliae* C4p375 que expresa el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* en dirección

antisentido cuando son crecidas en medio mínimo a temperatura constante (28 °C) durante 5 días.

La **Figura 4** muestra la producción masiva de conidios de la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* sobre los granos de arroz. Para ello se sembraron los conidios de la cepa en arroz previamente esterilizado en bolsas de polipropileno y fueron incubadas a temperatura constante (28 °C) durante 12 días. La humedad conservada por el arroz posterior a la esterilización es suficiente para apoyar el crecimiento y conidiación del hongo. La conidiación en arroz es ampliamente utilizada en la producción semi-industrial de este controlador biológico.

10 La **Figura 5** muestra la producción masiva de conidios sobre los granos de arroz, de la cepa transformante de *Metarhizium anisopliae* C4p375 que expresa el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* en dirección antisentido. Para ello se sembraron los conidios de la cepa en arroz previamente esterilizado en bolsas de polipropileno y fueron incubadas a temperatura constante (28 °C) durante 8 días.

15 La **Figura 6** muestra el porcentaje de viabilidad de los conidios producidos por C4 silvestre y de la transformante de *Metarhizium anisopliae* que expresa el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* en dirección antisentido, medido como capacidad de germinar en medio mínimo. C4 es la cepa silvestre (barras negras), y C4p375 es una transformante de *Metarhizium anisopliae* (barras blancas), con número de acceso CECT20777 (transformada con el plásmido pGG375 que contiene el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae*). En esta figura se observa que en un lapso de 16 horas, ambas cepas germinan al 100%.

La **Figura 7** muestra el aspecto de la larva sana de *Plutella xylostella* sin infectar y observada en un microscopio estereoscópico Zeisse Stemi SV6.

25 La **Figura 8** muestra el aspecto micosado de larvas de *Plutella xylostella* infectadas y muertas por la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae*; observación en un microscopio estereoscópico Zeisse Stemi SV6.

30 La **Figura 9** muestra el aspecto micosado de larvas de *Plutella xylostella* infectadas y muertas por la cepa transformante C4p375 de *Metarhizium anisopliae*; observación al microscopio estereoscópico Zeisse Stemi SV6. El aspecto de las larvas muertas por cada una de las cepas de *Metarhizium anisopliae* es muy similar entre sí (Figuras 8 y 9).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a los métodos que permiten el mejoramiento de cepas de *Metarhizium spp* utilizadas en el control de plagas de suelo, p. ej. el complejo gallina ciega (*Phyllophaga sp*), o plagas de follaje como la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), así como las transformantes obtenidas por estos métodos, modificando de manera específica la eficiencia de conidiación mediante la integración en su genoma de
10 secuencias específicas de DNA del propio hongo incidiendo en optimización de la producción masiva de conidios del biocontrolador reduciendo su costo de producción.

Los métodos de la presente invención, permiten obtener transformantes de *Metarhizium anisopliae*, que producen de 3 a 23 veces más conidios en un tiempo de incubación de 5-8 días (alrededor de 30×10^8 conidios por placa, y 12×10^{10} conidios en arroz) debido a la
15 expresión del gen CIE1 en dirección antisentido (con número de acceso FN666606 en el GenBank del NCBI), cuya secuencia nucleotídica está representada por la SEQ ID No.1 del listado de secuencia.

Los métodos implican el uso del gen CIE1 en dirección antisentido, lo cual significa que el gen CIE1 en dirección antisentido va a disminuir la expresión del gen CIE1 normal, y la
20 metodología para construir un gen en antisentido es conocida. La novedad radica en el fenotipo generado de mayor conidiación debido a la disminución de la expresión del gen CIE1 por efecto del antisentido del gen CIE1, en comparación con la cepa silvestre. La presente invención se refiere a un método para la obtención de cepas con mayor producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* que comprende las siguientes etapas:

- 25
- a) Proporcionar cepas transformadas de *Metarhizium anisopliae*, que de acuerdo con la invención, expresan el gen CIE1 en dirección antisentido.
 - b) Proporcionar la cepa transformada de *Metarhizium anisopliae*, que expresa el gen CIE1 en dirección antisentido, con mayor producción de conidios en fase sólida en 5-8 días de incubación (medio mínimo o arroz).

Etapas (a). Transformación de cepas silvestres de *Metarhizium anisopliae* con un plásmido que contiene la secuencia nucleotídica del gen CIE1 en dirección ~~antisentido~~ (Figura 1) y que produce el RNA complementario del gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* siguiendo cualquiera de los protocolos de transformación descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y/o 4. El ensayo consiste en la formación de protoplastos (Goettel *et al*, 1990) de C4 silvestre de *Metarhizium anisopliae*; se colectó por filtración el micelio de *Metarhizium anisopliae* crecido durante 36-48 horas de incubación en 50-100 ml de medio rico, y se suspendió en 3-8 ml de medio de digestión (MD) el cual contenía una mezcla de quitinasas y glucanasas al 0.05%. Se incubó 2-4 horas en agitación de 60-100 rpm y los protoplastos se recuperaron por filtración y se concentraron por centrifugación a 500-1500 rpm durante 5-15 minutos y se suspendieron en 300-600 μ L de medio de transformación (TM). 100-300 μ l de la suspensión de protoplastos fueron mezclados con 1-50 μ g del plásmido pGG375 (Figura 1). Se incubaron a 2-10°C durante 30-60 minutos. Se adicionó 700-800 μ l de Polietilenglicol (PEG) y se incubó durante 10-30 minutos a 18-26°C y se sembraron en placas de medio de regeneración el cual contiene medio selectivo (dextrosa 2%, sales, agarosa 2%, y el antibiótico glufosinato 200-600 μ g/mL) adicionado de sorbitol 1Molar, incubando las placas durante 4-10 días a 22-30 °C hasta que aparezcan colonias.

Seleccionar las transformantes de *Metarhizium anisopliae* por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico **carboxina, benomyl, glufosinato o higromicina**, acorde con el marcador de selección presente en el plásmido (genes de resistencia *Cbx^r*, *Bml*, *bar*, o *HygB^r*, respectivamente): Las colonias que crecieron en el medio selectivo fueron recuperadas y transferidas al mismo medio pero sin sorbitol incubando a 22-30 °C durante 7-10 días para que haya conidiación. Los conidios fueron nuevamente transferidos al medio selectivo sin sorbitol, repitiendo el proceso 2-5 veces eliminar falsos positivos. De esta manera se seleccionan los transformantes que al haber integrado el plásmido en su genoma, el gen **As CIE1** de *Metarhizium anisopliae* presente en el plásmido también se ha integrado en su genoma de manera estable, produciéndose de manera constitutiva el RNA complementario de CIE1 de *Metarhizium anisopliae*. En el caso particular descrito, para permitir la expresión constitutiva del gen CIE1 en dirección antisentido produciéndose el RNA complementario, se empleó el promotor del gen gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa (p gpdA) y el terminador trpC (t trpC) de *Aspergillus nidulans*, ambos previamente utilizados en *Metarhizium* de manera exitosa (St Leger et al. 1996)

Etapa (b). Los transformantes se crecen hasta conidiación en cajas de medio mínimo MM o en bolsas de polipapel conteniendo 100-300 g de arroz esterilizado. Para ello se siembran 5 500 conidios en el medio mínimo (MM, que es igual al medio de regeneración pero carece del antibiótico y del sorbitol); o 1×10^6 a 1×10^7 conidios en 100-300 g de arroz. Se incuban entre 22-30 °C durante 5-15 días, hasta conidiación completa. Se colectan los conidios suspendiéndolos en una solución con detergente al 0.01-0.001 % (peso/volumen) y se cuentan al microscopio en una cámara de Neubauer. En ambas condiciones las 10 transformantes presentan una producción de conidios 3-23 veces mayor en comparación con la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones (Tablas 1 y 2; Figuras 2, 3, 4 y 5). En seguida se procede a la cuantificación de la viabilidad de los conidios, mediante la capacidad de germinar en MM o MDS; para ello se siembran 200-400 conidios en gota en MM o MDS preparado sobre una laminilla, se incuban a 22-30 °C durante 16 horas en total, 15 contando el número de germínulas al microscopio a las 8 horas y después cada dos horas. Se cuantifican el número de germínulas y de conidios intactos en al menos 100 células totales de cada réplica. Los experimentos se realizan al menos tres veces por triplicado de manera independiente (Figura 6). La viabilidad de los conidios también se cuantifica mediante la capacidad de germinar y formar colonias sembrando 200-400 conidios por caja 20 Petri conteniendo MM, incubando por 48-72h a 22-30 °C contando el número de colonias (Tabla 3). Estos experimentos también se hacen al menos tres veces por triplicado. En ambas condiciones de crecimiento, en medio mínimo o arroz, la viabilidad de los conidios del transformante es igual que en la cepa silvestre C4. Las cepas transformadas de *Metarhizium anisopliae* As CIE1 pueden ser propagadas en 25 fase sólida (cajas de medio mínimo) para la obtención y mantenimiento de los inóculos (Tabla 1, Figuras 2 y 3) para su posterior propagación masiva semi-industrial e industrial en fase sólida (arroz) (Tabla 2, Figuras 4 y 5). La cepa transformada obtenida denominada C4p375 con número de acceso CECT20777 puede ser producida a nivel semi-industrial e industrial en la fabricación de una

composición para el control de plagas agrícolas tales el complejo gallina ciega (*Phyllophaga sp*), entre otras, susceptibles al ataque de *Metarhizium*.

Dentro de la transformante, la producción del RNA complementario del gen CIE1 *Metarhizium anisopliae* a partir de la construcción antisentido del gen CIE1, reduce los niveles de expresión del RNA mensajero de CIE1 ya que es capaz de alinearse con él, debido a que contiene la secuencia complementaria. De esta manera se bloquea su traducción y/o se estimula su degradación, dando como resultado final que, en comparación con la cepa silvestre, la transformante de *Metarhizium anisopliae* produce mayor número de conidios, alrededor de 3-23 veces más conidios por placa o en arroz como se describe detalladamente en el ejemplo 5, lo cual redundará en un mayor rendimiento de producción masiva de conidios, por lo tanto bajará los costos de producción de este controlador biológico en la fabricación de una composición para el control de plagas agrícolas tales como el complejo gallina ciega (*Phyllophaga sp*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) langosta (*Locusta migratoria*) (*Schistocerca gregaria*), entre otras, susceptibles al ataque de *Metarhizium*.

El RNA complementario del gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* será producido en todas las etapas del ciclo de vida del hongo debido al promotor fuerte constitutivo que lo controla, el promotor *gpdA* (St. Leger *et al* 1996), manteniendo bajos los niveles del RNA mensajero CIE1 provocando una producción alrededor de 3-23 veces más conidios por placa o en arroz en un tiempo de incubación de 5-8 días.

En los métodos de la presente invención en la Etapa (a); el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae*, expresándose en dirección antisentido a partir de un promotor funcional como el promotor del gen *gpdA* (*p gpdA*) produce el RNA complementario de CIE1 en *Metarhizium*, se puede introducir en el genoma de *Metarhizium anisopliae* de manera directa mediante un plásmido empleando como marcadores de selección los genes de resistencia a los fungicidas: **carboxina**, gen *Cbx^r* proveniente del hongo *Ustilago maydis* descrito por (Keon *et al.* 1991); **benomyl**, gen *Bml* de *Neurospora crassa* utilizado previamente en *Metarhizium* (Bogo *et al.* 1996); **higromicina**, gen *Hyg^r* previamente empleado en *Ustilago maydis* (Wang *et al.* 1988); y **glufosinato**, gen *bar* previamente empleado en *Metarhizium* (Inglis *et al.* 2000) para la selección de las transformantes.



Tal y como ya se mencionó en la Etapa (a), la presente invención utiliza principalmente métodos de transformación directa con DNA que contiene el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae*. Sin embargo, puede utilizarse un método indirecto mediante el empleo de *Agrobacterium tumefaciens*, para la introducción de los genes en *Metarhizium*, como ha sido recientemente descrito por (Fang *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2007; Staats *et al.* 2007) para *Metarhizium anisopliae*.

En los métodos de la presente invención en la etapa (a), las transformantes pueden ser seleccionadas después de la transformación, usando una de las secuencias de DNA que confieren resistencia a los fungicidas **carboxina, benomyl, glufosinato o higromicina**, no obstante es posible introducir en el plásmido otro marcador de selección o algún otro gen que confiera resistencia a otro fungicida o que permita la selección directa en *Metarhizium anisopliae*.

En una modalidad preferida de la presente invención, el método de transformación de *Metarhizium anisopliae* utiliza transformación directa, donde se incluyen entre otros, la transformación mediada por PEG (polietilenglicol), la electroporación y la biobalística o bombardeo.

En una modalidad de la presente invención, el método de transformación mediada por PEG emplea protoplastos o blastosporas.

En una modalidad de la presente invención, el método de biobalística o bombardeo puede emplear el bombardeo con partículas/biobalística sobre conidios del hongo, o bien sobre micelio, o bien sobre células osmóticamente sensibles.

En otra modalidad de la presente invención, el método de transformación de *Metarhizium anisopliae* utiliza transformación indirecta empleando *Agrobacterium tumefaciens*, se pueden utilizar las técnicas descritas por (Fang *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2007; Staats *et al.* 2007) para *Metarhizium*.

En otra modalidad de la presente invención, el método de transformación de *Metarhizium anisopliae* mediada por electroporación utiliza conidios intactos.

En una modalidad preferida de la presente invención, el método para la obtención de cepas mejoradas de *Metarhizium anisopliae*, en su capacidad de producción de conidios, emplea métodos de transformación directa con DNA del gen CIE1 de *Metarhizium*.



- El método comprende transformar a *Metarhizium anisopliae* la secuencia del gen CIE1 en dirección antisentido de manera estable en su genoma, mediante transformación con el plásmido pGG375 que contiene este gen CIE1 en dirección antisentido bajo el control del promotor *pgpdA* y contiene también el gen *bar* de resistencia a glufosinato para la selección de transformantes, y de este modo obtener *Metarhizium anisopliae* transformada en la cual ha sido integrada la secuencia del gen CIE1 en dirección antisentido de *Metarhizium*, y que le permite una producción alrededor de 3-23 veces más conidios por placa o en arroz.
- Los plásmidos empleados para la selección de las transformantes de *Metarhizium anisopliae* que portan el gen CIE1 de *Metarhizium*, pueden contener un gen marcador funcional en *Metarhizium*, o bien, dentro de las secuencias de ácido nucleico empleadas, se puede encontrar una molécula de DNA recombinante que codifica ya sea para resistencia a antibióticos, para resistencia a un herbicida, para resistencia a un fungicida, para complementación de una auxotrofia, o para un gen reportero.
- El plásmido o vehículo de la secuencia del gen CIE1 en dirección antisentido de *Metarhizium anisopliae*, puede ser una molécula de DNA que incluye un plásmido capaz de replicarse en *Escherichia coli*, conteniendo un marcador de resistencia a antibióticos; una molécula de DNA recombinante que comprende: una secuencia o secuencias promotoras que funcionan en *Metarhizium spp*, para la controlar la producción de una secuencia o más de RNA; secuencias estructurales de DNA que conllevan a la producción de RNA mensajero del gen usado como marcador de selección y el RNA complementario del gen CIE1 de *Metarhizium*, y una secuencia terminadora 3' que permite la terminación de la transcripción y la adición de secuencias poliadeniladas al extremo 3' del correspondiente RNA.
- El plásmido o vehículo de la secuencia del gen CIE1 en dirección antisentido, también puede ser una molécula de DNA que incluye un fragmento de DNA recombinante constituido por: una secuencia promotora proveniente de otro organismo o del mismo *Metarhizium anisopliae* que funciona en *Metarhizium anisopliae* para controlar la producción de un RNA; secuencias estructurales de DNA que conllevan a la producción de RNA complementario del gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae*; y, una secuencia 3' de



DNA que funciona en *Metarhizium*, dando lugar a la terminación de la transcripción y a la adición de secuencias poliadeniladas al extremo 3' de la secuencia.

- Las transformantes de *Metarhizium anisopliae* que se obtienen con los métodos de la presente invención, mejoradas en su rendimiento en la producción de conidios produciendo
- 5 alrededor de 3-23 veces más conidios por placa o en arroz, en comparación con el número de conidios producidos por la cepa silvestre C4. Estos conidios pueden ser usados contra insectos plaga agrícolas o de importancia en la salud pública, producida por introducción de una o más copias del gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* para producir el RNA complementario del gen CIE1, integradas de manera estable en su genoma.
- 10 La transformante de *Metarhizium anisopliae* obtenida mediante la transformación de protoplastos de la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* con el plásmido pGG375 contiene en su genoma al menos una copia del gen CIE1 en dirección antisentido y consecuentemente produce alrededor de 3-23 veces más conidios por placa o en arroz, presentando conidiación completa en un periodo de 5-8 días de incubación, en placa o arroz
- 15 respectivamente. El plásmido pGG375 contiene la secuencia nucleotídica del gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* en dirección antisentido, bajo el control del promotor del gen *gpda* (*p gpda*) de *Aspergillus nidulans* y del terminador del gen *trpC* (*t trpC*) de *Aspergillus nidulans*; el gen *amp* de resistencia a ampicilina, como marcador de selección en *E. coli*; el gen *bar* de resistencia al fungicida glufosinato, como marcador de selección para
- 20 *Metarhizium anisopliae*. Esta transformante de *Metarhizium anisopliae* se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia el 23 de marzo de 2011 con número de acceso CECT20777 atribuido por la Autoridad Internacional del Depósito. Los depósitos referidos en la presente solicitud se refieren a los depósitos ante la CECT y tales depósitos son mantenidos bajo los términos del Tratado de Budapest
- 25 sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Construcción de transformantes que expresen el gen CIE1 en dirección antisentido, produciendo el RNA complementario del gen CIE1.

Usando una de las posibles variantes de los métodos descritos en esta invención, se generaron transformantes de *Metarhizium anisopliae* que producen alrededor de 3-23 veces más conidios por placa o en arroz en un periodo de 5-8 días de incubación. El ensayo consistió en la formación de protoplastos (Goettel *et al*, 1990) de C4 silvestre de *Metarhizium anisopliae*; se colectó por filtración el micelio de *Metarhizium anisopliae* crecido durante 36-48 horas de incubación en 50-100 ml de medio rico, y se suspendió en 3-8 ml de medio de digestión (MD) el cual contenía una mezcla de quitinasas y glucanasas al 0.05%. Se incubó 2-4 horas en agitación de 60-100 rpm y los protoplastos se recuperaron por filtración y se concentraron por centrifugación a 500-1500 rpm durante 5-15 minutos y se suspendieron en 300-600 μ l de medio de transformación (TM) y fueron transformados mediante la técnica de PEG- CaCl_2 , empleando el plásmido pGG375 (Figura 1) el cual contiene toda la información necesaria para la expresión del RNA complementario del gen CIE1 (es decir, en dirección antisentido) de *Metarhizium* en *Metarhizium anisopliae*. Además, contiene los elementos necesarios para seleccionar a las transformantes mediante la resistencia al fungicida glufosinato. Para ello 100-300 μ l de la suspensión de protoplastos fueron mezclados con 1-50 μ g del plásmido pGG375 (Figura 1). Se incubaron a 2-10 °C durante 30-60 minutos. Se adicionó 700-800 μ l de Polietilenglicol (PEG) y se incubó durante 10-30 minutos a 18-26°C y se sembraron en placas de medio de regeneración el cual contiene medio selectivo (dextrosa 2%, sales, agarosa 2%, y el antibiótico glufosinato 200-600 μ g/ml) adicionado de sorbitol 1Molar, incubando las placas durante 4-10 días a 22-30 °C hasta que aparezcan colonias.

Se seleccionaron varias transformantes con el plásmido pGG375 que contienen una o más copias del gen CIE1 de *Metarhizium* en su genoma. Cada una de estas transformantes y C4 silvestre de *Metarhizium anisopliae* fueron usadas en experimentos de evaluación de la conidiación y de la viabilidad de los conidios (Figuras 2 y 3).

EJEMPLO 2

En otra de las posibles variantes de los métodos descritos en esta invención se pueden generar transformantes de *Metarhizium anisopliae* que producen alrededor de 3-26 veces más conidios por placa o en arroz en 5-8 días de incubación mediante transformación directa empleando el método de electroporación de conidios o blastosporas de la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* con el plásmido pGG375 que contiene la secuencia nucleotídica del gen CIE1 en dirección antisentido de *Metarhizium anisopliae* como se muestra en la Figura 1, produciendo por tanto el RNA complementario CIE1. Donde el plásmido pGG375 contiene toda la información necesaria para la expresión en dirección antisentido del gen CIE1 de *Metarhizium* en *Metarhizium anisopliae*. Además, contiene los elementos necesarios para seleccionar a las cepas transformantes mediante la resistencia al fungicida glufosinato.

Transformación por electroporación utilizando conidios:

Una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^8 - 1×10^9 conidios/ml, se centrifuga a 3000 rpm por 5-10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se lavan los conidios de la cepa C4 silvestre de *Metarhizium anisopliae* con sorbitol 1M dos veces. Los conidios se resuspenden en sorbitol 1 M y se incuban en hielo (0°C). Se mezclan 5-10 μ l el DNA del plásmido pGG375 con 50-100 μ l de la suspensión de conidios y se transfirieren a una cubeta de electroporación, previamente enfriada a 0 °C. Se le aplica a la muestra un pulso eléctrico de 600 Ω , por 8-16 milisegundos en un electroporador. Inmediatamente se adiciona sorbitol 1 M y solución de recuperación compuesta por extracto de levadura 0.5% y dextrosa al 1 %, incubándose por 2-4 horas a 22-30°C y agitación constante de 60-120 rpm, para posteriormente sembrar en placas de medio selectivo (medio mínimo que contiene glufosinato).

Transformación por electroporación utilizando blastosporas:

Para producir las blastosporas, los conidios se sembraron en Medio Dextrosa Saboraud líquido durante 36-60 horas a 22-30 °C en agitación a 150-200 rpm. Las blastosporas se recuperaron por filtración y se lavaron con agua estéril concentrándolas por centrifugación a 2000-3000 rpm, contando las blastosporas en cámara de Neubauer al microscopio. Y se

transforman por electroporación tal cual como se describió en la transformación por electroporación de conidios.

Se recuperan los transformantes que contienen una o más copias del gen CIE1 en dirección antisentido en su genoma. Los transformantes y la cepa silvestre CARO4 de *Metarhizium anisopliae* se pueden usar en experimentos de cuantificación de la conidiación y evaluación de la viabilidad de los conidios.

EJEMPLO 3

En otra de las posibles variantes de los métodos descritos en esta invención se pueden generar transformantes de *Metarhizium anisopliae* que producen alrededor de 30×10^8 conidios por placa en 5-8 días, mediante la transformación directa empleando el método de biobalística o bombardeo de conidios de la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* empleando partículas de Tungsteno, con el plásmido pGG375 (que contiene el gen CIE1 en dirección antisentido) (Figura 1). Donde el plásmido pGG375, contiene toda la información necesaria para la expresión del RNA mensajero complementario del gen CIE1 de *Metarhizium* en *Metarhizium anisopliae*. Además, contiene los elementos necesarios para seleccionar a las transformantes mediante la resistencia a los fungicidas: **carboxina, benomyl, glufosinato o higromicina**. El ensayo consiste de los siguientes pasos: a) 200-300 μ l de la suspensión de partículas de Tungsteno M5 (partículas de 0.4 μ m de diámetro promedio) en glicerol al 50% (v/v), se suspenden en 200-300 μ l de etanol absoluto, se agitan en un agitador Vortex, para homogenizar completamente, se dejan reposar 15-20 segundos y se centrifugan a 14000 rpm por 10-25 segundos, en una microcentrífuga. El sobrenadante se elimina cuidadosamente, posteriormente las partículas de Tungsteno se lavan tres veces con 200-300 μ l de agua estéril, agitando en el vortex, para mezclar uniformemente las partículas y en cada ocasión centrifugando a 14000 rpm por 5-15 segundos. El sobrenadante se retira con una micropipeta y las partículas se resuspenden en Glicerol al 50% y se almacenan a -20°C hasta su uso.

b) Para la transformación de la cepa C4 de *Metarhizium anisopliae*, se toman 50-100 μ l de las partículas de Tungsteno, previamente preparadas, y se les adiciona 3-10 μ g de plásmido a utilizar (pGG375). Se añade CaCl_2 2.5 M, se sonica la mezcla durante 3-10 segundos, y se

agrega espermidina 0.1 M, se sonica nuevamente la mezcla durante ~~3-10 segundos y se~~
centrifuga a 14000 rpm durante 10 segundos. Se elimina cuidadosamente el sobrenadante y
se lavan las partículas con 50-100 μ l de etanol absoluto, se sonica nuevamente durante 3-10
segundos y nuevamente se centrifugan las partículas a 14000 rpm durante 10 segundos. Se
5 elimina cuidadosamente el sobrenadante y se resuspenden las partículas en 10-20 μ l de
etanol absoluto (para homogenizar se sonica durante 3-10 segundos). Una vez preparadas
las partículas con los plásmidos, se procede a la transformación de la cepa C4 de
Metarhizium anisopliae, en un aparato de biobalística. Se colocan 2-5 μ l de partículas
preparadas con los plásmidos en el acarreador de partículas del aparato, se cierra la cámara
10 de balística y se procede a bombardear con 60-75 unidades de presión de vacío (cm Hg) y
35-45 kilogramo fuerza por centímetro cuadrado de Helio (kgf/cm^2). Se realizan dos
disparos por placa de Petri que contienen medio mínimo y el inhibidor de selección
(carboxina, benomyl, glufosinato o higromicina) previamente inoculadas con 1×10^5 a $1 \times$
 10^6 conidios de la cepa C4 de *Metarhizium anisopliae*. Enseguida las placas se incuban
15 durante 6-14 días a 22-30 °C.

Se seleccionan transformantes con cada uno de los plásmidos que contienen una o mas
copias del gen CIE1 integrado de manera estable en su genoma. Las transformantes y la
cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* pueden ser usadas en experimentos de
20 cuantificación de la conidiación y evaluación de la viabilidad de los conidios producidos.

EJEMPLO 4

En otra de las posibles variantes de los métodos descritos en esta invención se pueden
generar transformantes de *Metarhizium anisopliae* que producen alrededor de 3-23 veces
25 más conidios por placa o en arroz en 5-8 días de incubación, introduciendo el gen CIE1
mediante un método indirecto empleando *Agrobacterium tumefaciens*, usando las técnicas
descritas por (Fang *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2007; Staats *et al.* 2007) para *Metarhizium*.
Para la utilización de este método es necesario construir un plásmido que sea funcional en
Agrobacterium tumefaciens y que porte la secuencia nucleotídica del gen CIE1. Uno de los
30 posibles plásmidos a emplear puede ser el plásmido binario pFBENGFP descrito por (Fang



et al. 2006), y a partir del plásmido pGG375, transferir el gen CIE1 a *Agrobacterium tumefaciens* mediante el plásmido binario que acarrea dentro de la región del T-DNA al gen CIE1 en dirección antisentido bajo el control de un promotor fuerte constitutivo como el promotor del gen *gpdA*, y un gen de resistencia a carboxina, benomyl, glufosinato o higromicina, se crece en caldo Luria Bertani (LB) con Kanamicina hasta alcanzar una densidad óptica a 660 nm (D.O. ₆₆₀) de 0,6 y se diluye 4 veces con medio de inducción adicionado de acetosiringona (IMAS). Se incuba 3-4 horas en agitación constante. Por otra parte se preparan células de *Metarhizium anisopliae* (conidios o blastosporas) a una concentración de $1-5 \times 10^5$ células/ml, se centrifugan a 5000 rpm 5 min, y a la pastilla se le adiciona *Agrobacterium tumefaciens* previamente inducidas. Se mezclan y después se esparcen sobre celofán depositado sobre placas Petri conteniendo medio IMAS. Después de 2 días de cultivo a 22-30 °C, el celofán con las células se transfieren a medio M-100 fresco con cefotaxima u otro inhibidor para *Agrobacterium tumefaciens* y el antibiótico para seleccionar los transformantes de *Metarhizium anisopliae* (carboxina, benomyl, glufosinato o higromicina). Después de un día de incubación, se transfirieron a nuevas placas del mismo medio y se volvieron a incubar. A los 3 días de incubación a 22-30°C se recogieron las transformantes sembrándolas en medio selectivo. Estas transformantes pueden ser usadas en experimentos de evaluación de la conidiación.

EJEMPLO 5

COMPROBACION DEL AUMENTO EN LA CONIDIACIÓN EN LAS TRANSFORMANTES DE *Metarhizium anisopliae*

Para analizar el efecto de la expresión del RNAm complementario del gen CIE1 en la producción de conidios, tanto la cepa silvestre C4 y las transformantes de *Metarhizium anisopliae* generadas por los métodos previamente mencionados, se inoculan en placas Petri con medio mínimo (MM) constituido por sal nitrogenada, glucosa y oligoelementos. Se inoculan 500 conidios por caja Petri. Las cajas Petri se incuban entre 22-30 °C durante

5-8 días, hasta conidiación completa, el ensayo de conidiación se hace por triplicado (Tabla 1, Figuras 2 y 3). La producción de conidios también se cuantifica en arroz en las condiciones empleadas en la producción del hongo a escala semi-industrial para su aplicación en campo como biopesticida. Para ello se siembran 1×10^6 a 1×10^7 conidios en 100-300 g de arroz esterilizado en bolsas de polipapel a 1.5 Kg/cm^2 de presión y $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Se incuban entre $22\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5-15 días, hasta conidiación completa. El ensayo se hace por triplicado (Tabla 2, Figuras 4 y 5). Para la cuantificación, los conidios se colectan suspendiéndolos en una solución con detergente al 0.01-0.001 % (peso/volumen) y se cuentan al microscopio en una cámara de Neubauer. Los datos de conidiación en caja de Petri con medio mínimo y los datos de conidiación obtenidos en arroz se sometieron a análisis estadístico aplicando el Método Lineal General Anova Factorial. Los resultados indican que en ambos casos, la diferencia de conidiación de la cepa C4p375 respecto de la cepa silvestre C4, es estadísticamente significativa, con un valor de P menor a 0.025.

En seguida se procede a la cuantificación de la viabilidad de los conidios, mediante la capacidad de germinar en MM; para ello se siembran 200-400 conidios por placa de Petri con MM, se incuban a $22\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 horas en total, contando el número de germínulas al microscopio a las 8 horas y después cada dos horas. Se cuantifican el número de germínulas y de conidios intactos en al menos 100 células totales de cada réplica. Los experimentos se realizan al menos tres veces por triplicado de manera independiente (Figura 6). La viabilidad de los conidios también se cuantifica mediante la capacidad de germinar y formar colonias sembrando 200-400 conidios por placa de MM, incubando por 48-72 horas a $22\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ contando el número de colonias (Tabla 3). Estos experimentos también se hacen al menos tres veces por triplicado.

Posteriormente se evalúa su virulencia mediante ensayos biológicos realizados como se describe en Morales Hernandez *et al*, 2010, utilizando como insecto de prueba larvas del tercer instar de *Plutella xylostella*, las cuales se inoculan con conidios de la cepa silvestre C4 o conidios de la cepa transformante C4p379, se incuban durante 5-10 días a temperatura ambiente proporcionándoles como alimento hojas de brócoli, cuantificando al final de la incubación el número de larvas muertas por la infección del hongo (micosis). En estos

ensayos se inoculan 160 larvas con cada dosis de conidios de cada cepa. En todos los tratamientos se observó la misma dosis letal media (DL₅₀) de 1.2×10^7 conidios/ml para la cepa C4p375 y la cepa silvestre C4 en el insecto de prueba *Plutella xylostella*, indicando que ambas cepas, por separado, matan con la misma eficiencia al insecto blanco. En la

5 Figura 7 se observa la larva sana. En las Figuras 8 y 9 se observa el aspecto de larvas infectadas y muertas por *Metarhizium anisopliae* cepas C4 y C4p375, respectivamente, el cual es muy similar entre ellos.

Estos resultados en conjunto, indican que la expresión del RNA complementario de CIE1 provoca mayor producción de conidios y no afecta la viabilidad del hongo ni su virulencia

10 en el insecto.

En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados de conidiación y la viabilidad de los conidios producidos por la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* y la transformante C4p375 con número de acceso CECT20777 (transformada con el plásmido pGG375 que contiene el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* en dirección antisentido). La producción de conidios

15 de la transformante es de 30×10^8 conidios por placa, o 12×10^{10} conidios producidos en arroz, en 5-8 días de incubación, siendo 3-23 veces la conidiación observada en la cepa silvestre C4 y que las reportadas para algunas cepas nativas por Sun *et al*, 2002. Además, la viabilidad de los conidios de la transformante es similar al de la cepa parental o tipo silvestre C4 de la cual proviene C4p375, y ambas cepas germinan al mismo tiempo (ver

20 Figura 6), demostrando que la expresión del RNAm complementario al mensajero de CIE1 de *M. anisopliae* en el propio *Metarhizium anisopliae* sólo afecta favorablemente la eficiencia de conidiación y no cambia otro aspecto del microorganismo.

25

30

TABLA 1. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* crecido en Medio Mínimo.

Cepa	Conidios producidos $\times 10^8$	Tiempo de incubación (días)
Silvestre C4	1.62 (± 0.02)	10
Transformante C4p375 No. de acceso CECT20777	36.9 (± 0.08)	5
F794 *	9 (± 0.3)*	11

*Conidiación a los 11 días de una cepa silvestre de *Metarhizium anisopliae* crecida en medio rico SDAY (Saboraud Dextrosa Agar suplementado con extracto de levadura), datos reportados por Sun et al, 2002.

5

TABLA 2. Producción masiva de conidios de *Metarhizium anisopliae* en arroz.

Cepa	Conidios producidos $\times 10^{10}$	Tiempo de incubación (días)
Silvestre C4	4.6 (± 0.04)	12
Transformante C4p375 No. de acceso CECT20777	12.6 (± 0.2)	8

TABLA 3. Viabilidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* cuantificada como capacidad de germinar y formar colonia en Medio Mínimo.

5

Cepa	Unidades formadoras de colonia UFC (%) ^a
Silvestre C4	100
Transformante C4p375 No. de acceso CECT20777	100

^a; los conidios se sembraron en medio mínimo, se incubaron a 28 °C durante 48-72 horas, contándose el número de colonias. Donde $UFC = (\text{número de colonias} / \text{número de conidios sembrados}) (100)$.

10

15

20



BIBLIOGRAFÍA

- 5 **Barajas CG, del Pozo EM, García I, Méndez A, (2010).** Obtención de conidios del aislamiento MA_002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Revista de Protección Vegetal*, 25 (3): 174-180.
- 10 **Bogo MR, Henning Vainstein M, Lima Aragao FJ, Rech E, Schranck A, (1996).** High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 142:123-127.
- Castelnuovo M, Rahman S, Guffanti E, Infantino V, Stutz F, Zenklusen D. (2013).** Bimodal expression of *PHO84* is modulated by early termination of antisense transcription. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20 (7): 851-859.
- 15 **Clarkson JM, Charnley AK, (1996).** New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4 (5): 197-203.
- 20 **Dhar P, Kaur, G (2011).** Response surface methodology for optimizing process parameters for the mass production of *Beauveria bassiana* conidiospores. *African Journal of Microbiology Research*, 4(17): 2300-2406.
- Desphande MV, (1999).** Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(3):229–243. DOI: 10.1080/10408419991299220
- 25 **de Vrije T, Antoine N, Buitelaar RM, Bruckner S, Dissevelt M, Durand A, Gerlagh M, Jones EE, Lüth P, Oostra J, Ravensberg WJ, Renaud R, Rinzema A, Weber FJ, Whipps JM, (2001).** The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Applied Microbiology and*
- 30 *Biotechnology*, 56:58–68. DOI 10.1007/s002530100678



Duarte RTD, Staats CC, Fungaro MHP, Schrank A, Vainstein ~~BA~~, ~~Engel~~ ~~ML~~,
Nakamura CV, de Souza W, Furlaneto MC, (2007). Development of a simple and rapid

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation system for the entomopathogenic
5 fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Letters in Applied Microbiology, 44:248–
254. DOI:10.1111/j.1472-765X.2006.02092.x

Fang W, Pei Y, Bidochka MJ, (2006). Transformation of *Metarhizium anisopliae*
mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Canadian Journal of Microbiology, 52:623-626.
10 DOI: 10.1139/W06-014.

Goettel MS, Leger RJ S, Bhairi S, Jung MK, Oakley BR, Roberts DW, Staples RC,
(1990). Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl
resistance. Current Genetics, 17:129-132

15 Hajek A, (2004). *Natural enemies; an introduction to Biological Control*. 1st ed. The
Edinburgh Building, Cambridge, CB2 8RU, UK. *Cambridge University Press*.

Hölker U, Höfer M, Lenz J, (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale
20 solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 64:175–
186. DOI 10.1007/s00253-003-1504-3

Inglis PW, Aragao FJL, Frazao H, Magalhaes BP, Valadares-Inglis MC, (2000).
Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with
25 green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. FEMS Microbiology
Letters, 191: 249-254.

Keon JPR, White GA, Hargreaves JA, (1991). Isolation, characterization and sequence
of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut
30 pathogen, *Ustilago maydis*. Current Genetics, 19:475-481.

- Machado ACR, Monteiro AC, Belasco de Almeida AM, Geraldo Martins AIE, (2010).**
5 Production technology for entomopathogenic fungus using biphasic culture system.
Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 45(10): 1157-1163
- Morales-Hernandez CE, Padilla-Guerrero IE, Gonzalez-Hernandez GA, Salazar-Solis
E, Torres Guzmán JC, (2010).** Catalase overexpression reduces the germination time and
10 increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. Applied Microbiology
and Biotechnology, 87(3): 1033-44. e pub 2 abril 2010.
- Pascual S, De Cal A, Magan N, Melgarejo P, (2000).** Surface hydrophobicity, viability
and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and
15 submerged culture. Journal of Applied Microbiology, 89:847-853.
- Soundarapandian P, Chandra R, (2007).** Mass production of entomopathogenic fungus
Metarhizium anisopliae (deuteromycota; Hyphocetes) in the laboratory. Research Journal
of Microbiology, 2(9): 690-695.
20
- Staats CC, Junges A, Fitarelli M, Furlaneto MC, Henning Vainstein M, Schrank A,
(2007).** Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi
Metarhizium anisopliae. Applied Microbiology and Biotechnology, 76:945-950. DOI:
10.1007/s00253-007-1043-4.
25
- St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW, (1996).** Construction of an improved
mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proceedings of the National Academy of
Science USA, 93:6349-6354.



Sun J, Fuxa JR, Henderson G, (2002). Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, 81:78-85.

5 **Viccini G, Mannich M, Fontana Capalbo DM, Valdebenito-Sanhueza R, Mitchell DA**, (2007). Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry*, 42:275-278. DOI:10.1016/j.procbio.2006.07.006

10 **Wang C, Duan Z, St Leger RJ**, (2008). MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*. 7(2):302-309. DOI:10.1128/EC.00310-07

Wang J, Holden DW, Leong SA, (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 85:865-869.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Metarhizium anisopliae*, caracterizada porque comprende el plásmido integrativo pGG375 que contiene el gen CIE1 de *Metarhizium anisopliae* en dirección antisentido, produciendo el RNA en dirección antisentido bajo el control del promotor pgpdA y contiene también el gen *bar* de resistencia a glufosinato cuya secuencia nucleotídica está representada por la SEQ ID No.1 del listado de secuencia, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito CECT 20777.
- 10 2. La cepa descrita en la reivindicación 1, caracterizada porque produce de 3 a 23 veces más conidios que la cepa silvestre C4 de *Metarhizium anisopliae* en un tiempo de incubación de 5-8 días debido a la expresión del gen CIE1 en dirección antisentido.
3. La cepa descrita en las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque crece e infecta a sus insectos hospederos igual que la cepa silvestre de *Metarhizium anisopliae*.
- 15 4. La cepa descrita en la reivindicación 1, caracterizada porque es propagada en fase sólida para su propagación masiva semi-industrial e industrial.

RESUMEN

La presente invención se refiere al método de obtención de transformantes de *Metarhizium anisopliae*, mejoradas en su capacidad de conidiación masiva con una producción de 3-23 veces mayor de conidios en placa o en arroz, en 5-8 días de incubación para ser usadas como agentes de control biológico de insectos plaga en la agricultura y de importancia en salud pública, por medio de técnicas de Ingeniería Genética; las cuales son capaces de disminuir o abolir el RNA mensajero del gen CIE1 dando como consecuencia un mayor rendimiento en la producción de conidios en un tiempo corto de incubación de 5-8 días. Estas técnicas permiten la modificación de cualquier cepa perteneciente al género *Metarhizium*, mediante transformación genética para bloquear la expresión del gen CIE1. El método de transformación implica la introducción del gen CIE1 en dirección antisentido de *Metarhizium anisopliae*, bajo el control de los elementos adecuados de regulación de la expresión, en una o más copias integradas de manera estable en su genoma. La cantidad de conidios producidos es mayor en las transformantes en comparación con la cepa silvestre utilizada como receptor de la información genética.



La presente invención se refiere al método de obtención de transformantes de *Metarhizium anisopliae*, mejoradas en su capacidad de conidiación masiva con una producción de 3-23 veces mayor de conidios en placa o en arroz, en 5-8 días de incubación para ser usadas como agentes de control biológico de insectos plaga en la agricultura y de importancia en salud pública, por medio de técnicas de Ingeniería Genética; las cuales son capaces de disminuir o abolir el RNA mensajero del gen CIE1 dando como consecuencia un mayor rendimiento en la producción de conidios en un tiempo corto de incubación de 5-8 días. Estas técnicas permiten la modificación de cualquier cepa perteneciente al género *Metarhizium*, mediante transformación genética para bloquear la expresión del gen CIE1. El método de transformación implica la introducción del gen CIE1 en dirección antisentido de *Metarhizium anisopliae*, bajo el control de los elementos adecuados de regulación de la expresión, en una o más copias integradas de manera estable en su genoma. La cantidad de conidios producidos es mayor en las transformantes en comparación con la cepa silvestre utilizada como receptor de la información genética.

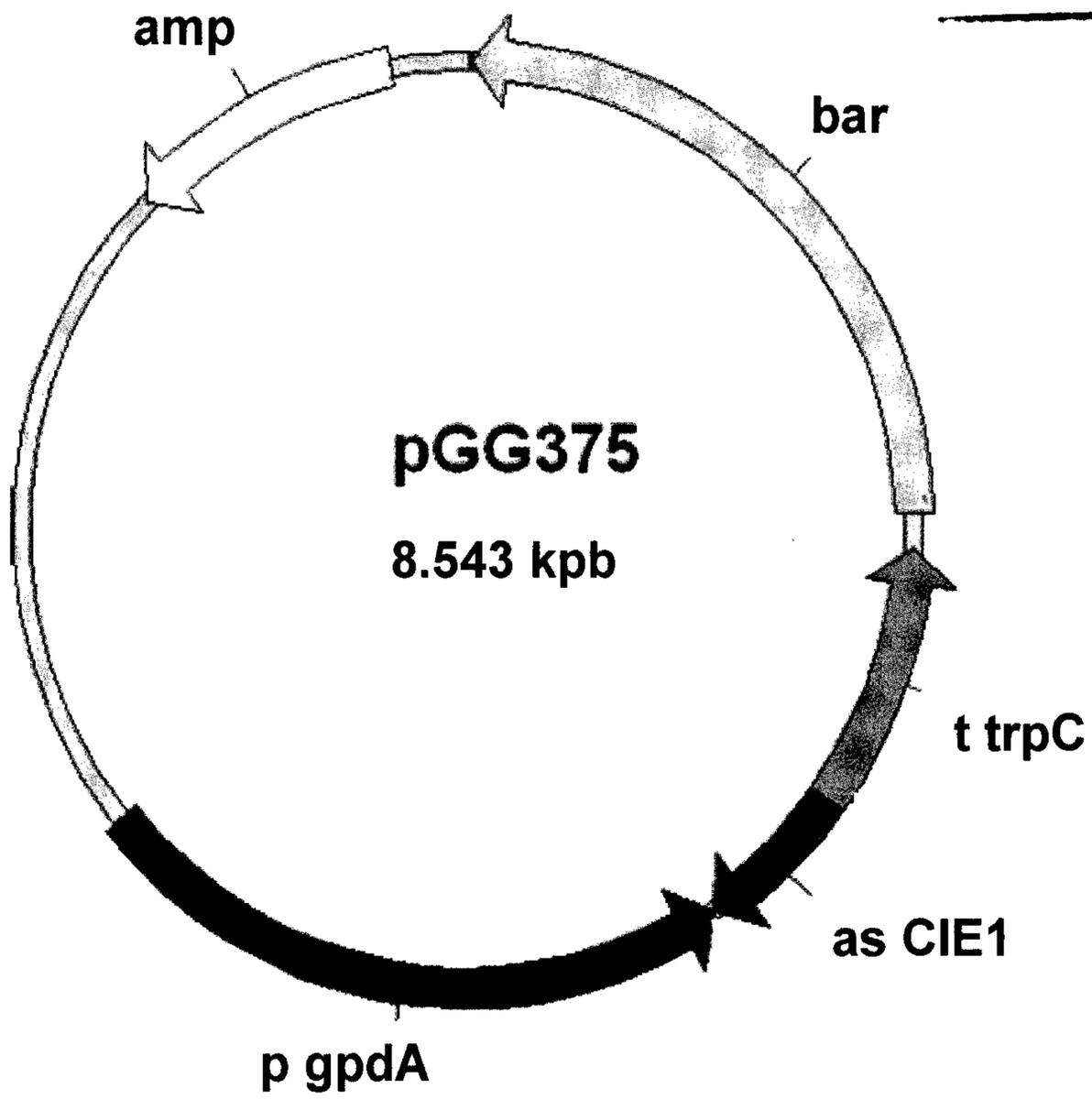


Figura 1

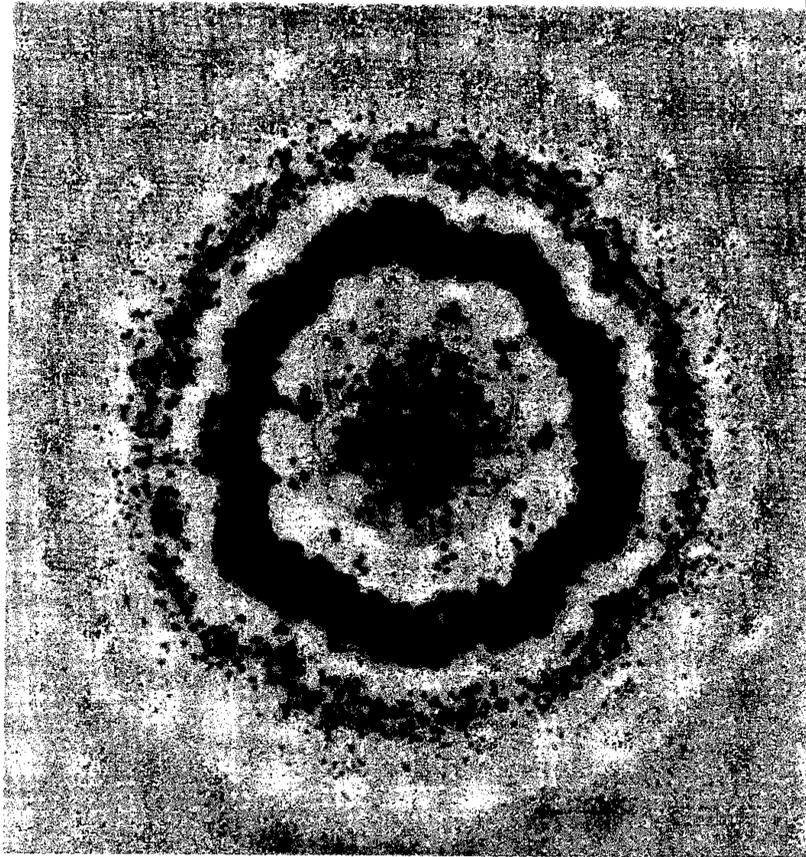


Figura 2

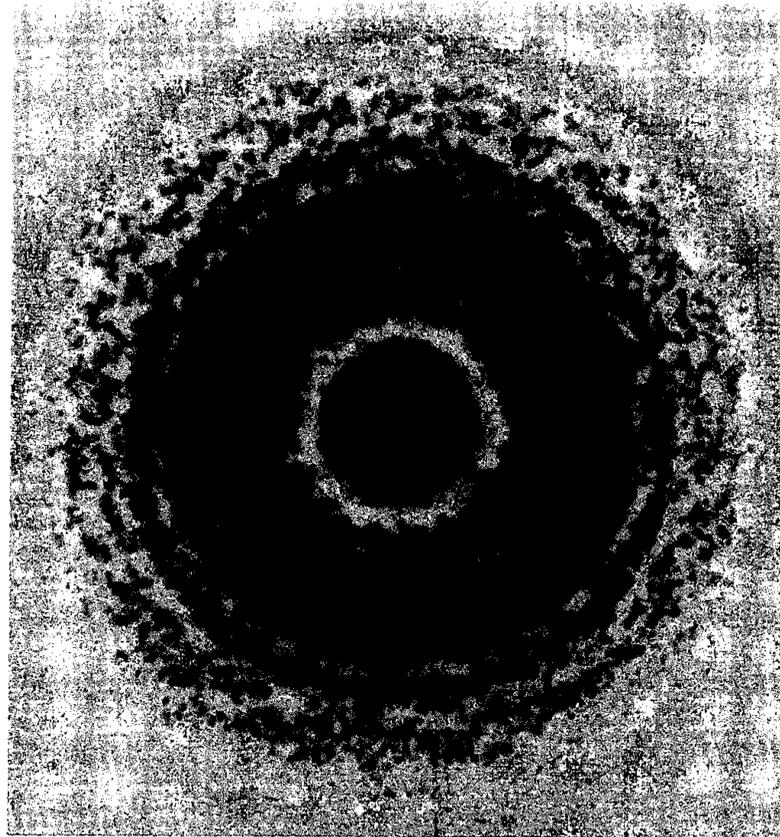


Figura 3



Figura 4



Figura 5

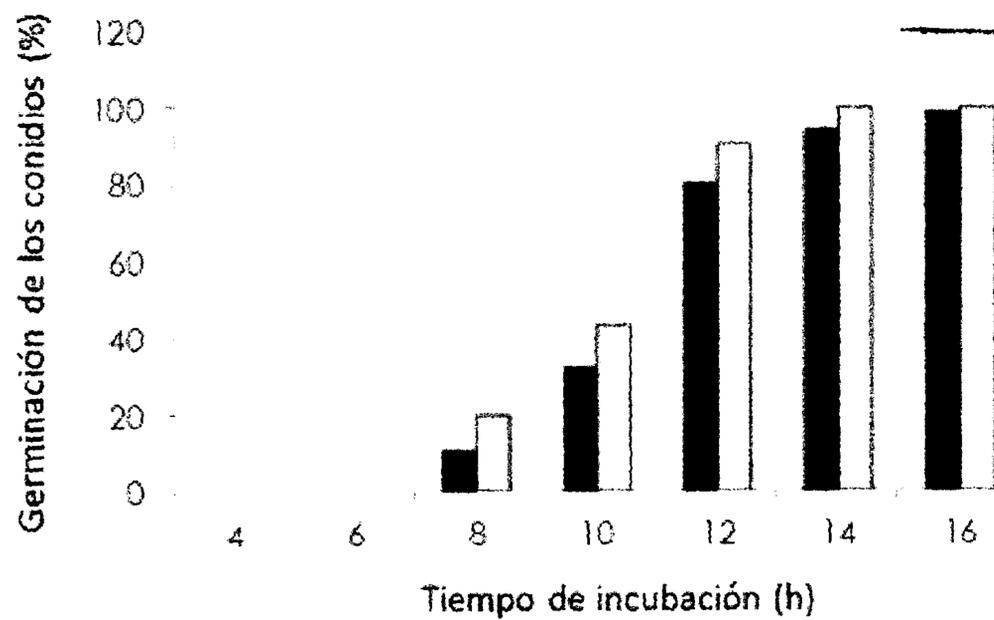


Figura 6



Figura 7



Figura 8

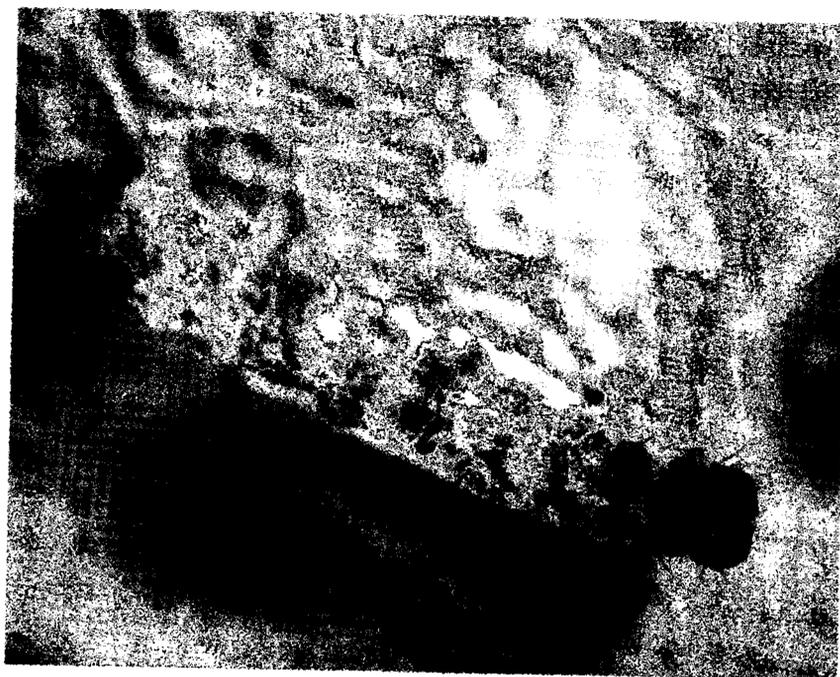


Figura 9

Listado de Secuencias



<110> Universidad de Guanajuato

Universidad de Guanajuato

5 Torres Guzman, Juan Carlos

Gonzalez Hernandez, Gloria Angelica

Salazar Solis, Eduardo

Salas, Manuel Dario

Ortiz Meza, Alfonso

10 Garcia Tapia, Adriana

Lopez Macias, Paola Ivonne

<120> **Metodo para aumentar la produccion masiva de conidos del
entomopatógeno *Metarhizium anisopliae***

15

<130> no aplica

<140> no aplica

<141> 2013-01-13

20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

25 <210> 1

<211> 3004

<212> DNA

<213> *Metarhizium anisopliae*

30

<220>

<221> exon

<222> (941)..(994)

35

<220>

<221> exon

<222> (1098)..(1238)

<220>

40

<221> exon

<222> (1292)..(1699)

<300>

<308> FN666606

45

<309> 2012-05-31

<313> (941)..(1699)

<400> 1

gcatgtcgac tggcttcagc tccggatggt acgacagacc aacatgatcg agcagaagga 60

50

tggaatcagg ccgagagaca ttgctggcat cggccacgta tcgagccaac gccctgcgca 120

atcggcgaac tgcagttgct gccatgttcc ctccccgat ccacactgat tgctcgccac 180

55

catgatttgt gattcggtag ttgcttaact gcattcgctt gcaacttggt tagatcgccc 240

tgcgattcgt ttttcggccc aagtctcaga tgtggaccag caattggtgc cagctactac 300



caattggca atgcccactc ccgcttctcg atcgtcatgt ttctccgtag cccacgaaga 360
60 tctggcatcg tgtattacc atcacaattc catgccgtcg agaagaatgc ccaagcctaa 420
cccaacgccg ccttagatag gcgaattagc aatgtctctc cccaacatgt ccccgtttct 480
65 ggcactgttg tggttgcgta acgcagtgc tatactccgt ggttcaattc ctgtgcagc 540
tgccgcgata cacaccgggc ctgccgtcat tctggatcgg acaccaagga ggttccgca 600
cttgaatcta gtattcttcc ccatccgtcg accgccttgc caagcctgag gtcattccac 660
70 ttgacttgac aagcttgggt ttcacctacg gaccaagccc tccgcgagtt cgtggtggat 720
cctcgctcga cgttgtgaga tgtaacacag ccccgacctc tgtcatcact tggacaagtc 780
75 ggcacatggc tctaagacgg tctcaagagg ctatatttgc gttccagtga gtattagcct 840
tagtattaa ctagtgcctc tgcaccccg ggctcccaac ttgaattgct cgatgttgct 900
tctctttcac aacccttctg caacttcaca tcattccaag atg gcc tca cat gtc 955
80 Met Ala Ser His Val
1 5
gac ctc gtc atg aat ccc tgg gaa gcc aaa gct ctc gat gtaaataaca 1004
Asp Leu Val Met Asn Pro Trp Glu Ala Lys Ala Leu Asp
85 10 15
aacctcatc ttcctgtgg ctggcagcgt tgatgctcta cgatgcttgt tgccgagtgc 1064

ataattagtt tgctaacaat gatttcgtca tag tac cat tat cca gcc gaa aca 1118

90 Tyr His Tyr Pro Ala Glu Thr

20 25

ttg cct tct gct aca ggg agg cca tcc agt gtt tct aga ggc cca tgg 1166

Leu Pro Ser Ala Thr Gly Arg Pro Ser Ser Val Ser Arg Gly Pro Trp

95 30 35 40

cag gcc atg tca aat tcc gtt ttc tat ccc ggc ctg tat tca gca acg 1214

Gln Ala Met Ser Asn Ser Val Phe Tyr Pro Gly Leu Tyr Ser Ala Thr

45 50 55

100

ggc ttc gat atc atg ggc ata ttg gtaggattct tctcgaagat ttcgtgacca 1268

Gly Phe Asp Ile Met Gly Ile Leu

60 65

105 agtcgttact gaccagcct tag atg agt cta agg gcc cga ccg aac cca caa 1321

Met Ser Leu Arg Ala Arg Pro Asn Pro Gln

70 75

gtt gaa att ggg aag ctc gac tgc tcc gtg gct ctc gtg ctc tgt aac 1369

110 Val Glu Ile Gly Lys Leu Asp Cys Ser Val Ala Leu Val Leu Cys Asn

80 85 90

ctt gaa gag cct gac gac cct ata gtg tac gca tcg gat gca ttc tgt 1417

Leu Glu Glu Pro Asp Asp Pro Ile Val Tyr Ala Ser Asp Ala Phe Cys

115 95 100 105

gcc ctc acc ggc tat tca caa gca gag gtc atc ggc aaa aat tgc cga 1465
 Ala Leu Thr Gly Tyr Ser Gln Ala Glu Val Ile Gly Lys Asn Cys Arg
 110 115 120

120

ttc ctc caa cag cca cac cct agc tca tgg gac atg tct aag agc aag 1513
 Phe Leu Gln Gln Pro His Pro Ser Ser Trp Asp Met Ser Lys Ser Lys
 125 130 135

125 ccc aag cac gac aag cac gca gcc tca aaa atg cgg cac gca ctt caa 1561
 Pro Lys His Asp Lys His Ala Ala Ser Lys Met Arg His Ala Leu Gln
 140 145 150 155

gcc gaa cag gag atc cag cta cgc gtt ata aac tat cga aaa gat ggt 1609
 130 Ala Glu Gln Glu Ile Gln Leu Arg Val Ile Asn Tyr Arg Lys Asp Gly
 160 165 170

cgc cga ttc atc aat cgc gtc agt att gta ccg gtg aca tta aat ggt 1657
 Arg Arg Phe Ile Asn Arg Val Ser Ile Val Pro Val Thr Leu Asn Gly
 135 175 180 185

tct ggc tac cgc tat gct gtt ggg tta ctg aac gat gat tca 1699
 Ser Gly Tyr Arg Tyr Ala Val Gly Leu Leu Asn Asp Asp Ser
 190 195 200

140

tagccctaag atggatcaca gaaatatcgc tgactggtg acgtgggctc tgtagagcgg 1759

ccacgtcaca aatcatcac agcatcttgc aaatagacgc tgagccatta gccaacacca 1819

145 tgactgatg gtgttccaat tgctagattg gaactgagcg gaacttctg ttatctccta 1879

tgtcgtattt ggcggccgat atgaaatggg gtgggatagg gcgccaacgc ctcggatggg 1939

cattgtcaac tcgacagtg cacaatcct tatttcaatt gccataacac aatagttgga 1999

150

gaaaggctcg tagttttcgt tcagcatgtg tntagctggg attatgatca ttgtttggag 2059

aatagcgacg gaacatagcg aaataatgat gatagattac cttttataag cgatttgata 2119

155 agccttttct tctttaactt gctccttggt ttattttgac atacaaatct agcttccaaa 2179

ggcgggctag cttcgtagtc gtaataattt aactacggga taacagactg tcaggctttt 2239

ctcatgcatt tctcaatgag atatcgtatc tgctttcagg gcatacctcg acgaaatggt 2299

160

caacctggta gagcaagaag ttagagatac agcgagcagt ccagattctt gtcatagtaa 2359

gcgaaagggtg tctaagtatt gtcaaagaga agtggcccca tgctcctagc gtattatgag 2419

165 gcatgatata ccatgaatag caatacattt aattcaattc cgtagtcgag tcgaacgccc 2479

tctccctgaa gcgaaaccag gctctggctt aaccacaccc tcttcttct ttacactcta 2539

gtcttctggt cttagtgaac ggctcggcac cctcaactcc atcctgttca agcttctttt 2599

170

tgccgggtct tctgtacttt tggcgcatac cagctcgtcc ggccaccaac cgtaataaac 2659

gccaatctc gccatgggta gtttactgga cgatcccttg cctcctttcc ccagcgggta 2719

175 ttgaacagcc aatggtctgg gaactgatcc gagtcccaa gcttgctac cgccgtctgg 2779

caaacatc gaatgctcg tatagcttct tgattcagc gtcgctaaag ctatcgctgt 2839

actgtccgg gtgaagctta agcttggtta ggagtctcgt cggccacca gttgccgatg 2899

180

ccactgatca tggcttggtc taacaggaga gctttaactg ggacatgacg ggctgcatc 2959

ttgccagca agtactcttc agtgaatcta tcagtatcaa tgacc 3004

185

