

TÍTULO DE PATENTE NO. 311248

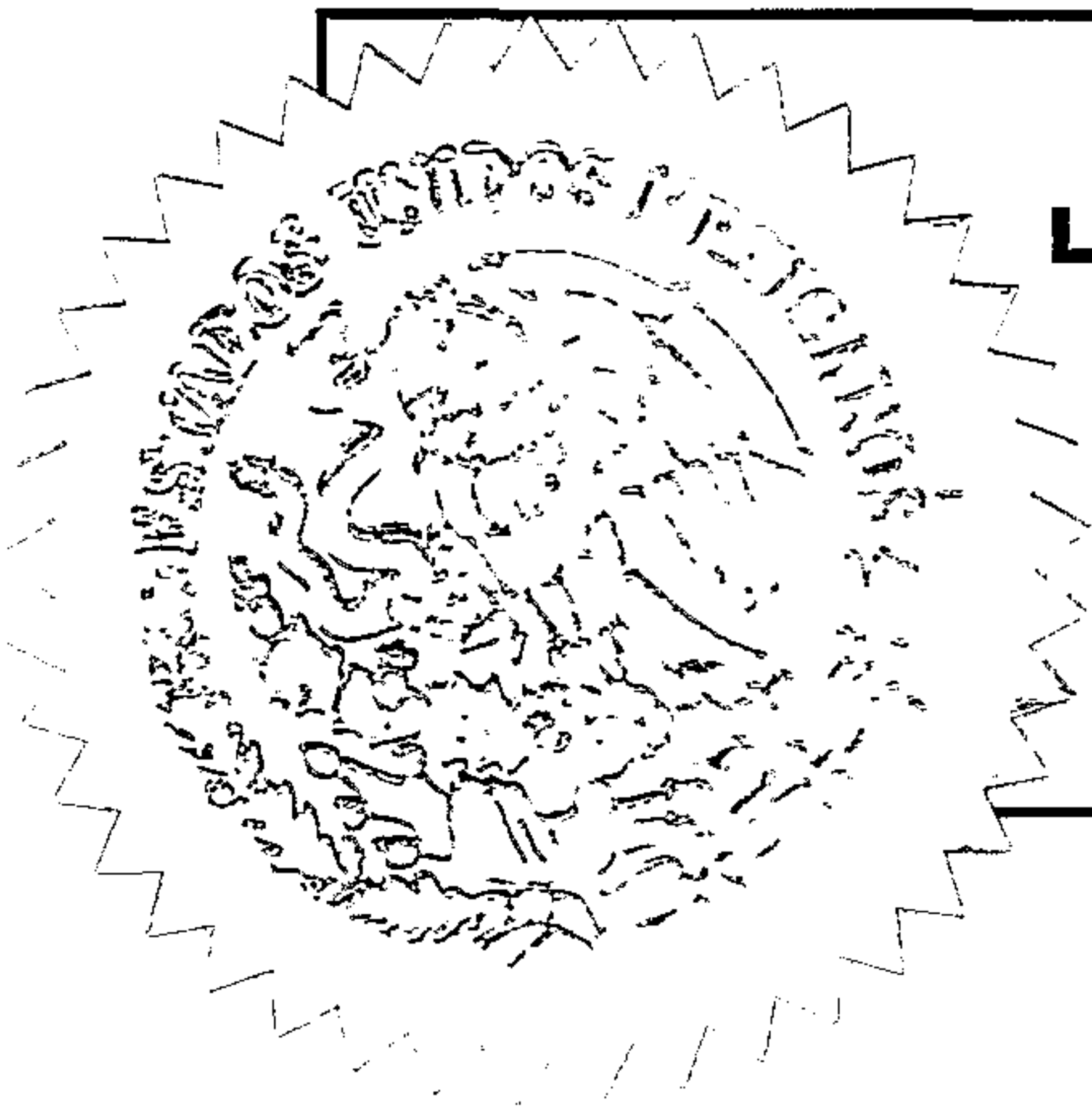
Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Domicilio: Lascuráin de Retana No. 5, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MEXICO.
Denominación: OBTENCION DE CEPAS MEJORADAS DE METARHIZIUM SPP. CON MAYOR RESISTENCIA A LA LUZ ULTRAVIOLETA
Clasificación: Int.CI.8: A01N25/00; C12N15/00; C12N15/04; C12N15/63
Inventor(es): GLORIA ANGÉLICA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ; JUAN CARLOS TORRES GUZMAN; EDUARDO SALAZAR SOLÍS

SOLICITUD		
Número: MX/a/2007/015095	Fecha de presentación: 29 de noviembre de 2007	Hora: 16:29
PRIORIDAD		
País:	Fecha:	Número:
Vigencia: Veinte años		
Fecha de Vencimiento: 29 de noviembre de 2027		
<p>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.</p> <p>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.</p> <p>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, 27/01/2010 y 09/04/2012); 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).</p>		

Fecha de expedición: 28 de junio de 2013

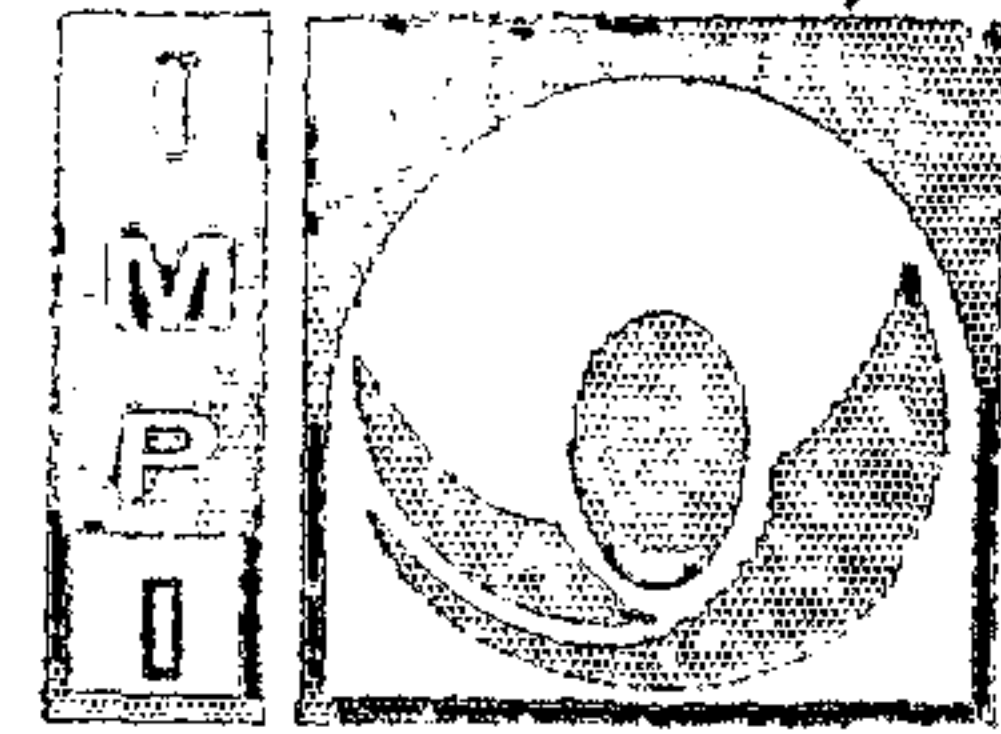
LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES



3/12/8
2006-2013

2007 / 1509



**OBTENCION DE CEPAS MEJORADAS DE METARHIZIUM SPP
CON MAYOR RESISTENCIA A LA LUZ ULTRAVIOLETA.**

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

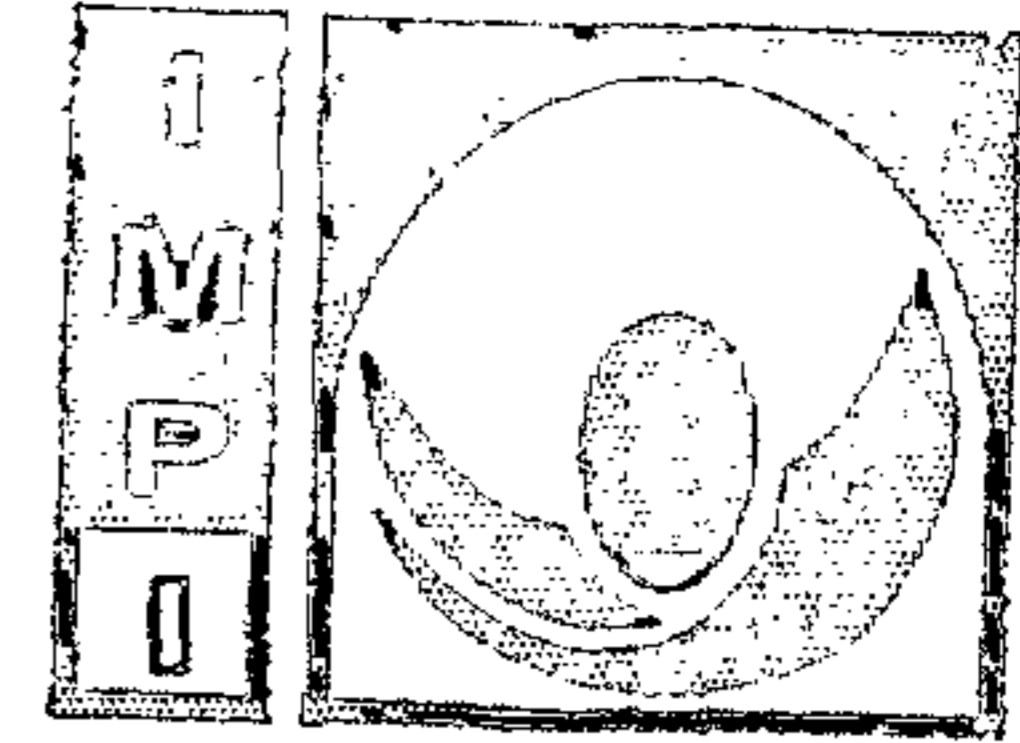
5 La presente invención se relaciona con la producción de células u organismos transgénicos para el control de insectos plaga en la agricultura, dentro de la Ingeniería Genética, y más particularmente está relacionada con un método para la obtención de cepas mejoradas de *Metarhizium_spp.* en su capacidad como agentes de control biológico.

10 OBJETOS DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta los efectos negativos que produce la luz solar, y específicamente la luz ultravioleta de tipo A (UVA), sobre la permanencia en campo de las esporas del hongo entomopatógeno *Metarhizium*, es un objeto de la presente invención la obtención de cepas de *Metarhizium_spp* con características mejoradas en su capacidad como agentes de control biológico, sin afectar ninguna otra característica, por medio de la mayor resistencia al daño producido por la luz ultravioleta, específicamente por la luz UVA

Es un objeto adicional de la presente invención, proveer un método para la obtención de cepas mejoradas de *Metarhizium_spp.*, en su capacidad como agentes de control biológico, que emplee técnicas de DNA recombinante para producir organismos transgénicos que

20



sobreproduzcan la proteínas mutTp, mutYp y mutMp de *E.coli* dando como consecuencia una mayor resistencia a los efectos negativos producidos por la luz solar.

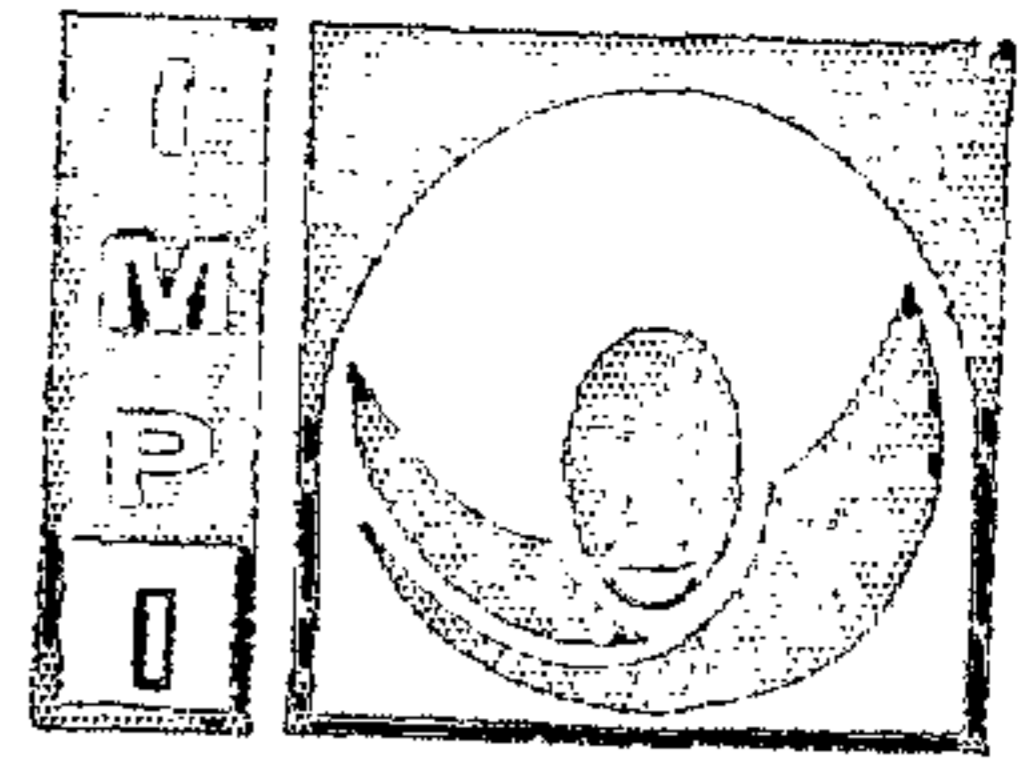
Es un objeto adicional de la presente invención, obtener una cepa transgénica de *Metarhizium anisopliae* CARO19, mejorada en su eficiencia de control biológico de insectos plaga.

ANTECEDENTES

La producción de células u organismos transgénicos, 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.

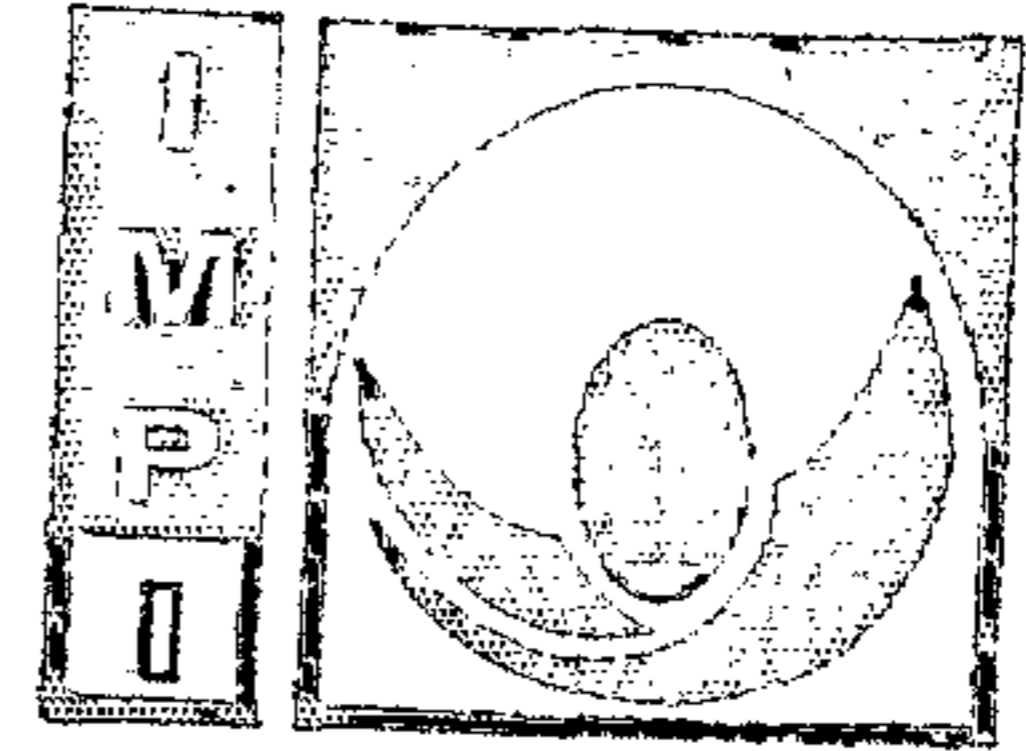
Una alternativa, para la que se ha buscado mayor utilización, es la aplicación de agentes existentes en la naturaleza, los cuales son enemigos naturales de los insectos plaga a controlar. El control microbiano de insectos se puede definir como la utilización dirigida y premeditada de organismos entomopatógenos con el objeto de disminuir las plagas de insectos (Badii *et al.* 2000).



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 (Fuxa 1987; McCoy *et al.* 1988; McCoy 1990).

En las últimas décadas, el control biológico realizado por organismos entomopatógenos y el manejo integral 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. 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.

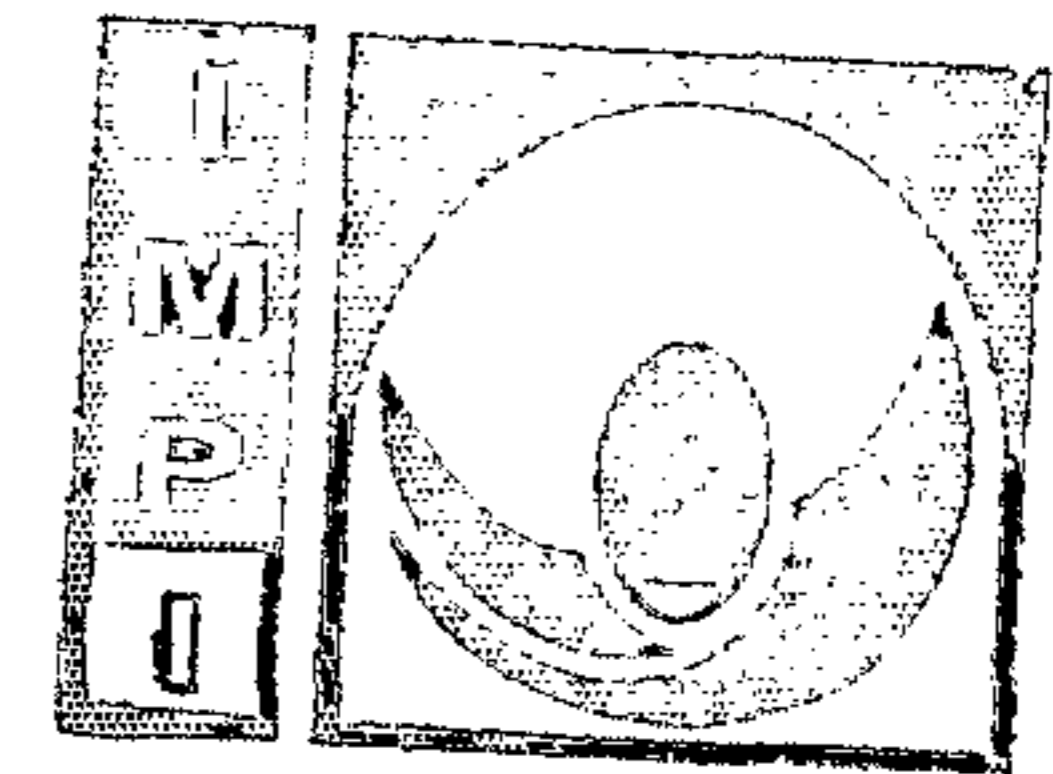
En los últimos años se han obtenido excelentes resultados con el uso de hongos entomopatógenos como factores de regulación de plagas agrícolas en distintas partes del mundo. Los hongos presentan ventajas, que los hacen únicos entre los organismos entomopatógenos, ya que más que destruir a su hospedero por la acción de una toxina, invaden el insecto de manera directa a través del tegumento, introduciendo el tubo germinativo de una conidia. 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 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 no permanecen en el suelo y además contaminan el agua, suelos, plantas y otras formas de vida (McCoy 1990).

Se ha observado que existen una variedad de factores ambientales que tienen un efecto dramático en la eficacia de los hongos entomopatógenos en contra de las plagas de insectos. Entre los parámetros que influyen en el éxito de los hongos entomopatógenos contra los insectos son: la radiación solar, la temperatura, disponibilidad de agua, precipitación pluvial y viento. El más importante de ellos es la radiación solar.

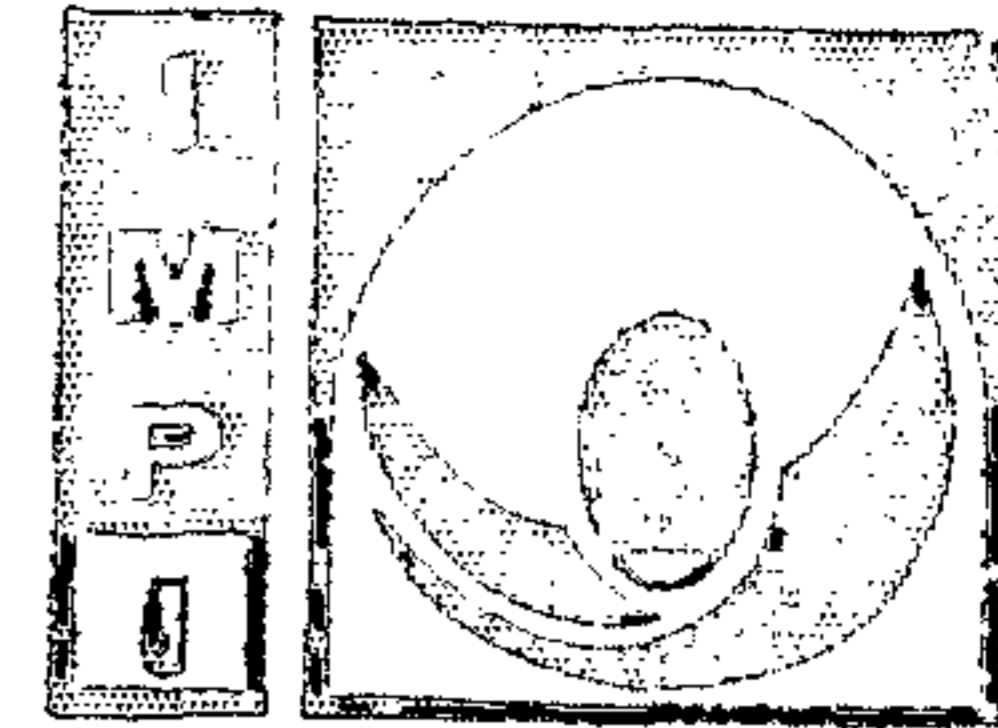
En campo, la persistencia de las conidias de *Metarhizium* y otros entomopatógenos es baja y uno de los factores mas agresivos es la luz solar, específicamente la luz UVA, ya que afecta gravemente su viabilidad (Ignoffo *et al.* 1977; Fargues *et al.* 1997; Braga *et al.* 2001a; Braga *et al.* 2001c; Braga *et al.* 2001b). Este efecto hace que el uso de estos organismos como biopesticidas no llegue a obtener los niveles de control y uso extensivo. No obstante, existen diversas patentes relacionadas con el uso de *Metarhizium* para el control de insectos, entre las cuales se encuentran las siguientes: A01N63/04, AU5476686, CN1542123, GB2380131, WO 2006/046067, WO 2003/038065, WO 2002/087344, WO 2000/064837, WO 1994/004034, WO 1993/024013, WO 1993/009672, WO 1992/003055, WO 1991/009527, WO 1990/010389.



Diversas técnicas han sido empleadas para intentar obtener organismos de este género mejorados en su eficiencia como agentes de control biológico, mediante resistencia a los factores ambientales como sequedad y luz ultravioleta, empleando formulaciones que ayuden a bloquear los efectos dañinos de la luz solar, pero estos procesos encarecen el producto.

La luz solar esta compuesta por radiaciones de diferentes longitudes de onda, siendo la luz ultravioleta de las más perjudiciales, la luz ultravioleta de acuerdo a su longitud de onda se clasifica en luz UV tipo A, B, C, siendo la luz ultravioleta del tipo A el 95% del total de la luz ultravioleta que incide sobre la tierra. En este sentido, se ha descrito que la luz UVA permite el entrecruzamiento del DNA con proteínas y rompimiento de las cadenas y deleciones además, las radiaciones UVA pueden ocasionar estrés oxidativo; debido a la formación de radicales de oxígeno, principalmente oxígeno en singulete, peroxido de hidrogeno y radicales hidroxilo (Ignoffo *et al.* 1977) siendo extremadamente perjudicial para todas las formas de vida.

A pesar de que la mayoría de los organismos tiene un mecanismo primario de defensa al estrés oxidativo, la radiación recibida por las células puede rebasar a estas actividades primarias dañando al DNA mediante la producción de nucleótidos oxidados como la 7,8 dihidro 8-oxoguanina (conocida como 8-hidroxiguanina o lesión **GO**) (Fowler *et al.* 2003). La 8-oxoguanina tiene propiedades ambivalentes de apareamiento de bases, es capaz de



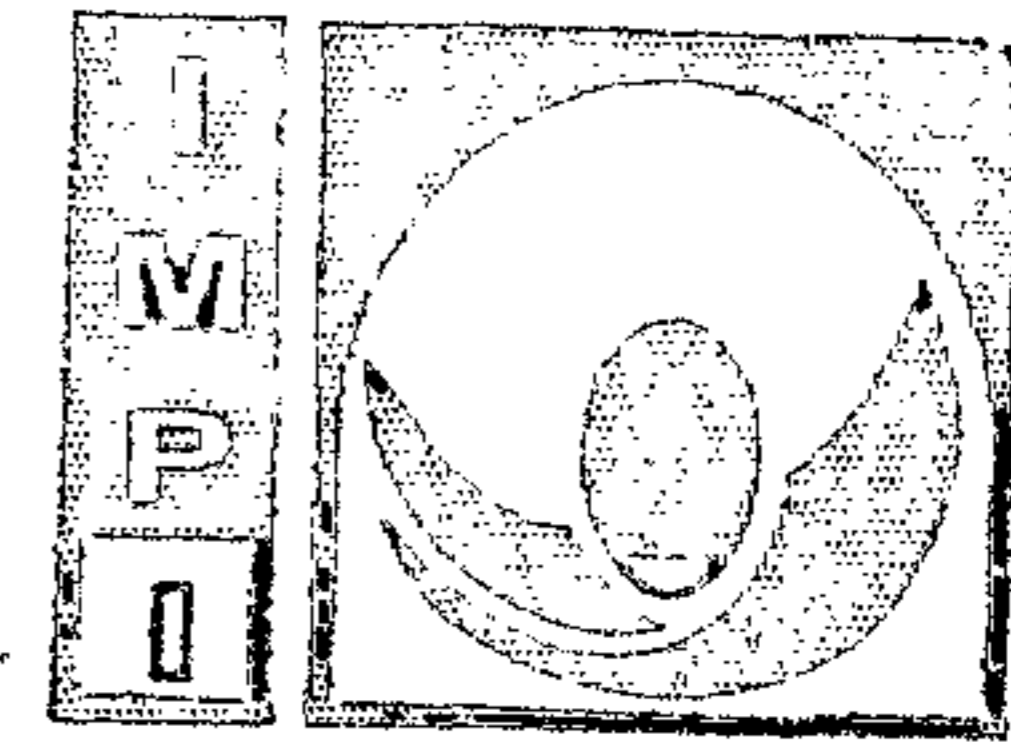
aparearse tanto con la citosina como con la adenina durante la síntesis del DNA. Consecuentemente, la 8-oxoguanina es una base altamente mutagénica.

5 Para combatir las consecuencias de la 8-oxoguanina los organismos han desarrollado mecanismos de defensa celular (Fowler *et al.* 2003).

El sistema GO es un mecanismo que esta dedicado a aumentar la fidelidad de la replicación del DNA. Se conoce que el sistema GO en bacteria protege del daño a nivel de DNA causado por estos radicales. En este proceso participan los genes *mutM* y *mutY*, y en la 10 degradación del 8-oxo-dGTP, compuesto mutagénico producido por acción de la luz UVA, el gen *mutT* (Fowler *et al.* 2003). Estas tres proteínas, codificadas por los genes *mutM*, *mutT* y *mutY* son las responsables de remover la forma de daño oxidativo de la guanina presente en el DNA y de la poza nucleótidos.

15 La proteína *mutTp* de *E. coli* hidroliza el compuesto mutagénico 8-oxoGTP (a 8-oxoGMP y pirofosfato) para prevenir el daño al DNA al impedir que sea utilizado como substrato por la DNA polimerasa (Fowler *et al.* 2003).

La proteína *mutYp* de *E. coli* es una enzima de reparación por escisión de bases (BER) 20 involucrada en el reconocimiento y la reparación del daño oxidativo en el DNA. Es una DNA glicosilasa que remueve bases de adenina apareadas erróneamente con guanina y con la 8-oxoguanina (Michaels *et al.* 1992; Michaels and Miller 1992).



La proteína mutMp de *E. coli* es una DNA glicosilasa que reconoce primariamente la lesión GO y cataliza su escisión y subsiguiente degradación del azúcar, de tal forma que se remueve por completo del DNA (Michaels *et al.* 1992; Michaels and Miller 1992).

5

Una de los factores que más afectan la viabilidad de *Metarhizium* como agente de control biológico es la luz solar, específicamente la luz ultravioleta tipo A (UVA) que representa el 95% de la radiación que incide sobre la superficie de la tierra. A pesar de que existen varios trabajos sobre el empleo de conidias de *Metarhizium* para el control de insectos

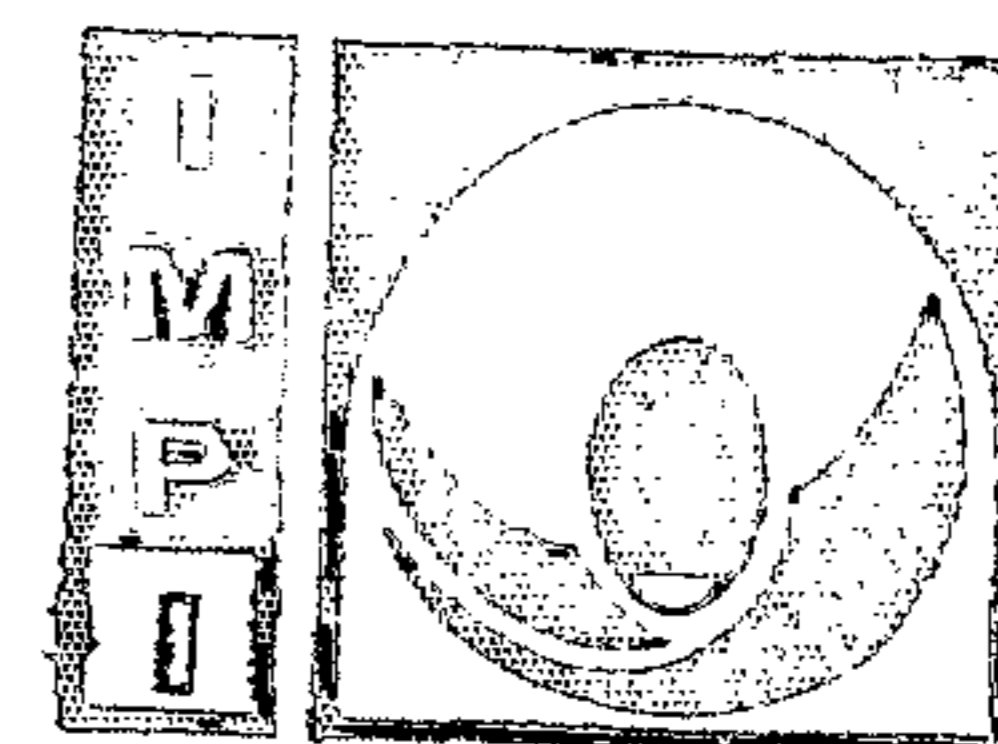
10

plaga en la agricultura (Patentes: A01N63/04, AU5476686, CN1542123, GB2380131, WO 2006/046067, WO 2003/038065, WO 2002/087344, WO 2000/064837, WO 1994/004034, WO 1993/024013, WO 1993/009672, WO 1992/003055, WO 1991/009527, WO 1990/010389, entre otras), ninguno de ellos se enfoca en la implementación de técnicas Genético - Moleculares para incrementar su persistencia en campo.

15

Una manera confiable y altamente eficiente de modificar estos organismos biocontroladores como *Metarhizium*, sin alterar características deseables en ellos, y que además permite hacerlo de una manera controlada, es la introducción de la característica deseable usando el segmento de información genética que lo codifica para transformar a dicho organismo.

20



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

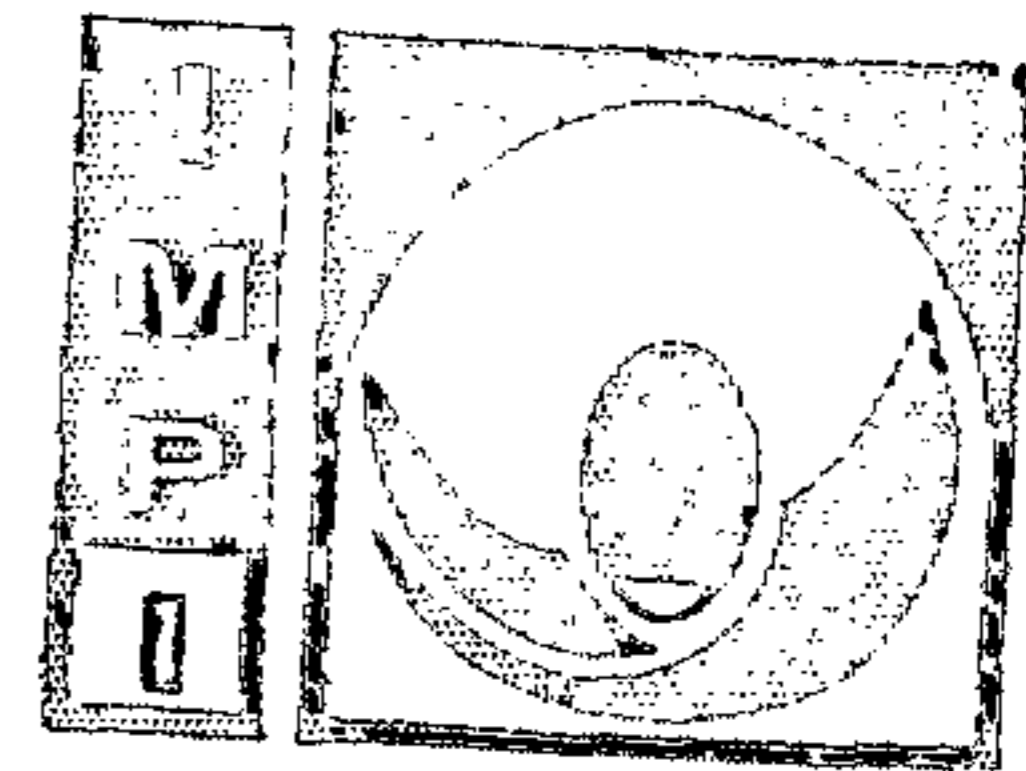
BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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 los dibujos que se acompañan, de los cuales:

10 La **Figura 1** muestra el mapa del plasmido **pGG241** que contiene los elementos necesarios para la selección de cepas transgénicas de *Metarhizium* con el gen *mutT* de *Escherichia coli*. Entre los que se incluyen los siguientes: “**amp**” representa el gen de resistencia a ampicilina, como marcador de selección en *E. coli*. “**cbx**” representa el gen de resistencia al fungicida carboxina. “**gpdpAp**” representa el promotor del gen *gpda* de *Aspergillus*
15 *nidulans*. “**trpC**” representa el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*. “**mutT**” representa el gen *mutT* de *Escherichia coli*., *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Nde*I, *Pst*I, *Sal*I, *Xba*I, *Xho*I, representan las posiciones de los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción respectivas presentes en el plásmido.

20

La **Figura 2** muestra el mapa del plasmido **pGG247** que contiene los elementos necesarios para la selección de cepas transgénicas de *Metarhizium* con el gen *mutM* de *E. coli*. Entre los que se incluyen los siguientes: “**amp**” representa el gen de resistencia a ampicilina,



como marcador de selección en *E. coli*. “**cbx**” representa el gen de resistencia al fungicida carboxina. “**gpdAp**” representa el promotor del gen *gpda* de *Aspergillus nidulans*. “**trpC**” representa el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*. “**mutM**” representa el gen *mutM* de *Escherichia coli*. *Bam*HI, *Bgl*II, *Bgl*III, *Nde*I, *Pst*I, *Sal*II, *Xba*I. representan las posiciones de los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción respectivas presentes en el plásmido.

La **Figura 3** muestra el mapa del plásmido **pGG250** que contiene los elementos necesarios para la selección de cepas transgénicas de *Metarhizium* con el gen *mutY* de *E. coli*. Entre los que se incluyen los siguientes: “**amp**” representa el gen de resistencia a ampicilina, como marcador de selección en *E. coli*. “**cbx**” representa el gen de resistencia al fungicida carboxina. “**gpdAp**” representa el promotor del gen *gpda* de *Aspergillus nidulans*. “**trpC**” representa el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*. “**mutY**” representa el gen *mutY* de *Escherichia coli*. *Bam*HI, *Eco*RI, *Nae*I, *Nco*I, *Nde*I, *Sal*II, *Xba*I representan las posiciones de los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción respectivas presentes en el plásmido.

La **Figura 4** muestra el mapa del plásmido **pGG268** que contiene los elementos necesarios para la selección de cepas transgénicas de *Metarhizium* con el gen *mutY* de *E. coli*. Entre los que se incluyen los siguientes: “**amp**” representa el gen de resistencia a ampicilina, como marcador de selección en *E. coli*. “**Higr**” representa el gen de resistencia al fungicida higromicina. “**gpdAp**” representa el promotor del gen *gpda* de *Aspergillus nidulans* “**trpC**” representa el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*. “**mutY**” representa el gen

