

TÍTULO DE PATENTE NO. 311248

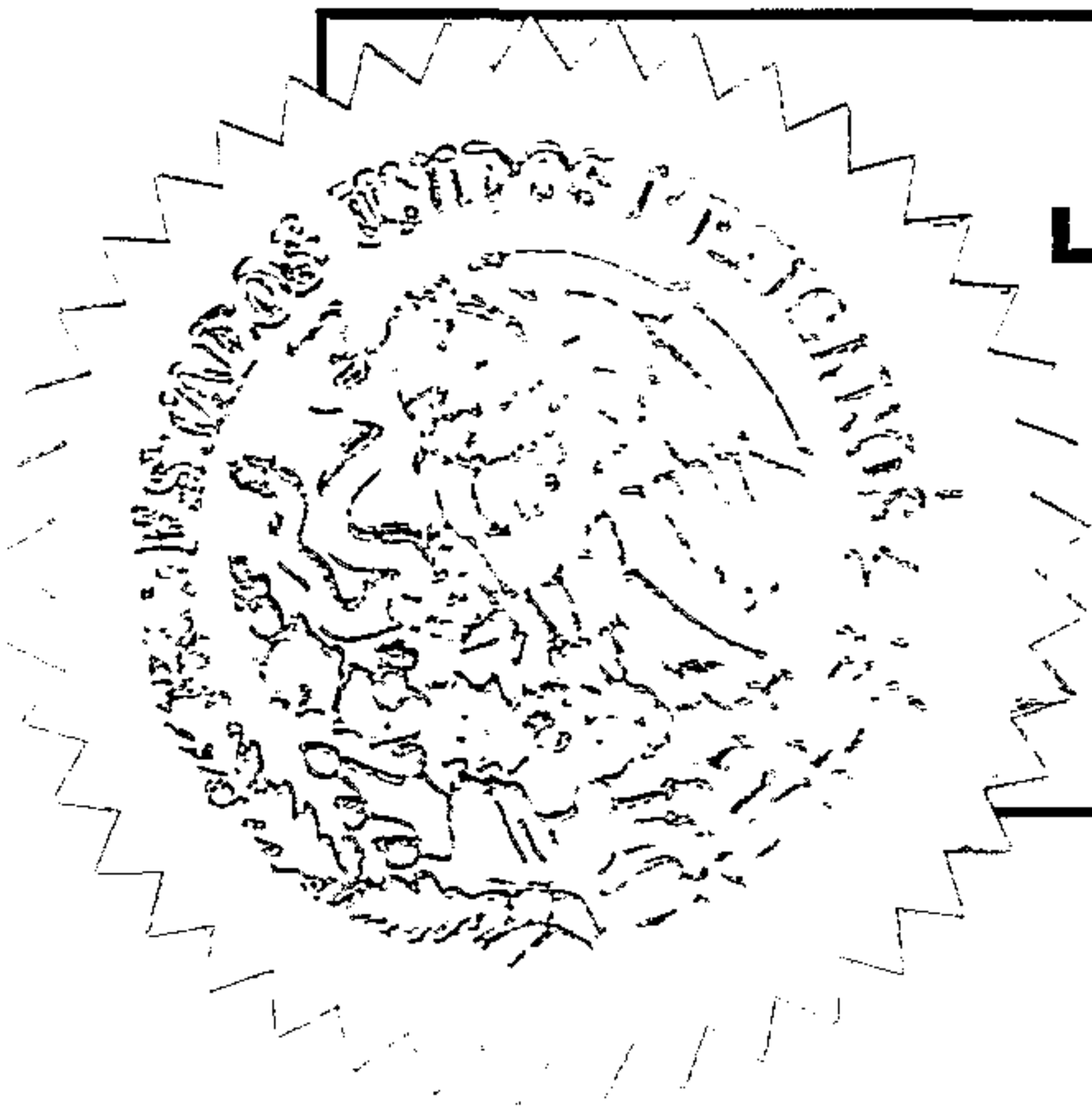
Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Domicilio: Lascuráin de Retana No. 5, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MEXICO.
Denominación: OBTENCION DE CEPAS MEJORADAS DE METARHIZIUM SPP. CON MAYOR RESISTENCIA A LA LUZ ULTRAVIOLETA
Clasificación: Int.CI.8: A01N25/00; C12N15/00; C12N15/04; C12N15/63
Inventor(es):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

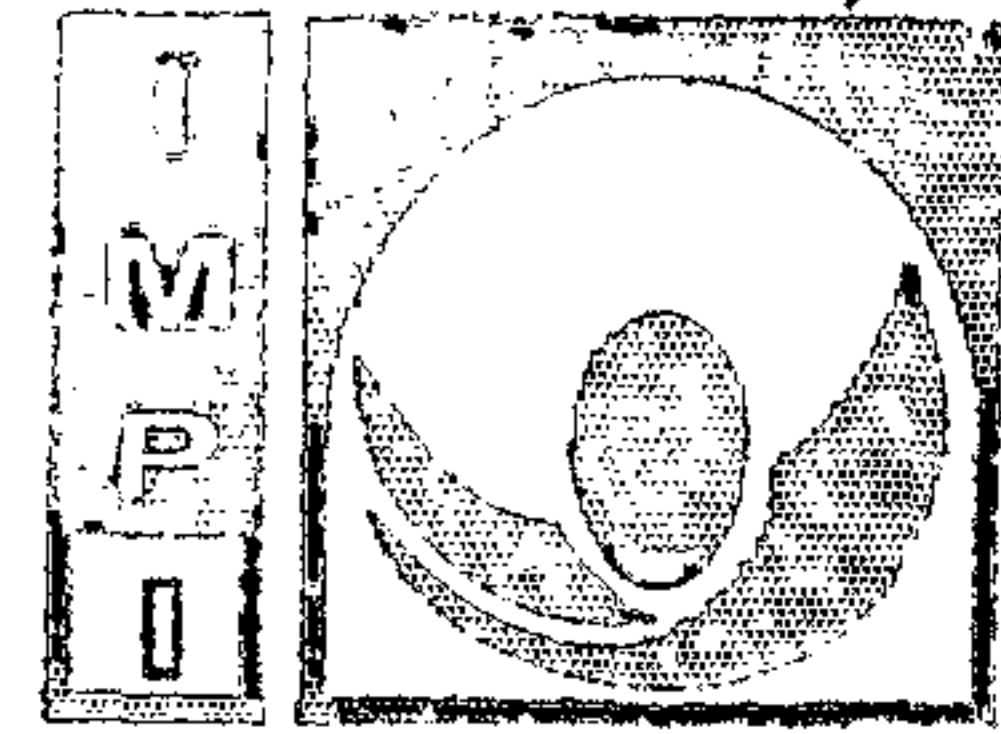
LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES



3/12/8
2006-2013

2007 / 15093



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

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

DESCRIPCIÓN

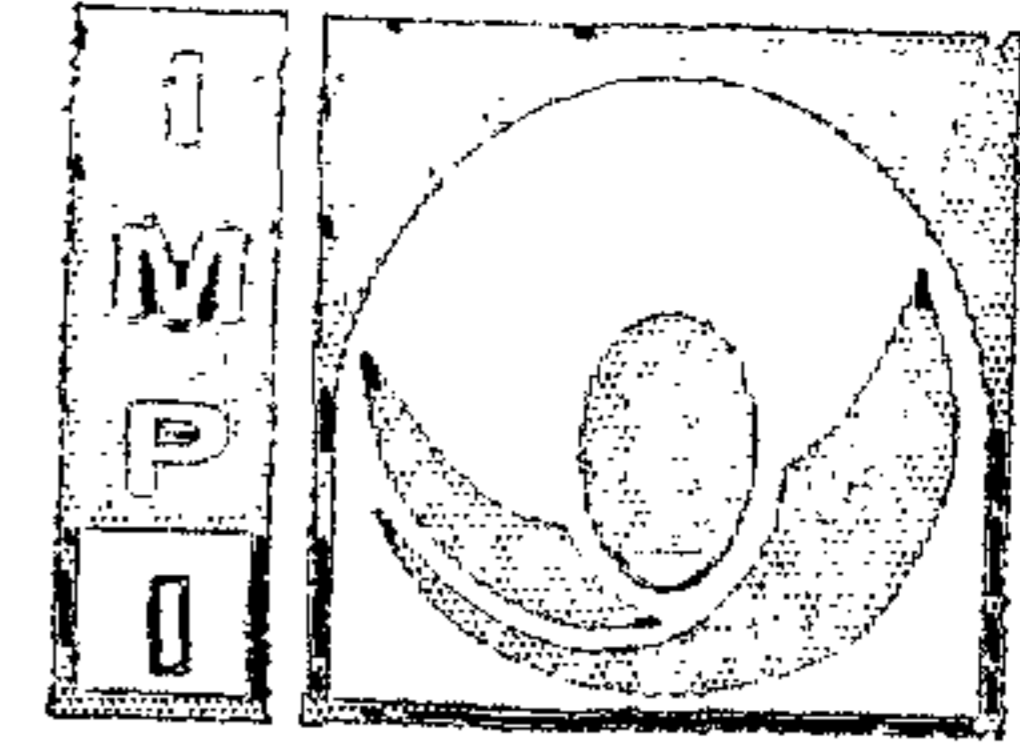
CAMPO DE LA INVENCION

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
15 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,
20 que emplee técnicas de DNA recombinante para producir organismos transgénicos que



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.

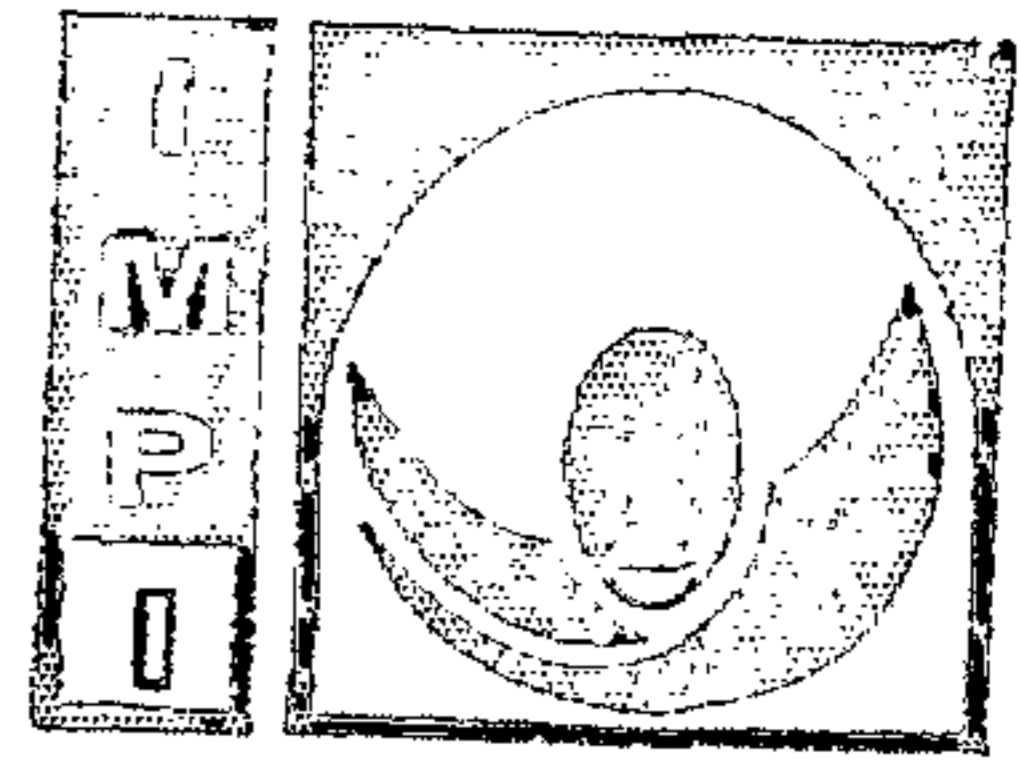
Es un objeto adicional de la presente invención, obtener una cepa transgénica de *Metarhizium anisopliae* CARO19, mejorada en su eficiencia de control biológico de insectos plaga.

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.

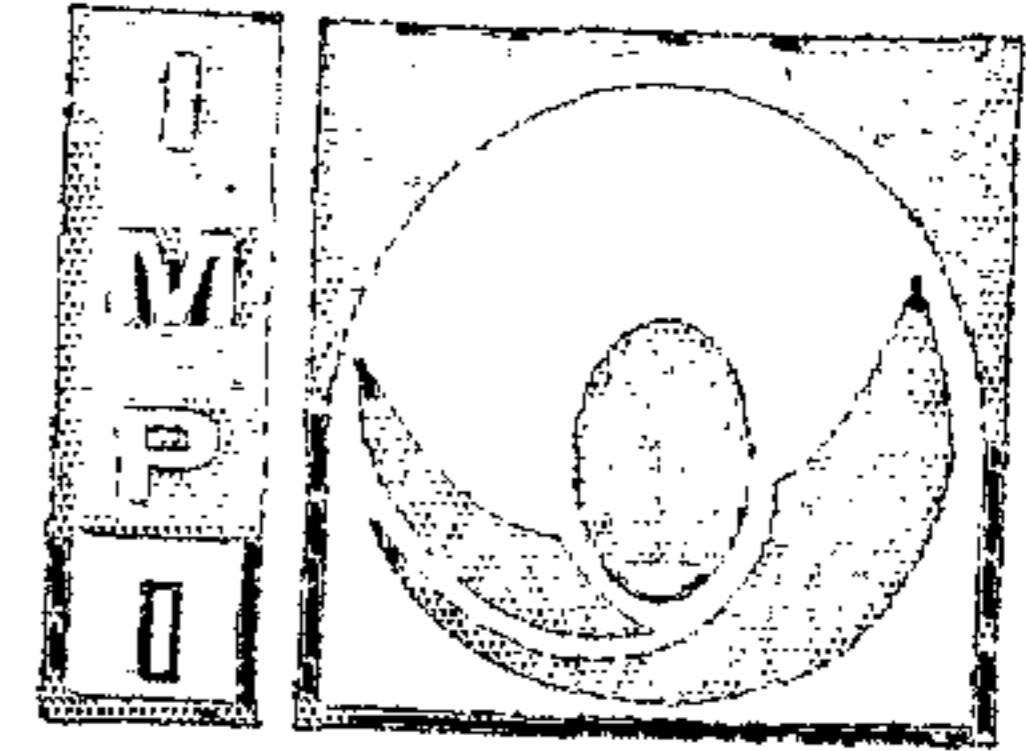
Una alternativa, para la que se ha buscado mayor utilización, es la aplicación de agentes existentes en la naturaleza, los cuales son enemigos naturales de los insectos plaga a controlar. El control microbiano de insectos se puede definir como la utilización dirigida y premeditada de organismos entomopatógenos 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.

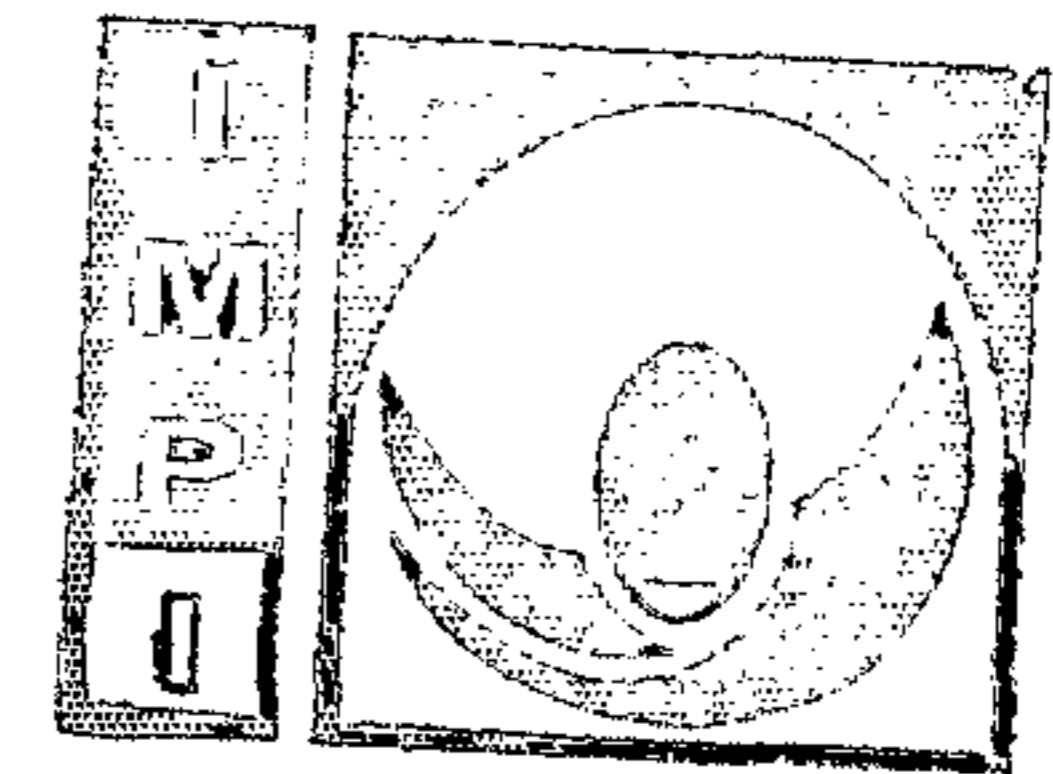
En los últimos años se han obtenido excelentes resultados con el uso de hongos entomopatógenos como factores de regulación de plagas agrícolas en distintas partes del mundo. Los hongos presentan ventajas, que los hacen únicos entre los organismos entomopatógenos, ya que más que destruir a su hospedero 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.

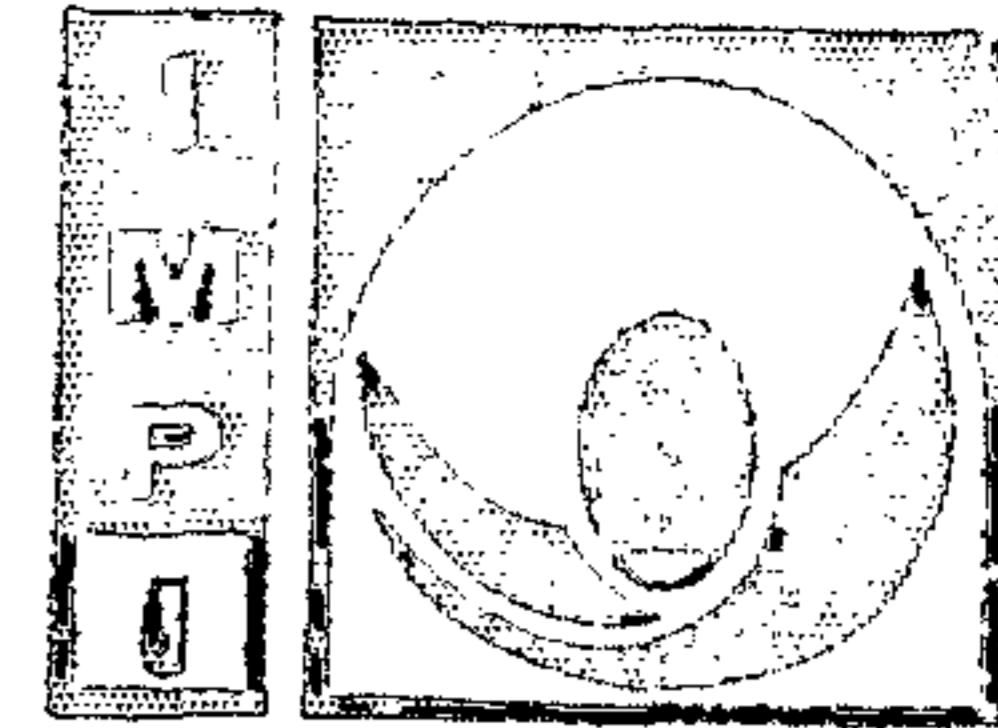
En campo, la persistencia de las conidias de *Metarhizium* y otros entomopatógenos es baja y uno de los factores mas agresivos es la luz solar, específicamente la luz UVA, ya que afecta gravemente su viabilidad (Ignoffo *et al.* 1977; Fargues *et al.* 1997; Braga *et al.* 2001a; Braga *et al.* 2001c; 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



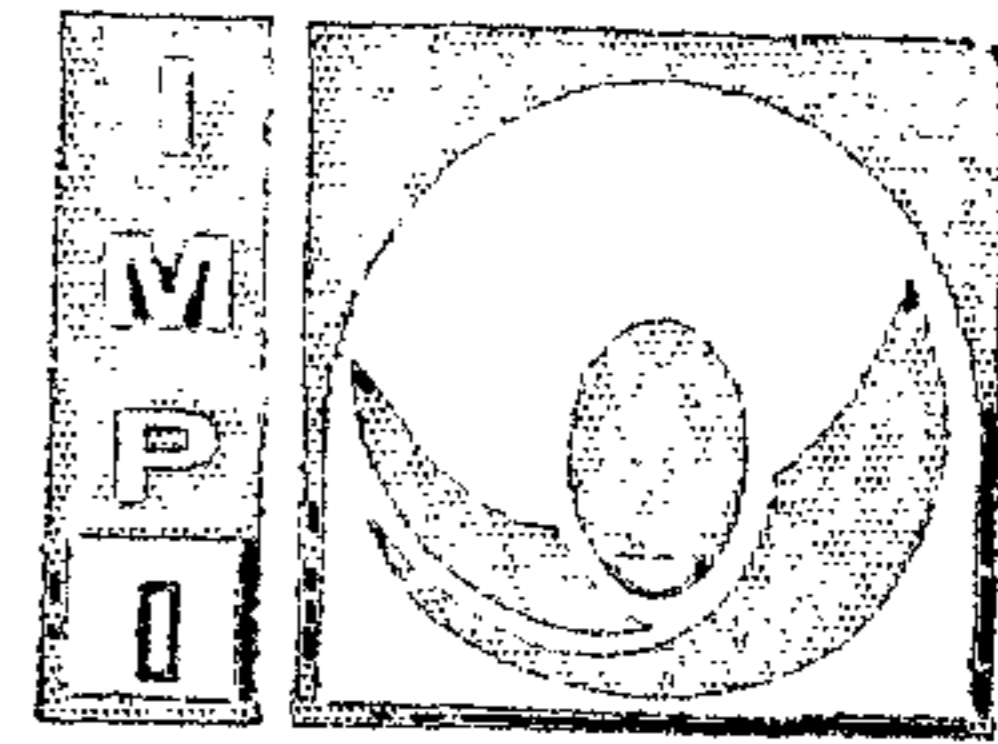
aparearse tanto con la citosina como con la adenina durante la síntesis del DNA. Consecuentemente, la 8-oxoguanina es una base altamente mutagénica.

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

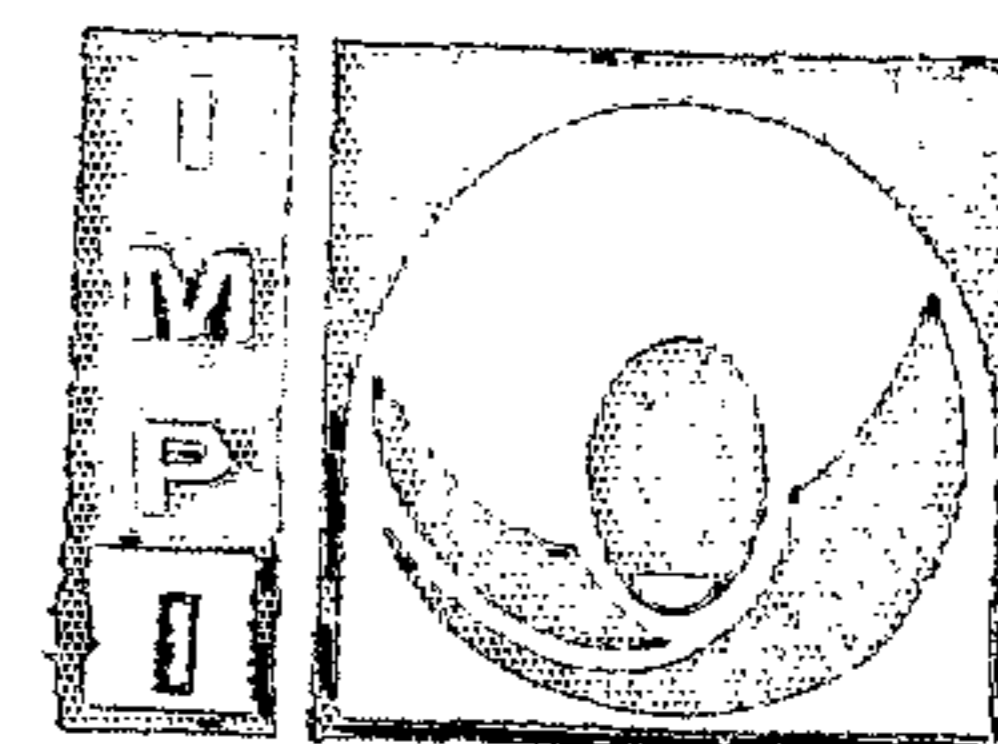
10

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

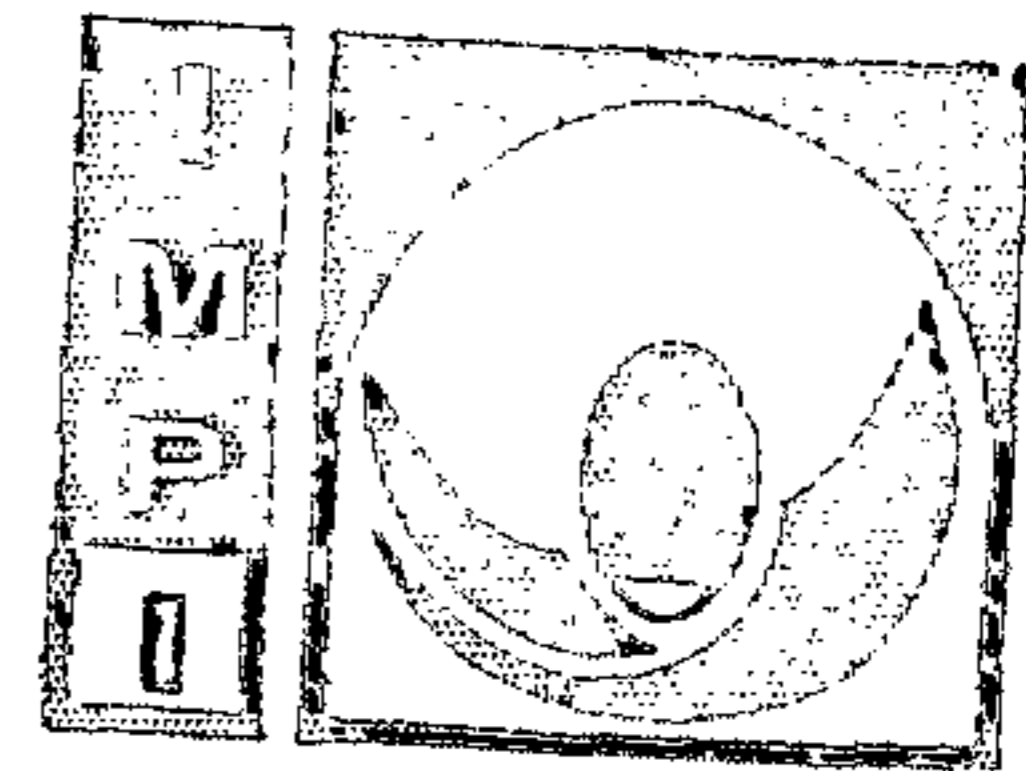
BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

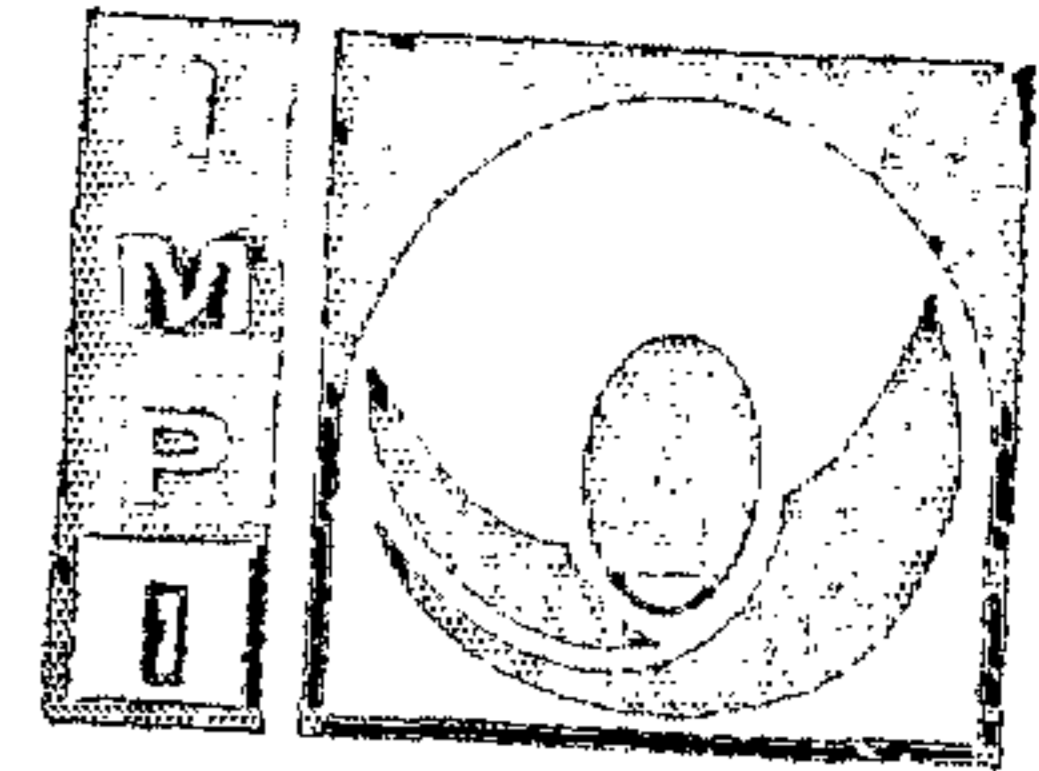
La **Figura 2** muestra el mapa del plasmido **pGG247** que contiene los elementos necesarios para la selección de cepas transgénicas de *Metarhizium* con el gen *mutM* de *E. coli*. Entre los que se incluyen los siguientes: “**amp**” representa el gen de resistencia a ampicilina,



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*I, *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*I, *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



mutY de *Escherichia coli*. *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Xba*I representan las posiciones de los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción respectivas presentes en el plásmido.

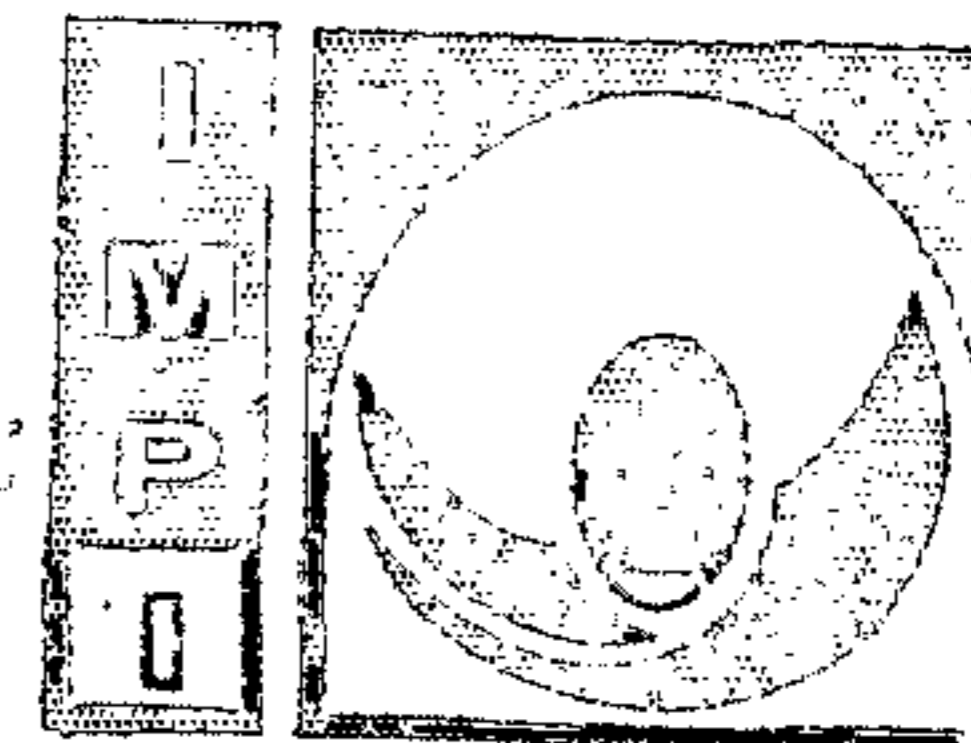
5

La **Figura 5** muestra el mapa del plásmido **pGG269** que contiene los elementos necesarios para la selección de cepas transgénicas de *Metarhizium* con el gen *mutY* de *E. coli*. Entre los que se encuentran los siguientes: “**amp**” representa el gen de resistencia a ampicilina, como marcador de selección en *E. coli*. “**glur**” representa el gen de resistencia al fungicida glufosinato. “**gpdAp**” representa el promotor del gen *gpda* de *Aspergillus 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, *Nco*I, *Xba*I representan las posiciones de los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción respectivas presentes en el plásmido.

15

La **Figura 6** muestra el mapa del plásmido **pGG270** que contiene los elementos necesarios para la selección de cepas transgénicas de *Metarhizium* con el gen *mutM* de *E. coli*. Entre los que se encuentran 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* “**mutM**” representa el gen *mutM* de *Escherichia coli*. *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Xba*I representan las posiciones

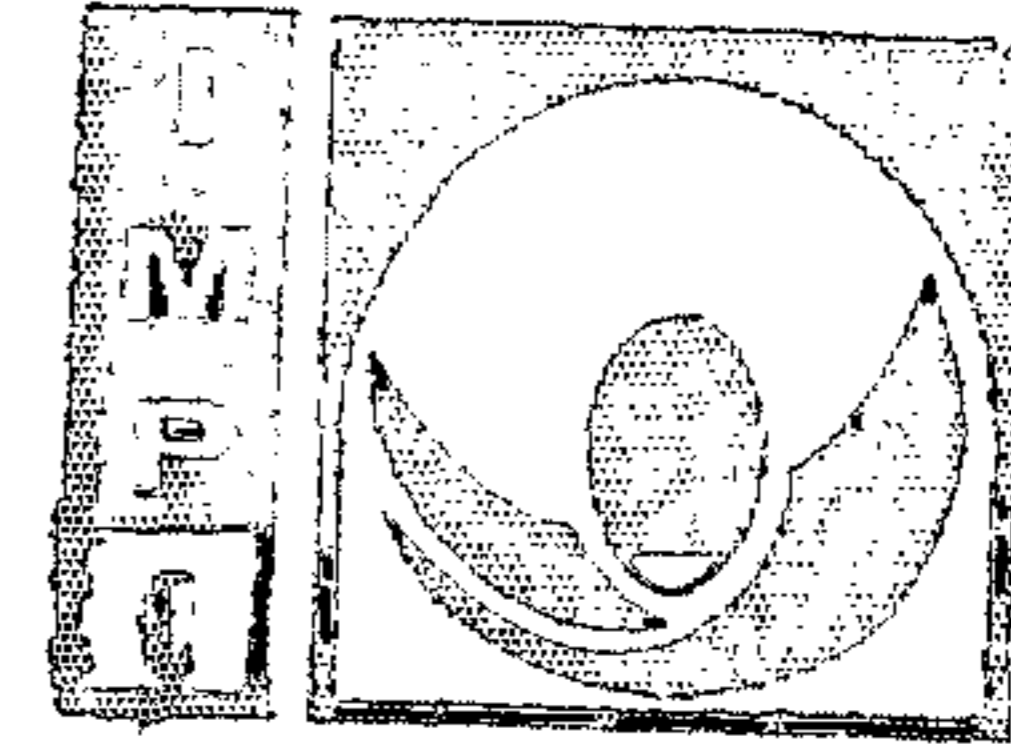
20



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

de los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción respectivas presentes en el plásmido.

La **Figura 7** muestra el porcentaje de supervivencia de las conidias de la cepa silvestre CARO19 y las cepas transgénicas de *Metarhizium* que sobreexpresan los genes *mut* de *E. coli*, al ser expuestas a luz UVA (320 – 400 nm) de 211.8 Kj/cKJ/m²/h por un total de 5 horas de irradiación, cuantificándose la viabilidad de las esporas, mediante la capacidad de germinar y formar colonias. Cepa silvestre (CARO19), cepas transgénicas de *M. anisopliae*, **C19mutM6** (transformada con el plásmido pGG247 que contiene el gen *mutM* de *E. coli*); **C19mutT3** (transformada con el plásmido pGG241 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*); **C19mutY6** (transformada con el plásmido pGG250 que contiene el gen *mutY* de *E. coli*); **C19mutY6M3** (transformada con el plásmido pGG250, que contiene el gen *mutY* *E. coli* y con el plásmido pGG270 que contiene el gen *mutM* de *E. coli*); **C19mutM6T3** (transformada con el plásmido pGG247, que contiene el gen *mutM* *E. coli* y con el plásmido pGG269 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*); **C19mutY6T11** (transformada con el plásmido pGG250, que contiene el gen *mutY* *E. coli* y con el plásmido pGG269 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*); **C19mutY6M3T23** (transformada con el plásmido pGG250 que contiene el gen *mutY* de *E. coli*, el plásmido pGG270 que contiene el gen *mutM* de *E. coli* y el plasmido pGG269 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*.



DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

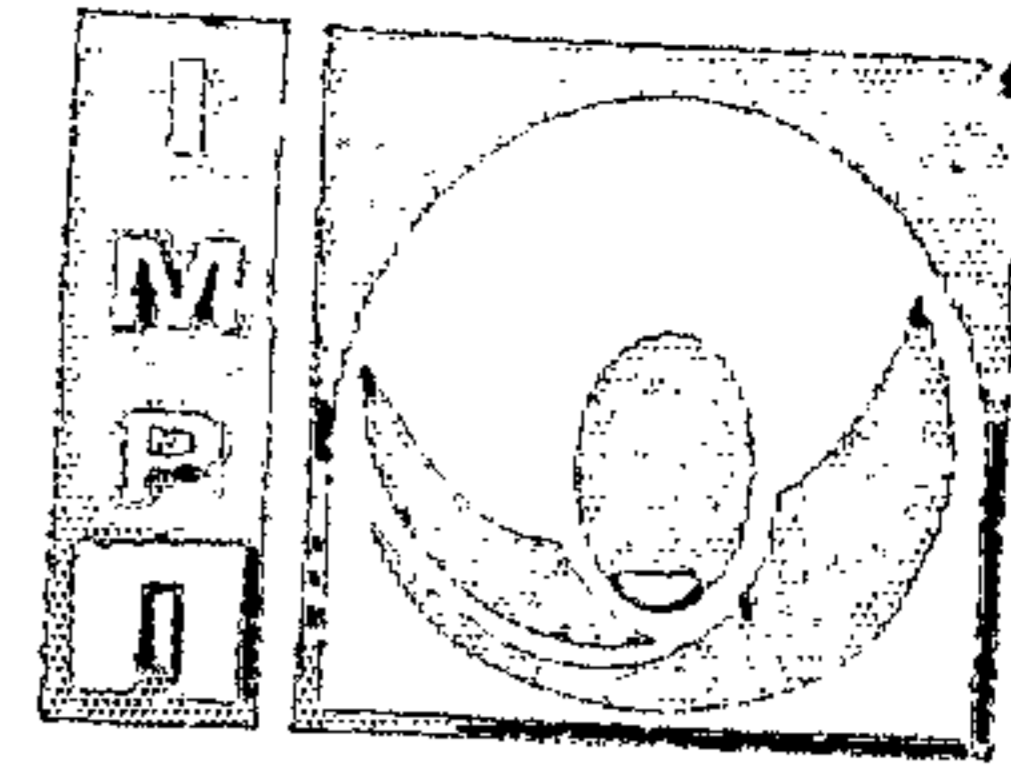
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

La invención se refiere a los métodos que permiten el mejoramiento de cepas de *Metarhizium* spp. así como las cepas obtenidas por este método, modificando de manera específica una de las características más importantes en el control biológico de insectos plaga, mediante la integración en su genoma de una secuencia específica de DNA.

El método de la presente invención, permite obtener cepas de *Metarhizium*, con una mayor resistencia al daño producido por la luz ultravioleta de tipo A, mediante la sobreexpresión de los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli*, cuya secuencia nucleotídica se muestra, de manera individual o en las distintas combinaciones de ellos.

Las proteínas *mutTp*, *mutYp* y *mutMp* de *E. coli* serán sobreexpresadas en el genoma de *Metarhizium* de manera constitutiva, en el caso particular se emplea el promotor del gen de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*gpdA*) y el terminador *trpC* de *Aspergillus nidulans*, ambos previamente empleados en *Metarhizium* de manera exitosa (St Leger *et al.* 1996), proporcionando al hongo la capacidad de resistir un mayor dosis de luz ultravioleta, lo cual redundará en un mayor tiempo de permanencia en campo, por lo tanto capaces de llevar a cabo un mejor control biológico.

Las proteínas *mutTp*, *mutYp* y *mutMp* de *E. coli* serán expresadas en todas las etapas del ciclo de vida del hongo, protegiéndolo del daño producido por la radiación solar en todas las etapas del proceso infeccioso a su hospedero.



Las construcciones de interés, se pueden introducir en el genoma de *Metarhizium* de manera directa mediante un plásmido, empleando como marcadores de selección los genes de resistencia a los fungicidas: **carboxina**, proveniente del hongo *Ustilago maydis* descrito por (Keon *et al.* 1991); **benomyl**, descrito previamente en *Metarhizium* (Bogo *et al.* 1996);

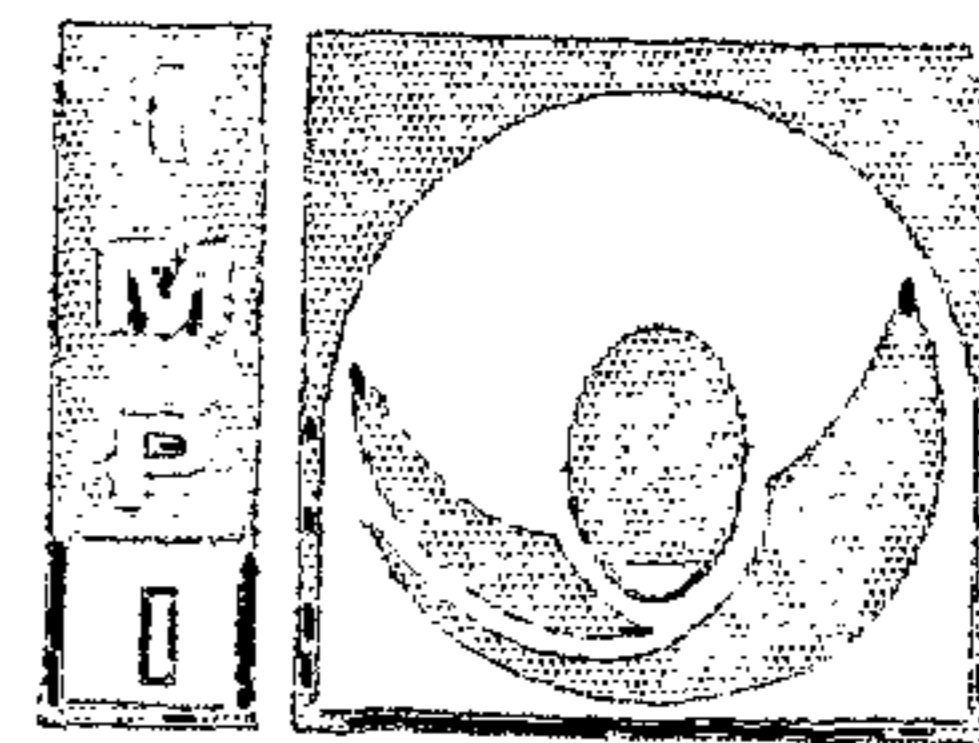
5 **higromicina**, previamente empleado en *Ustilago maydis* (Wang *et al.* 1988); y **glufosinato**, previamente empleado en *Metarhizium* (Inglis *et al.* 2000) para la selección de las cepas modificadas.

Las cepas modificadas, pueden ser seleccionadas después de la transformación, usando

10 secuencias de DNA que confiere 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 en *Metarhizium*.

15 Tal y como ya se mencionó, el método de la presente invención utiliza principalmente métodos de transformación directa con DNA que contienen los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *E.coli*. Sin embargo, puede utilizarse un método indirecto mediante el empleo de *Agrobacterium tumefaciens*, para la introducción de los genes en *Metarhizium*.

20 Entre los métodos de transformación directa que se pueden utilizar, se incluyen ente otros, la transformación mediada por PEG (polietilenglicol), la electroporación y la biobalística o bombardeo.



El método de transformación mediada por PEG, emplea protoplastos, siendo mediada por polietilen-glicol y cloruro de calcio.

En el método de electroporación puede emplearse electroporación de células osmóticamente sensibles o conidias del hongo.

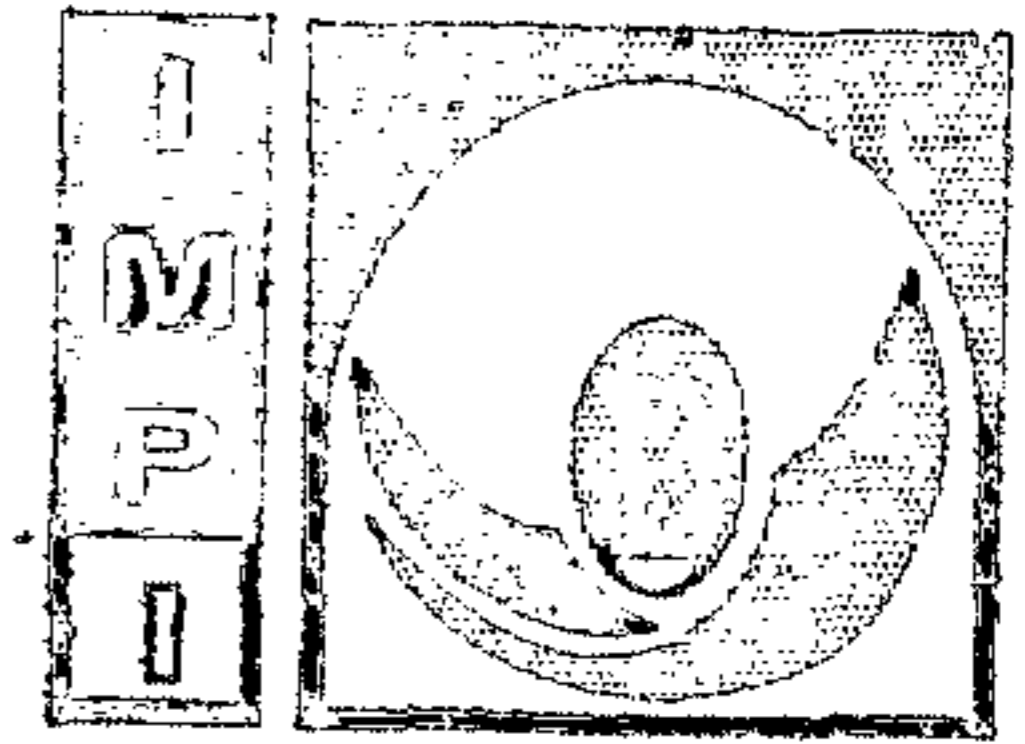
El método de biobalística o bombardeo puede ser bombardeo con partículas/biobalística sobre conidias del hongo, o bien sobre micelio, o bien sobre células osmóticamente sensibles.

10

En el método indirecto empleando *Agrobacterium tumefaciens*, se pueden utilizar las técnicas descritas por (Fang *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2007; Staats *et al.* 2007) para *Metarhizium*.

15 En una modalidad específica de la presente invención, el método para la obtención de cepas mejoradas de *Metarhizium* spp., en su capacidad de control biológico, emplea métodos de transformación directa con DNA de los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli*.

20 El método comprende básicamente transformar células de *Metarhizium* con el gen de interés, por transformación con un vector, en el cual se encuentran el gen de interés (*mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli*) y otras secuencias accesorias, en un plásmido que lleva las funciones necesarias para la selección de cepas transgénicas, para finalmente,



obtener células de *Metarhizium* transformadas, en las cuales ha sido integrado los genes de interés en su genoma.

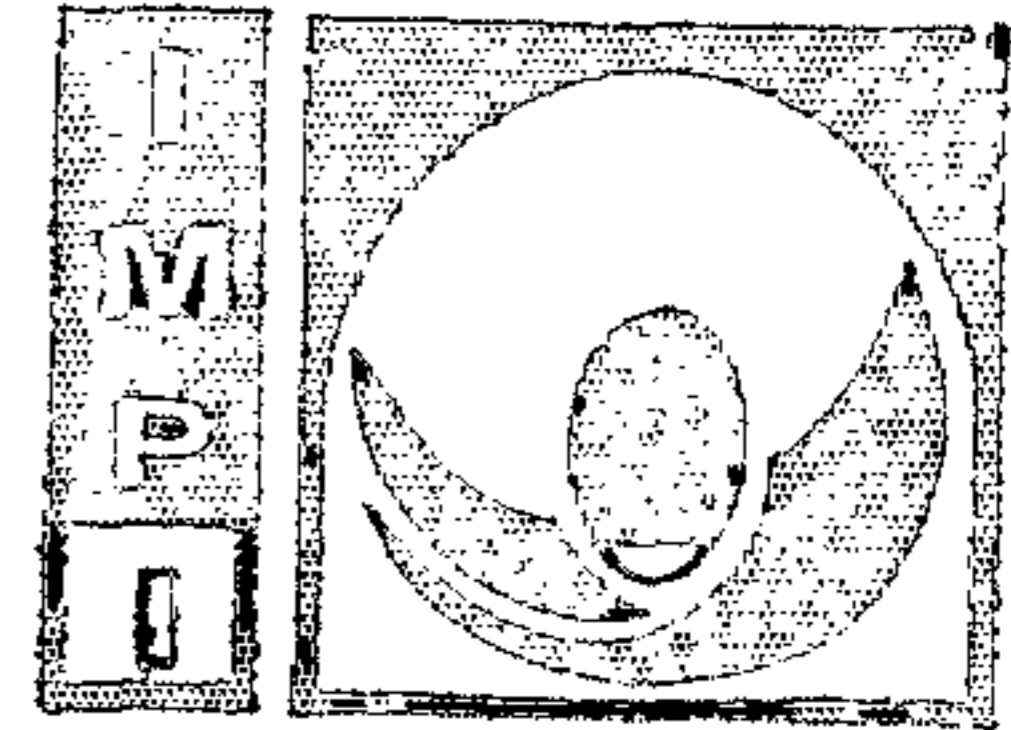
Las secuencias de ácido nucleico empleadas para la selección, pueden contener un gen
5 marcador funcional en *Metarhizium*, o bien, dentro de las secuencias de ácido nucleico
empleadas, se puede encontrar una molécula de DNA recombinante que codifica ya sea
para resistencia a antibióticos, para resistencia a un herbicida, para resistencia a un
fungicida, para complementación de una auxotrofia, o bien, que codifica para un gen
reportero.

10

El plásmido vehículo de la secuencia de interés, puede ser una molécula que incluye un
plásmido capaz de replicarse en *Escherichia coli*, conteniendo un marcador de resistencia a
antibióticos; y, una molécula de DNA recombinante que comprende: una secuencia o
15 secuencias promotoras que funcionan en *Metarhizium*, para la producción de una secuencia
o más de RNA; secuencias estructurales de DNA que conllevan a la producción de
secuencias de RNA que codifican para los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli*
y para el marcador de selección; y, una secuencia o secuencias 3' de DNA que funciona(n)
en *Metarhizium*, dando lugar a la terminación de la transcripción y a la adición de
secuencias poliadeniladas al extremo 3' de la(s) secuencia(s) correspondiente(s) de RNA.

20

La secuencia de interés, también puede ser una molécula que incluye una molécula de DNA
recombinante que comprende: una secuencia promotora proveniente de otro organismo o
del mismo *Metarhizium* que funciona en *Metarhizium* para la producción de una secuencia



de RNA; secuencias estructurales de DNA que conllevan a la producción de secuencias de RNA que codifican para la proteínas *MutTp*, *MutMp* y/o *MutYp* de *Escherichia coli* en la 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 correspondiente de RNA.

La cepa que se obtienen con el método de la presente invención, es la cepa transgénica de *Metarhizium*, mejorada en su eficiencia de control biológico contra insectos plaga en la agricultura, producida por medio de introducción de copias múltiples de los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli* integradas de manera estable en su genoma.

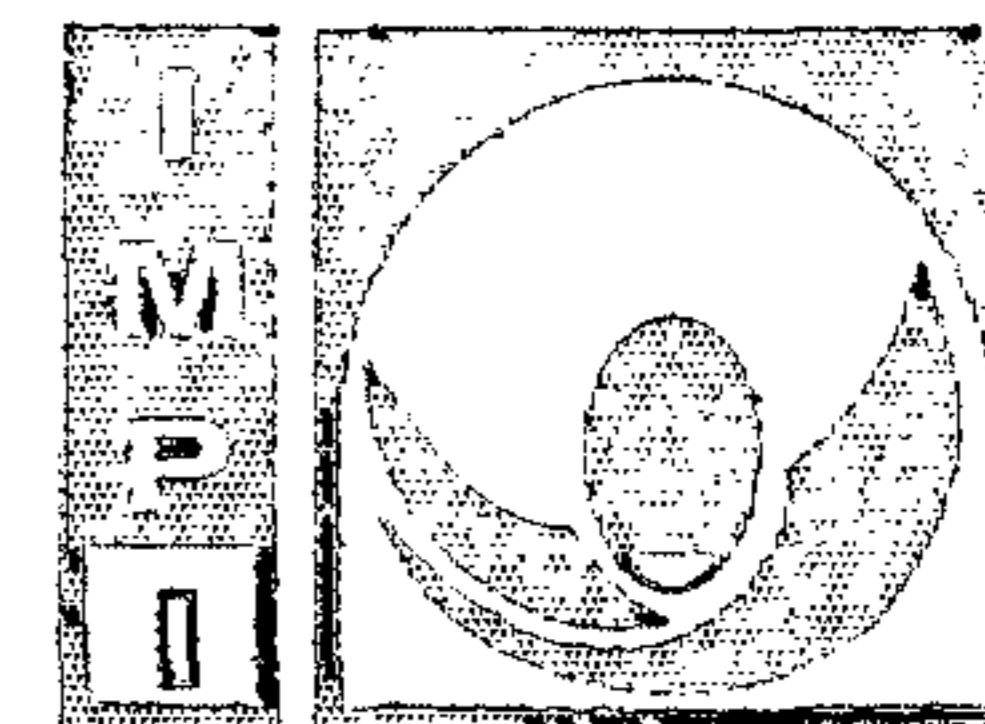
Estas cepas son capaces de producir RNA y proteína de los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli* en *Metarhizium* y consecuentemente siendo más resistente al daño producido por la luz ultravioleta de tipo A.

15

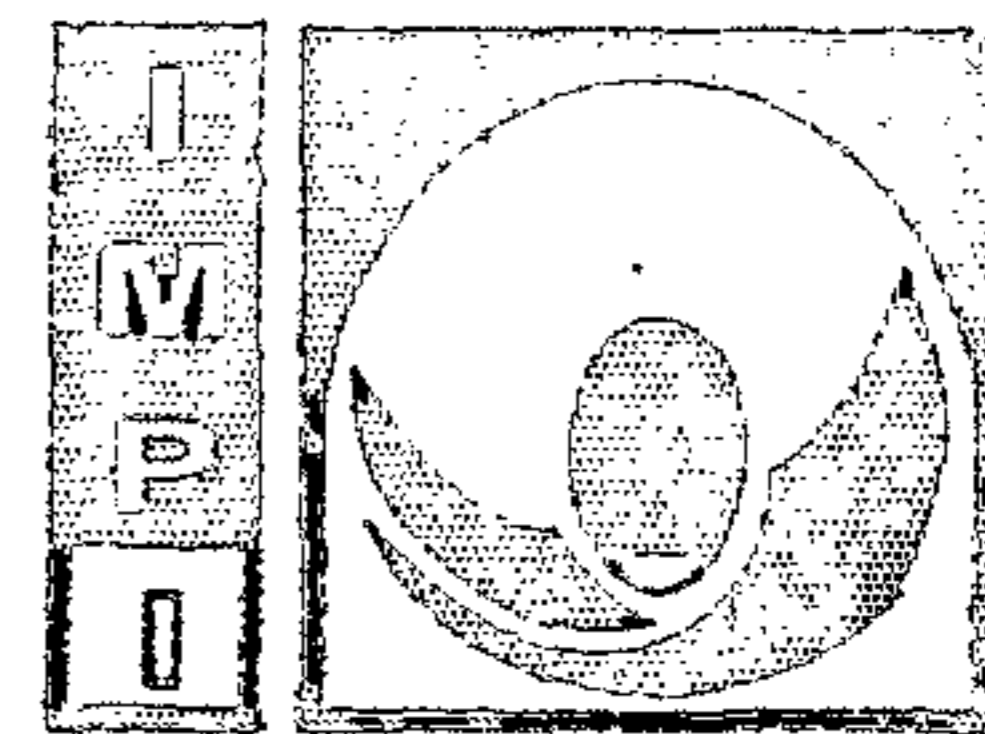
EJEMPLO

Usando una de las posibles variantes de los métodos descritos en esta invención, se han generado cepas de *Metarhizium anisopliae* cepa CARO19 con una mayor capacidad de resistir al daño producido por la luz ultravioleta de tipo A. Brevemente, la experiencia consistió en la formación de protoplastos empleando una modificación de la técnica descrita por (Goettel *et al.* 1990), los cuales fueron transformados mediante la técnica de PEG-CaCl₂, empleando los plásmidos pGG241 (que contiene el gen *mutT* de *E.coli*),

20

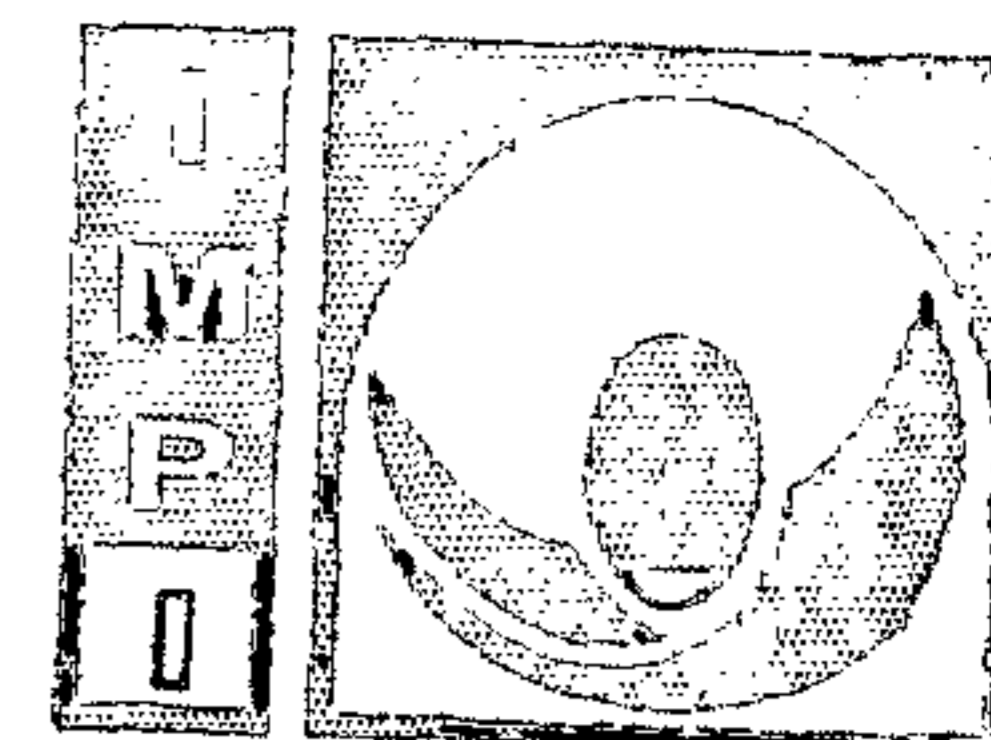


- (Figura 1); pGG247 (que contiene el gen *mutM* de *E.coli*), (Figura 2) pGG250 (que contiene el gen *mutY* de *E.coli*), (Figura 3); pGG268 (que contiene el gen *mutY* de *E.coli*), (Figura 4); pGG269 (que contiene el gen *mutT* de *E.coli*), (Figura 5); pGG270 (que contiene el gen *mutM* de *E.coli*), (Figura 6). Donde los plásmidos: pGG241, pGG247, pGG250, pGG268, pGG269 y pGG270, contienen toda la información necesaria para la expresión de los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *E. coli* respectivamente en *Metarhizium*. Además, contienen los elementos necesarios para seleccionar a las cepas transgénicas mediante la resistencia a los fungicidas: carboxina, glufosinato y/o higromicina.
- 10 Se seleccionaron una serie de transformantes con cada uno de los plásmidos que contienen múltiples copias de los genes *mut* de *E.coli* en su genoma, células de cada una de éstas cepas transgénicas y de la cepa silvestre fueron usadas en experimentos de sensibilidad producida por la luz UVA, como se describe a continuación:
- 15 Para analizar el efecto de la Luz ultravioleta de tipo A (UVA, 320 – 400 nm) sobre las conidias de las cepas transgénicas y la cepa silvestre de *Metarhizium anisopliae*, se inocularon por cuadruplicado, 500 esporas por caja de cada una de las cepa en placas de medio Dextrosa-Sabouraud con ampicilina y TritonX-100 al 0.01%. Como control negativo, 2 de las placas se envolvieron con papel aluminio (para que no reciban radiación)
- 20 y todas se sometieron a un radiación de luz UVA (320 – 400 nm) de 211.8 Kj/cm²/h en una cámara “CL-1000 Ultraviolet crosslinker” (UVP), por períodos de 10 minutos de irradiación y 10 minutos de no irradiación, hasta completar un total de 5 horas de irradiación. Las placas se incubaron a 28° en un incubador marca “Lab-Line” de



temperatura controlada durante 5 días, cuantificándose la viabilidad de las esporas, mediante la capacidad de germinar y formar colonias. Los experimentos se realizaron al menos tres veces por duplicado de manera independiente.

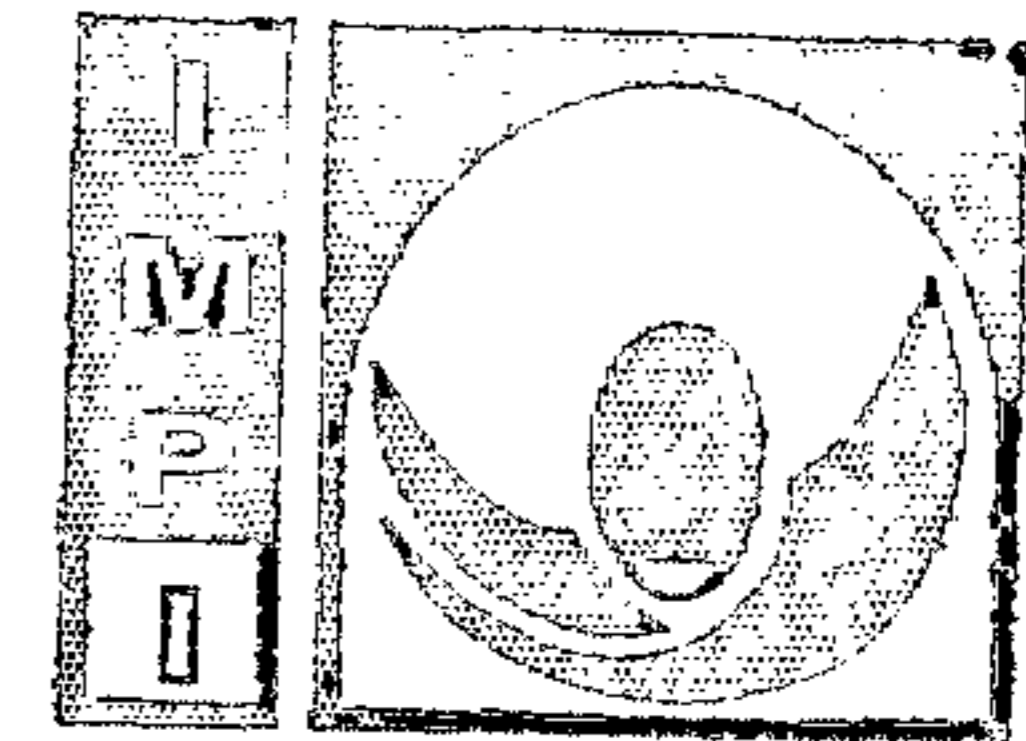
- 5 En la Figura 7 se muestran los resultados de la viabilidad de las esporas de la cepa silvestre (CARO19) y las cepas transgénicas de *M. anisopliae*, **C19mutM6** (transformada con el plásmido pGG247 que contiene el gen *mutM* de *E. coli*); **C19mutT3** (transformada con el plásmido pGG241 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*); **C19mutY6** (transformada con el plásmido pGG250 que contiene el gen *mutY* de *E. coli*); **C19mutY6M3** (transformada con el plásmido pGG250, que contiene el gen *mutY* *E. coli* y con el plásmido pGG270 que contiene el gen *mutM* de *E. coli*); **C19mutM6T3** (transformada con el plásmido pGG247, que contiene el gen *mutM* *E. coli* y con el plásmido pGG269 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*); **C19mutY6T11** (transformada con el plásmido pGG250, que contiene el gen *mutY* *E. coli* y con el plásmido pGG269 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*); **C19mutY6M3T23** (transformada con el plásmido pGG250 que contiene el gen *mutY* de *E. coli*, el plásmido pGG270 que contiene el gen *mutM* de *E. coli* y el plásmido pGG269 que contiene el gen *mutT* de *E. coli*). En todos los casos la viabilidad de los conidios de las cepas transgénicas es mayor que la de la cepa silvestre CARO19, demostrando que la sobreexpresión de los genes *mut* de *E.coli* protegen a *Metarhizium* del daño producido por la luz ultravioleta de tipo A.
- 10
- 15
- 20



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

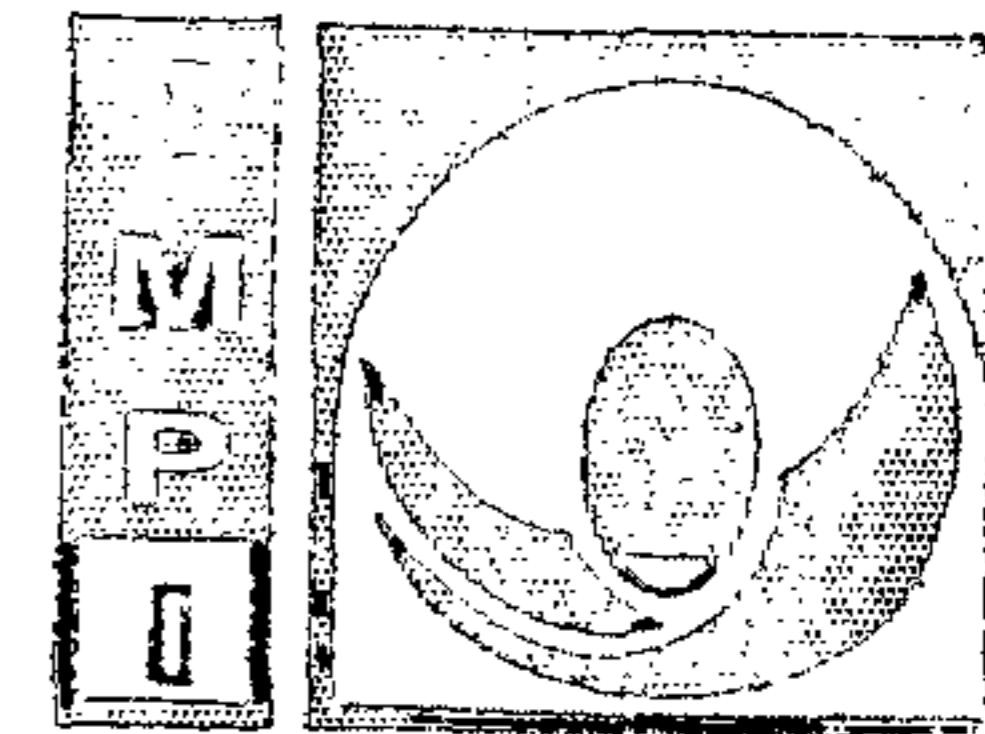
BIBLIOGRAFIA

- Badii MH, Flores EA, Galan LJ (2000) Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico. *Industria*
Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico
- 5 Bogo MR, Vainstein MH, Aragao FJ, Rech E, Schrank A (1996) High frequency gene conversion
among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium*
anisopliae. FEMS Microbiol Lett 142:123-127
- Braga GU, Flint SD, Messias CL, Anderson AJ, Roberts DW (2001a) Effects of UVB irradiance on
conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a
study of reciprocity and recovery. Photochem Photobiol 73:140-146
- 10 Braga GU, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, Roberts DW (2001b) Both solar UVA and UVB
radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus
Metarhizium anisopliae. Photochem Photobiol 74:734-739
- Braga GU, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, Roberts DW (2001c) Variability in response to UV-B
among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 degrees
15 N to 54 degrees S. J Invertebr Pathol 78:98-108
- Duarte RT, Staats CC, Fungaro MH, Schrank A, Vainsten MH, Furlaneto-Maia L, Nakamura CV, de
Souza W, Furlaneto MC (2007) Development of a simple and rapid *Agrobacterium*
tumefaciens-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium*
anisopliae var. *acidum*. Lett Appl Microbiol 44:248-254
- 20 Fang W, Pei Y, Bidochka MJ (2006) Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by
Agrobacterium tumefaciens. Can J Microbiol 52:623-626
- Fargues J, Rougier M, Goujet R, Smits N, Coustere C, Itier B (1997) Inactivation of conidia of
Paecilomyces fumosoroseus by near- ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. J
Invertebr Pathol 69:70-78
- 25 Fowler RG, White SJ, Koyama C, Moore SC, Dunn RL, Schaaper RM (2003) Interactions among
the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways. DNA Repair
(Amst) 2:159-173



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

- Fuxa JR (1987) Ecological considerations for the use of entomopathogens in IMP. *Annu Rev Mexicano de Entomol* 32:225-251
- Goettel MS, St. Leger RJS, Bhairi S, Jung MK, Oakley BR, Roberts DW, Staples RC (1990) Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed by benomyl resistance. *Current Genetics* 17:129-132
- 5 Ignoffo CM, Hostetter DL, Sikorowski PP, Sutter G, Brooks WM (1977) Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. *Environmental Entomology* 6:411-415
- Inglis PW, Aragao FJ, Frazao H, Magalhaes BP, Valadares-Inglis MC (2000) Biolistic co-
10 transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiol Lett* 191:249-254
- Keon JP, White GA, Hargreaves JA (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* 19:475-481
- 15 McCoy CW (1990) Entomogenous fungi as microbial pesticides. In: *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Diseases*, pp 139-159
- McCoy CW, Samms RA, Boucias DG (1988) In: Ignoffo CM (ed) *CRC Handbook of Natural Pesticides*. CRC Press Inc, New York, p 151
- Michaels ML, Cruz C, Grollman AP, Miller JH (1992) Evidence that MutY and MutM combine to
20 prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7022-7025
- Michaels ML, Miller JH (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* 174:6321-6325
- 25 St Leger R, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6349-6354



Staats CC, Junges A, Fitarelli M, Furlaneto MC, Vainstein MH, Schrank A (2007) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*

Appl Microbiol Biotechnol

Wang J, Holden DW, Leong SA (1988) Gene transfer system for the phytopathogenic fungus

5 *Ustilago maydis*. Proc Natl Acad Sci U S A 85:865-869.

A01N63/04. Uso Combinado de productos químicos y Microbianos para controlar las cucarachas. Bayer Corporation. 07/12/1994.

AU5476686. A BIOCIDAL COMPOSITION OF METARHIZIUM ANISOPLIAE

10 AND/OR BEAUFERIA BASSIANA FUNGI. PINNOCK D E; UNIV ADELAIDE;
COLES R B .18/09/1986.

CN1542123. *Metarhizium anisopliae*. CHONGQING UNIVERSITY.03/11/2004.

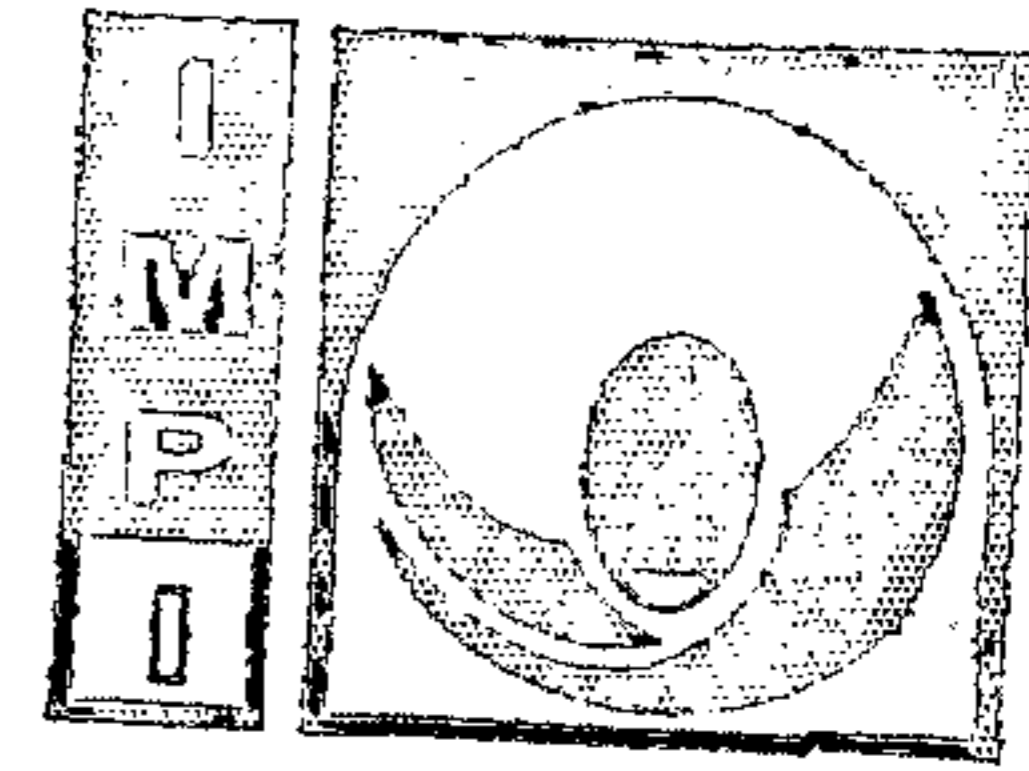
GB2380131. Method of controlling rhinoceros beetle, using *Metarhizium anisopliae* formulated in nutrient-supplemented pellets consisting mycelia. MALAYSIAN

15 PALM OIL BOARD. 02/04/2003

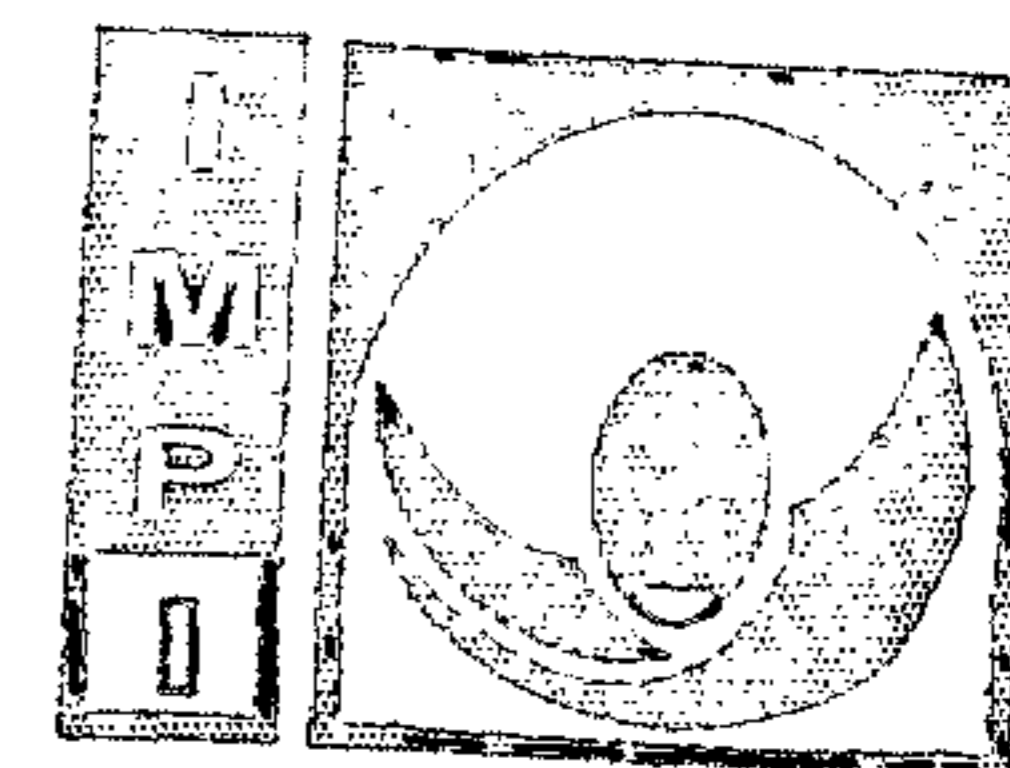
(WO 2006/046067). Biological Control of Insect Pests. Internacional Pheromone Systems Limited. 04/05/2006.

(WO 2003/038065). The novel *Metarhizium* genus microorganism and the method for controlling the soil pest using the same. Korea Research Institute of Bioscience and
20 Biotechnology. 08/05/2003.

(WO 2002/087344). Biological Control of Soil Dwelling pest. UWS Ventures Limited.
29/04/2002.



- WO 2000/064837). Inorganic Fertilizer containing a filamentous fungus, for feeding and protecting plants. Lovochemie. A.S. 02/11/2000.
- (WO 1994/004034). Biological Control of Termites. Ecoscience Corporation. 29/07/1993.
- WO 1993/024013. Method for storing fungal culture and conidia. Ecoscience Corporation. 09/12/1993.
- 5
- WO 1993/009672. Insect Pest Control. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 27/05/1993.
- WO 1992/003055. Method and Device for the Biological Control of Insects. Ecoscience Corporation. 05/03/1992.
- 10
- WO 1991/009527. Insect Pathogenic Method. Kemira Oy Hokkanen, Heikki. 11/07/1991
- WO 1990/010389. PROCEDE ET DISPOSITIF INSECTICIDES BIOLOGIQUES.
Ecoscience Laboratories Inc. 20/09/1990.

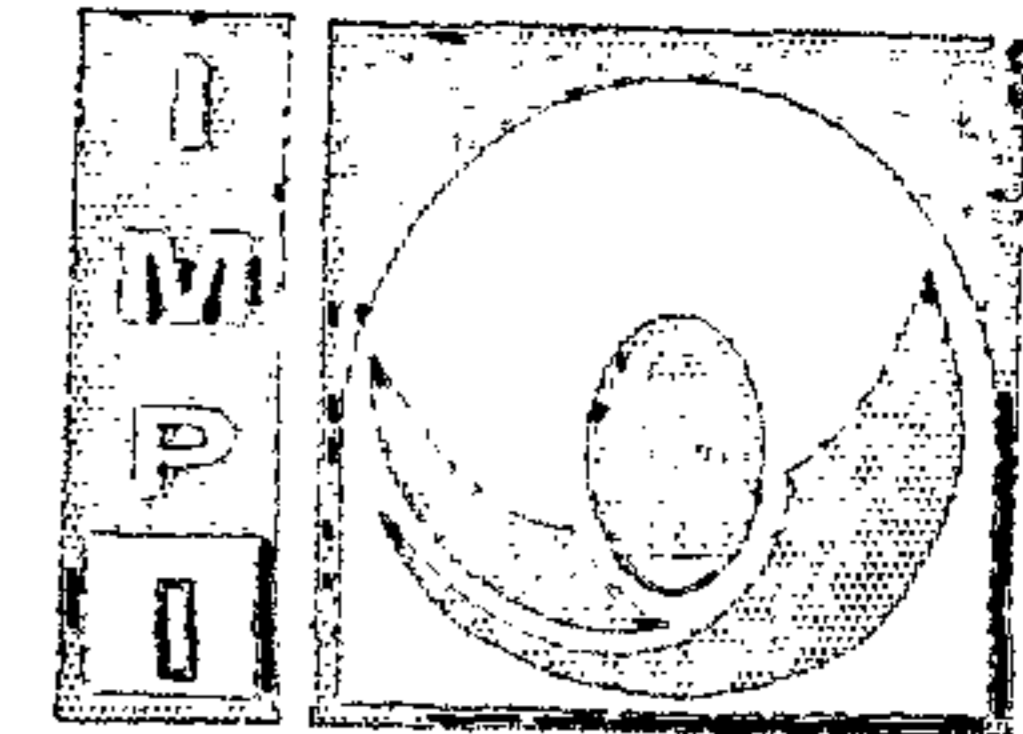


Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

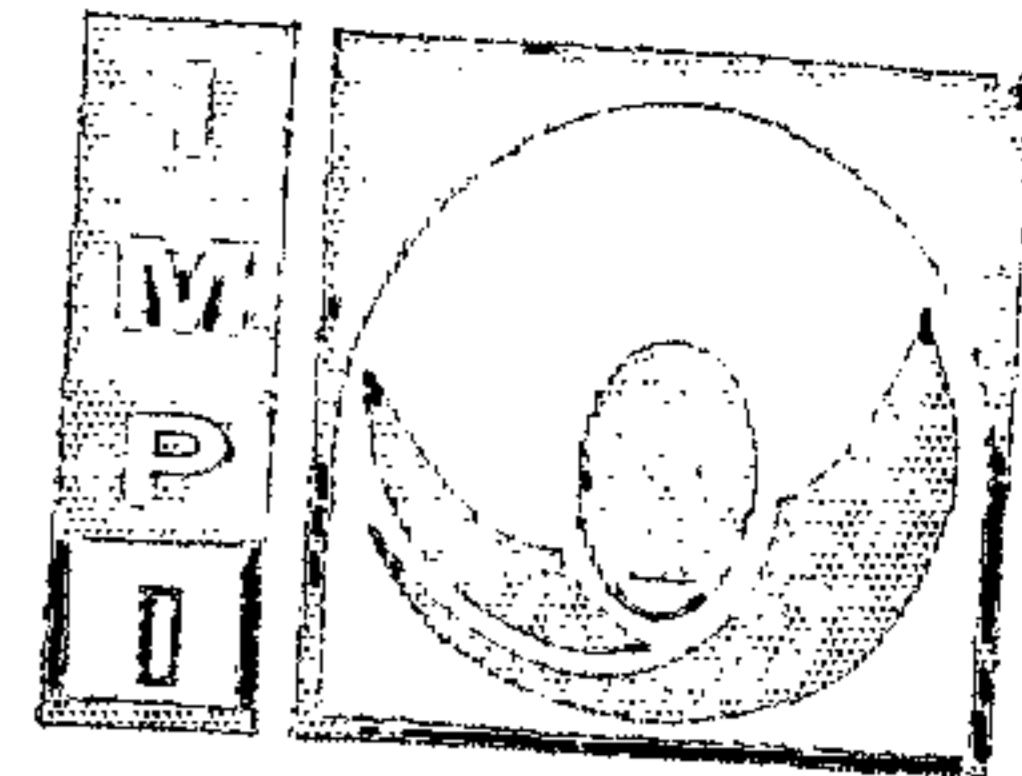
REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto
5 reclamo como mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

1. Una cepa de *Metarhizium anisopliae* modificada genéticamente con mayor
resistencia al daño producido por la luz ultravioleta tipo A en comparación que la
10 de la cepa silvestre, caracterizada porque sobreexpresa de manera estable en su
genoma, de manera individual o combinada la secuencia nucleotídica del gen
mutT, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli*, donde la sobreexpresión se obtiene por
transformación del organismo.
2. La cepa de conformidad con las reivindicacion 1 y caracterizada además porque
15 el vector es un plásmido seleccionado de al menos uno de los siguientes
plásmidos: pGG241, pGG247, pGG250, pGG268, pGG269 o pGG270.
3. La cepa de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es la
cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el
número de acceso CECT-20707.
- 20 4. La cepa de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es la
cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el
número de acceso CECT-20708.



5. La cepa de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es la cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT-20709.
- 5 6. La cepa de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es la cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT-20710.
7. La cepa de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es la cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT-20711.
- 10 8. La cepa de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es la cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT-20712.
- 15 9. La cepa de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es la cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT-20713.
- 20 10. Un método para la obtención de una cepa de *Metarhizium anisopliae* modificada genéticamente según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende los pasos: a) transformar células de una cepa silvestre de *Metarhizium anisopliae* con un vector seleccionado de al menos uno de los siguientes plásmidos: pGG241, pGG247, pGG250, pGG268, pGG269 o pGG270; y (b) seleccionar las células transformadas de *Metarhizium anisopliae* que sobreexpresan de manera estable en su genoma, de manera individual o combinada



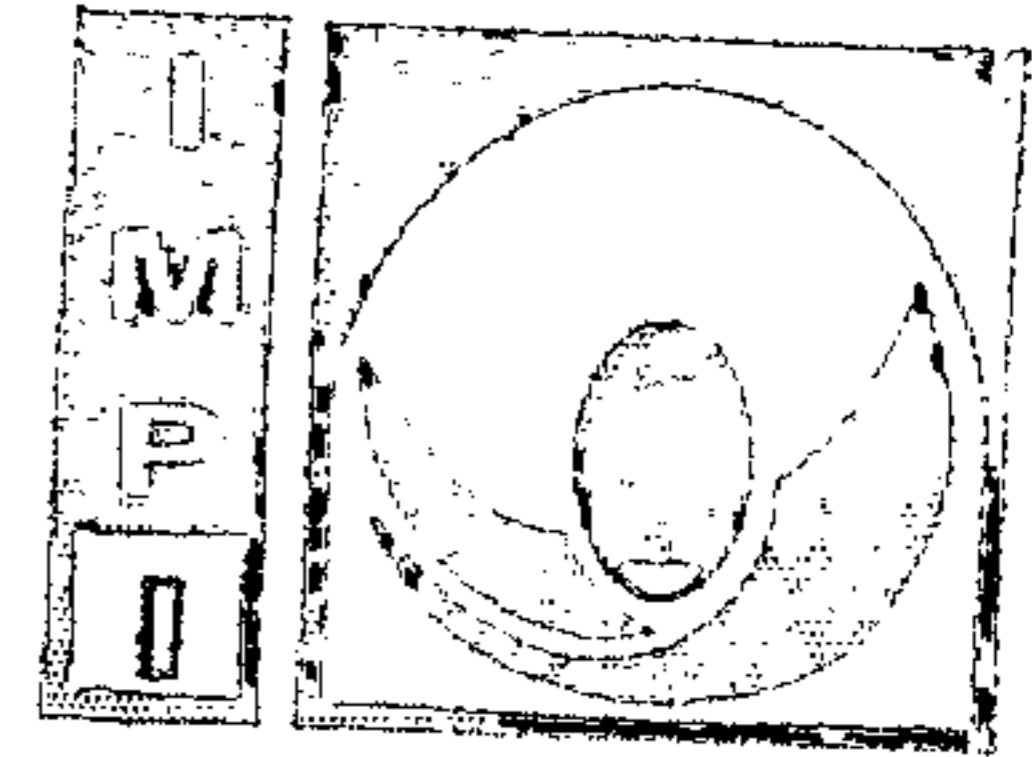
uno de los genes *mutT*, *mutM* y/o *mutY* de *Escherichia coli*, en la cual un marcador de selección es expresado.

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

11. El uso de una cepa de *Metarhizium anisopliae* modificada genéticamente de conformidad con las reivindicaciones 1 a 10 para el control de plagas agrícolas, donde la plaga agrícola consiste de la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gallina ciega (*Phyllophaga ravidata*) o langosta (*Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*).
12. El uso de una cepa de *Metarhizium anisopliae* modificada genéticamente de conformidad con las reivindicaciones 1 a 11 para el control de plagas urbanas, donde la plaga urbana se selecciona del grupo que consiste de la cucaracha común (*Blatta orientalis*) o cucaracha americana (*Periplaneta americana*)

15

20



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

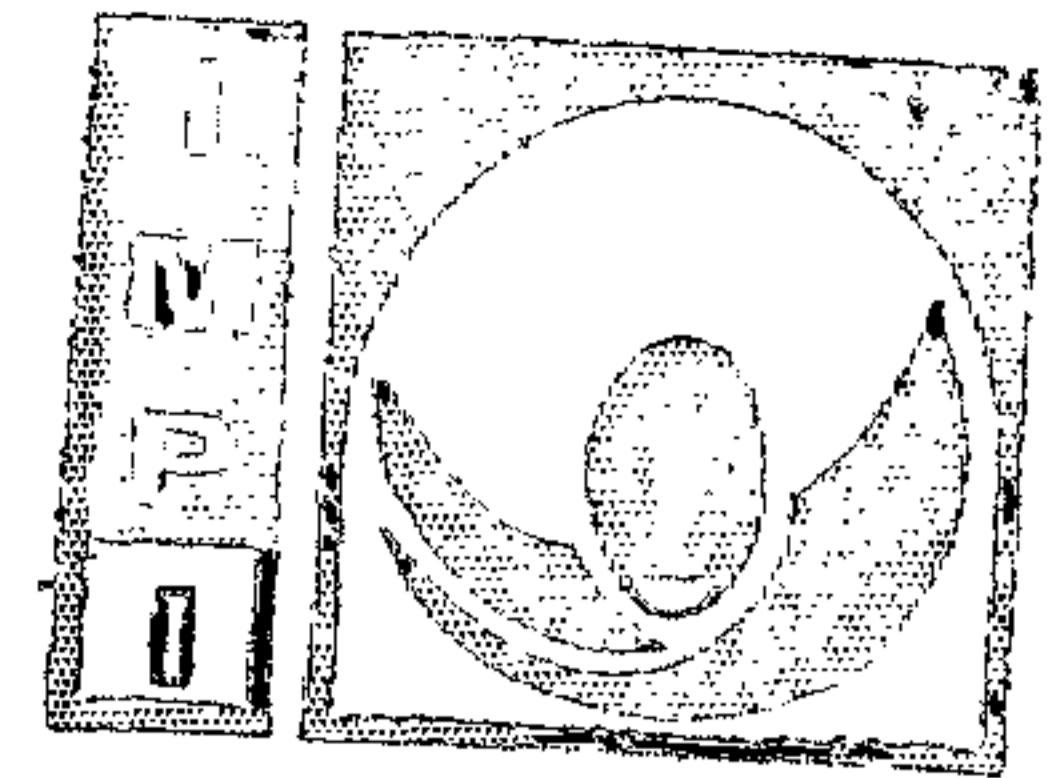
RESUMEN

La presente invención se refiere a la obtención de cepas mejoradas de *Metarhizium* spp., en su capacidad como agentes de control biológico de insectos plaga en la agricultura, por medio de técnicas de Ingeniería Genética; las cuales son capaces de reproducir las proteínas mutTp, mutYp o mutMp de *Escherichia coli* dando como consecuencia una mayor resistencia a los efectos negativos producidos por la luz solar. Estas técnicas permiten la modificación de cualquier cepa perteneciente al género *Metarhizium*, mediante transformación genética para reproducir las proteínas antes mencionadas. El método de transformación implica la introducción de los genes *mutT*, *mutM* o *mutY* de *E. coli*, bajo el control de los elementos adecuados de regulación de la expresión, en copias múltiples de manera estable. La resistencia al daño producido por la luz solar, específicamente por la luz UVA es mayor en las cepas transgénicas que en la cepa silvestre utilizada como receptor de la información genética.

15

20

LISTADO DE SECUENCIAS



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

<120> METODO PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS MEJORADAS DE METARHIZIUM
CON MAYOR RESISTENCIA A LA LUZ ULTRAVIOLETA

5

<130> MX 200715095 A

<140> MX 2007015095 A

<141> 2012-10-03

10

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15

<211> 810

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

20

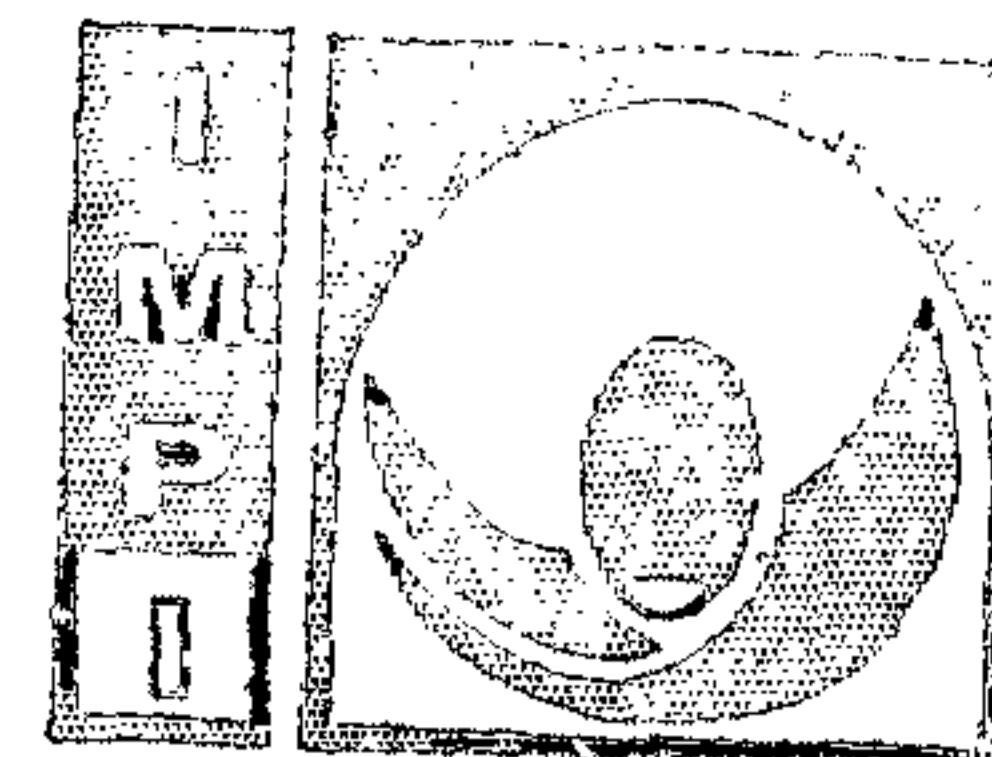
<221> CDS

<222> (1) .. (810)

<223> Gen mutM

25

formamidopirimidina/5-formiluracil/5-hidroximetiluracil DNA
glicosilasa



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

<300>

<308> EMBL/AP009048.1

<309> 2006-01-22

<313> (3829263)..(3830072)

5

<400> 1

atg cct gaa tta ccc gaa gtt gaa acc agc cgc cgc ggc ata gaa ccg 48

Met Pro Glu Leu Pro Glu Val Glu Thr Ser Arg Arg Gly Ile Glu Pro

10 1 5 10 15

cat ctc gtt ggt gca acc att ctt cat gca gtg gtg cgc aac gga cgc 96

His Leu Val Gly Ala Thr Ile Leu His Ala Val Val Arg Asn Gly Arg

20 25 30

ttg cgc tgg ccg gtt tca gaa gag atc tac cgt tta agc gac caa cca 144

15 Leu Arg Trp Pro Val Ser Glu Glu Ile Tyr Arg Leu Ser Asp Gln Pro

35 40 45

gtg ctt agc gtg cag cgg cgg gct aaa tat ctg ctg ctg gag ctg cct 192

Val Leu Ser Val Gln Arg Arg Ala Lys Tyr Leu Leu Leu Glu Leu Pro

50 55 60

20 gag ggc tgg att atc att cat tta ggg atg tct ggc agc ctg cgc atc 240

Glu Gly Trp Ile Ile Ile His Leu Gly Met Ser Gly Ser Leu Arg Ile

65 70 75 80

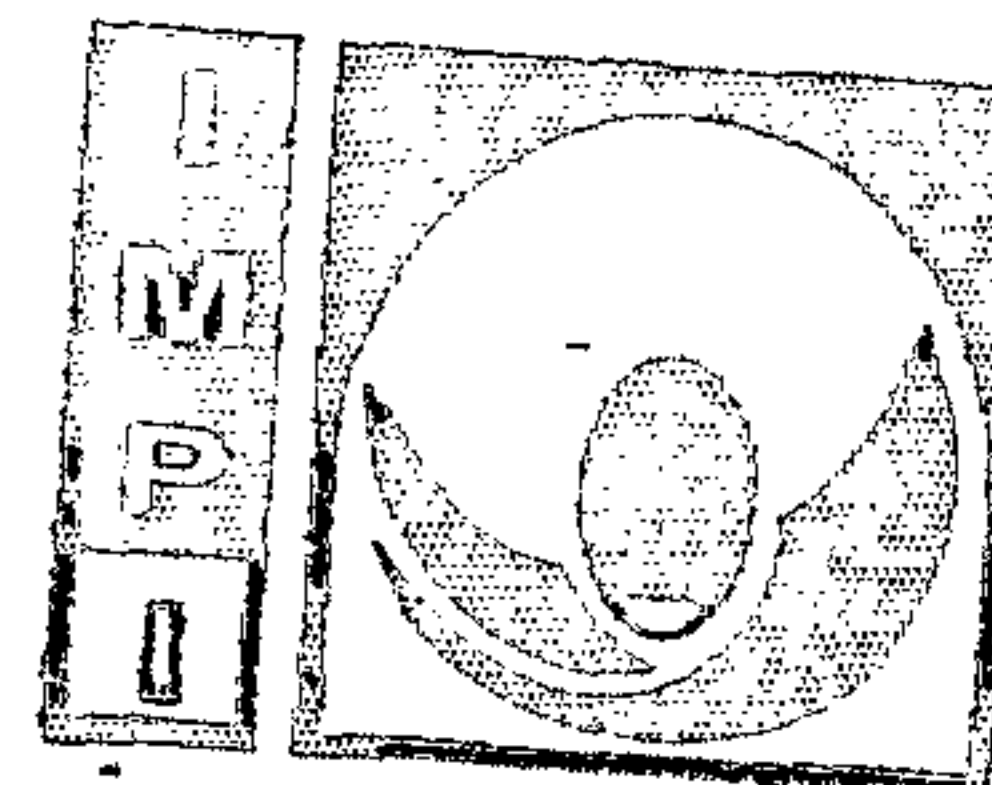
ctt cca gaa gaa ctt ccc cct gaa aag cat gac cat gtg gat ttg gtg 288

Leu Pro Glu Glu Leu Pro Pro Glu Lys His Asp His Val Asp Leu Val

25 85 90 95

atg agc aac ggc aaa gtg ctg cgc tac acc gat ccg cgc cgc ttt ggt 336

Met Ser Asn Gly Lys Val Leu Arg Tyr Thr Asp Pro Arg Arg Phe Gly



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

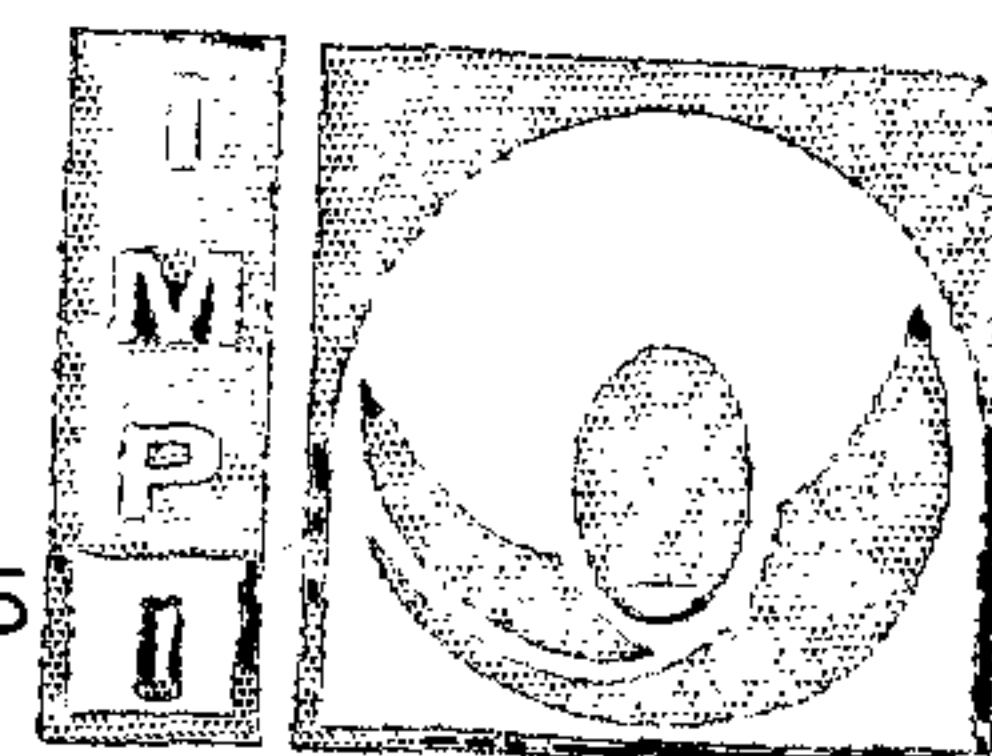
	100		105		110		
	gcc tgg ctg tgg acc aaa gag ctg gaa ggg cat aat gtg ctg gcc cat						
	Ala Trp Leu Trp Thr Lys Glu Leu Glu Gly His Asn Val Leu Ala His						
	115		120		125		
5	ctt gga ccg gag ccg ctt agc gac gat ttc aat ggt gag tat ctg cat						432
	Leu Gly Pro Glu Pro Leu Ser Asp Asp Phe Asn Gly Glu Tyr Leu His						
	130		135		140		
	cag aag tgc gcg aag aaa aaa acg gcg att aaa ccg tgg ctg atg gat						480
	Gln Lys Cys Ala Lys Lys Lys Thr Ala Ile Lys Pro Trp Leu Met Asp						
10	145		150		155	160	
	aac aag ctg gtg gta ggg gta ggg aat atc tat gcc agc gaa tca ctg						528
	Asn Lys Leu Val Val Gly Val Gly Asn Ile Tyr Ala Ser Glu Ser Leu						
		165		170		175	
	ttt gcg gcg ggg atc cat ccg gat cgg ctg gcg tca tca ctg tcg ctg						576
15	Phe Ala Ala Gly Ile His Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ser Leu Ser Leu						
	180		185		190		
	gca gag tgt gaa ttg tta gct cgg gtg att aaa gcg gtg ttg ctg cgt						624
	Ala Glu Cys Glu Leu Leu Ala Arg Val Ile Lys Ala Val Leu Leu Arg						
	195		200		205		
20	tcg att gag cag ggt ggt aca acg ctg aaa gat ttt ctg caa agt gat						672
	Ser Ile Glu Gln Gly Gly Thr Thr Leu Lys Asp Phe Leu Gln Ser Asp						
	210		215		220		
	ggt aaa ccg ggc tat ttc gct cag gaa ttg cag gtt tac ggg cga aaa						720
	Gly Lys Pro Gly Tyr Phe Ala Gln Glu Leu Gln Val Tyr Gly Arg Lys						
25	225		230		235	240	
	ggt gag ccg tgt cgg gtg tgc ggt acg ccg att gtg gcg act aaa cat						768
	Gly Glu Pro Cys Arg Val Cys Gly Thr Pro Ile Val Ala Thr Lys His						

4

245

250

255



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

gcg cag cgg gca acg ttt tat tgt cgg cag tgc cag aag taa

Ala Gln Arg Ala Thr Phe Tyr Cys Arg Gln Cys Gln Lys

260

265

5

<210> 2

<211> 269

<212> PRT

10 <213> Escherichia coli

<400> 2

Met Pro Glu Leu Pro Glu Val Glu Thr Ser Arg Arg Gly Ile Glu Pro

15 1 5 10 15

His Leu Val Gly Ala Thr Ile Leu His Ala Val Val Arg Asn Gly Arg

20 25 30

Leu Arg Trp Pro Val Ser Glu Glu Ile Tyr Arg Leu Ser Asp Gln Pro

35 40 45

20 Val Leu Ser Val Gln Arg Arg Ala Lys Tyr Leu Leu Leu Glu Leu Pro

50 55 60

Glu Gly Trp Ile Ile Ile His Leu Gly Met Ser Gly Ser Leu Arg Ile

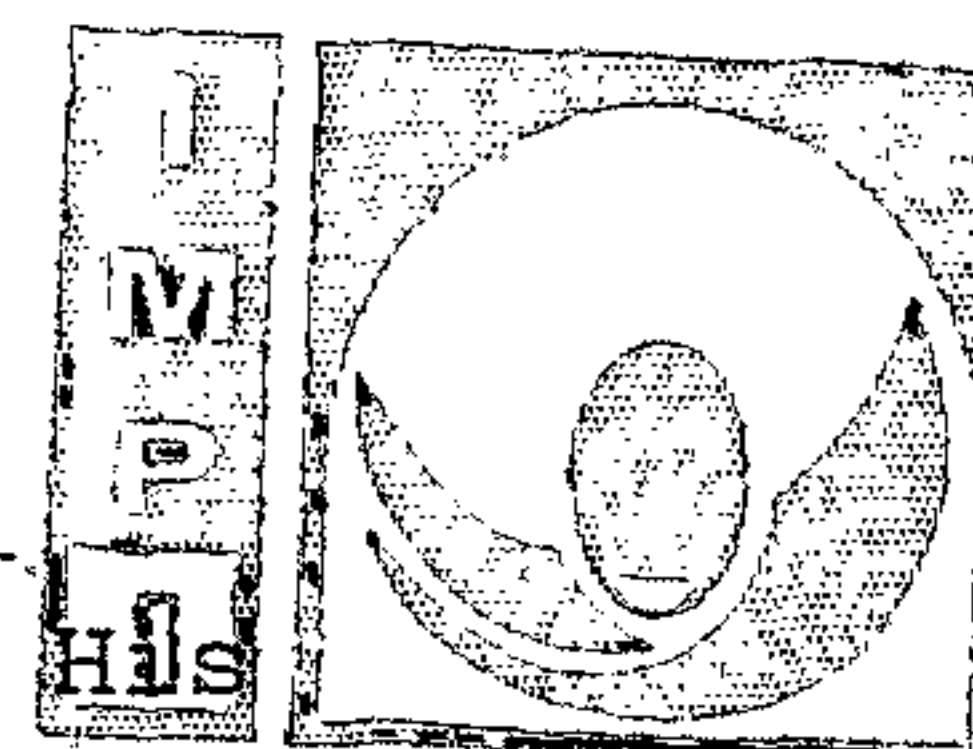
65 70 75 80

Leu Pro Glu Glu Leu Pro Pro Glu Lys His Asp His Val Asp Leu Val

25 85 90 95

Met Ser Asn Gly Lys Val Leu Arg Tyr Thr Asp Pro Arg Arg Phe Gly

100 105 110



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Ala Trp Leu Trp Thr Lys Glu Leu Glu Gly His Asn Val Leu Ala

115

120

125

Leu Gly Pro Glu Pro Leu Ser Asp Asp Phe Asn Gly Glu Tyr Leu

130

135

140

5 Gln Lys Cys Ala Lys Lys Lys Thr Ala Ile Lys Pro Trp Leu Met Asp

145

150

155

160

Asn Lys Leu Val Val Gly Val Gly Asn Ile Tyr Ala Ser Glu Ser Leu

165

170

175

Phe Ala Ala Gly Ile His Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ser Leu Ser Leu

10

180

185

190

Ala Glu Cys Glu Leu Leu Ala Arg Val Ile Lys Ala Val Leu Leu Arg

195

200

205

Ser Ile Glu Gln Gly Gly Thr Thr Leu Lys Asp Phe Leu Gln Ser Asp

210

215

220

15 Gly Lys Pro Gly Tyr Phe Ala Gln Glu Leu Gln Val Tyr Gly Arg Lys

225

230

235

240

Gly Glu Pro Cys Arg Val Cys Gly Thr Pro Ile Val Ala Thr Lys His

245

250

255

Ala Gln Arg Ala Thr Phe Tyr Cys Arg Gln Cys Gln Lys

20

260

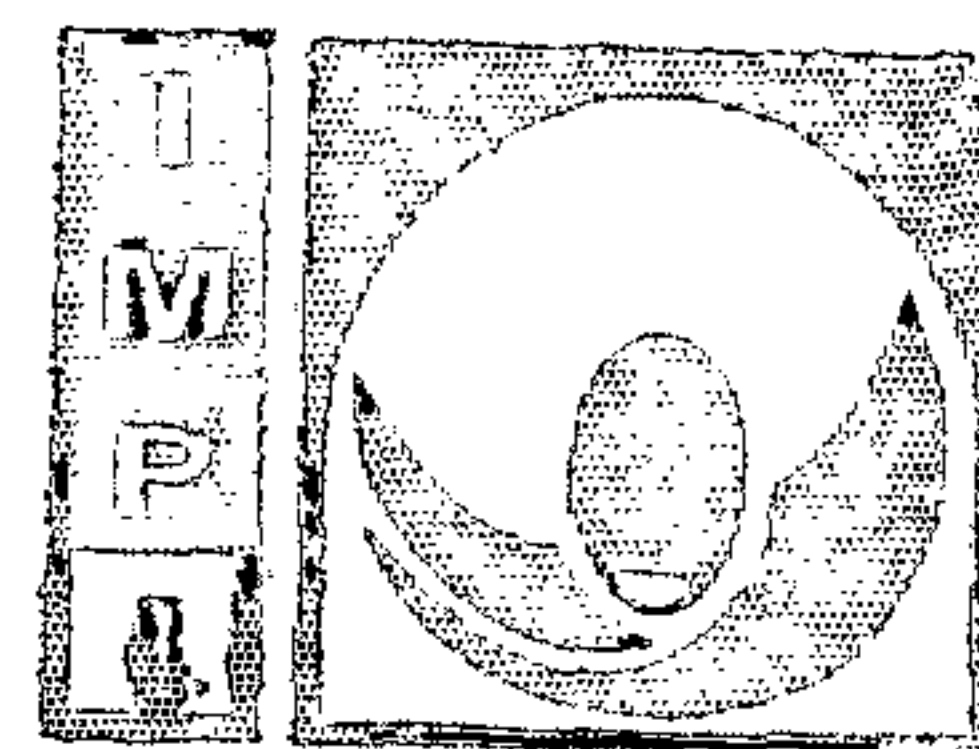
265

<210> 3

25 <211> 1231

<212> DNA

<213> Escherichia coli



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

<220>

<221> CDS

<222> (148)..(1200)

5 <223> Gen mutY

adenina glicosilasa

<300>

10 <308> EMBL/X52391.1

<309> 1990-06-13

<313> (1)..(1231)

<400> 3

15 cttgtgaaag tgttctgaaa acgggcatta tccaaagtta gttgccggat gcaagcatga 60

taaggccgtg gctgcggaaa gttccggttt acaccctgcc gtcgctgtgc tgcaatcttg 120

cccccaacaa cagtgaattc ggtgacc atg caa gcg tcg caa ttt tca gcc cag 174

Met Gln Ala Ser Gln Phe Ser Ala Gln

1

5

20 gtt ctg gac tgg tac gat aaa tac ggg cga aaa act ctg ccc tgg caa 222

Val Leu Asp Trp Tyr Asp Lys Tyr Gly Arg Lys Thr Leu Pro Trp Gln

10 15 20 25

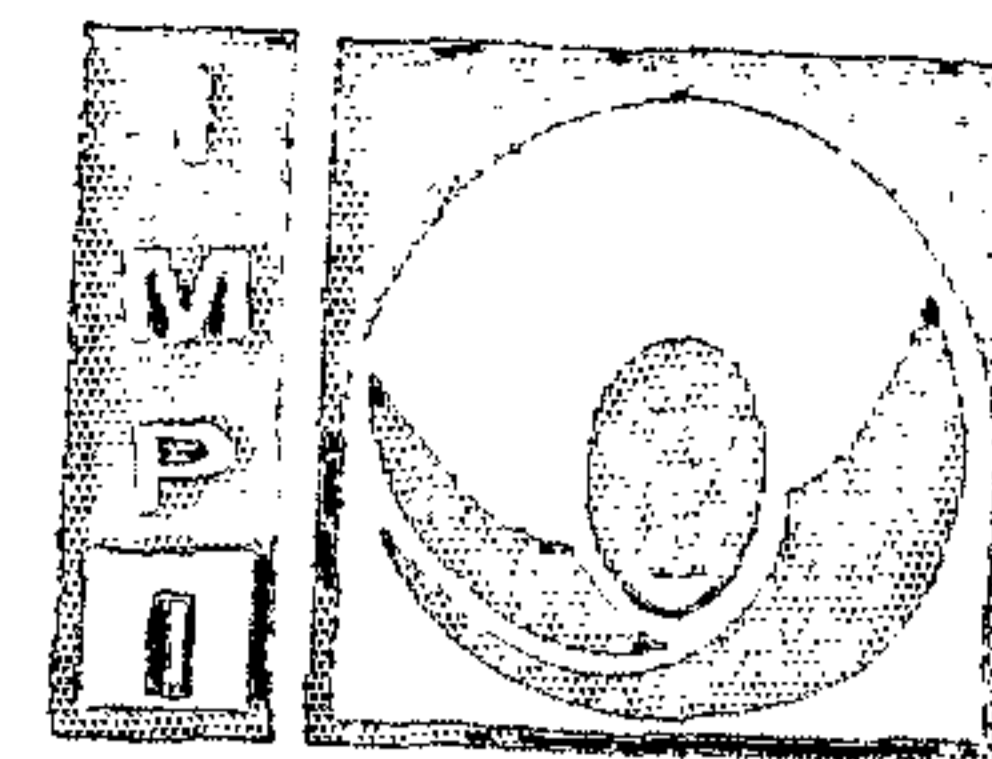
att gac aag acg ccc tac aaa gta tgg ctc tca gaa gtg atg ttg caa 270

Ile Asp Lys Thr Pro Tyr Lys Val Trp Leu Ser Glu Val Met Leu Gln

25 30 35 40

caa act cag gtt gcg acc gtt atc ccc tat ttt gaa cgc ttt atg gcg 318

Gln Thr Gln Val Ala Thr Val Ile Pro Tyr Phe Glu Arg Phe Met Ala



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

45

50

55

cgc ttc ccg acg gtg acc gat ctc gcc aat gcg ccg ctc gac gaa gtt
Arg Phe Pro Thr Val Thr Asp Leu Ala Asn Ala Pro Leu Asp Glu Val

60

65

70

5 ctc cac ttg tgg acc ggg ctt ggc tat tac gcc cgc gcg cgc aat ctg 414

Leu His Leu Trp Thr Gly Leu Gly Tyr Tyr Ala Arg Ala Arg Asn Leu

75

80

85

cat aaa gcg gca caa caa gtg gcg acc tta cac ggc ggt aaa ttc ccg 462

His Lys Ala Ala Gln Gln Val Ala Thr Leu His Gly Gly Lys Phe Pro

10

90 95 100 105

gaa acc ttt gag gaa gtt gca gca ctg ccg ggc gtc ggg cgt tcc acc 510

Glu Thr Phe Glu Glu Val Ala Ala Leu Pro Gly Val Gly Arg Ser Thr

110

115

120

gca ggc gcg att ctc tcg ctt tct ctg ggt aag cac ttt ccg att ctc 558

15

Ala Gly Ala Ile Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys His Phe Pro Ile Leu

125

130

135

gac ggt aac gtc aaa cgc gtg ctg gcg cgc tgc tat gct gta agc ggc 606

Asp Gly Asn Val Lys Arg Val Leu Ala Arg Cys Tyr Ala Val Ser Gly

140

145

150

20

tgg cct ggg aaa aaa gag gtc gag aat aaa tta tgg agt ttg agc gag 654

Trp Pro Gly Lys Lys Glu Val Glu Asn Lys Leu Trp Ser Leu Ser Glu

155

160

165

cag gtg acg ccc gcg gtt ggc gtg gaa cgg ttt aat cag gcg atg atg 702

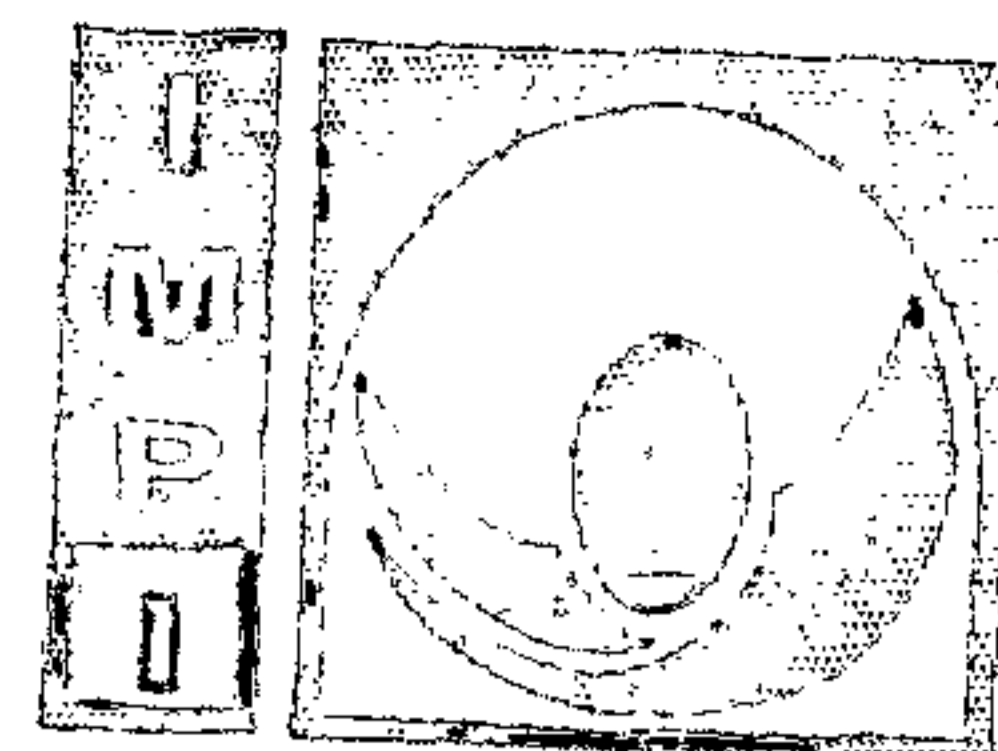
Gln Val Thr Pro Ala Val Gly Val Glu Arg Phe Asn Gln Ala Met Met

25

170 175 180 185

gat ttg ggt gcg atg att tgt acg cgc tcg aaa ccg aaa tgt tcg ctc 750

Asp Leu Gly Ala Met Ile Cys Thr Arg Ser Lys Pro Lys Cys Ser Leu



190 .

195

200

tgt ccg cta caa aac gga tgt att gcc gcc gcc aac aat agc tgg gcg
Cys Pro Leu Gln Asn Gly Cys Ile Ala Ala Ala Asn Asn Ser Trp Ala

205

210

215

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

5 ctt tat ccg ggc aaa aaa ccg aaa cag acg ctg ccg gag cgc acc ggc
Leu Tyr Pro Gly Lys Lys Pro Lys Gln Thr Leu Pro Glu Arg Thr Gly

220

225

230

846

tac ttt ttg cta tta cag cac gaa gat gaa gta ttg ctg gcg cag cgt
Tyr Phe Leu Leu Leu Gln His Glu Asp Glu Val Leu Leu Ala Gln Arg

894

10 235

240

245

ccg ccg agc gga ttg tgg ggc ggt tta tac tgt ttc ccg cag ttt gcc
Pro Pro Ser Gly Leu Trp Gly Gly Leu Tyr Cys Phe Pro Gln Phe Ala

942

250 255 260 265

gac gaa gaa agt ttg cgg cag tgg ctg gcg caa cgg cag att gct gcc

990

15 Asp Glu Glu Ser Leu Arg Gln Trp Leu Ala Gln Arg Gln Ile Ala Ala

270

275

280

gat aac ctg acg caa ctg acc gcg ttt cgg cat acc ttc agc cat ttc
Asp Asn Leu Thr Gln Leu Thr Ala Phe Arg His Thr Phe Ser His Phe

1038

285

290

295

20 cac tta gat att gtg cct atg tgg ctt ccc gtg tcg tca ttc acc ggc
His Leu Asp Ile Val Pro Met Trp Leu Pro Val Ser Ser Phe Thr Gly

1086

300

305

310

tgc atg gat gaa ggc aat gcg ctc tgg tat aac tta gcg caa ccg ccg
Cys Met Asp Glu Gly Asn Ala Leu Trp Tyr Asn Leu Ala Gln Pro Pro

1134

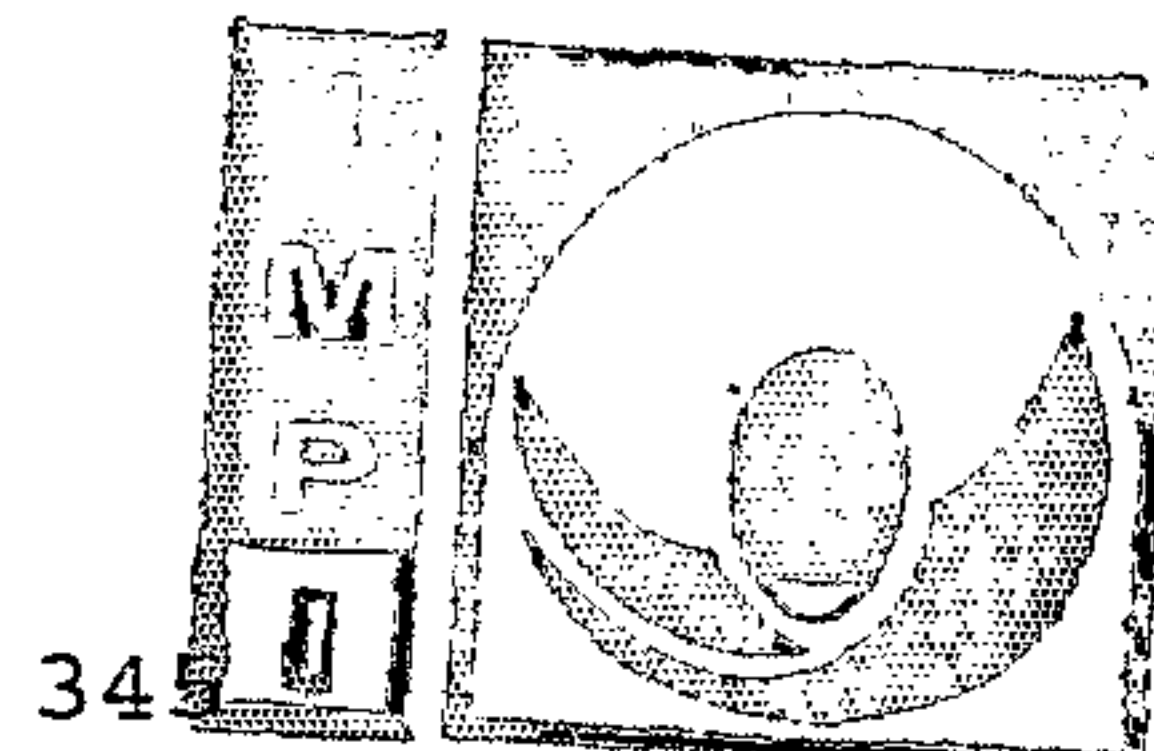
25 315

320

325

tca gtt ggc cta gcg gct ccc gtg gag cgt ttg tta cag cag tta cgc
Ser Val Gly Leu Ala Ala Pro Val Glu Arg Leu Leu Gln Gln Leu Arg

1182



Instituto
1231
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

330 335 340
act ggc gcg ccg gtt tag cgtgagtcga taaagaggac gatttatgag c
Thr Gly Ala Pro Val

350

5

<210> 4

<211> 350

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Gln Ala Ser Gln Phe Ser Ala Gln Val Leu Asp Trp Tyr Asp Lys

15 1 5 10 15

Tyr Gly Arg Lys Thr Leu Pro Trp Gln Ile Asp Lys Thr Pro Tyr Lys

20 25 30

Val Trp Leu Ser Glu Val Met Leu Gln Gln Thr Gln Val Ala Thr Val

35 40 45

20 Ile Pro Tyr Phe Glu Arg Phe Met Ala Arg Phe Pro Thr Val Thr Asp

50 55 60

Leu Ala Asn Ala Pro Leu Asp Glu Val Leu His Leu Trp Thr Gly Leu

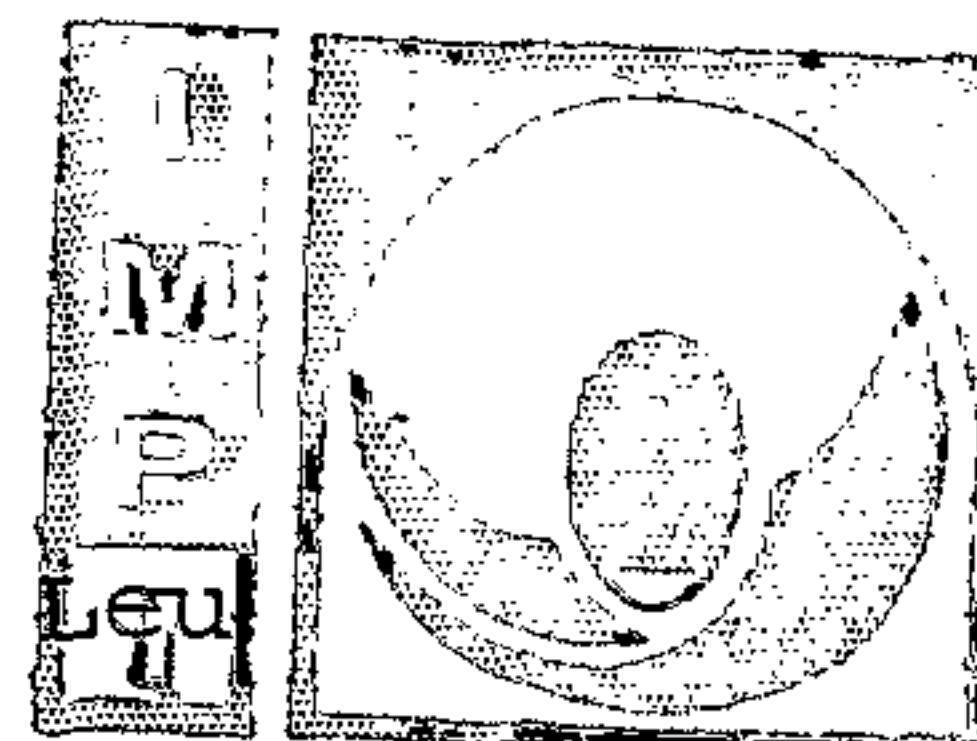
65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Ala Arg Ala Arg Asn Leu His Lys Ala Ala Gln Gln Val

25 85 90 95

Ala Thr Leu His Gly Gly Lys Phe Pro Glu Thr Phe Glu Glu Val Ala

100 105 110



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

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

115 120 125

Ser Leu Gly Lys His Phe Pro Ile Leu Asp Gly Asn Val Lys Arg Val

130 135 140

5 Leu Ala Arg Cys Tyr Ala Val Ser Gly Trp Pro Gly Lys Lys Glu Val

145 150 155 160

Glu Asn Lys Leu Trp Ser Leu Ser Glu Gln Val Thr Pro Ala Val Gly

165 170 175

Val Glu Arg Phe Asn Gln Ala Met Met Asp Leu Gly Ala Met Ile Cys

10 180 185 190

Thr Arg Ser Lys Pro Lys Cys Ser Leu Cys Pro Leu Gln Asn Gly Cys

195 200 205

Ile Ala Ala Ala Asn Asn Ser Trp Ala Leu Tyr Pro Gly Lys Lys Pro

210 215 220

15 Lys Gln Thr Leu Pro Glu Arg Thr Gly Tyr Phe Leu Leu Leu Gln His

225 230 235 240

Glu Asp Glu Val Leu Leu Ala Gln Arg Pro Pro Ser Gly Leu Trp Gly

245 250 255

Gly Leu Tyr Cys Phe Pro Gln Phe Ala Asp Glu Glu Ser Leu Arg Gln

20 260 265 270

Trp Leu Ala Gln Arg Gln Ile Ala Ala Asp Asn Leu Thr Gln Leu Thr

275 280 285

Ala Phe Arg His Thr Phe Ser His Phe His Leu Asp Ile Val Pro Met

290 295 300

25 Trp Leu Pro Val Ser Ser Phe Thr Gly Cys Met Asp Glu Gly Asn Ala

305 310 315 320

Leu Trp Tyr Asn Leu Ala Gln Pro Pro Ser Val Gly Leu Ala Ala Pro

11

325

330

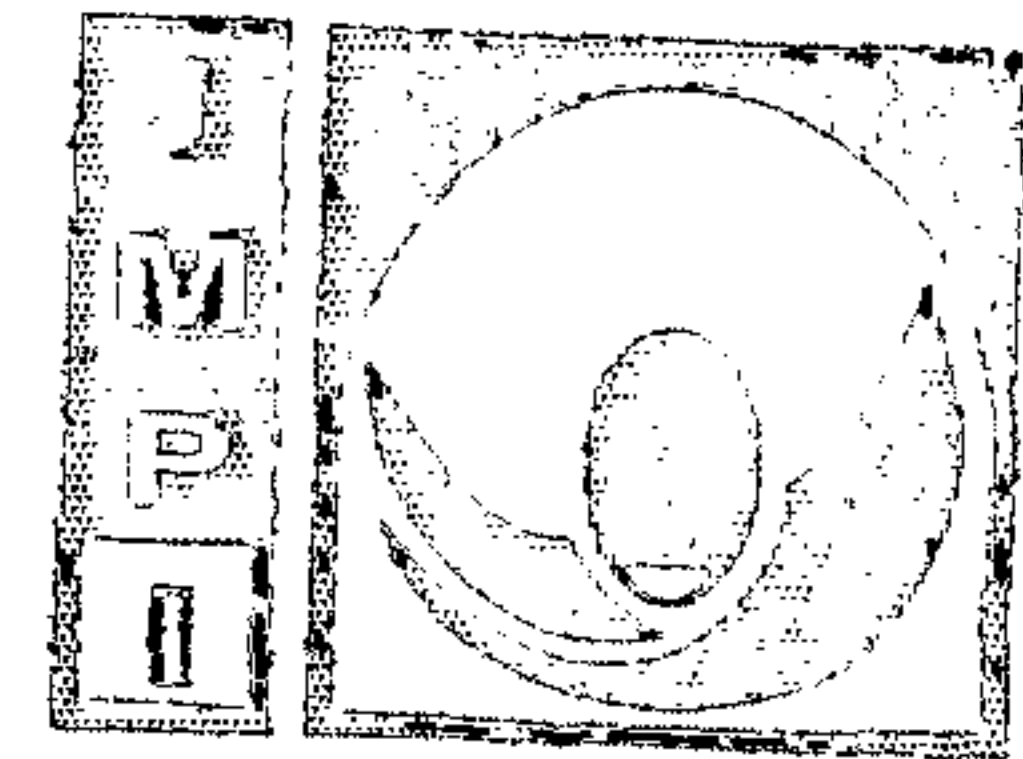
335

Val Glu Arg Leu Leu Gln Gln Leu Arg Thr Gly Ala Pro Val

340

345

350



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

5

<210> 5

<211> 390

<212> DNA

10 <213> Escherichia coli

<220>

15 <221> CDS

<222> (1)..(390)

<223> Gen mutT

8-oxo-dGTP difosfatasa

20 <300>

<308> EMBL/X55034.1

<309> 1991-02-21

<313> (27574)..(27963)

<400> 5

25 atg aaa aag ctg caa att gcg gta ggt att att cgc aac gag aac aat

48

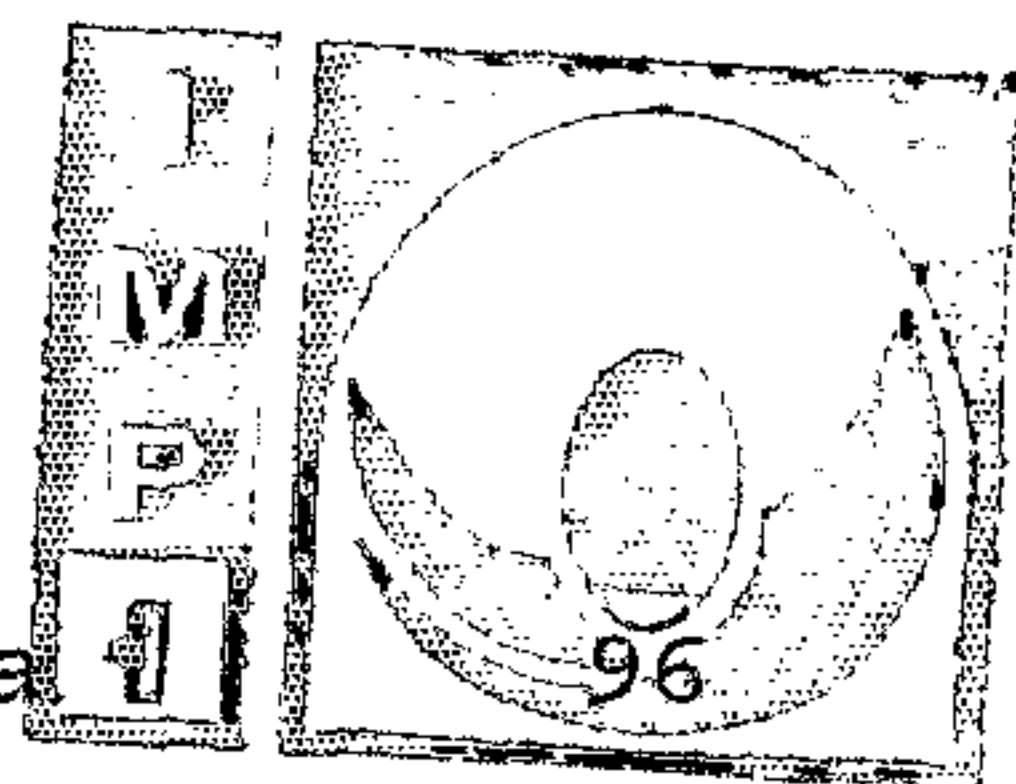
Met Lys Lys Leu Gln Ile Ala Val Gly Ile Ile Arg Asn Glu Asn Asn

1

5

10

15



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial 144

gaa atc ttt ata acg cgt cgc gca gca gat gcg cac atg gcg aat aaa

Glu Ile Phe Ile Thr Arg Arg Ala Ala Asp Ala His Met Ala Asn Lys

20 25 30

ctg gag ttt ccc ggc ggt aaa att gaa atg ggt gaa acg ccg gaa cag

5 Leu Glu Phe Pro Gly Gly Lys Ile Glu Met Gly Glu Thr Pro Glu Gln

35 40 45

gcg gtg gtg cgt gaa ctt cag gaa gaa gtc ggg att acc ccc caa cat 192

Ala Val Val Arg Glu Leu Gln Glu Glu Val Gly Ile Thr Pro Gln His

50 55 60

10 ttt tcg cta ttt gaa aaa ctg gaa tat gaa ttc ccg gac agg cat ata 240

Phe Ser Leu Phe Glu Lys Leu Glu Tyr Glu Phe Pro Asp Arg His Ile

65 70 75 80

aca ctg tgg ttt tgg ctg gtc gaa cgc tgg gaa ggg gag ccg tgg ggt 288

Thr Leu Trp Phe Trp Leu Val Glu Arg Trp Glu Gly Glu Pro Trp Gly

15 85 90 95

aaa gaa ggg caa ccc ggt gag tgg atg tcg ctg gtc ggt ctt aat gcc 336

Lys Glu Gly Gln Pro Gly Glu Trp Met Ser Leu Val Gly Leu Asn Ala

100 105 110

gat gat ttt ccg cca gcc aat gaa ccg gta att gcg aag ctt aaa cgt 384

20 Asp Asp Phe Pro Pro Ala Asn Glu Pro Val Ile Ala Lys Leu Lys Arg

115 120 125

ctg tag 390

Leu

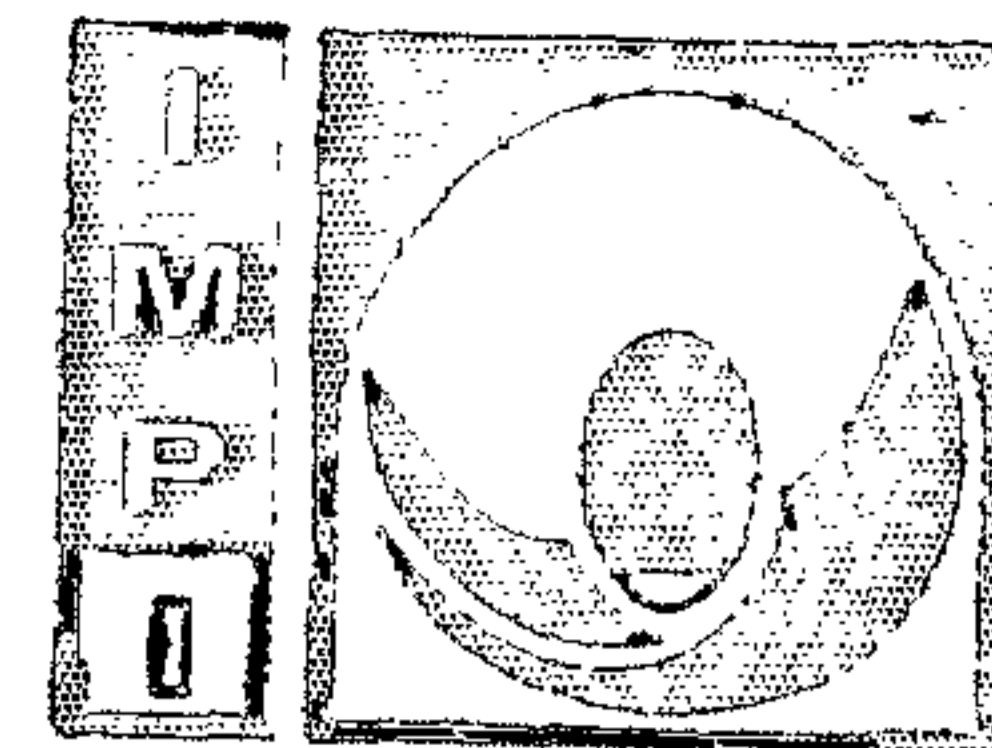
25 <210> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> Escherichia coli

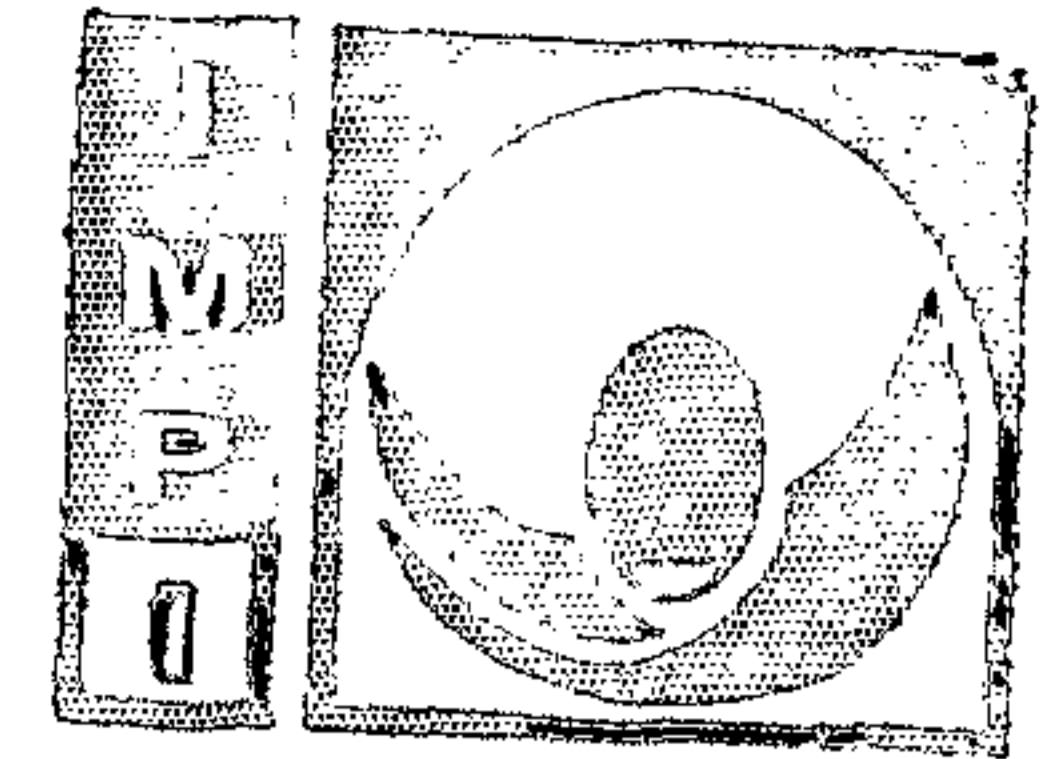
<400> 6



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Met Lys Lys Leu Gln Ile Ala Val Gly Ile Ile Arg Asn Glu Asn Asn
 5 1 5 10 15
 Glu Ile Phe Ile Thr Arg Arg Ala Ala Asp Ala His Met Ala Asn Lys
 20 25 30
 Leu Glu Phe Pro Gly Gly Lys Ile Glu Met Gly Glu Thr Pro Glu Gln
 35 40 45
 10 Ala Val Val Arg Glu Leu Gln Glu Glu Val Gly Ile Thr Pro Gln His
 50 55 60
 Phe Ser Leu Phe Glu Lys Leu Glu Tyr Glu Phe Pro Asp Arg His Ile
 65 70 75 80
 Thr Leu Trp Phe Trp Leu Val Glu Arg Trp Glu Gly Glu Pro Trp Gly
 15 85 90 95
 Lys Glu Gly Gln Pro Gly Glu Trp Met Ser Leu Val Gly Leu Asn Ala
 100 105 110
 Asp Asp Phe Pro Pro Ala Asn Glu Pro Val Ile Ala Lys Leu Lys Arg
 115 120 125
 20 Leu

25



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

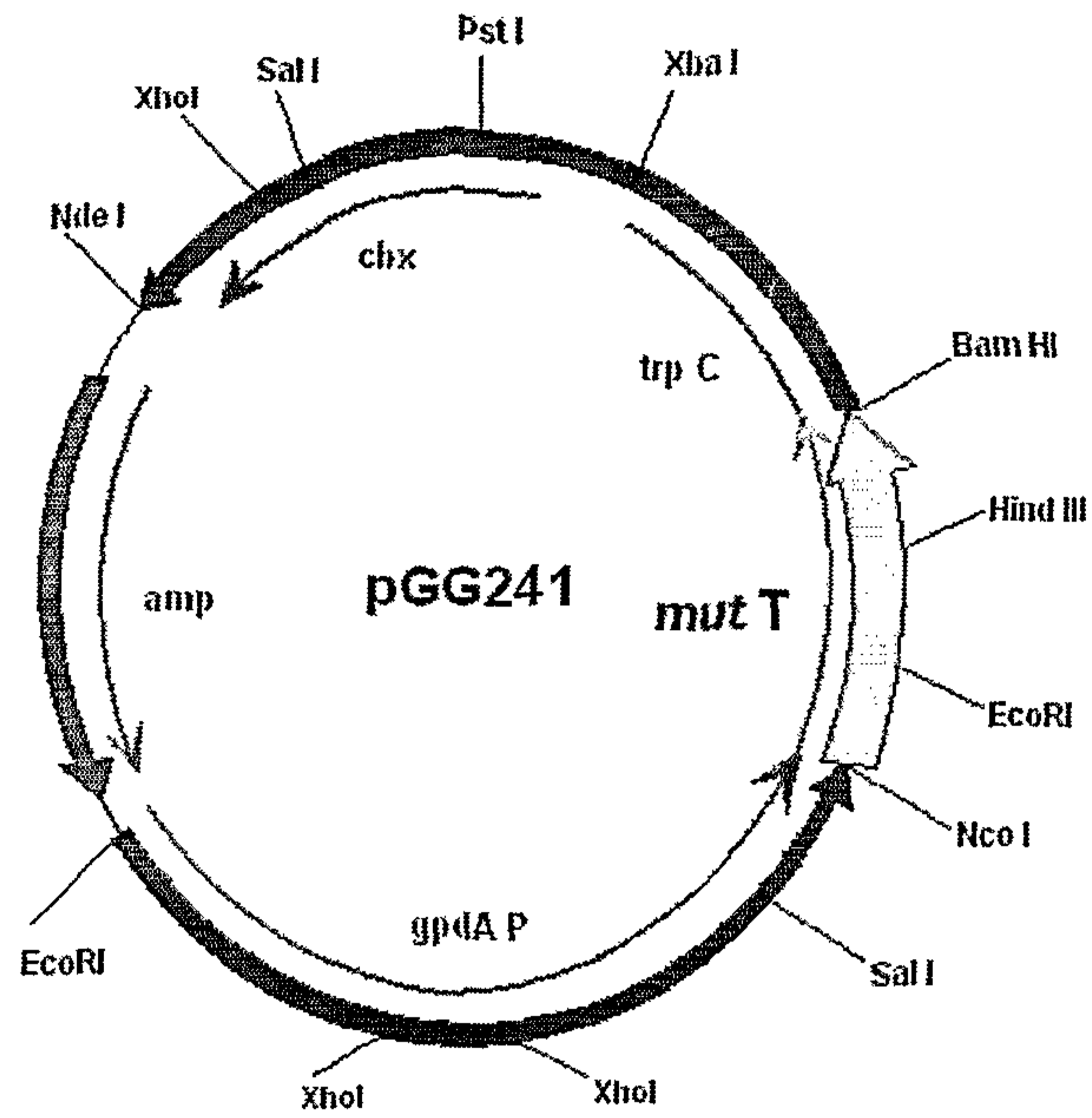
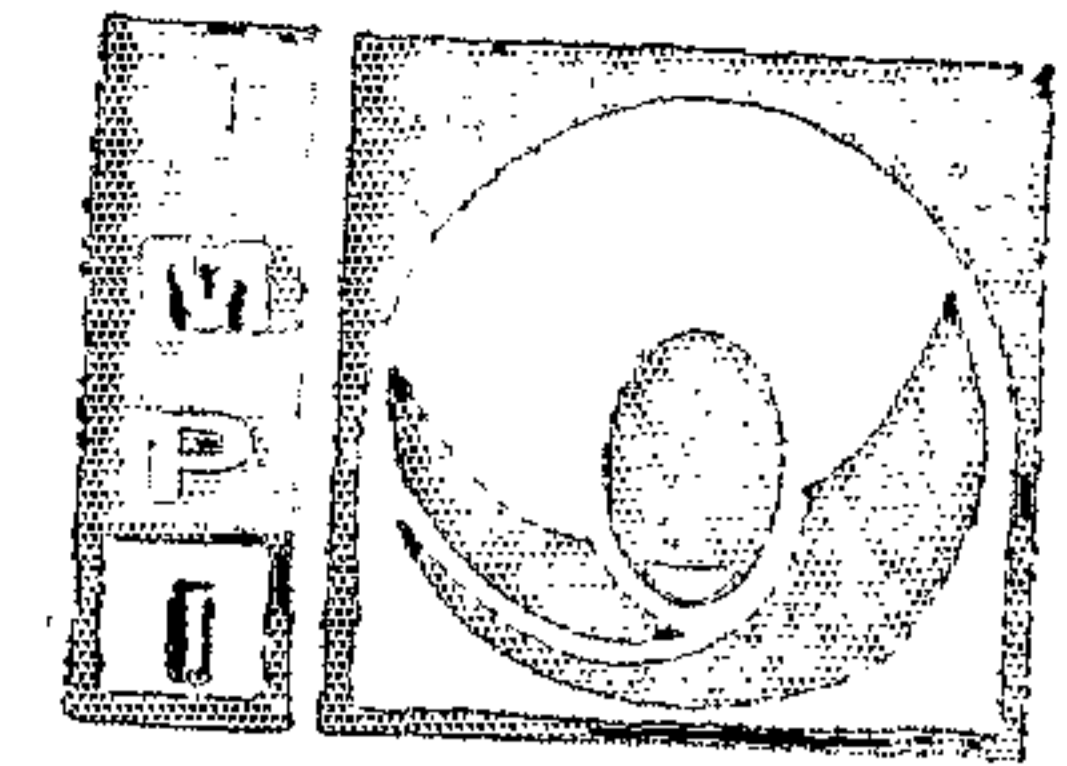


FIGURA 1



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

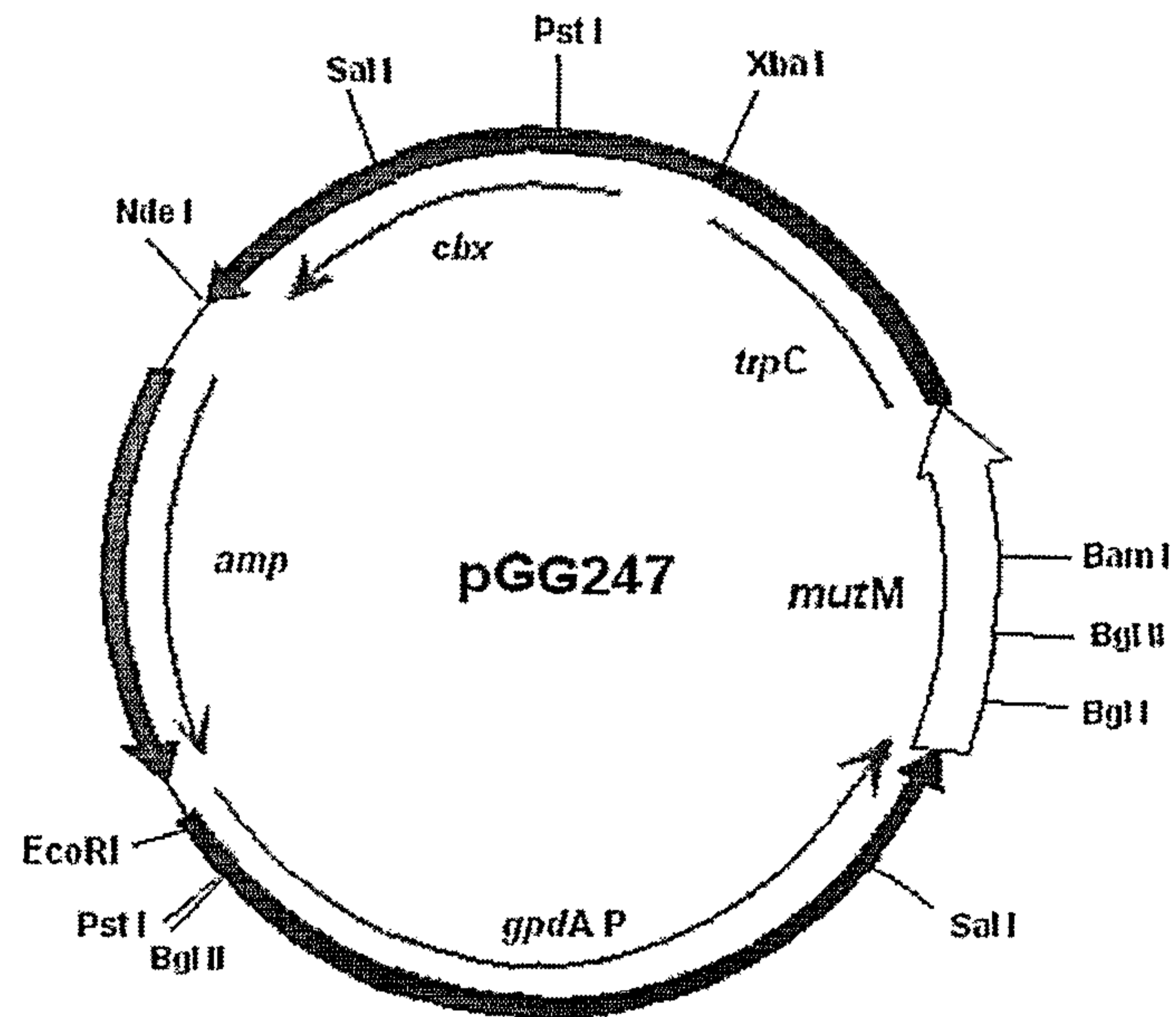
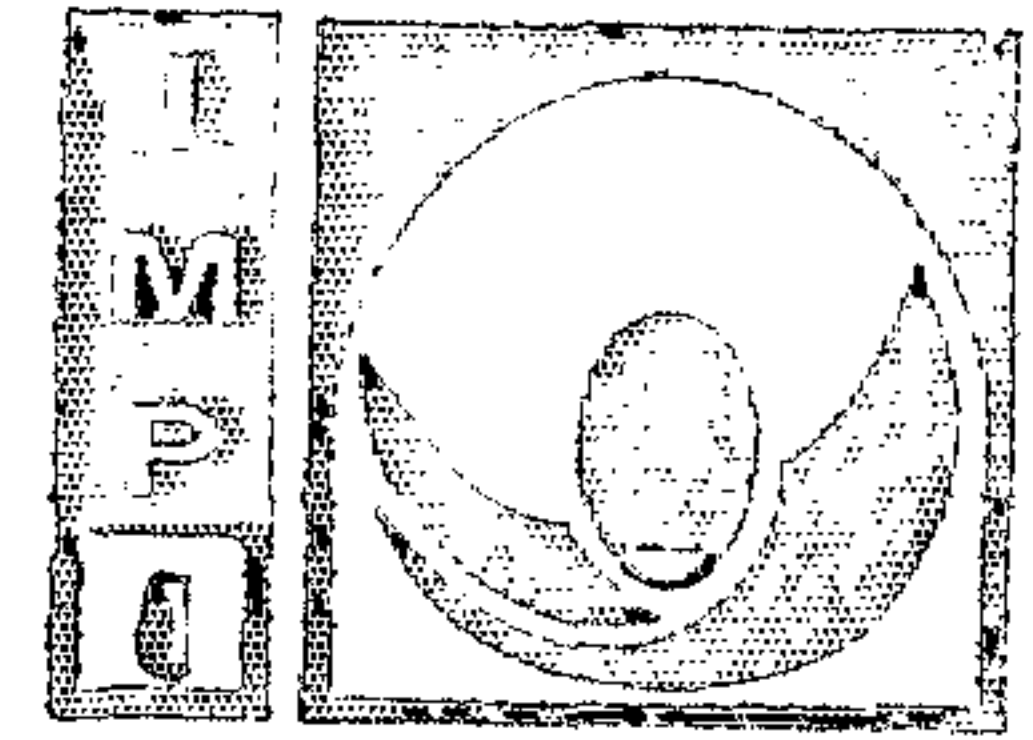


FIGURA 2



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

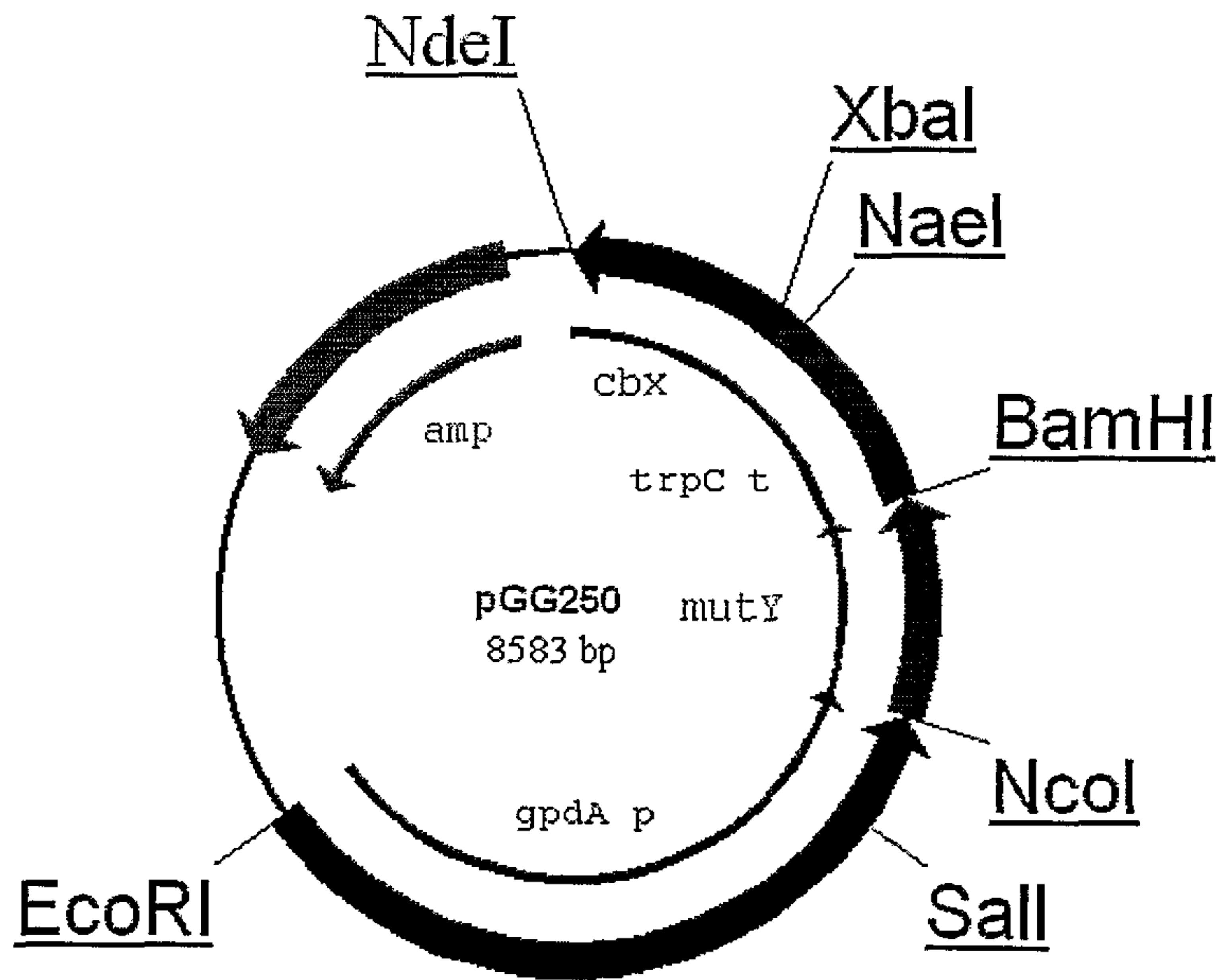
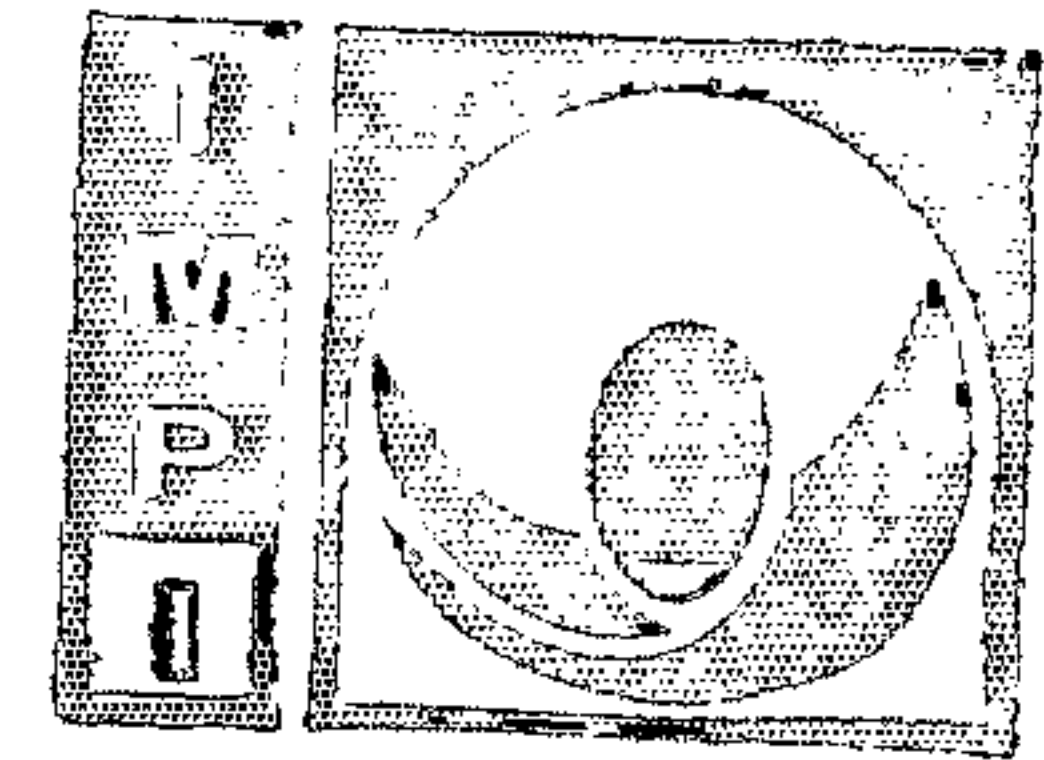


FIGURA 3



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

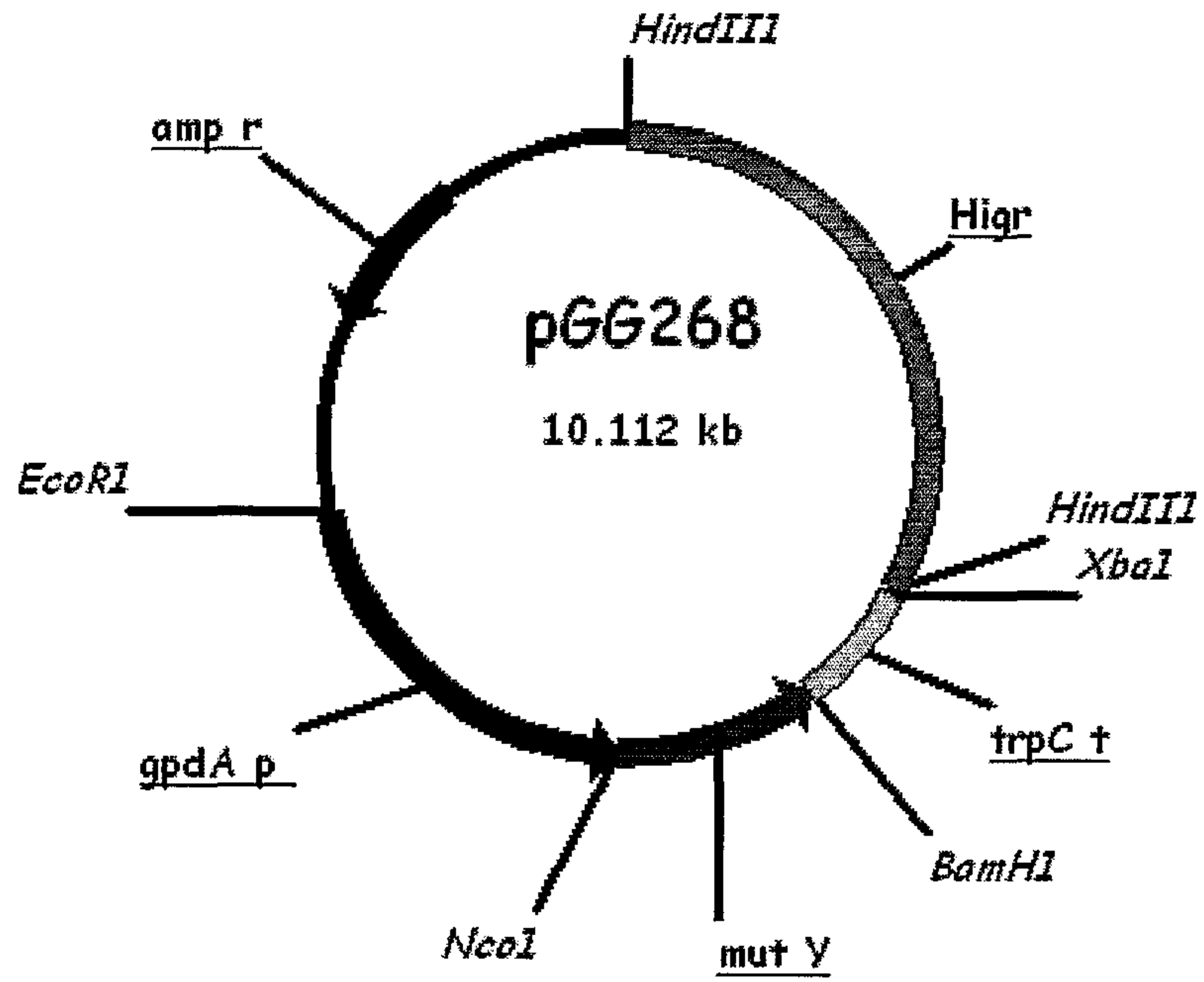
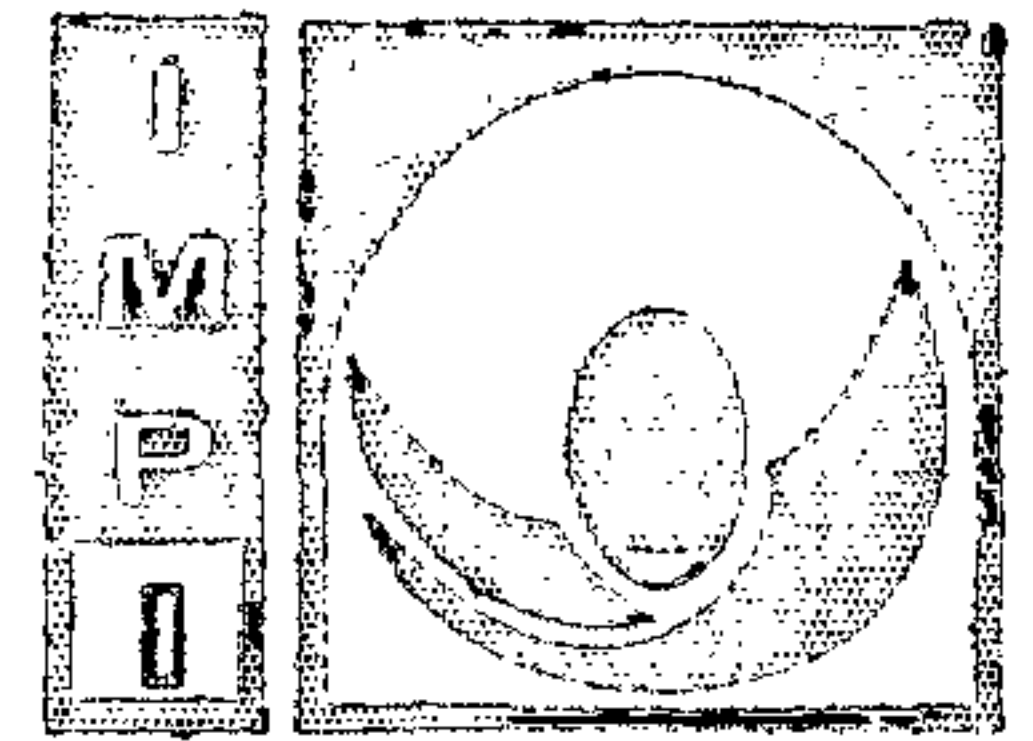


FIGURA 4



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

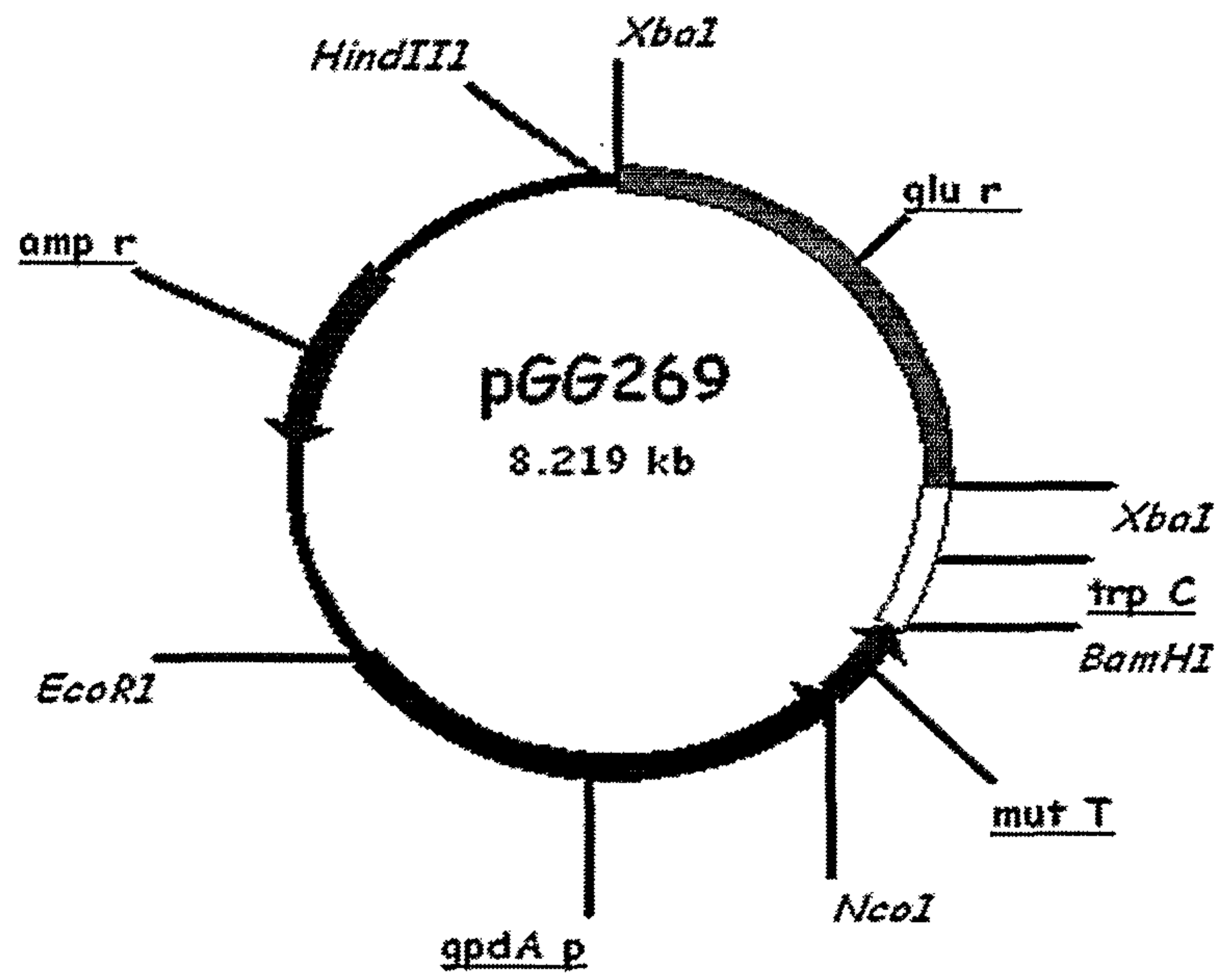
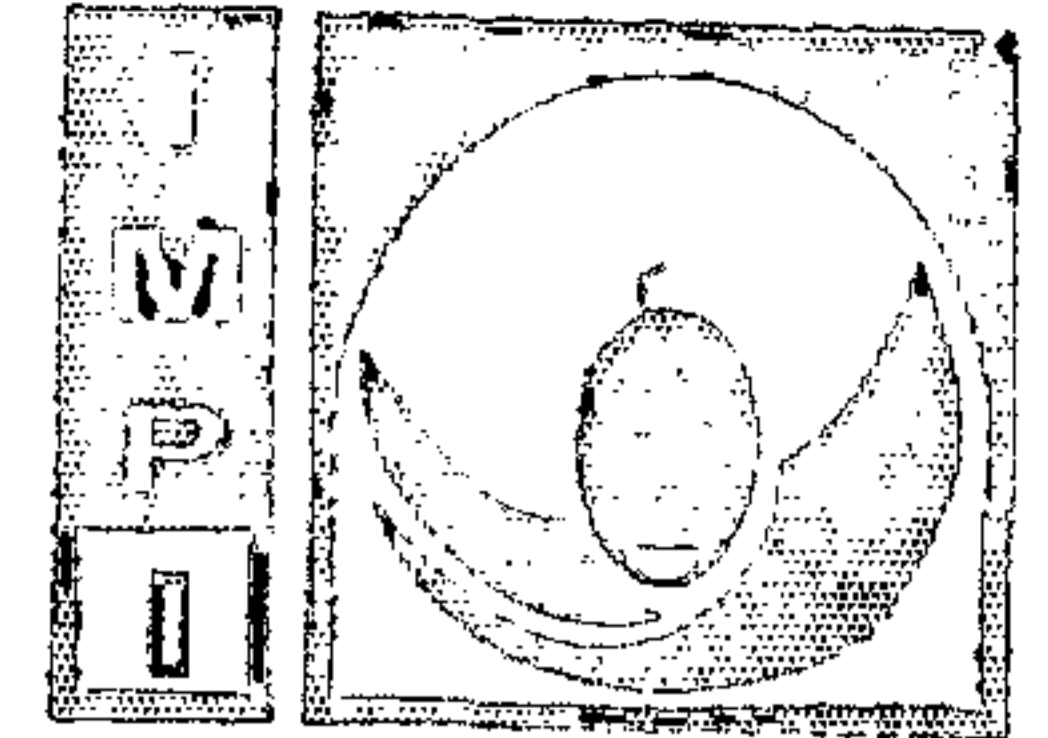


FIGURA 5



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

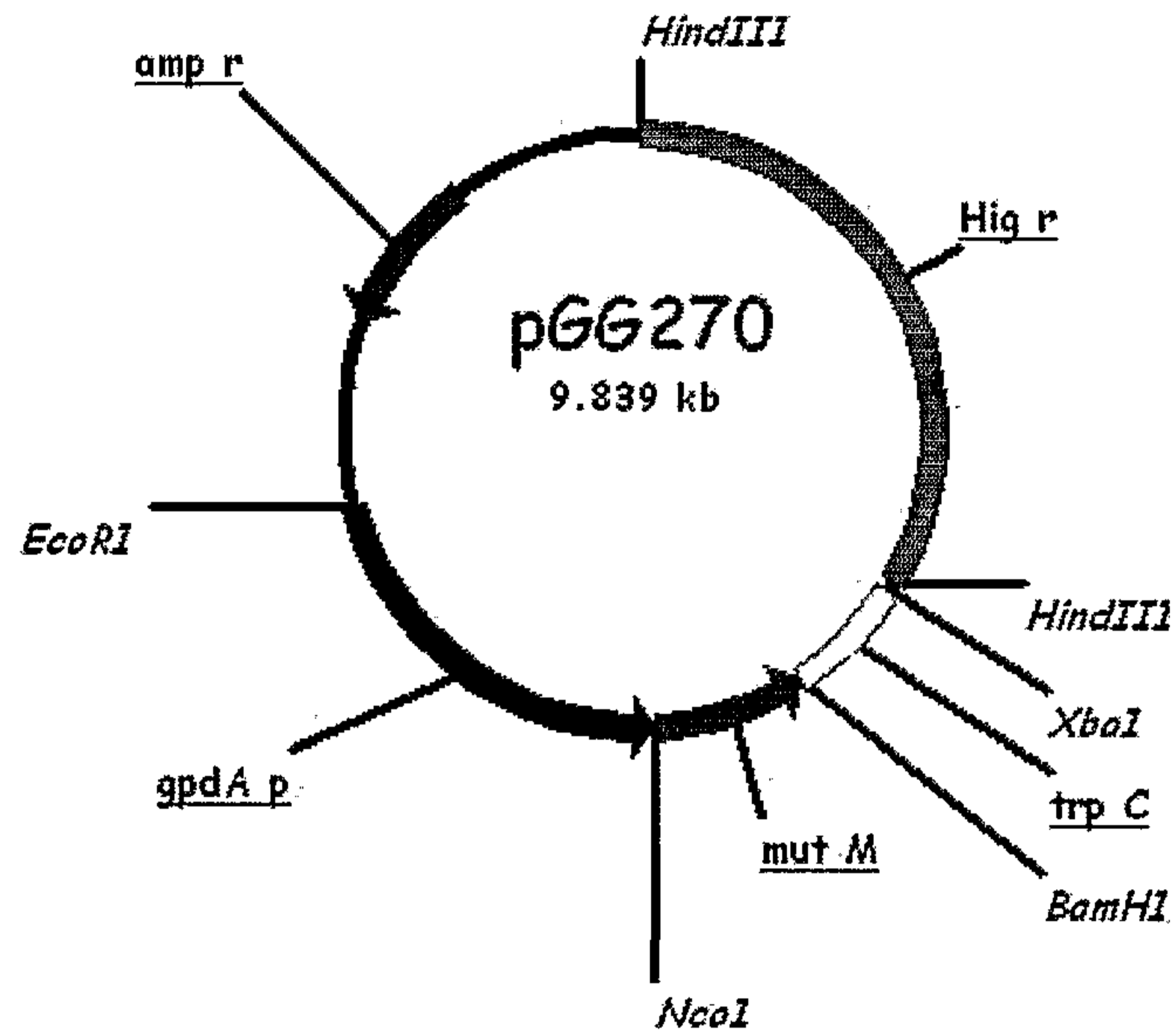


FIGURA 6

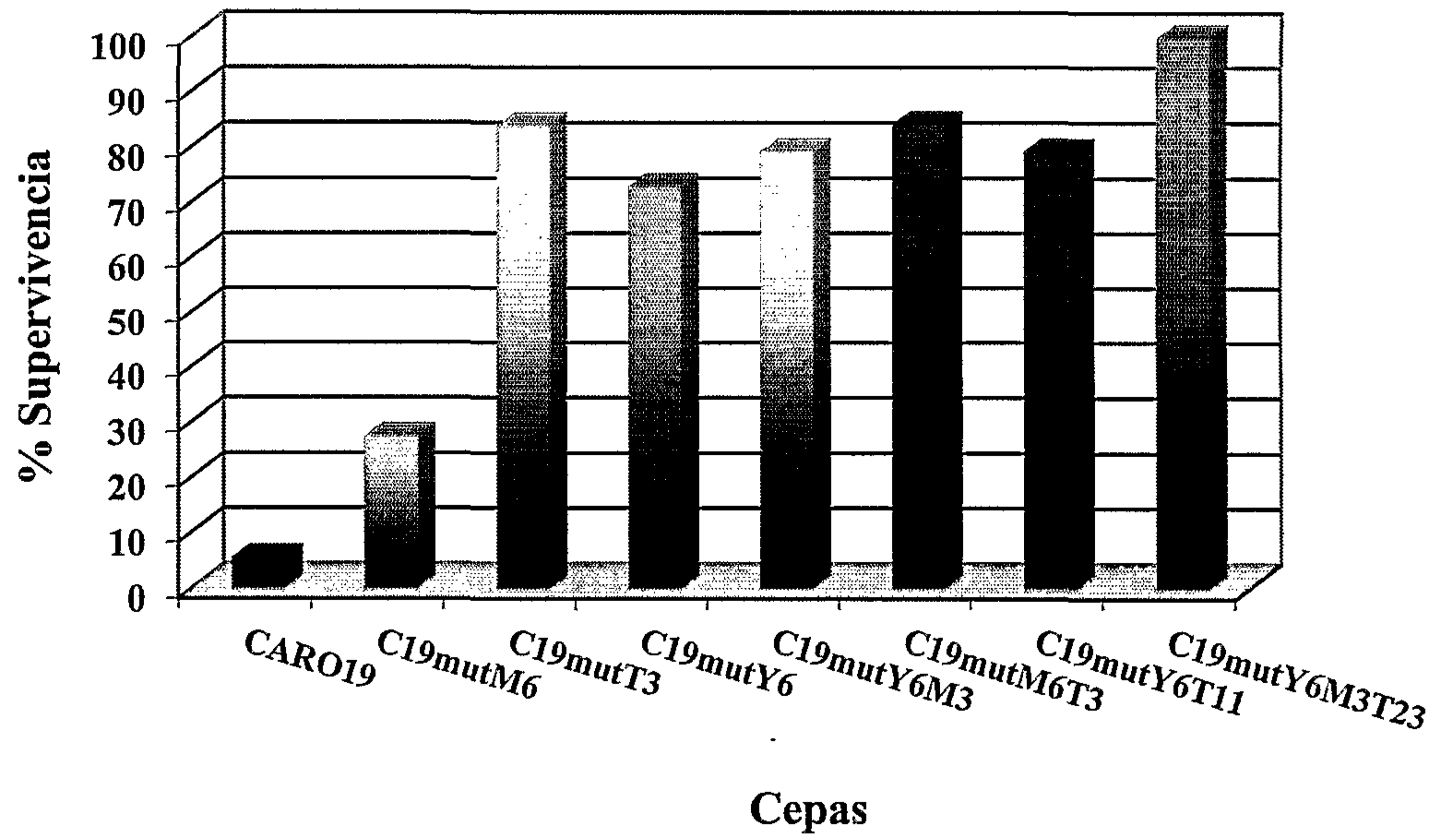


FIGURA 7