

SISTEMA DE EXPRESIÓN GÉNICA

La presente invención se refiere a sistemas de expresión letales condicionales para insectos, a su uso y a métodos de control de población utilizando insectos transformados con los mismos.

Un método significativo de control de las poblaciones de insectos en el medio salvaje consiste en el arte de Insecto Estéril irradiado (SIT), que sirve como un método de control de insectos inocuo para el medio ambiente, implica la cría en masa de las moscas y la esterilidad de los machos por irradiación. Sin embargo, la SIT no es efectiva ni económicamente viable en todas las áreas cuando se compara con otros métodos de control, y el éxito del programa de radiación SIT depende de que la mosca irradiada tenga patrones de comportamiento similares a las poblaciones salvajes de machos. Otra limitación de este método SIT es la separación de machos y hembras en la etapa pupal. Es deseable liberar solamente insectos machos, ya que la liberación de insectos hembra puede resultar en un mayor daño a los cultivos en la zona de liberación. En particular, la separación requiere una clasificación manual laboriosa de los insectos, y consume mucho tiempo.

25

Un método alternativo ha sido la introducción de las cepas sexadas letales sensibles a la temperatura (TSL), por lo que una translocación cromosómica de una mutación espontánea en la mosca del mediterráneo (medfly) ha permitido una separación sensible a la temperatura (Caceres 2002); Esta línea transformada es 99% efectiva en la eliminación de las hembras (Mumford 2012). Sin embargo, la cepa *tsl* ha

demostrado un alto grado de inestabilidad y, por lo tanto, requiere instalaciones laboriosas y costosas de colonia de filtros en instalaciones de cría en masa (Caceres 2002).

Otro método de control es el uso de un sistema genético represible, dominante, letal introducido en el genoma de un insecto. Un perfeccionamiento adicional de este método ha consistido en utilizar un sistema genético represible, dominante, letal específico para la hembra. Estos sistemas proporcionan para la expresión específica para hembras de un producto de gen letal en ausencia de un represor. Se desarrollaron sistemas de dos componentes, en los que un producto del gen transactivador actúa como un transactivador para un gen letal, mediante la activación de un promotor para el gen letal. El sistema es represible proporcionando un represor que evitaría la acción del producto génico transactivador sobre el promotor del gen letal.

En desarrollos posteriores de este sistema genético represible, dominante, letal, específico hembra, se proporciona un solo gen a expresar, con el producto del gen que es un transactivador para el gen y que es un producto letal, creando así un bucle de retroalimentación positivo que conduce a la muerte del insecto transgénico.

Gong *et al.* Describen cepas de moscas del mediterráneo que albergan transactivadores de tetraciclina (tTA) que causan letalidad en etapas tempranas de desarrollo de la progenie heterocigótica pero que tienen poco efecto sobre la supervivencia de los insectos transgénicos parentales. En este sistema, tTA es tanto el transactivador como el letal, ya que se cree que los altos niveles de tTA son perjudiciales para las células. De hecho, el tTA se modificó para ser

optimizado para la expresión en insectos, y esta variante se conoce como tTAV. Sin embargo, este documento describe que algunos insectos escaparon al efecto letal del tTAV, y que la posibilidad de resistencia bioquímica a la molécula efectora letal puede ser un inconveniente para este sistema. También se describe que se prefiere la letalidad temprana en el desarrollo.

Fu *et al.* Describen un sistema genético autocida específico en hembras *C. capitata*, utilizando tTA y *Cctra*. El *Cctra* insertado en el tTA produce la interrupción de la transcripción tTA en las variantes del empalme en machos, pero no en las variantes del empalme en hembras (Figura 1). Anteriormente, había carencia de sistemas de expresión génica caracterizados capaces de conferir expresión específica en hembras en etapas de desarrollo tempranas. El sistema de Fu *et al.*, proporciona esa expresión específica en hembras en las primeras etapas del desarrollo. El intrón específico en hembras *Cctra* se insertó en la región codificadora de tTAV en un bucle de retroalimentación positiva de Gong *et al.*, y esto proporcionó letalidad específica en hembras.

Sin embargo, los datos obtenidos en Fu *et al.*, indica que la letalidad ocurre en las etapas larval tardía/pupal temprana del desarrollo y que la mayoría de las líneas de insectos no son 100% penetrantes. Fu *et al.*, también describe que una dificultad potencial de este sistema es la saturación de la capacidad de respuesta. Se cree que los factores que regulan el empalme alternativo están en suministro relativamente corto, de manera que la vía de empalme alternativa puede saturarse si se produce demasiado pre-mARN. Para que el sistema de retroalimentación positiva específico de la hembra sea letal, se deben producir grandes cantidades de tTAV, por

lo que se requieren altos niveles de empalme de tipo F1 (tipo hembra). Otro problema es la ineficiencia, ya que una proporción sustancial del pre-mARN en las hembras se procesa en las formas macho (M1 y M2). Éstos no producen una proteína
5 funcional, por lo que tienden a atenuar la letalidad con respecto a los constructos no específicas del sexo.

Por lo tanto, es deseable proporcionar un sistema genético represible, dominante, letal específico para hembras,
10 mejorado, con inicio temprano del efecto letal en el desarrollo al previamente visto, preferiblemente con penetración mejorada, y preferiblemente con un riesgo reducido de resistencia bioquímica. Una mejora adicional deseable es la mayor estabilidad del sistema una vez
15 insertado en el genoma del huésped.

Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que la penetración de un sistema transgénico de este tipo se mejora proporcionando un transgén que tiene dos sistemas de
20 expresión letales dominantes reprimibles, específicos para la hembra. La provisión de dos sistemas de expresión de este tipo sorprendentemente también tiene la ventaja adicional de inducir una aparición temprana de letalidad, además de reducir el riesgo de desarrollar resistencia bioquímica al
25 producto letal.

Por lo tanto, en un primer aspecto, se proporciona una secuencia de polinucleótidos que comprende un primer y un segundo sistema de expresión génica, en el que:

30

- i) el primer sistema de expresión génica comprende los componentes; un primer gen letal dominante operativamente

unido a un primer promotor, un gen que codifica un primer factor de transcripción de activación, y una primera secuencia de control de empalme,

ii) el segundo sistema de expresión génica comprende los componentes; un segundo gen letal dominante operativamente unido a un segundo promotor, un gen que codifica un segundo factor de transcripción de activación, y una segunda secuencia de control de empalme,

en la que

Cada uno de dichos factores de transcripción de activación es capaz de activar al menos uno de dichos promotores, con la condición de que ambos de dichos promotores se activan cuando se expresan ambos de dichos factores de transcripción,

Cada una de la primera y segunda secuencias de control de empalme media la expresión específica para la hembra del primero y segundo gen letal dominantes, respectivamente, mediante empalme alternativo, la actividad de transactivación de cada uno del primero y el segundo factores de transcripción de activación es represible por un primero y un segundo factor de control exógeno, respectivamente, en donde dicho primer factor de control exógeno es igual o diferente de dicho segundo factor de control exógeno; y

Cada uno de dichos componentes de dicho primer sistema de expresión génica es el mismo o diferente de dichos componentes de dicho segundo sistema de expresión génica.

Los sistemas de expresión de la invención son capaces de expresarse en insectos, preferiblemente al menos en dípteros, coleópteros y/o lepidópteros.

5 Los sistemas de expresión de la invención preferiblemente comprenden cada uno un promotor seleccionado para la expresión en insectos, preferiblemente al menos en dípteros, coleópteros y/o lepidópteros. El promotor puede ser un promotor de insecto, o un promotor que es operativo en al
10 menos un tejido de un insecto objetivo.

Se ha demostrado que dos o más sistemas de expresión génica condicional, dominante, letal proporcionan altos niveles de penetración en insectos. La letalidad generalmente se induce
15 en una etapa temprana de desarrollo y el riesgo de resistencia bioquímica se reduce, en comparación con un único sistema de expresión génica, letal dominante condicional para insecto. La invención es útil para el control de las poblaciones de insectos.

20

Cada uno de los dos sistemas comprende un gen letal dominante que se ha de expresar y un factor de transcripción de activación para activar la expresión del gen letal. El efecto del factor de transcripción de activación puede ser
25 reprimido, y el producto del gen letal dominante tiene un efecto letal sobre el insecto cuando se expresa en cantidad suficiente. Cada sistema de expresión también comprende una secuencia de control de empalme que proporciona la especificidad en hembras del efecto letal. La presencia de
30 dos sistemas de expresiones letales, dominantes, reprimibles, específicos de la hembra mejora la penetración del sistema aumentando la cantidad de producto letal expresado, con lo

que se incrementa así la probabilidad de letalidad efectiva. La presencia de dos sistemas de expresión también induce una aparición temprana de letalidad durante el desarrollo debido a una acumulación de producto letal, y el riesgo de
5 mecanismos de resistencia se reduce porque la probabilidad de desarrollar resistencia a ambos sistemas de expresión es baja.

El término "penetrancia", tal como se utiliza aquí, se
10 refiere a la proporción de individuos que llevan una variante particular de un gen que expresa también el rasgo fenotípico asociado con esa variante. Por lo tanto, la "penetrancia", en relación con la presente invención, se refiere a la proporción de organismos transformados que expresan el
15 fenotipo letal.

El término "constructo", como se usa aquí, se refiere a un segmento de ADN construido artificialmente para su inserción en un organismo huésped, para modificar genéticamente el
20 organismo huésped. Al menos una parte del constructo se inserta en el genoma del organismo huésped y altera el fenotipo del organismo huésped. El constructo puede formar parte de un vector o ser el vector.

25 El término "transgén", tal como se utiliza en este documento, se refiere a la secuencia de polinucleótidos que comprende un primer y un segundo sistema de expresión génica para ser insertado en el genoma del organismo huésped, para alterar el fenotipo del organismo huésped.

30

El término "sistema de expresión génica", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen a ser expresado junto

con cualquier gen y secuencias de ADN que se requieran para la expresión de dicho gen a ser expresado.

El término "secuencia de control de empalme", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de ADN asociada con un gen, en donde la secuencia de ADN, junto con un espliceosoma, media el empalme alternativo de un producto de ARN de dicho gen. Preferiblemente, la secuencia de control de empalme, junto con el spliceosoma, media el empalme de un transcripto de ARN del gen asociado para producir un mRNA que codifica una proteína funcional y media el empalme alternativo de dicho transcripto de ARN para producir al menos un mRNA alternativo que codifica una proteína no funcional.

15

El término "actividad de transactivación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la actividad de un factor de transcripción de activación, que da como resultado una velocidad aumentada de expresión de un gen. El factor de transcripción de activación puede unirse a un promotor operativamente unido a dicho gen, activando de este modo el promotor y, en consecuencia, potenciando la expresión de dicho gen. Alternativamente, el factor de transcripción de activación puede unirse a un potenciador asociado con dicho promotor, promoviendo así la actividad de dicho promotor a través de dicho potenciador.

El término "gen letal", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un gen cuyo producto de expresión tiene un efecto letal, en cantidad suficiente, sobre el organismo dentro del cual se expresa el gen letal.

El término "efecto letal", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un efecto perjudicial o esterilizante, tal como un efecto capaz de destruir el organismo *per se* o su progenie, o capaz de reducir o destruir la función de ciertos tejidos de los mismos, de los cuales el tejido reproductor se prefiere particularmente, de manera que el organismo o sus descendientes son estériles. Por lo tanto, algunos efectos letales, tales como venenos, destruirán al organismo o al tejido a corto plazo en relación con su vida, mientras que otros pueden simplemente reducir la capacidad del organismo para funcionar, por ejemplo, de forma reproductiva.

El término "variante del gen tTAV", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido que codifica la proteína tTA pero que difieren en la secuencia de nucleótidos.

El término "promotor", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN, generalmente directamente corriente arriba de la secuencia codificadora, requerida para la transcripción basal y/o regulada de un gen. En particular, un promotor tiene suficiente información para permitir el inicio de la transcripción, generalmente tiene un sitio donde comienza la iniciación de la transcripción y un sitio de unión para el complejo de la polimerasa.

El término "promotor mínimo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un promotor como se ha definido anteriormente, generalmente tiene un sitio donde comienza la iniciación de la transcripción y un sitio de unión para el complejo de la polimerasa y, además,

generalmente tienen una secuencia adicional suficiente para permitir que estos dos sean efectivos. Generalmente carece de otra información de secuencia, tal como, por ejemplo, la que determina la especificidad del tejido.

5

El término "factor de control exógeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que no se encuentra naturalmente en el organismo huésped y que no se encuentra en el hábitat natural de un organismo huésped o en
10 una condición ambiental que no se encuentra en el hábitat natural del organismo huésped. De este modo, la presencia del factor de control exógeno se controla mediante el manipulador de un organismo huésped transformado con el fin de controlar la expresión del sistema de expresión génica.

15

El término, "tet0", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más unidades operadoras *tet0* ubicadas en serie.

20 El término, por ejemplo, "tet0x7", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un elemento *tet0* que consiste del número indicado de unidades de operador *tet0*. De este modo, las referencias a "tet0x7" se refieren a un elemento *tet0* que consta de siete unidades de operador *tet0*,
25 de manera similar, las referencias a "tet0x14" se refieren a un elemento *tet0* que consiste en 14 unidades de operador *tet0*, y así sucesivamente.

El término "intrón *tra*" como se usa en este documento, se
30 refiere a una secuencia de control de empalme en la que el empalme alternativo del transcrito de ARN está regulado por

la proteína TRA, por ejemplo unida a este, solo o en combinación (i.e., cuando está complejo) con TRA2.

El término "repetición mínima", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a las secuencias de repetición altamente conservadas observadas que se requieren para la actividad de una transposasa dada.

Cuando se hace referencia a una secuencia particular de nucleótidos o proteínas, se entenderá que esto incluye la referencia a cualquier mutante o variante de la misma, que tenga una actividad biológica sustancialmente equivalente a la misma. Preferiblemente, el mutante o variante tiene al menos un 85%, preferiblemente al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95%, preferiblemente al menos un 99%, preferiblemente al menos un 99,9% y más preferiblemente una identidad de secuencia al 99,99% con las secuencias de referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1 (A) y (B) son una representación esquemática del rasgo de letalidad específico de la hembra. La inserción del intrón específico en las hembras en el componente *tTA* y Ccra de un sistema génico represible a la tetraciclina de tal manera que sólo las hembras producen mRNA que codifica el *tTA* funcional. (A) Las cajas indican exones que contienen codones de parada presentes en los transcritos en machos que conducen a una *tra* truncada. (B) Las flechas por debajo de la representación indican la ubicación de hibridación del primer para el análisis de RT-PCR. (C) es una fotografía de un gel que muestra los resultados del análisis por PCR del empalme

de *tra* para la expresión específica del sexo. El intrón de *Cctra* se empalma correctamente para producir el transcrito F1 de tTAV en las hembras solamente.

La Figura 2 es una representación esquemática de una
5 implementación del constructo genético de la invención.

Las Figuras 3 (A), (B), (C) y (D) son fotografías de ciclos de gel de cuatro reacciones de PCR que abarcan las regiones de los constructos donde las secuencias *piggyBac* deberían
10 haberse eliminado mediante intercambio de casete después de cruzar las cepas OX3864A/OX3647Q con la cepa OX3133 - una fuente de transposasa - como se describe por Dafa'alla *et al* (2006).

15 La Figura 4 (A) es un gráfico que muestra la supervivencia de *C. capitata* transformada en condiciones de "ensayo de esfuerzo", i.e., sin post-eclosión de alimento o agua. Los datos de supervivencia del macho adulto y de la hembra combinados (n=180). (B) es un gráfico que muestra la
20 supervivencia bajo condiciones no estresantes, condiciones de alimento y agua ad libitum (n=180). (C) es un gráfico que muestra la fecundidad individual en la vida en las hembras. (D) es un gráfico que muestra la productividad del huevo hembra a lo largo de la vida, mostrando la producción
25 promedio de tres jaulas de 30 hembras durante 3 semanas. (E) es un gráfico que muestra las tasas de eclosión de huevos depositados por las hembras en el panel (C). (F) es una fotografía que muestra la fluorescencia de *DsRed2* en machos de cepas transformadas OX3864A (derecha) y OX3647Q (medio) en
30 comparación con machos de tipo salvaje (izquierda). (G) es una fotografía de los mismos machos adultos de (F) bajo luz blanca.

La Figura 5 es una fotografía de un gel de un ensayo con base en PCR para la identificación específica de OX3864A. El gel muestra los homocigotos OX3864, los heterocigotos OX3864, individuos de tipo salvaje y un control negativo de agua amplificado con primers específicos de OX3864, TG1 y TG2, junto con primers de Adh. El marcador (M) = Escala inteligente (Eurogentec).

La Figura 6 es una fotografía de un gel de análisis con base en PCR para la detección de la cadena principal del plásmido en muestras de mosca OX3864A. Los carriles 1-4: muestras de moscas homocigotas OX3864A; el Carril 5: insecto transformado de control positivo en el que se ha insertado el esqueleto del plásmido; el Carril 6: WT-gADN mosca del mediterráneo tipo salvaje.

La Figura 7 es una fotografía de un gel de análisis de PCR para la detección de inserciones silenciosas en moscas OX3864A. Control positivo: nueve pupas de tipo salvaje clavadas con una pupa heterocigota; Control negativo: agua. (A) muestra la detección de secuencias transgénicas (772 pb) utilizando los primers TD539) Diag3K10 (CAACTCTTCTCGTTTTGAAGTCAGC; SEQ ID NO: 22) y 852) ttAVdiagF (CGTCAGGCAATCGAGCTGTTC; SEQ ID NO: 23). (B) Muestra la detección de secuencias de tipo salvaje (852/952 pb con base en el polimorfismo tipo salvaje previamente observado) usando primers 1351) Med3864altF (GGATACC GAATTCATAGCGGCG; SEQ ID NO: 24) y 1366) Med3864flldiagR2 (GGTGAGAAGCATCCATTCCAGGC; SEQ ID NO: 25). Marcador (M): Escala inteligente (Eurogentec).

30

La Figura 8 es una gráfica de la evolución de la dinámica poblacional de la mosca del mediterráneo mediante la

introducción de machos OX3864A. (A) es un gráfico que muestra las tasas promedio de producción diaria de huevo para cada semana dada en las jaulas de tratamiento y control. La línea más baja denota la temperatura semanal promedio diaria (centígrados), tomada de las lecturas diarias de la temperatura del mediodía. (B) muestra el número calculado de hembras de las jaulas de tratamiento y control. (C) muestra la proporción de progenie devuelta a cada una de las jaulas de tratamiento a partir de las trampas de oviposición que muestran el fenotipo fluorescente *DsRed2*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS LISTADOS DE SECUENCIAS

La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de nucleótidos del sistema de expresión génica de insecto.

La SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de nucleótidos del sistema de expresión génica flanqueada por ADN genómico de *C. capitata*.

La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de nucleótidos del sistema de expresión génica flanqueada por ADN genómico de *C. capitata*.

La SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de nucleótidos del primer TG1-3864AttpflR.

La SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de nucleótidos del primer TG1 - AttPF2.

La SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de nucleótidos del primer TG2-3864FRTFIF.

La SEQ ID NO: 7 muestra una secuencia de nucleótidos del primer TG2-FRTNheF.

La SEQ ID NO: 8 muestra una secuencia de nucleótidos del primer CcAdh2RTF.

La SEQ ID NO: 9 muestra una secuencia de nucleótidos del primer CcAdh2RTR.

La SEQ ID NO: 10 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Cc3864FRTtaqF.

5 La SEQ ID NO: 11 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Cc3864FRTtaqR.

La SEQ ID NO: 12 muestra una secuencia de nucleótidos de la sonda Cc3864FRT.

10 La SEQ ID NO: 13 muestra una secuencia de nucleótidos del primer PB5out.

La SEQ ID NO: 14 muestra una secuencia de nucleótidos del primer PB3out.

La SEQ ID NO: 15 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Diag-5PBmin.

15 La SEQ ID NO: 16 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Diag-Pb5.

La SEQ ID NO: 17 muestra una secuencia de nucleótidos del primer AmCydiagF.

20 La SEQ ID NO: 18 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Dlag6-pb3.

La SEQ ID NO: 19 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Dlag-K10 - 1.

La SEQ ID NO: 20 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Diag7-pb3.

25 La SEQ ID NO: 21 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Diag2-hr5.

La SEQ ID NO: 22 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Diag3K10.

30 La SEQ ID NO: 23 muestra una secuencia de nucleótidos del primer ttaVdiagF.

La SEQ ID NO: 24 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Med3864altF.

La SEQ ID NO: 25 muestra una secuencia de nucleótidos del primer Med3864fldiagR2

La SEQ ID NO: 26 muestra una secuencia de nucleótidos del gen tTAV.

5 La SEQ ID NO: 27 muestra una secuencia de nucleótidos del gen tTAV2.

La SEQ ID NO: 28 muestra una secuencia de nucleótidos del gen tTAV3.

La SEC ID N°: 29 muestra una secuencia polipeptídica de la
10 proteína tTAV.

La SEQ ID NO: 30 muestra una secuencia de nucleótidos de un extremo 5 '*piggyBac* que incluye 5'ITR.

La SEQ ID NO: 31 muestra una secuencia de nucleótidos de un extremo 3 '*piggyBac* que incluye 3'ITR.

15 La SEQ ID NO: 32 muestra una secuencia de nucleótidos de un extremo 3 '*piggyBac* que incluye 3'ITR.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente invención permite el control selectivo de la expresión del primero y/o segundo gen letal dominante, proporcionando así control selectivo de la expresión de un fenotipo letal. Por lo tanto, se apreciará que cada uno del gen letal codifica una proteína funcional. Se prefiere que
25 cada sistema de expresión génica sea como se describe en el documento W02005/012534.

Cada uno del gen letal tiene un efecto letal que es condicional. Un ejemplo de condiciones adecuadas incluye la
30 temperatura, de modo que el letal se expresa a una temperatura pero no, o en menor grado, a otra temperatura. Otro ejemplo de una condición adecuada es la presencia o

ausencia de una sustancia, por lo que el letal se expresa en la presencia o ausencia de la sustancia, pero no en ambas. Se prefiere que el efecto del gen letal sea condicional y no se exprese bajo condiciones permisivas que requieran la presencia de una sustancia que está ausente del entorno natural del organismo, de tal manera que el efecto letal del sistema letal ocurra en el medio natural del organismo.

Cada sistema genético letal puede actuar sobre células o tejidos específicos o imponer su efecto sobre todo el organismo. Los sistemas que no son estrictamente letales sino que imponen un costo sustancial del estado físico también se prevén, por ejemplo, conduciendo a la ceguera, ausencia de vuelo (para los organismos que podrían volar normalmente), o la esterilidad. También se prevén sistemas que interfieren con la determinación del sexo, por ejemplo transformando o tendiendo a transformar todo o parte de un organismo de un tipo sexual a otro. Sin embargo, se prefiere que el producto de cada gen letal dé lugar a la esterilización, ya que esto permite que el organismo compita en el medio natural ("en estado salvaje") con organismos de tipo salvaje, pero el organismo estéril no puede producir descendencia viable. De esta manera, la presente invención consigue un resultado similar a técnicas tales como la Técnica de Insecto Estéril (SIT) en insectos, sin los problemas asociados con la SIT, tales como el costo, el peligro para el usuario y la competitividad reducida del organismo irradiado.

En algunas implementaciones, el producto de al menos uno de los gen letal es preferiblemente un factor inductor de apoptosis, tal como la proteína AIF descrita, por ejemplo, en Cande *et al* (Journal of Cell Science 115, 4727-4734 (2002)) u

homólogos del mismo. Los homólogos de AIF se encuentran en mamíferos e incluso en invertebrados, incluyendo insectos, nematodos, hongos y plantas, lo que significa que el gen AIF se ha conservado en todo el reino eucariótico. En otras implementaciones, el producto de al menos uno de los gen letal es Hid, el producto proteico del gen defectuoso de involución de cabeza de *Drosophila melanogaster*, o Reaper (Rpr), el producto del gen reaper de *Drosophila*, o sus mutantes. El uso de Hid fue descrito por Heinrich y Scott (Proc. Natl Acad. Sci USA 97,8229-8232 (2000)). El uso de un derivado mutante, HidAla5 fue descrito por Horn y Wimmer (Nature Biotechnology 21,64-70 (2003)). Se describe aquí el uso de un derivado mutante de Rpr, RprKR (ver también White *et al* 1996, Wing *et al.*, 2001, y Olson *et al.*, 2003). Tanto Rpr como Hid son proteínas pro-apoptóticas, se cree que se unen a IAP1. La IAP1 es una proteína anti-apoptótica bien conservada. Se espera que Hid y Rpr trabajen a lo largo de un amplio rango filogenético (Huang *et al.*, 2002, Vernooy *et al.*, 2000) aunque su propia secuencia no está bien conservada.

En otras implementaciones, al menos uno de los gen letal es Nipp1 Dm, el homólogo de *Drosophila* de Nipp1 de mamífero (Parker y col., Biochemical Journal 368, 789-797 (2002), Bennett *et al.*, Genetics 164, 235-245 (2003)). El Nipp1 Dm es otro ejemplo de una proteína con efecto letal si se expresa a un nivel adecuado, tal como sería entendido por el versado en el arte. De hecho, serán conocidos muchos otros ejemplos de proteínas con un efecto letal por la persona versada en el arte.

Preferiblemente, al menos uno del gen letal es tTA o una variante del gen tTAV. El tTAV es un análogo de tTA, en el que la secuencia de tTA ha sido modificada para mejorar la compatibilidad con las especies de insectos deseadas. Son
5 posibles variantes de tTAV, que codifican la proteína tTA, de manera que los productos génicos variantes del tTAV tienen la misma funcionalidad que el producto del gen tTA. De este modo, las variantes del gen tTAV comprenden secuencias de nucleótidos modificadas en comparación con la secuencia de
10 nucleótidos tTA y entre sí, pero codifican proteínas con la misma función. Por lo tanto, se pueden usar variantes génicas de tTAV en lugar de tTA. De hecho, se prefiere usar variantes génicas de tTAV en el transgén de la invención.

15 Puede utilizarse cualquier combinación de gen letal y, en algunas implementaciones, los gen letal son los mismos mientras que, en otras implementaciones, los gen letal son diferentes. La penetración mejorada del efecto letal y el inicio temprano de la letalidad se logra mediante una
20 acumulación de producto letal.

En implementaciones preferidas, cada uno del gen letal primero y segundo es independientemente tTA o una variante del gen tTAV. En algunas implementaciones, cada uno del
25 primero y segundo gen letal es independientemente uno de tTAV (SEQ ID NO: 26), tTAV2 (SEQ ID NO: 27) y tTAV3 (SEQ ID NO: 28). En otras implementaciones, el primero y el segundo gen letal son iguales. En otras implementaciones, uno de los gen letal primero y segundo es tTAV (SEQ ID NO: 26) y el otro gen
30 es tTAV3 (SEQ ID NO: 28). Sin embargo, se puede usar cualquier combinación de variantes de tTAV; por lo tanto, en algunas implementaciones, uno de los genes primero y segundo

es tTAV (SEQ ID NO: 26) y el otro es tTAV2 (SEQ ID NO: 27),
mientras que en otra implementación uno de los genes primero
y segundo es tTAV2 (SEQ ID NO: 27) y el otro gen es tTAV3
(SEQ ID NO: 28). En otras implementaciones, el primer gen
5 letal es tTAV (SEQ ID NO: 26) y el segundo gen letal es tTAV3
(SEQ ID NO: 28).

Cada gen letal está operativamente unido a un promotor, en el
que dicho promotor es capaz de ser activado por un factor de
10 transcripción de activación codificado por un gen también
incluido en al menos uno de los sistemas de expresión génica.
El promotor puede ser un promotor grande o complejo, pero
éstos a menudo sufren el inconveniente de ser mal o poco
utilizados cuando se introducen en insectos no hospedadores.
15 Por consiguiente, en algunas implementaciones, se prefiere
emplear promotores mínimos. Se apreciará que pueden obtenerse
promotores mínimos directamente a partir de fuentes conocidas
de promotores, o derivados de promotores de ocurrencia
natural de mayor tamaño, o de otro modo conocido. Los
20 promotores mínimos adecuados y cómo obtenerlos serán
fácilmente evidentes para los versados en el arte. Por
ejemplo, los promotores mínimos adecuados incluyen un
promotor mínimo derivado de *Hsp70*, un promotor mínimo de P,
un promotor mínimo de *CMV*, un promotor mínimo con base en
25 *Act5C*, un fragmento promotor de *BmA3* y un promotor de núcleo
Adh (Bieschke, E., Wheeler, J., y Tower, J. (1998).
""Doxycycline-induced transgene expression during *Drosophila*
development and aging". *Mol Gen Genet*, 258, 571-579). No
todos los promotores mínimos trabajarán necesariamente en
30 todas las especies de insectos, pero es evidente para los
versados en el arte cómo asegurar que el promotor sea activo.

Se prefiere que al menos uno de los promotores ligados operativamente presentes en la invención sea activo durante el desarrollo temprano del organismo huésped, y particularmente preferible durante las etapas embrionarias, con el fin de asegurar que el gen letal se exprese durante el desarrollo temprano del organismo.

En algunas implementaciones, al menos uno de los promotores es el promotor mínimo, es un promotor de choque térmico, tal como *Hsp70*. En otras implementaciones, al menos uno de los promotores es el promotor específico del embrión de *srya* (Horn & Wimmer (2003)) de *Drosophila melanogaster*, o sus homólogos, o promotores de otros genes específicos de embriones o embriones activos, tales como el del gen *Drosophila* lento como melaza (*slam*), o sus homólogos de otras especies.

En algunas implementaciones, al menos uno de los promotores es un promotor mínimo. En algunas implementaciones, cada uno de los promotores es independientemente *Hsp70*, *Hsp73* o *srya*. En implementaciones preferidas, uno de los promotores primero y segundo es *Hsp70* y el otro es *srya*. En una implementación, el primer promotor es *Hsp70* y el segundo promotor es *srya*.

Cada sistema de expresión génica comprende además un gen que codifica un factor de transcripción de activación, en el que cada factor de transcripción de activación activa la expresión de un gen letal del transgén. Por lo tanto, cada gen que codifica un factor de transcripción de activación puede expresarse por el organismo huésped, para producir una proteína funcional. En particular, cada factor de transcripción de activación es capaz de activar al menos un promotor, en el que el promotor está unido operativamente a

un gen letal. Por consiguiente, cuando un factor de transcripción de activación activa un promotor, la expresión del gen letal unido operativamente al promotor está regulada positivamente. Cada factor de transcripción de activación puede actuar sobre el primero o el segundo promotor, o cada factor de transcripción de activación puede actuar tanto en el primero como en el segundo promotor. Se prefiere que, cuando se expresa más de un factor de transcripción de activación, se active más de un promotor. Por lo tanto, cuando se expresan tanto el primero como el segundo factores de transcripción de activación, se activan tanto el primero como el segundo promotor.

Los productos génicos que actúan como factores de transcripción de activación pueden actuar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, los factores de transcripción de activación pueden unirse a un potenciador localizado en la proximidad a al menos un promotor, sirviendo así para aumentar la unión a la polimerasa en el promotor. Se pueden emplear otros mecanismos, tales como mecanismos que contrarresta el represor, tales como el bloqueo de un inhibidor de transcripción o traducción. Los inhibidores de la transcripción pueden bloquearse, por ejemplo, mediante el uso de horquillas ARN o ribozimas para bloquear la traducción del mRNA que codifica el inhibidor, o el producto puede unirse directamente al inhibidor, evitando así la inhibición de la transcripción o traducción.

En implementaciones preferidas, el efecto del factor de transcripción de activación sobre la expresión del gen letal puede ser controlado por el versado en el arte, preferiblemente mediante el uso de un factor de control

exógeno. Se prefiere particularmente que la actividad de transactivación del factor de transcripción de activación pueda ser reprimida por el factor de control exógeno. De este modo, es posible controlar la expresión del gen letal controlando la actividad transactivante del factor de transcripción de activación. La presencia del factor de control exógeno, aplicado por el versado en el arte, reduce la actividad del factor de transcripción de activación en el promotor relevante. En consecuencia, se reprime la activación del promotor, de modo que se reduce la expresión del gen letal ligado operativamente.

Se puede utilizar cualquier factor de transcripción de activación, cuya actividad de transactivación se pueda controlar, en cada uno de los sistemas de expresión génica o en cualquiera de ellos. Por ejemplo, el factor de transcripción de activación puede ser la proteína activadora de la transcripción (tTA) reprimible con tetraciclina que, cuando se expresa, se une a la secuencia del operador tetO y dirige la expresión desde un promotor mínimo próximo. Otros ejemplos de factores de transcripción de activación controlables incluyen GAL4.

Los genes que codifican los factores de transcripción de activación pueden ser iguales o diferentes. En implementaciones preferidas, cada gen que codifica un factor de transcripción de activación es, independientemente, tTA o una variante génica de tTAV. En implementaciones particularmente preferidas, cada uno de los genes que codifican un factor de transcripción de activación es independientemente una variante del gen tTAV, y puede ser la misma o diferente variante del gen tTAV. Puede utilizarse

cualquier combinación de tTA y variante del gen tTAV. En algunas implementaciones, cada uno de los genes que codifican un factor de transcripción de activación es independientemente tTAV (SEQ ID NO: 26), tTAV2 (SEQ ID NO: 27) y tTAV3 (SEQ ID NO: 28), y los genes pueden ser iguales o diferentes. En algunas implementaciones, cada gen que codifica un factor de transcripción de activación es independientemente uno de tTAV (SEQ ID NO: 26), tTAV2 (SEQ ID NO: 27) y tTAV3 (SEQ ID NO: 28). En otras implementaciones, uno del primero y segundo genes que codifican un factor de transcripción de activación es tTAV (SEQ ID NO: 26) y el otro gen es tTAV3 (SEQ ID NO: 28). Puede utilizarse cualquier combinación de variantes de tTAV; por lo tanto, en algunas implementaciones, uno del primero y segundo genes que codifican un factor de transcripción de activación es tTAV (SEQ ID NO: 26) y el otro es tTAV2 (SEQ ID NO: 27), mientras que en otra implementación uno del primero y segundo genes que codifican un factor de transcripción de activación es tTAV2 (SEQ ID NO: 27) y el otro gen es tTAV3 (SEQ ID NO: 28). En otras implementaciones, el gen que codifica el primer factor de transcripción de activación es tTAV (SEQ ID NO: 26) y el gen que codifica el segundo factor de transcripción de activación es tTAV3 (SEQ ID NO: 28).

Como se mencionó anteriormente, los factores de control de activación son controlables, preferiblemente reprimibles, mediante un factor de control exógeno. El control de los factores de transcripción de activación se puede hacer por cualquier medio adecuado, y puede ser efectivo a cualquier nivel. Por ejemplo, el control puede ser efectivo para bloquear la transcripción del gen que codifica el factor de transcripción de activación o para bloquear la traducción del

producto ARN del mismo, o para prevenir o inhibir la acción del producto de traducción del gen.

Se apreciará que el factor de control exógeno utilizado
5 dependerá del factor de transcripción de activación
codificado en el transgén. Por ejemplo, en implementaciones
en las que al menos uno de los genes que codifica un factor
de transcripción de activación codifica GAL4, el factor de
control puede ser la temperatura (ya que GAL4 es algo
10 sensible al frío) y/o GAL80 o sus mutantes. En
implementaciones en las que al menos uno de los genes que
codifica un factor de transcripción de activación es tTA o
una variante del gen tTAV, el factor de control exógeno es
tetraciclina. La tetraciclina se une al tTA o al producto
15 variante del gen tTAV (i.e., tTA), evitando de este modo que
el tTA tenga una actividad de transactivación. La presencia o
ausencia, o modulación de la concentración, de tetraciclina
se utiliza para controlar el sistema cuando se usa tTA o un
análogo del mismo, tal como tTAV.

20

La expresión de los gen letal dominantes del transgén puede
ser específica para el sexo, o ser una combinación específica
del sexo y específica de la etapa, específica de la línea
germinal o específica del tejido, debido a la presencia de al
25 menos una secuencia de control de empalme en cada sistema de
expresión del gen. En implementaciones preferidas, la
expresión específica del sexo es específica de la hembra. La
secuencia de control de empalme en cada secuencia de
expresión génica permite un nivel adicional de control de la
30 expresión de la proteína, además del promotor. Por ejemplo,
la expresión específica de tejido o de sexo en embriones
podría ser extremadamente difícil por métodos convencionales.

El primero y el segundo gen letal comprenden una secuencia codificante para una proteína o polipéptido, i.e., al menos un exón, y preferiblemente dos o más exones, capaces de codificar un polipéptido, tal como una proteína o fragmento
5 de la misma. Preferiblemente, los diferentes exones se empalman diferencialmente entre sí para proporcionar mARNs alternativos. Preferiblemente, dichos mARNs alternativos empalmados tienen potencial de codificación diferente, i.e., codifican diferentes proteínas o secuencias de polipéptidos.
10 Por lo tanto, la expresión de la secuencia codificadora se regula mediante empalme alternativo.

Cada secuencia de control de empalme en el sistema comprende al menos un sitio donador de empalme y al menos un sitio
15 donante de empalme. El número de sitios donador y aceptor puede variar, dependiendo del número de segmentos de secuencia que se van a empalmar juntos.

En algunas implementaciones, una o ambas secuencias de
20 control de empalme regulan el empalme alternativo por medio de nucleótidos tanto intrónicos como exónicos.

En otras implementaciones, una o ambas secuencias de control de empalme es (son) una secuencia de control de empalme
25 intrónica. En otras palabras, se prefiere que dicha secuencia o secuencias de control de empalme se derive sustancialmente de polinucleótidos que forman parte de un intrón y por lo tanto se escinden del transcripto primario por empalme, de tal manera que estos nucleótidos no se retienen en la
30 secuencia madura de mARN.

Se entenderá que en el empalme alternativo, las secuencias pueden ser intrónicas en algunas circunstancias (i.e., en algunas variantes de empalme alternativas), pero exónicas en otras circunstancias (i.e., en otras variantes). De este modo, la al menos una secuencia de control de empalme de la presente invención preferiblemente se deriva sustancialmente de polinucleótidos que forman parte de un intrón en al menos una variante de empalme alternativa, i.e., en el primer producto de mRNA empalmado o en el al menos un producto de mRNA empalmado alternativamente. Por lo tanto, los intrones o secuencias intrónicas pueden verse como empalmados en por lo menos un transcripto o tipo de transcripto.

En el empalme "normal" (no-alternativo) y en el empalme alternativo, los intrones generalmente se eliminan del pre-ARN para formar un mRNA empalmado, que puede ser luego traducido en un polipéptido, tal como una proteína o fragmento de proteína, que tiene una secuencia de aminoácido. Por lo tanto, será fácilmente evidente para el versado en el arte cómo determinar aquellas secuencias del presente sistema que han de considerarse intrónicas, en lugar de exónicas.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias exónicas pueden estar implicadas en la mediación del control del empalme alternativo, pero se prefiere que al menos algunas secuencias intrónicas de control estén implicadas en la mediación del empalme alternativo. En otras palabras, cada sistema de expresión génica también puede incluir secuencias de control de empalme presentes en exones, siempre y cuando haya alguna participación intrónica del control. En algunas implementaciones, una o ambas secuencias de control de empalme se derivan o contienen elementos del gen *dsx*, donde,

sin estar limitado por la teoría, se piensa que las secuencias exónicas ayudan en el mecanismo de empalme alternativo.

5 Por lo tanto, en algunas implementaciones, la al menos una secuencia de control de empalme comprende secuencias exónicas y se entenderá que esto se contempla mediante definiciones usadas para describir la presente invención. Por lo tanto, como será evidente, es posible que algunos nucleótidos estén
10 abarcados dentro de la definición de la al menos una secuencia de control de empalme y también dentro de la definición de una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína funcional. En otras palabras, la definición de estos elementos puede superponerse, de manera que ciertos
15 nucleótidos pueden ser cubiertos por la definición de más de un elemento. Sin embargo, el versado en el arte reconocerá que esto no es inusual en la biología molecular, ya que los nucleótidos a menudo pueden realizar más de un papel. En otras implementaciones, al menos una de las secuencias de
20 control de empalme es únicamente intrónica, i.e., sin influencia exónica.

Se prefiere que al menos una secuencia de control de empalme sea capaz de ser eliminada del pre-ARN, por empalme.
25 Preferiblemente, dicha al menos una secuencia de control de empalme no da como resultado un desplazamiento de marco en al menos una variante de empalme producida. Preferiblemente, esta es una variante de empalme que codifica una proteína funcional de longitud completa. En otras palabras, al menos
30 la secuencia de control de empalme preferiblemente no media la eliminación de nucleótidos que forman parte, o estaban destinados a formar parte de, la secuencia de polinucleótidos

que codifica una proteína funcional, definida entre un codón de inicio y un codón de parada, a ser expresado en un organismo. Con esto se quiere decir que los nucleótidos que se escinden por empalme, en al menos una variante de empalme, no son nucleótidos que codifican aminoácidos en la forma de tipo salvaje de la proteína o gen. Una o más variantes de empalme pueden tener dichos nucleótidos escindidos, pero al menos una variante debe retener estos nucleótidos, de manera que no se induce un cambio de marco en al menos una variante. Estos nucleótidos eliminados son aquellos que se eliminan en adición a las secuencias que normalmente se empalman tales como el intrón.

La interacción de la al menos una secuencia de control de empalme con maquinaria de empalme celular, i.e., el spliceosoma, conduce o media la eliminación de una serie de, preferiblemente, al menos 50 nucleótidos consecutivos de la transcripción primaria y ligadura (empalme) junto de secuencias de nucleótidos que no fueron consecutivas en la transcripción primaria (porque ellos, o su complemento si se considera la secuencia antisentido, no fueron consecutivas en la secuencia de plantilla original a partir de la cual se transcribió el transcripto primario). Dicha serie de al menos 50 nucleótidos consecutivos comprende un intrón. Esta mediación actúa preferiblemente de una manera específica del sexo, más preferiblemente, específica de la hembra, de modo que los transcriptos primarios equivalentes en diferentes sexos, y opcionalmente también en diferentes etapas, tipos de tejido, etc., tienden a eliminar intrones de diferente tamaño o secuencia, o en algunos casos puede eliminar un intrón en un caso, pero no otro. Este fenómeno, la eliminación de intrones de diferente tamaño o secuencia en diferentes

circunstancias, o la eliminación diferencial de intrones de un tamaño o secuencia dado, en diferentes circunstancias, se conoce como empalme alternativo. El empalme alternativo es un fenómeno bien conocido en la naturaleza, y muchos casos son conocidos, ver mas adelante.

Cuando la mediación del empalme alternativo es específica del sexo, se prefiere que la variante de empalme que codifica una proteína funcional que se expresa en un organismo es la variante de empalme F1, i.e., una variante de empalme encontrada sola o predominantemente en las hembras y preferiblemente es la variante más abundante encontrada en las hembras, aunque esto no es esencial.

Como se mencionó anteriormente, en algunas implementaciones la manera o mecanismo de empalme alternativo es específica del sexo, preferiblemente específica de la hembra, y puede usarse cualquier secuencia de control de empalme adecuada. En implementaciones preferidas, al menos una secuencia de control de empalme se deriva de un intrón *tra*. El intrón *tra* de *Ceratitis capitata* del gen transformador se caracterizó inicialmente por Pane *et al.*, (2002), supra. En insectos, por ejemplo, la proteína *tra* se expresa diferencialmente en diferentes sexos. En particular, se sabe que la proteína *tra* está presente en gran parte en las hembras y, por tanto, media el empalme alternativo de tal manera que una secuencia codificante se expresa de una manera específica del sexo, i.e. que en algunos casos una proteína se expresa solamente en hembras o en un nivel mucho más alto en las hembras que en los machos o, alternativamente, en otros casos una proteína se expresa sólo en los machos, o en un nivel mucho más alto en los machos que en las hembras. El mecanismo para conseguir

este empalme alternativo específico del sexo mediado por la proteína *tra* o el complejo TRA/TRA-2 es conocido y se discute, por ejemplo, en Pane *et al.*, (Development 129, 3715-3725 (2002)).

5

Se apreciará que los homólogos del intrón *tra* de *Ceratitis capitata* del gen transformador existen en otras especies, y éstos pueden identificarse fácilmente en dichas especies y también en sus diversos géneros. Por lo tanto, cuando se hace
10 referencia a *tra* se apreciará que esto también se refiere a homólogos *tra* en otras especies. Por tanto, en algunas implementaciones cada uno de los mecanismos de empalme alternativos se deriva de forma independiente del intrón *tra* de *Ceratitis capitata* (*Cctra*), o de otro ortólogo u homólogo.
15 En algunas implementaciones, el ortólogo u homólogo es de un artrópodo, preferiblemente un tefrítido. En otras implementaciones, el ortólogo u homólogo es del género *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* o *Rhagoletis*. En otras implementaciones, el ortólogo u homólogo es de *C. rosa*, o *B.*
20 *zonata*. En otras implementaciones, el ortólogo u homólogo es de *B. zonata*, y este ortólogo u homólogo se denomina en el presente documento *Bztra* (número de acceso a GenBank BzTra KJ397268).

25 Las secuencias de control de empalme de los sistemas de expresión génica pueden ser iguales o diferentes. En algunas implementaciones, se prefiere que las secuencias de control de empalme se deriven de especies diferentes con el fin de reducir el riesgo de recombinación. Por lo tanto, en
30 implementaciones preferidas, una de la primera y segunda secuencias de control de empalme es *Cctra* y la otra se deriva de una especie diferente. En implementaciones particularmente

preferidas, una de la primera y segunda secuencias de control de empalme es *Cctra* y la otra es *Bztra* (número de acceso de GenBank *BzTra* KJ397268). En otra implementación, la primera secuencia de control de empalme es *Cctra* y la segunda
5 secuencia de control de empalme es *Bztra* (número de acceso de GenBank *BzTra* KJ397268).

La longitud exacta de la secuencia de control de empalme derivada del intrón *tra* no es esencial, siempre que sea capaz
10 de mediar el empalme alternativo. A este respecto, se piensa que alrededor de 55 a 60 nucleótidos es la longitud mínima para un intrón *tra* modificado, aunque el intrón *tra* de tipo salvaje (variante de empalme F1) de *C. capitata* tiene una extensión de 1345 nucleótidos.

15 En otras implementaciones, al menos una de las secuencias de control de empalme se deriva del mecanismo de empalme alternativo del gen *Actina-4* derivado de un artrópodo, preferiblemente un tefrítido. En implementaciones en las que más de una secuencia de empalme se deriva de *Actina-4*, pueden
20 derivarse de la misma o de diferentes especies de tefrítidos. En algunas implementaciones, cada gen *Actina-4* se deriva independientemente de una especie de los géneros *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* o *Rhagoletis*. En otras implementaciones, el primero y el segundo genes de *Actina-4*
25 se derivan independientemente de *Ceratitis capitata*, *Trocera oleae*, *Ceratitis rosa* o *Bactrocera zonata*. En algunas implementaciones, al menos uno de los genes primero y segundo *Actina-4* se deriva de *Ceratitis capitata*. En implementaciones en las que más de una secuencia de control de empalme se
30 deriva de *Actina-4*, las secuencias de control de empalme pueden derivarse de la misma especie. Sin embargo, se prefiere que las secuencias de control de empalme se deriven

de diferentes especies con el fin de reducir el riesgo de recombinación.

En algunas implementaciones, al menos una de las secuencias
5 de control de empalme comprende al menos un fragmento del gen
doublesex (*dsx*) derivado de un artrópodo, preferiblemente un
tefrítido. En algunas implementaciones, más de una secuencia
de control de empalme (e.g., tanto la primera como la segunda
secuencia de control de empalme) se deriva de *dsx*, y los
10 genes *dsx* se derivan de la misma o diferente especie de
tefrítido. En algunas implementaciones, cada gen *dsx* se
deriva independientemente de una especie de los géneros
Ceratitis, *Bactrocera*, *Anastrepha* o *Rhagoletis*. En algunas
implementaciones, los genes *dsx* se derivan independientemente
15 de *Ceratitis capitata*, *Trocera oleae*, *Ceratitis rosa* o
Bactrocera zonata. En algunas implementaciones, al menos uno
de los genes *dsx* primero y segundo se deriva de *Ceratitis*
capitata. En implementaciones en las que más de una secuencia
de control de empalme se deriva de *dsx*, las secuencias de
20 control de empalme pueden derivarse de la misma especie. Sin
embargo, se prefiere que las secuencias de control de empalme
se deriven de diferentes especies con el fin de reducir el
riesgo de recombinación.

25 Aunque en algunas implementaciones se prevé que las
secuencias de control de empalme se derivan del mismo gen o
intrón de origen, en otras implementaciones las secuencias de
control de empalme se derivan de diferentes genes o intrones
de origen. Por ejemplo, en algunas implementaciones, una de
30 las secuencias de control de empalme se deriva del intrón *tra*
y la otra secuencia de control de empalme se deriva del gen
Actina-4 o del gen *dsx*.

En algunas implementaciones, al menos uno del primero y segundo sistemas de expresión génica comprende además un potenciador que está asociado con el promotor de dicho sistema de expresión génica. Al menos uno de los factores de transcripción de activación, codificado en el primero y/o
5 segundo sistema de expresión génica, se une al potenciador, de tal manera que la unión del factor o factores de transcripción de activación sirve para potenciar la actividad de dicho promotor asociado, por ejemplo, mediante la
10 promoción de la unión de la polimerasa al promotor.

En implementaciones en las que un promotor de un sistema de expresión génica está asociado con un potenciador, el promotor es sustancialmente inactivo en ausencia de un
15 potenciador activo. Tales promotores son preferiblemente promotores mínimos, tales como los descritos anteriormente.

Se aprecia que los versados en el arte reconocerán qué potenciadores son adecuados para su uso en la presente
20 invención. En particular, el potenciador debe ser adecuado para estar unido por un factor de transcripción de activación como se describió anteriormente (i.e., que es controlable por un factor de control exógeno).

25 Por lo tanto, en implementaciones en las que uno o más de los genes letales dominantes es tTA o una variante de gen tTAV, un potenciador es un elemento tetO, que comprende una o más unidades del operador tetO. Corriente arriba de un promotor, en cualquier orientación, tetO es capaz de aumentar los
30 niveles de transcripción a partir de un promotor en estrecha proximidad con él, cuando está unido por el producto del gen tTA o una variante del gen tTAV. En algunas implementaciones,

cada potenciador es independientemente uno de tet0x1, tet0x2, tet0x3, tet0x4, tet0x5, tet0x6, tet0x7, tet0x8, tet0x9, tet0x10, tet0x11, tet0x12, tet0x13, tet0x14, tet0x15, tet0x16, tet0x17, tet0x18, tet0x19, tet0x20 Y tet0x21. En algunas implementaciones, cada potenciador es independientemente uno de tet0x1, tet0x14 y tet0x21. En implementaciones que comprenden más de un potenciador, el primer potenciador es el mismo o diferente del segundo potenciador.

10

En implementaciones preferidas, tanto el primero como el segundo sistema de expresión génica además comprenden un potenciador, i.e., el primero y el segundo potenciadores, respectivamente. En algunas implementaciones, uno de los potenciadores primero y segundo es tet0x7 y el otro potenciador es tet0x14. En otras implementaciones, el primer potenciador es tet0x7 y el segundo potenciador es tet0x14.

En algunas implementaciones, en un sistema de expresión génica dado, se prefiere vincular el gen letal dominante de dicho sistema de expresión génica con el gen que codifica el factor de transcripción de activación, del mismo sistema de expresión génica. Esto puede lograrse colocando los dos genes en tándem, incluyendo la posibilidad de proporcionar los dos como un producto de fusión, o, por ejemplo, proporcionando cada gen con su propio promotor en orientaciones opuestas pero en yuxtaposición al sitio potenciador.

En algunas implementaciones, al menos uno de los sistemas de expresión génica forma un sistema de expresión lineal. Por tanto, cuando se expresa el gen que codifica el factor de transcripción de activación, dicho factor de transcripción de

activación activa el promotor unido operativamente al gen letal, con lo que se regula positivamente la expresión del gen letal. En algunas implementaciones, el factor de transcripción de activación activa sólo el promotor del sistema de expresión génica por el que dicho factor de transcripción de activación se expresa. En otras implementaciones, el factor de transcripción de activación también puede activar el promotor del otro sistema de expresión génica.

10

En implementaciones más preferidas, el gen letal dominante de un sistema de expresión génica particular es uno y el mismo que el gen que codifica el factor de transcripción de activación también parte de dicho sistema de expresión génica. Por tanto, el producto letal actúa como el factor de transcripción de activación para al menos ese sistema de expresión génica. En consecuencia, el producto del gen letal activa el promotor de dicho sistema de expresión génica, con lo que se regula positivamente la expresión de dicho gen letal, dando como resultado un bucle de retroalimentación positivo. En otras palabras, dicho gen letal dominante es también el gen que codifica el factor de transcripción de activación de dicho sistema de expresión génica. Por lo tanto, la potenciación del promotor no sólo sirve para aumentar la transcripción del factor de transcripción de activación, sino que también conduce a una acumulación del producto letal de ese sistema de expresión génica, dando como resultado un efecto letal sobre el organismo huésped. A este respecto, en una implementación, se prefiere particularmente que el bucle de retroalimentación positivo del primero y/o segundo sistemas de expresión génica sea como se describe en el documento W02005/012534.

30

Preferiblemente, el primero y/o segundo gen letal es tTA o una variante del gen tTAV como se describió anteriormente. En tales implementaciones, el sistema de expresión génica relevante comprende además un elemento tetO, como se describió anteriormente, como potenciador. El gen que codifica el factor de transcripción de activación es uno y el mismo que dicho gen letal. El factor de control exógeno es tetraciclina. Por lo tanto, el control se ejerce sobre el mecanismo de retroalimentación positivo por la presencia o ausencia de tetraciclina, con la presencia de tetraciclina que reprime la actividad de transactivación del producto tTA o de la variante del gen tTAV sobre el promotor.

Aunque, cuando al menos uno de los sistemas de expresión génica es un bucle de retroalimentación positiva, el factor de transcripción de activación de dicho bucle de retroalimentación positiva activa el promotor de dicho sistema de expresión génica, en algunas implementaciones el factor de transcripción de activación también activa el promotor del otro sistema de expresión génica.

En algunas implementaciones, uno de los sistemas de expresión génica es un sistema de expresión génica lineal como se describió anteriormente, y el otro es un bucle de retroalimentación positiva, como se describió anteriormente.

En algunas implementaciones, tanto el primero como el segundo sistemas de expresión génica actúan como bucles de retroalimentación positivos. Cada uno de los sistemas de expresión génica primero y segundo expresa un producto de gen letal diferente, de tal manera que el producto del gen letal del primer sistema de expresión génica actúa como el factor

de transcripción de activación sólo para el primer sistema de expresión génica y viceversa.

En implementaciones preferidas, tanto el primero como el
5 segundo sistemas de expresión génica actúan como bucles de retroalimentación positivos y expresan los mismos productos letales o similares. Por lo tanto, el producto del gen letal expresado por el primer sistema de expresión génica actúa como un factor de transcripción de activación tanto para el
10 primero como para el segundo sistema de expresión génica, y viceversa. Por consiguiente, en algunas implementaciones, tanto el primero como el segundo sistemas de expresión génica comprenden tTA o una variante del gen tTAV tanto como el gen letal y el gen que codifica el factor de transcripción de
15 activación. Por consiguiente, ambos sistemas de expresión génica comprenden un potenciador que es un elemento tetO como se describió anteriormente, que dirige la expresión a partir del promotor asociado. El primer factor de transcripción de activación (i.e., el primer producto de gen letal) puede
20 unirse tanto al primero como al segundo potenciador, y el segundo factor de transcripción de activación puede unirse tanto al primero como al segundo potenciador.

En algunas implementaciones, uno de los sistemas de expresión
25 génica comprende además un tercer gen letal dominante, operativamente unido a un tercer promotor. El factor de transcripción de activación que es capaz de activar el promotor del sistema de expresión génica relevante también es capaz de activar el tercer promotor, potenciando con ello la
30 expresión del tercer gen letal. De este modo, la expresión del tercer gen letal también se puede controlar,

preferiblemente reprimida, por el factor de control exógeno que actúa sobre dicho factor de transcripción de activación.

En algunas implementaciones, el sistema de expresión génica
5 relevante comprende además un potenciador como se describió anteriormente, así como opcionalmente un tercer gen letal y un tercer promotor. En algunas de tales implementaciones, el promotor de dicho sistema de expresión génica y el tercer promotor están ambos asociados con dicho potenciador.
10 Preferiblemente, el promotor de dicho sistema de expresión génica está asociado con un extremo del potenciador y el tercer promotor está asociado con el otro extremo del potenciador. En particular, como se describió anteriormente, algunos potenciadores son capaces de aumentar los niveles de
15 transcripción en cualquier orientación.

El tercer gen letal expresa un producto letal y, por lo tanto, se agrega al efecto letal del transgén debido a la acumulación del producto letal total. Sin embargo, las
20 mejoras, descritas anteriormente, proporcionadas por el transgén se observan incluso sin la presencia del tercer gen letal en el transgén.

El tercer gen letal puede ser cualquiera conocido por los
25 versados en el arte. En algunas implementaciones, el tercer gen letal es cualquiera de los mencionados anteriormente en relación con el primero y el segundo gen letal. En algunas implementaciones, el tercer gen letal es *tTA*, una variante del gen *tTAV* o *VP16*. En implementaciones preferidas, el
30 tercer gen letal es *VP16*.

El tercer promotor puede ser cualquiera de los descritos anteriormente en relación con el primero y el segundo promotores del transgén. En algunas implementaciones, el tercer promotor es un promotor mínimo. En implementaciones
5 preferidas, el tercer promotor se expresa en el desarrollo temprano del organismo, preferiblemente al menos durante las etapas embrionarias. Preferiblemente, el tercer promotor es *Hsp70* o *srya*. En otras implementaciones, el tercer promotor es *Hsp70*.

10

En algunas implementaciones, el transgén comprende además un marcador genético. En algunas implementaciones, este marcador es un marcador fluorescente, que es un gen que codifica una proteína fluorescente. Los marcadores genéticos adecuados
15 serán evidentes para los versados en el arte. En implementaciones preferidas, el marcador fluorescente es *DsRed2*, que codifica la proteína fluorescente *DsRed2*. En otras implementaciones, el marcador genético es una proteína fluorescente verde, o variantes de la misma. Estos marcadores
20 genéticos son útiles en la selección de organismos transformados con éxito. Además, tales marcadores son útiles para distinguir, por ejemplo, moscas transgénicas de moscas de tipo salvaje en el campo, o aquellas capturadas en el campo.

25

Los versados en el arte apreciarán que, en implementaciones que comprenden dichos marcadores genéticos, los componentes requeridos para expresar el marcador también se incluirán en dicha implementación. Por ejemplo, se prevé que los
30 marcadores fluorescentes estarán operativamente por lo tanto unidos a un promotor. Se puede usar cualquier promotor adecuado, por ejemplo *Hr5/IE1*.

En una implementación preferida, tTAV (SEQ ID NO: 26) es el primer gen letal dominante, *Hsp70* es el primer promotor y *Cctra* es la primera secuencia de control de empalme. Este primer sistema de expresión génica es un bucle de retroalimentación positiva como se describió anteriormente, de tal manera que el primer gen letal es también el gen que codifica el primer factor de transcripción de activación. El primer sistema de expresión génica comprende además un primer potenciador, en el que el primer potenciador es tetOx7. El segundo sistema de expresión génica comprende tTAV3 (SEQ ID NO: 28) como segundo gen letal dominante, *srya* como el segundo promotor y Bztra (número de acceso a GenBank BzTra KJ397268) como la segunda secuencia de control de empalme. El segundo sistema de expresión génica también forma un bucle de retroalimentación positivo, de tal manera que el segundo gen letal es el gen que codifica el segundo factor de transcripción de activación. El segundo sistema de expresión génica comprende además un segundo potenciador, en el que el segundo potenciador es tetOx14. El segundo sistema de expresión génica también comprende además un tercer gen letal conectado operativamente a un tercer promotor, en el que el tercer gen letal es *VP16* y el tercer promotor es *Hsp70*. El tercer promotor está asociado con el segundo potenciador, con el segundo promotor que esta asociado con un extremo del potenciador y el tercer promotor que está asociado con el otro extremo del segundo potenciador. El transgén comprende además un marcador genético y un promotor del mismo, en el que el marcador genético es *DsRed2* y el promotor por lo tanto es *Hr5/IE1*. En otra implementación, el transgén es una secuencia de polinucleótidos que tiene la secuencia representada por la SEQ ID NO: 1.

El primero y segundo sistemas de expresión génica están dispuestos en tándem, formando un transgén, y el transgén puede o no comprender secuencias enlazadoras de nucleótidos entre cada sistema de expresión génica. En implementaciones que no comprenden una secuencia enlazadora entre los sistemas de expresión génica, el primero y segundo sistemas de expresión génica son contiguos. En implementaciones que comprenden una secuencia enlazadora entre el primero y el segundo sistemas de expresión génica, la secuencia enlazadora es de 1 pb a 10 kbps de longitud.

También se apreciará que, en implementaciones en las que el transgén comprende además un marcador genético y su promotor asociado, puede haber o no una secuencia enlazadora de nucleótidos entre el marcador genético (o su promotor) y el sistema de expresión génica adyacente. Como anteriormente, en las implementaciones en las que no está presente ninguna secuencia enlazadora, el marcador genético o su promotor es contiguo a uno de los sistemas de expresión génica del transgén. En implementaciones en las que el transgén comprende una secuencia enlazadora entre el marcador genético y el sistema de expresión génica relevante, la secuencia enlazadora es de 1 pb a 10 kbps de longitud.

25

Sin embargo, también será apreciado por los versados en el arte que se prefiere que no haya secuencias enlazadoras presentes en el transgén, de modo que los elementos del transgen sean contiguos. Esto es para reducir el riesgo de que se introduzcan mutaciones aleatorias en el transgen y para reducir el riesgo de recombinación.

La secuencia de polinucleótidos, i.e., el transgén, que comprende los sistemas de expresión génica puede formar parte de un constructo genético. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona un constructo genético que
5 comprende un primer y un segundo sistema de expresión génica como se describió anteriormente. El constructo genético puede comprender otros componentes que no forman parte del transgén. Dichos componentes pueden o no estar presentes en un organismo transformado con el mismo.

10

En algunas implementaciones, el constructo genético comprende además, al menos, cuatro repeticiones invertidas, formando al menos dos pares de repeticiones invertidas opuestas. El transgen se sitúa entre dos pares de repeticiones invertidas.
15 Esto significa que la escisión de los pares de repetición invertidos, *in situ*, es efectiva para dejar los sistemas de expresión génica insertados en el genoma del huésped, sin que estén presentes en el genoma huésped las repeticiones derivadas del transposón flanqueante. Las al menos cuatro
20 repeticiones invertidas son como se describe en el documento W02005/003364 y proporcionan la eliminación de extremos transponibles como se describe en Dafa'alla et al (2006).

En algunas implementaciones, el constructo genético comprende
25 cuatro repeticiones invertidas que forman al menos dos pares de repeticiones invertidas opuestas. En algunas de tales implementaciones, se prefiere que las cuatro repeticiones invertidas sean repeticiones terminales invertidas *piggyBac* (ITRs). Dos de las repeticiones invertidas son distales al
30 transgén, i.e. son repeticiones invertidas externas, y las repeticiones invertidas restantes son repeticiones invertidas internas. En particular, esto significa que una repetición

invertida interna está entre una repetición invertida externa y el transgén. Las cuatro repeticiones invertidas por lo tanto forman cuatro elementos transponibles diferentes, con dos de los elementos transponibles que no contienen el transgén. Los elementos transponibles que no incluyen los sistemas de expresión génica son mucho más cortos que los otros dos elementos transponibles. En general, las transposasas serán más eficaces para cortar secuencias más cortas de modo que, cuando un transposón tiene una repetición 5' y dos repeticiones 3', por ejemplo, el transposón más común que se observará que se transfiere a otro locus será el más corto, formado por la repetición 5' junto con la más proximal de las dos repeticiones 3'. Por lo tanto, como los transposones que no contienen el transgén son más cortos que los que lo hacen, la escisión de los transposones que no incluyen el transgen se produce con mayor frecuencia que la escisión de los transposones que contienen el transgen.

En algunas implementaciones, las dos ITR *piggyBac* internas se modifican para incluir aproximadamente 160 pares de bases de secuencia *piggyBac* subterminal adicional. Esta secuencia adicional puede añadirse para asegurar que los transposones más cortos (i.e., aquellos que no contienen el transgén) se escindan durante las rondas posteriores de exposición a la transposasa.

En implementaciones preferidas, el constructo comprende cuatro repeticiones invertidas *piggyBac* que forman, al menos dos pares de repeticiones invertidas opuestas. Las cuatro repeticiones invertidas *piggyBac* consisten en las secuencias de nucleótidos representadas por las SEQ ID NOs: 30-32, con la secuencia representada por la SEQ ID NO: 30 que se usa

para dos de las repeticiones invertidas *piggyBac*. En particular, una repetición invertida externa consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 30 y la otra repetición invertida externa consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 31. Una de las repeticiones internas de *piggyBac* consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 30 y la otra repetición invertida *piggyBac* interna consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 32.

Más específicamente, la repetición *piggyBac* externa 5' consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 30 y una repetición invertida *piggyBac* interna 3' consistente en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 32 está entre la repetición invertida *piggyBac* externa 5' y el transgén. La repetición invertida *piggyBac* externa 3' consiste en la secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 31 y una repetición invertida *piggyBac* interna 5' consistente en la secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 30 está entre la repetición invertida *piggyBac* externa 3' y El transgén.

Por consiguiente, los cuatro transposones posibles en tal implementación están entre:

- i) las repeticiones invertidas *piggyBac* externas 5' y externas 3',
- ii) las repeticiones invertidas *piggyBac* externas 5' e internas 3',
- iii) las repeticiones invertidas *piggyBac* externas 3' e internas 5', y
- iv) las repeticiones invertidas *piggyBac* internas 5' e internas 3'.

Como se describió anteriormente, los transposones ii) y iii) no contienen el transgen, y son más cortos que los transposones i) y iv).

5 En algunas implementaciones que tienen cuatro repeticiones invertidas, el constructo comprende además, al menos un marcador genético asociado con al menos un transposón posible con el fin de permitir al usuario seguir el progreso de las diversas etapas de transposición y escisión y determinar en
10 qué individuos han ocurrido con éxito dichas etapas. En algunas implementaciones, al menos un marcador genético está asociado con una etapa identificable en el proceso de transposición/escisión, y más preferiblemente, el marcador está asociado con el transgén. Tales marcadores asociados con
15 el transgén pueden ser como se describió anteriormente.

Preferiblemente, al menos un marcador genético está asociado con cada posible transposón. Por consiguiente, al menos un marcador genético se coloca entre cada par de repeticiones
20 invertidas. Se apreciará que puede usarse cualquier marcador genético adecuado, y ejemplos de tales marcadores incluyen *DsRed2*, *AmCyan* y *ZsGreen*. En algunas implementaciones, el constructo comprende tres marcadores genéticos, en los que se coloca un marcador entre cada par de repeticiones invertidas.
25 Se apreciará que, para distinguir entre los transposones, cada uno de los marcadores debe ser diferente.

Los versados en el arte entenderán que las implementaciones que comprenden al menos un marcador genético comprenderán también un promotor para dirigir la expresión del marcador
30 genético. En algunas implementaciones, el promotor es *Hr5/IE1* (Choi & Guarino, 1995), mientras que en otras implementaciones el promotor es poliubiquitina (Handler &

Harrel, 2001). Sin embargo, los promotores para uso con el marcador genético no se limitan a estos dos ejemplos, y se pueden usar otros. Los versados en el arte reconocerán qué promotores son adecuados.

5

En implementaciones preferidas, el constructo comprende el transgén representado por la SEQ ID NO: 1 y comprende además cuatro repeticiones invertidas *piggyBac* como se describió anteriormente. El constructo comprende además, un marcador genético entre la repetición *piggyBac* externa 5' y la repetición *piggyBac* interna 3', y un marcador genético entre la repetición *piggyBac* externa 3' y la repetición *piggyBac* interna 5', en la que uno de estos marcadores genéticos es *AmCyan* y El otro es *ZsGreen*. En implementaciones particularmente preferidas, el constructo es como se muestra en la Figura 2, en la que el marcador entre la repetición *piggyBac* externa 5' y la repetición *piggyBac* interna 3' es *ZsGreen* y el marcador entre la repetición *piggyBac* externa 3' y la repetición *piggyBac* interno 5' es *AmCyan*.

20

Como se mencionó anteriormente, el transgén y el constructo genético de la invención son útiles en el control de poblaciones de organismos en el medio salvaje. Específicamente, los artrópodos transformados con el transgén muestran letalidad sexual específica, con penetrancia de transgén mejorada y comienzo de letalidad más temprano en comparación con los insectos transgénicos previamente descritos. La transformación de artrópodos con cualquiera de los transgenes o constructos anteriores proporciona también un mecanismo de seguridad en caso de resistencia bioquímica. Los constructos que además comprenden al menos cuatro repeticiones invertidas, como se describió anteriormente,

30

proporcionan la ventaja adicional de que es posible la eliminación después de la integración de todas las secuencias de transposón, dando lugar a estabilidad tanto en condiciones de cría en masa como de campo.

5

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, se proporcionan organismos transformados con un transgén o un constructo como se describió anteriormente. En algunas implementaciones, el organismo es un artrópodo. En algunas implementaciones, el organismo es un insecto. En algunas implementaciones, el organismo es del orden de Lepidoptera, Siphonaptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Orthoptera o Mesostigmata. En otras implementaciones, el organismo es de la familia Tephritidae, Drosophilidae, Lonchaeidae, Pallopteridae, Platystomatidae, Pyrogothidae, Richardiidae o Ulidiidae. En implementaciones preferidas, el organismo es de la familia Tephritidae o Drosophilidae. En implementaciones preferidas, el organismo es del género *Ceratitis*, *Drosophila*, *Bactrocera*, *Anastrepha* o *Rhagoletis*. Más preferiblemente, el organismo es del género *Ceratitis*. En implementaciones particularmente preferidas, el organismo es *Ceratitis capitata*.

Se apreciará que el transgén o constructo puede ser administrado por cualquier medio conocido por los versados en el arte, pero generalmente probado después de integrarse en el genoma. La administración puede ser por métodos conocidos en el arte, tales como parenteralmente, intravenosos, intramuscular, oral, transdérmico, suministrados a través de una membrana mucosa, y así sucesivamente. La inyección en embriones es particularmente preferida. En algunas

implementaciones, el transgén o constructo se administra como un plásmido.

En implementaciones preferidas, el organismo transformado es
5 *Ceratitis capitata*, y el insecto transformado comprende la
secuencia representada por la SEQ ID NO: 2 ó 3. En
implementaciones preferidas particularmente, la *Ceratitis*
capitata transformada comprende la secuencia representada por
la SEQ ID NO: 2 y *Ceratitis capitata* que comprende esta
10 secuencia se denomina aquí OX3864A. En otras
implementaciones, la *Ceratitis capitata* transformada
comprende la secuencia representada por la SEQ ID NO: 3, y la
Ceratitis capitata transformada que comprende esta secuencia
se denomina aquí OX3647Q.

15

En algunas implementaciones, una *Ceratitis capitata*
transformada que comprende la secuencia representada por la
SEQ ID NO: 2 (i.e., OX3864A) es particularmente preferida por
las siguientes razones:

- 20 i) La penetración del transgen es un 100% con una copia;
i.e., como se ve en los Ejemplos, incluso en un
estado heterocigótico todas las hembras murieron en
ausencia de tetraciclina a partir del medio larvario;
- ii) La relación macho-hembra en presencia de
25 tetraciclina incorporada en la dieta larvaria es de
50:50 indicando una buena reprimibilidad de la
expresión transgénica en las hembras (esto es
importante para una propagación costo-efectiva de la
cepa en una instalación de cría);
- 30 **iii)** OX3864A mostró letalidad en hembras pre-pupales
completa en ausencia de tetraciclina;

- v) La expresión del marcador rojo (*DsRed2*) es robusta y sostenible. El marcador es evidente en todas las etapas del desarrollo, permitiendo protocolos de control de calidad (QC) en la instalación de crianza en masa y monitoreo confiable en el campo;
- vi) Los parámetros de la historia de vida son comparables a los de la cepa tipo salvaje utilizada para la transformación, como se muestra en los Ejemplos, lo que indica que 03864A tiene un estado físico para el tipo salvaje cuando se cría en tetraciclina;
- vii) El constructo insertado se ha estabilizado después de la inserción mediante la eliminación de los extremos *piggyBac* del vector, tal que el transgén es fijo y heredable en el genoma del insecto.

También es útil identificar organismos que se han transformado con éxito con un transgén o constructo como se describió anteriormente. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para detectar un organismo transformado con un transgén o constructo como se describió anteriormente, y los primers para su uso en dicho método. El método comprende un ensayo con base en PCR para detectar un organismo transformado, amplificando una secuencia de ADN que se superpone al ADN genómico del organismo que flanquea el transgén insertado y el propio transgén. El método comprende poner en contacto una muestra de ADN obtenida de un organismo con un par de primers específicos para un transgén como se describió anteriormente, insertado en el genoma del insecto, en el que un primer en el par es específico para una secuencia de nucleótidos del transgén y el otro primer en el par es específico para una secuencia de nucleótidos genómica

flanqueando el transgén insertado, y amplificando la muestra de ADN. De este modo, un primer en un par de primers hibridiza el ADN genómico flanqueante y el otro primer en el par de primers hibridiza el transgén. El producto de
5 amplificación se puede entonces visualizar y, en general, se puede detectar usando técnicas estándar conocidas por los versados en el arte.

La amplificación de la muestra de ADN se lleva a cabo
10 utilizando técnicas de PCR conocidas por los versados en el arte. Como se mencionó anteriormente, los primers en el par de primers son específicos del organismo transformado, de manera que sólo cuando el transgén está integrado en la posición genómica relevante, se amplificará a una banda de
15 tamaño apropiado.

Los versados en el arte apreciarán que se pueden usar diversos primers en el método de la invención y que dichos primers se pueden preparar usando técnicas conocidas por los
20 versados en el arte. Los primers usados definirán el tamaño del producto de amplificación por PCR que se visualizará o se detectará más generalmente.

En algunas implementaciones, el método es para detectar un
25 organismo transformado con el transgén o el constructo genético. En algunas implementaciones, el organismo es un artrópodo. En algunas implementaciones, el organismo es un insecto. En algunas implementaciones, el organismo es del orden de Lepidoptera, Siphonaptera, Diptera, Hymenoptera,
30 Coleoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Orthoptera o Mesostigmata. En otras implementaciones, el organismo es de la familia Tephritidae, Drosophilidae, Lonchaeidae,

Pallopteridae, Platystomatidae, Pyrogotidae, Richardiidae o Ulidiidae. En implementaciones preferidas, el organismo es de la familia Tephritidae o Drosophilidae. En otras implementaciones, el organismo es del género *Ceratitis*,
5 *Drosophila*, *Bactrocera*, *Anastrepha* o *Rhagoletis*. En implementaciones preferidas, el organismo es del género *Ceratitis*. En implementaciones particularmente preferidas, el organismo es *Ceratitis capitata*.

10 En implementaciones preferidas, el método utiliza primers específicos para una *Ceratitis capitata* transformada. En algunas implementaciones, los primers específicos de *Ceratitis capitata* comprenden la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2. En esta implementación, se
15 proporciona un primer par de primers (TG1), un segundo par de primers (TG2) o un tercer par de primers. TG1 consiste en los primers TG1-3864AttpflR (SEQ ID NO: 4) y TG1-AttPF2, (SEQ ID NO: 5). En este par, TG1-3864AttpflR es específico para el ADN genómico que flanquea el transgén y TG1-AttPF2 es
20 específico para el propio transgén. TG2 consiste en los primers representados por las SEQ ID NO: 6 y 7. TG2 consiste en los primers TG2-3864FRTFIF (SEQ ID NO: 6) y TG2-FRTNheF (SEQ ID NO: 7). En TG2, TG2-3864FRTFIF es específico para el ADN genómico que flanquea el transgén insertado, y TG2-
25 FRTNheF es específico para el propio transgén. El tercer par de primers consiste en Cc3864FRTtaqF (SEQ ID NO: 10) y Cc3864FRTtaqR (SEQ ID NO: 11). En el tercer par de primers, Cc3864FRTtaqF es específico para el transgén y Cc3864FRTtaqR es específico para el ADN genómico flanqueante.

30

En otras implementaciones, cualquiera de los primers específicos del transgén descrito anteriormente puede estar

emparejado con cualquiera de los primers específicos del ADN genómico flanqueante, y un experto en el arte apreciará que el tamaño del producto de amplificación por PCR dependerá de los pares de primers utilizados.

5

En otras implementaciones, el método para detectar un organismo transformado con un transgén o constructo como se describió anteriormente comprende además el uso de una sonda marcada de forma dual durante las etapas de amplificación.

10

La secuencia en la unión del transgén integrado y el ADN genómico del organismo presenta una huella digital única. Por lo tanto, es posible detectar una unión única utilizando tres oligonucleótidos específicos. Dos de los oligonucleótidos
15 usados en el método son primers para permitir la amplificación de un fragmento predeterminado de transgén insertado y ADN genómico flanqueante, al que se hibridiza un tercer oligonucleótido, etiquetado doble, i.e., la sonda. En algunas implementaciones, la sonda comprende una molécula de
20 desactivación fluorescente (quencher) y una molécula reportera 5'.

En algunas implementaciones, el método comprende las etapas de poner en contacto una muestra de ADN obtenida de un
25 organismo con un par de primers específico para un transgén como se describió anteriormente insertado en el genoma del organismo, en el que un primer en el par es específico para el transgén y el otro primer en el par es específico para una secuencia de nucleótidos genómicos que flanquea el transgén
30 insertado, y amplifica la muestra de ADN. Esta etapa del método es en gran parte como se describió anteriormente. La sonda se añade a la mezcla de amplificación por PCR con los

primers. La sonda específicamente puentea la unión del transgén y el ADN flanqueante en el producto de PCR amplificado, requiriendo este límite para una salida positiva. En cada etapa de la amplificación por PCR, la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq libera una molécula reportera 5' (FAM) de la sonda hibridada, dando como resultado una emisión acumulativa que es detectable en una máquina de PCR en tiempo real en muestras que portan el transgén integrado. De este modo, el método comprende además las etapas de poner en contacto la muestra de ADN con una sonda durante la amplificación por PCR de la muestra de ADN.

En algunas implementaciones, el organismo es un artrópodo, y los artrópodos preferidos han sido discutidos anteriormente. En implementaciones preferidas, el organismo es un insecto, preferiblemente un tefrítido, más preferiblemente del género *Ceratitis*. En implementaciones particularmente preferidas, el insecto es de la especie *Ceratitis capitata*. Así, en tales implementaciones, los primers son específicos para una *Ceratitis capitata* transformada. Preferiblemente, los primers son específicos para *Ceratitis capitata* que comprende la secuencia representada por la SEQ ID NO: 2 (i.e., 0X3864A). En esta implementación, los primers que permiten la amplificación de un fragmento predeterminado son Cc3864FRTtaqF y Cc3864FRTtaqR, representados por las SEQ ID NOs: 10 y 11, respectivamente. Cc3864FRTtaqF es específico para el ADN genómico flanqueante y Cc3864FRTtaqR es específico para el transgén. En tales implementaciones, la sonda es, la sonda Cc3864FRT, como se representa por la SEQ ID NO: 12.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para el control de la población de un organismo. En implementaciones preferidas, el método comprende la etapa de transformar un organismo u organismos con un transgén o un constructo como se describió anteriormente. En algunas implementaciones, el método comprende además liberar dicho(s) organismo(s) transformado(s) en la población a controlar. En otras implementaciones, el método puede comprender también la etapa de monitorizar la población a controlar. Los organismos liberados se reproducen con la población a ser controlada, y la letalidad específica de la hembra conferida por los sistemas de expresión génica significa que la progenie hembra producida por este cruzamiento morirá durante las primeras etapas de desarrollo. La progenie masculina que hereda los sistemas de expresión génica sobrevive para transmitir el fenotipo letal a las generaciones posteriores.

En algunas implementaciones, la población a controlar es una población de artrópodos. En algunas implementaciones, la población es una población de insectos. En algunas implementaciones, la población es del orden de Lepidoptera, Siphonaptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Orthoptera o Mesostigmata. En otras implementaciones, la población es de la familia Tephritidae, Drosophilidae, Lonchaeidae, Pallopteridae, Platystomatidae, Pyrogothidae, Richardiidae o Ulidiidae. En implementaciones preferidas, la población es de la familia Tephritidae o Drosophilidae. En otras implementaciones, la población es del género *Ceratitis*, *Drosophila*, *Bactrocera*, *Anastrepha* o *Rhagoletis*. En implementaciones preferidas, la población es

del género *Ceratitis*. En algunas implementaciones, la población es una población de *Ceratitis capitata*.

La liberación de organismos puede ser por cualquier método conocido por los versados en el arte, por ejemplo, mediante un método tal como liberación en jaula o liberación de bolsa de papel, tales como los descritos en Simmons *et al.* (2011) o Harris *et al.* (2011).

La etapa de monitorizar la población de organismos puede ser por cualquier método conocido por los versados en el arte. En algunas implementaciones, el transgén insertado en el (los) organismo(s) transformado(s) incluye un marcador genético, tal como *DsRed2*. Por lo tanto, la monitorización de la población a controlar puede ser atrapando insectos de la población, después de la liberación del (de los) organismo(s) transformado(s) y de la visualización, o más generalmente detección del marcador genético en los individuos atrapados.

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Selección del producto que conduce la cepa de *C. capitata*

Las cepas transformadas se generaron a través de la transformación mediada por piggyBac utilizando el constructo mostrado en la Figura 2 de la cepa *C. capitata* colonizada por Toliman (Origen: Guatemala). El entrecruzamiento a moscas de tipo salvaje produjo múltiples líneas transgénicas (Tabla 1).

Se obtuvieron 49 adultos G0 para OX3864 (una tasa de supervivencia del 21%) y 950 para OX3647 (35% de supervivencia).

5 La relación de sexos bajo estas dos condiciones de dieta se usó para evaluar la funcionalidad del constructo en dos parámetros cruciales: 1) supresión total de la letalidad en hembras cuando se alimentan con tetraciclina, y 2) letalidad en hembras completa en ausencia de tetraciclina. Las líneas
10 se seleccionaron para las pruebas adicionales con base en su capacidad para satisfacer estos parámetros y en la fuerza de la fluorescencia.

11 líneas fallaron en proporcionar penetración completa con una sola copia del transgén y se descartaron. Una línea
15 demostró reprecibilidad incompleta de la tetraciclina y también se descartó. Dos líneas no produjeron suficiente progenie, posiblemente debido a las penalidades de estado físico impuestas por la inserción del transgén, y por lo
20 tanto se interrumpieron. La fluorescencia fue buena en todas las líneas generadas; sin embargo, el constructo OX3864 proporciona en general un fenotipo de fluorescencia más fuerte y más clara. En las Figuras 4F y 4G se pueden ver fotografías de moscas macho adultas OX3864A y OX3647Q. Aunque
25 ambas cepas muestran un fenotipo reconocible en comparación con los machos WT, es evidente que el fenotipo fluorescente OX3864A (+++) es más fuerte que el de OX3647Q (++)

Line	T food							NT food						
	Pupae		F adults		NF adults			Pupae		F adults		NF adults		
	F	NF	♂	♀	♂	♀		F	NF	♂	♀	♂	♀	
3647L1	61	46	5	7	10	2		106	81	0	107	81	0	
3647L2	89	106	41	41	35	44		63	60	33	37	28	37	
3647L3	307	223	55	232	178	21		87	93	8	82	92	1	
3647G	17	26	11	6	10	15		72	58	16	16	29	27	
3647M1	79	32	23	39	24	0		97	60	6	70	47	0	
3647M2	76	2	27	37	1	1		76	17	39	34	4	12	
3647M3	47	47	0	42	43	1		46	27	0	46	26	1	
3647Q	107	68	49	45	36	32		122	302	92	0	125	112	
3647P	199	193	92	88	84	72		61	96	21	0	24	25	
3647(2)B	138	188	61	46	90	71		207	380	171	0	185	159	
3647(2)C1	139	146	53	66	66	58		105	132	63	0	65	65	
3647(2)C2	196	299	95	83	121	127		152	217	132	0	152	142	
3647(2)J	240	196	133	88	83	84		177	231	108	0	92	102	
3647(2)W	194	168	80	82	66	66		141	185	79	0	84	84	
3647(3)C	305	175	125	2	42	50		11	29	8	0	8	12	
3647(3)C ₁	271	321	152	0	0	153		49	45	48	0	1	44	
3647(3)F	305	150	32	37	44	33		66	79	29	18	33	30	
3647(3)F ₁	71	70	16	17	23	13		28	34	10	0	12	15	
3647(3)G	181	185	51	55	50	50		132	63	49	41	30	19	
3647(3)H	120	109	49	32	54	39		33	33	13	1	17	8	
3647(3)H ₁	124	89	40	40	32	29		1	43	44	0	27	33	
3647(3)J	12	23	3	0	12	4		21	19	9	0	7	5	
3647(3)J ₁	39	52	12	7	14	8		4	20	4	0	11	9	
3647(3)K	2	1	0	0	0	0		1	5	1	0	2	3	
3647(3)Q	105	47	18	79	43	0		67	54	28	36	34	0	
3647(3)P	1	2	0	1	0	1		0	0	0	0	0	0	
3647(3)P ₁	44	66	11	17	13	18		38	62	15	1	18	21	
3647(3)Q ₁	58	96	24	18	17	23		31	52	11	0	18	34	
3647(3)Q ₂	27	13	14	8	5	6		0	0	0	0	0	0	
3647(3)R	88	116	38	50	61	58		77	158	20	0	65	44	
3647(3)R ₁	35	44	24	0	10	42		1	7	0	0	2	2	
3864A	351	369	176	160	177	188		60	124	50	0	35	34	
3864E	466	514	191	140	171	154		395	696	212	0	262	236	

Tabla 1. Análisis de supervivencia G2 de machos y hembras de diferentes líneas OX supervivientes con y sin microinyección de tetraciclina (G0), se reunieron (10 machos o 20 hembras) antes de ser cruzadas con el tipo salvaje de TOLIMAN. Las líneas se nombraron de acuerdo con un número y un sufijo alfabético (e.g., OX3647Q) para indicar el grupo de donde se recogieron los descendientes G1. Debido al número muy elevado de sobrevivientes OX3647, el sistema del alfabeto fue reutilizado y se indicó con un número entre paréntesis antes del sufijo alfabético, e.g., OX3647(2)B. Se dieron números adicionales a múltiples progenitores G1 que emergen del mismo grupo (e.g., OX3647L1, L2) y estos fueron tratados inicialmente como eventos de inserción potencialmente separados. Cada uno de los machos G1 transgénicos se cruzó con varias hembras de tipo salvaje virgen. La progenie G2 se puntuó para fluorescencia (F) o no fluorescencia (NF) y por sexo, sobre medios que contenían tetraciclina-(T, 100 µg/ml) o no tetraciclina (NT).

El análisis posterior de las cepas generadas incluyó:

- Una sola inserción transgénica originalmente medida como segregación en G2 del alelo marcador,
- 5 • Potencial de homocigosis medido como segregación de alelo marcador cuando los machos y hembras de la misma línea se cruzaron,
- Eliminación de PiggyBac mediante el cruce con la cepa OX3133, que proporciona una fuente de
- 10 transposasa, siguiendo el método descrito por Dafa'alla *et al.* (2006).

Cinco líneas presentaron múltiples inserciones, y para tres líneas se encontró que la inserción del transgén estaba

15 ligada al sexo. Por lo tanto, las ocho líneas se descartaron. La cepa OX3864E contenía una inserción silenciosa (confirmada por análisis de secuencia flanqueante) y se descartó. Todas las cepas restantes fueron positivas para el potencial de homocigosis y, por tanto, se cruzaron con la cepa OX3133 de

20 mosca del mediterráneo para la escisión *piggyBac* (Dafa'alla *et al.*, 2006). Sólo las cepas OX3864A y OX3647Q demostraron la eliminación completa de todas las secuencias *piggyBac* y, por lo tanto, se seleccionaron como cepas potenciales de producto.

25

Posteriormente, las líneas homocigóticas de cada una de OX3864A y OX3647Q se obtuvieron por endogamia para producir homocigotos putativos, con confirmación por PCR. Otra evidencia para la eliminación completa de la secuencia

30 *piggyBac* es proporcionada por PCR (Figura 3). Como se puede ver en la Figura 3, no hay secuencias *piggyBac* presentes en las cepas OX3864A y OX3647Q, como se muestra por la falta de

producto gel para líneas resueltas cuando se usan cuatro PCR diseñadas para generar un producto cuando el *piggyBac* está presente en los constructos. Para producir los geles, se extrajo ADN genómico de adultos individuales usando el kit de
5 ADN genómico Purelink (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo utilizando Biotaq (biosistemas PCR), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguido por
10 10 ciclos de 94°C 15s, 60°C 30s, disminución 0,5°C/ciclo y 72°C 15s, luego 25 ciclos de 94°C 15s, 55°C 30s, 72°C 15s, y un alargamiento final de 72°C durante 7 minutos.

La reacción de PCR que da como resultado el gel mostrado en
15 el panel A de la Figura 3 utiliza primers 916) AttPF2 (GTCATGTCGGCGACCCTACGC; SEQ ID NO: 5) y TD935) Diag-5PBmin (GCCACCGAGTATGACCGGTAG; SEQ ID NO: 15). La presencia del motivo *piggyBac* genera un fragmento de ADN de 512 pb. La reacción de PCR que resulta en el gel mostrado en el panel B
20 de la Figura 3 utilizó primers TD222) Dlag - Pb5 (CTGATTTTGAACCTATAACGACCGCGTG; SEQ ID NO: 16) y 432) AmCydiagF (TCACCTACGAGGACGGCGG; SEQ ID NO: 17). La presencia del motivo *piggyBac* genera un fragmento de ADN de 820 pb. La reacción de PCR que da como resultado el gel mostrado en el panel C de la
25 Figura 3 utiliza los primers TD1445) Dlag6-pb3 (GTGCCAAAGTTGTTTCTGACTGAC; SEQ ID NO: 18) y TD154) Dlag-K10-1 (CACTTAAGCGACAAGTTTGGCCAAC; SEQ ID NO: 19). La presencia de los motivos *piggyBac* genera un fragmento de ADN de 972 pb. La reacción de PCR que daba como resultado el gel mostrado en el
30 panel D de la Figura 3 usó los primers TD1312)Diag7-pb3 (CCCTAGAAAGATAATCATATTGTGACG; SEQ ID NO: 20) y TD677)Diag2-hr5 (CATACTTGATTGTGTTTTACGCGTAG; SEQ ID NO:

21) la presencia de los motivos *piggyBac* genera un fragmento de ADN de 470bp. Los productos de PCR de OX3864A, OX3647Q, un control positivo no resuelto OX3647 y dos controles negativos (tipo salvaje de TOLIMAN y agua) se corrieron en un gel al 1% con una escala inteligente (Eurogentec, tamaños de banda de arriba hacia abajo: 10kb, 8kb, 6kb, 5kb, 4kb , 3kb, 2,5kb, 2kb, 1,5kb, 1kb, 800pb, 600pb, 400pb, 200pb).

Tras la inserción y el análisis de escisión, las cepas OX3864A y OX3647Q se ensayaron adicionalmente para determinar los parámetros de la historia de vida en comparación con la cepa de tipo salvaje TOLIMAN de la que ambos fueron derivados y también la cepa Vienna 8 (referencia) letal, sensible a la temperatura (*tsl*). La *tsl* es la cepa genética T (Y; 5) 101 llamada también Vienna-8 (sin la inversión pericéntrica D53) (Caceres, 2002), introgresada en el tipo salvaje de TOLIMAN que se utiliza actualmente en muchos programas de Técnica de Insecto Estéril (SIT) en todo el mundo. Los detalles de las pruebas realizadas se indican a continuación. Los gráficos se presentan en la Figura 4. Los índices de estado físico se dan en la Tabla 2.

Longevidad

Se realizaron pruebas de longevidad a 21°C y una humedad relativa (HR) de 50% en seis jaulas plásticas (9cm x 9cm x 9cm), cada una con 30 machos y 30 hembras del mismo genotipo (1 insecto/8.1 cm²). Tres de las jaulas fueron asignadas al azar a una prueba de "estrés" de ningún alimento y sin agua. Esto se hizo para evaluar las medidas relativas de las reservas de nutrientes disponibles en la eclosión, un indicador importante de la longevidad potencial en

condiciones de liberación. Las jaulas restantes tenían un suministro ad libitum de alimentos y agua. Las jaulas fueron monitoreadas diariamente; Los adultos muertos fueron removidos y sexados, hasta que todas las moscas estuvieron
5 muertas, de acuerdo con las directrices de la FAO/IAEA/USDA.

Las moscas sujetas a las condiciones de estrés, redujeron significativamente la duración de vida en comparación con las alimentadas con agua y alimento (Log Rank Test $X^2_1 = 1307$, $P < 0,001$); todas las moscas estresadas se murieron en seis días (Figura 4D). En las jaulas no sometidas a estrés, dado el alimento y el agua, hubo efectos significativos sobre la supervivencia del genotipo (i.e., RIDL frente al tipo salvaje y *tsl*; $X^2_3 = 15,6$, $P < 0,001$; el sexo no tuvo un efecto
10 significativo sobre la longevidad ($X^2_1 = 0,17$, $P = 0,68$), y por lo tanto se combinaron los datos de supervivencia para ambos sexos. En condiciones de estrés, OX3647Q mostró una supervivencia significativamente mayor en ambos sexos en comparación con el tipo salvaje (promedios $\pm$ error estándar:
20 tipo salvaje = 4,1 días $\pm$ 0,054; OX3647Q = 4,38 días $\pm$ 0,066; riesgos proporcionales de Cox: $z = -2,1$, $P = 0,035$). Sin embargo, el patrón bajo alimento completo, condiciones no estresantes se invirtió (tipo salvaje = 18,9 días $\pm$ 0,52; OX3647Q = 13,7 días $\pm$ 0,53; $z = 5,92$, $P < 0,01$). No hubo
25 diferencias significativas en la esperanza de vida media de las moscas OX3864A y las *tsl* en comparación con el tipo salvaje para los tratamientos con estrés o sin estrés (tratamiento con estrés: OX3864A = 4,13 días $\pm$ 0,055; $z = 0,59$, $P = 0,55$, *tsl* = 4,13 $\pm$ 0,064; $z = 0,53$, $P = 0,33$;
30 alimentación completa, tratamiento sin estrés: OX3864A = 17,2 días $\pm$ 0,53; $z = 1,13$; $P = 0,26$, *tsl* = 17,0 días $\pm$ 0,52; $z = 0,7$, $P = 0,49$).

Fecundidad de por vida en hembras

De las jaulas no estresadas descritas anteriormente, se
5 recogieron los huevos durante periodos de 24 horas y se
contaron bajo un microscopio de disección. Las muestras de
huevo luego se incubaron sobre papel de filtro Whatman húmedo
(Fisher Scientific) y selladas en una caja de Petri con
parafilm (200 huevos por caja de Petri, 600 huevos por línea
10 en total). 72 horas después de la recolección de huevos, las
cajas de Petri fueron destapadas y examinadas bajo un
microscopio de disección con el fin de contar el número de
envolturas de huevo vacías.

15 La producción diaria de huevos por jaula de las jaulas "no
estresadas" disminuyó significativamente con el tiempo
(Medidas Repetidas ANOVA: $F_{1.6, 12,9} = 253,04$, $P < 0,001$) y hubo
un efecto significativo del genotipo ($F_{4.8, 12,9} = 5,19$, $P =$
 $0,008$). Las comparaciones en pares con una corrección de
20 Bonferroni describen que se producían significativamente
menos huevos a lo largo de la vida para ambas líneas RIDL y
tsl en comparación con el tipo salvaje (producción de huevos
promedio en la vida tipo salvaje = $4315 \pm 48,51$; OX3864A =
 3470 ± 226 , $P < 0,014$; OX3647Q = 2593 ± 147 , $P < 0,001$; *tsl* =
25 $2465 \pm 93,29$, $P < 0,001$). Las cepas OX3647Q y *tsl* también
produjeron significativamente menos huevos que OX3864A
(OX3647Q frente al tipo salvaje, $P < 0,001$; *tsl* frente al tipo
salvaje, $P = 0,005$, Figura 4D).

30 Al registrar la mortalidad diaria, también fue posible
estimar la producción de huevos específica por edad para
hembra. Consistente con lo anterior, esto también mostró que

la fecundidad disminuyó significativamente con el tiempo (Medidas Repetidas ANOVA: $F_{1.9, 15.2} = 131,85$, $P < 0,001$). Sin embargo, no hubo efecto significativo del genotipo en este descenso ($F_{5.7, 15.2} = 2.19$, $P = 0,104$, Figura 4C). A su vez, un ANOVA unidireccional sobre el número de huevos depositados en la fecundidad máxima (día 10), tampoco reveló diferencias significativas en la puesta de huevos por hembra entre cualquiera de las líneas ($F_{3,8} = 0,029$, $P = 0,97$).

10 Tasa de incubación de huevos

Hubo un efecto significativo de la edad en las tasas de incubación de huevos (ANOVA $F_{5,40} = 207,3$, $P < 0,001$), así como un efecto significativo del genotipo ($F_{15,40} = 4,52$, $P < 0,001$, Figura 4E). Las comparaciones en pares con una corrección de Bonferroni mostraron que OX3647Q y *tsl*, pero no la OX3864A, tasas promedio en porcentaje de incubación de huevos que fueron significativamente más bajas que el tipo salvaje (tipo salvaje = $89,56\% \pm 0,84$; OX3647Q = $79,11\% \pm 0,84$, $P < 0,001$; *tsl* = $78,33\% \pm 0,84$, $P < 0,001$; OX3864A = $87,11\% \pm 0,84$, $P = 0,247$).

Tasa de eclosión de adultos

300 pupas de cada línea se mantuvieron aisladamente y se monitorizaron para la eclosión. Se comprobó que los adultos tenían sexo y deformidad visible antes del registro. Se contaron las envolturas de pupas no cerradas o parcialmente cerradas y luego se descartaron.

30

También hubo una diferencia significativa en las tasas de eclosión de adultos entre líneas (ANOVA: $F_{3, 10} = 9,89$, P

<0,001). Una prueba Tukey HSD *post hoc* reveló que esto era atribuible principalmente a una tasa de eclosión en adultos significativamente más baja en OX3647Q en comparación con el tipo salvaje (tipo salvaje = 86,1% ± 0,69; OX3647Q = 75,7% ± 2,43, P <0,01; OX3864A = 84,7% ± 0,91, P = 0,9; tsl = 81,2% ± 1,04, P = 0,25). Hubo un efecto significativo del genotipo sobre la relación de sexo adulto ($F_{3, 10} = 5,06$, P = 0,036), atribuible a una diferencia en la relación sexo de machos a hembras en OX3647Q pero no en las otras líneas (pruebas Tukey HSD *post hoc*: tipo salvaje = 47% ± 1,8; OX3647Q = 54% ± 1, P = 0,035; OX3864A = 55% ± 2,3, P = 0,055; *tsl* = 50% ± 1,5, P = 0,83).

Índices de estado físico

A partir de los componentes individuales de la historia de vida, se calculó la tasa reproductiva neta por hembra (R_0) y el tiempo promedio de generación (G) (que abarca el pico de fertilidad en hembras de una generación a la siguiente) (Tabla 2). A partir de estas estimaciones, se derivó un índice de estado físico (r) por hembra. El valor de r para el tipo salvaje fue de 0.195, lo que equivale a que cada hembra contribuye en promedio 0.195 hembras por día a la siguiente generación. Las otras líneas tuvieron índices de estado físico más bajos (OX3864A: r = 0,187, OX3647Q: r = 0,176, *tsl*: r = 0,165).

	Tipo Salvaje	OX3864A	OX347Q	TSL
Tasa reproductiva neta (R_0) de las hembras	267,6	183,7	113,1	133,1
Tiempo de generación en días (G)	32	32.1	35.6	36
índice de estado físico (r)	0.195	0.187	0.176	0.165

Tabla 2. Los índices de estado físico para las cepas OX3864A, OX3647Q, tipo salvaje y *tsl*, se calcularon a partir de los datos del historial de vida.

5 **Competitividad de apareamiento de machos OX3864A y OX3647 con moscas TOLIMAN tipo salvaje.**

Se obtuvieron adultos OX3864A, OX3647Q, TOLIMAN tipo salvaje a partir de larvas criadas off-tet a baja densidad (1
10 larva/0,5 g de medio). En el invernadero del Departamento de Zoología de la Universidad de Oxford (Oxford, Reino Unido) se construyeron jaulas de campo de 1,25 m de altura con una base de 0,5 m², con naranjos pequeños (~1 m de altura) colocados dentro, los experimentos se realizaron en agosto (amanecer
15 06.00) utilizando luz natural y una temperatura y humedad estables (25°C, 50% RH). Se colocaron 30 machos de OX3864A u OX3647Q junto con 30 machos tipo salvaje a las 06:30 y 30 hembras se introdujeron 30 minutos más tarde.

20 La secuencia básica del cortejo y la cópula está bien caracterizada en la mosca del mediterráneo, y sigue una secuencia distinta de patrones de comportamiento en machos (Cayol *et al.*, 2002), consistente en "llamada de feromonas" y rápidas vibraciones del ala. Después de cortejar el macho
25 saltará sobre la hembra y si ocurre la intromisión exitosa, el par permanecerá generalmente inmóvil. La cópula generalmente dura entre 90 y 195 minutos. Los pares de apareamiento se retiraron de las jaulas después de la intromisión, y se introdujeron cuidadosamente en inserciones
30 horizontales de 1,5 ml. El tiempo de iniciación de la copulación se registró y las copulaciones se puntuaron como exitosas sólo si el par se aparea durante >30 minutos después

de la transferencia al eppendorf. Las copulaciones cortas (<15 minutos) fueron eliminadas de los datos ya que a menudo resultan en no transferencia de esperma. Los experimentos de apareamiento terminaron 9 horas después de la iniciación (16:00) o cuando todas las hembras habían copulado, lo que fue cuanto antes. La identidad de la pareja machos se determinó marcando a los machos para la presencia o ausencia del marcador fluorescente *DsRed2* bajo un microscopio de fluorescencia. Las pruebas se realizaron con 10 repeticiones para cada línea. Se evaluaron 167 y 237 parejas para OX3864A y OX3647Q, respectivamente.

El índice de esterilidad relativa (RSI) se utilizó como una medida de la competitividad sexual para machos (McInnis *et al.*, 2002, FAO/IAEA/USDA, 2003). RSI oscila entre 0 y 1, un RSI de 1 representaría el 100% de apareamientos por machos transgénicos, un valor de 0, 100% con el tipo salvaje y 0,5 representando igual número de apareamientos. Los resultados mostraron que ninguna de las cepas transgénicas mostró una reducción significativa en la competitividad con respecto a los machos tipo salvaje (prueba-t: OX3864A: RSI $0,46 \pm 0,08$, $t_{18} = -2,09$, OX3864A machos acoplados tipo salvaje $n = 77$, machos acoplados tipo salvaje $n = 90$, $P = 0,05$; OX3647Q: RSI $0,47 \pm 0,09$, $t_{18} = -1,72$, machos acoplados OX3647Q $n = 112$, machos acoplados tipo salvaje $n = 125$, $P = 0,1$).

No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de re-apareamiento de las hembra entre las hembras inicialmente apareadas con bien sea los machos tipo salvaje o fsRIDL (Prueba Exacta de Fisher: OX3864A: $X^2_1 = 0,82$, $n = 40$, $P = 0,775$; siete hembras primero apareadas con machos OX3864A re-apareados; ocho hembras primero apareadas con machos tipo

salvaje re-apareados; OX3647Q: $X^2_1 = 0$, $n = 40$, $P = 1$, 12 hembras primero apareadas con machos OX3647Q re-apareados y 12 hembras primero apareadas con machos tipo salvaje re-apareados). Para el caso de las hembras que hicieron re-apareamiento cuando se aparearon por primera vez a un macho RIDL, el genotipo del segundo macho no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia de re-apareamiento (OX3864A: $X^2_1 = 0,58$, $P = 0,4$ (hembras que primero se aparearon con OX3864A, luego re-apareadas con el tipo salvaje $n = 3$ re-apareados con OX3864A $n = 4$; hembras que primero se aparearon con el tipo salvaje y luego re-apareadas con el tipo salvaje $n = 5$, re-apareados con OX3864A $n = 3$); OX3647Q: $X^2_1 = 0,17$, $P = 0,5$ (hembras que primero se aparearon con OX3647Q luego se re-aparearon con el tipo salvaje $n = 6$, re-apareadas con OX3647Q $n = 6$, hembras que primero se aparearon con el tipo salvaje luego re-apareadas con el tipo salvaje $n = 7$, re-apareadas con OX3647Q $n = 5$)).

Aunque ambas cepas de mosca del mediterráneo mostraron buenas características de cría y apareamiento en comparación con la cepa *tsl* Vienna 8 y la cepa TOLIMAN tipo salvaje, la cepa OX3864A superó a la cepa OX3647Q y, por lo tanto, se seleccionó como la cepa productora principal de mosca del mediterráneo.

25

Ejemplo 2: Características moleculares de la cepa OX3864A

Ensayo con base en PCR para la identificación específica del evento OX3864A.

Con el fin de llevar a cabo el control de calidad en la cepa OX3864A y para monitorear el uso en el campo, se desarrolló un ensayo específico de detección de nucleótidos con base en

la PCR. El protocolo para este ensayo se muestra en el Ejemplo 4, a continuación, y los primers utilizados se describen en la Tabla 3.

TG1-3864Attpf1R-Primer genómico flanqueante	5'-GCTGCCCATTGCTAAGGTTTGTG-3' (SEQ ID NO: 4)
TG1-AttPF2-Primer específico del Transgen	5' - GTCATGTCGGCGACCCTACGC-3' (SEQ ID NO: 5)
TG2-3864FRTFIF-Primer genómico flanqueante	5'-CAACGAGTGACAGCAATGATATTCCTTAC- 3' (SEQ ID NO: 6)
TG2-FRTNheF- Primer específico del transgen	5' TGTGGCTAGCTCGAAGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCC- 3' (SEQ ID NO: 7)
CcAdh2RTF-Cca Primer Adh	5'- GAAAGCTGTTCTGGGCTTCAGGC - 3' (SEQ ID NO: 8)
CcAdh2RTR -Cca primer Adh	5'- CTTGGAGGTGATGTCGAATTTG GTG - 3' (SEQ ID NO: 9)

5

Tabla 3.

Cada par de primers detectores de transgenes comprende un primer que se hibrida dentro del transgén y uno que se hibrida en el ADN genómico flanqueante de OX3864. Por tanto, sólo cuando el transgén está integrado en la posición genómica descrita para OX3864 se amplificará una banda del tamaño apropiado. Los pares de primers TG1 y TG2 se dirigen al ADN flanqueante en los extremos opuestos del transgén. Se utilizó un par de primers que amplifica un fragmento del gen Adh endógeno como control positivo para asegurar la calidad del ADN genómico utilizado en este ensayo.

Los resultados del ensayo con base en PCR se muestran en la Figura 5. Las muestras OX3864 mostraron las bandas esperadas de 591 pb y 523 pb, para TG1 y TG2 respectivamente, mientras que las muestras de tipo salvaje y agua fueron negativas. Todas las muestras de ADN genómico mostraron el producto esperado de 491 pb con primers de Adh, mostrando que el ADN

genómico era de calidad suficiente para la amplificación por PCR.

Ensayo TAQMAN para detectar específicamente la unión del
5 transgén integrado y la secuencia flanqueante. Este ensayo se
desarrolló para detectar la secuencia en la unión del
transgén integrado y el gADN de *Ceratitis capitata*, que
presentan una huella digital única para OX3864. Este ensayo
se desarrolló para detectar una unión utilizando tres
10 oligonucleótidos específicos (Tabla 4). Dos de los primers
permiten la amplificación de un fragmento de 98 pb (52 pb de
gADN flanqueante + 46 pb del transgen) fragmento al cual
hibridiza la sonda un tercer oligonucleótido [5' reportero
(FAM) - 3' de desactivación fluorescente (BHQ1)], doblemente
15 etiquetado. La sonda puentea específicamente la unión de la
integración y el ADN flanqueante en el producto de PCR
amplificado, requiriendo este límite para una salida
positiva. En cada etapa de la amplificación por PCR, la
actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa Taq libera el
20 reportero fluorescente 5' (FAM) de la sonda hibridada, dando
como resultado una emisión acumulativa que es detectable en
una máquina de PCR en tiempo real en muestras que portan ADN
OX3864. El primer y las sondas usadas en este ensayo se
muestran en la Tabla 4.

25

Cc3864FRTtaqF primer especifico flanqueante	5' - CAGGCAATCTGCTCCATTAAC -3' (SEQ ID NO: 10)
Cc3864FRTtaqR primer especifico del transgen	5' - GACCTAGTCCCAAAGATTTTCG-3' (SEQ ID NO: 11)
Cc3864FRT sonda OX3864-fla sonda	5' FAM-AGTGCTTACATTCATTTTAAGA GCACCTCAT - BHQ1-3' (SEQ ID NO:

	12)
--	-----

Tabla 4.

Análisis de esqueleto plasmídico sobre la cepa OX3864A

5

La presencia de la cadena principal del plásmido en el genoma de esta cepa se verificó por PCR utilizando primers que hibridizan los elementos piggyBac:

PB5 fuera (CTCTGGACGTCATCTTCACTTACGTG) (SEQ ID NO: 13) y

10 PB3 fuera (CTCGATATACAGACCGATAAAACACATGC) (SEQ ID NO: 14),
que dan un fragmento de 4045 pb si está presente el esqueleto del plásmido. Los resultados se muestran en la Figura 6. La ausencia completa de cualquier secuencia de la cadena principal del plásmido se confirmó en todas las muestras de
15 mosca probadas.

Inserción(es) transgénica(s) silenciosa(s) en la cepa OX3864A

La posibilidad de inserciones silenciosas en esta cepa se
20 investigó por análisis de PCR. Los machos de tipo salvaje fueron cruzados con hembras heterocigotas OX3864A, y viceversa en una proporción de 1:3 (macho: hembra). La siguiente generación se crió para pupas y se cribó para la fluorescencia. Se mantuvieron 1000 individuos no
25 fluorescentes a -20°C y se analizaron por PCR. Los resultados se muestran en la Figura 7. El uso de primers para la amplificación de secuencias de tipo salvaje fue para asegurar la calidad de las muestras de ADN analizadas. Se incluyó un control positivo de 9 pupas de tipo salvaje con una pupa
30 heterocigótica, junto con un control negativo de agua. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% con

una escala inteligente (Eurogentec, tamaños de banda de arriba a abajo: 10kb, 8kb, 6kb, 5kb, 4kb, 3kb, 2,5kb, 2kb, 1,5kb, 1kb, 800pb, 400pb, 200pb).

5 **Ejemplo 3. Ensayo de campo de la cepa OX3864A**

Competencia de apareamiento con las medusas salvajes de la región mediterránea.

10 Los ensayos de apareamiento competitivos de las cepas contra machos tipo salvaje para hembras tipo salvaje se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices FAO/IAEA/USDA (FAO/IAEA/USDA, 2003). Para probar la capacidad de los machos para inducir la refractariedad de re-apareamiento en las

15 hembras, las hembras apareadas se separaron en dos grupos de 40 con base en su elección inicial de apareamiento (tipo salvaje o macho Oxitec) a continuación, al día siguiente se volvieron a exponer a igual número de machos de tipo salvaje y Oxitec. Este proceso se llevó a cabo durante 3 días, con

20 jaulas marcadas para apareamientos durante 9 horas diarias. Los pares de apareamiento se eliminaron durante el apareamiento como se describió anteriormente y los machos fueron nuevamente genotipados mediante la detección de fluorescencia. Para pruebas de competición de apareamiento

25 con moscas de origen salvaje, se recuperaron pupas de naranjas infestadas recolectadas de huertos de naranjas libres de insecticidas en la provincia de Heraklion, Creta. Los adultos de origen salvaje fueron separados por sexo inmediatamente después de la eclosión. Las moscas de origen

30 salvaje se dejaron a 25°C, 50% de humedad relativa (HR) durante 10-13 días para alcanzar la madurez sexual. Se dejó que todas las moscas se ajustaran a la luz natural y a las

condiciones de temperatura del invernadero durante un mínimo de 24 horas antes del inicio del experimento. Cada experimento comenzó una hora después del amanecer y duró un mínimo de 9 horas. Las pruebas de apareamiento se realizaron en instalaciones de invernadero en la Universidad de Creta. Se realizaron pruebas de competencia de apareamiento OX3864A en 7 repeticiones con 89 pares evaluados.

El valor promedio de RSI de las moscas OX3864A, cuando se aparean con la mosca del mediterráneo derivada salvaje procedente de Creta, fue $0,45 \pm 0,13$ (prueba t: $t_{12} = -0,9$, $n = 89$, $P = 0,38$), lo que no dio evidencia de una diferencia significativa en la competitividad de apareamiento entre los machos OX3864A y de origen salvaje.

15

Supresión en jaulas de poblaciones salvajes estables

Se establecieron poblaciones estables de moscas del mediterráneo en cuatro jaulas grandes de campo con dos jaulas elegidas al azar para ser jaulas de "tratamiento" en las cuales, además del número normal de pupas añadidas a las jaulas, se liberaron aproximadamente 1500 machos RIDL por semana. Este protocolo se basó en el de Wise de Valdez *et al.* Las jaulas de campo con efecto invernadero fueron de 8m³ cada una y contenían un limonero de 1.5m de alto, y se alojaron en la Universidad de Creta, Heraklion, utilizando luz natural y una temperatura y humedad estables (c.25°C, 50% R.H.). Las jaulas contenían tres fuentes de alimento y agua y dos vasijas de oviposición llenas de agua desionizada (vacuada diariamente), cada una con dos superficies para puesta de huevos de 40 cm².

Las poblaciones tipo salvaje se establecieron durante un periodo de 8 semanas introduciendo un número fijo de pupas a cada jaula por semana (200 en la semana 1, 300 en la semana 2, 180 en la semana 3 y 230 después de las semanas 4-8). Las adiciones pupales durante las primeras 4 semanas se originaron de una colonia de stock tipo salvaje; a partir de entonces todas las adiciones pupales fueron de huevos capturados en las vasijas de oviposición, y se criaron en el laboratorio a baja densidad (1 larva/0,5 g de medio) antes de la reintroducción a las jaulas de campo como pupas. Los números de huevos se contaron diariamente de las vasijas de oviposición, mientras que los números de adultos se calcularon semanalmente.

A la semana 7, las jaulas se dividieron aleatoriamente en tratamiento o control. A partir de la semana 8, las jaulas de tratamiento RIDL recibieron adiciones semanales de 1700 pupas OX3864A criadas off-tet (resultando en la adición de aproximadamente 1500 machos adultos por semana). Esto dio una proporción inicial de ~7 OX3864A machos a 1 macho tipo salvaje en la semana 8, sobre la base de estimaciones de las poblaciones de jaulas (1500 machos liberados en jaulas con una población aproximada de 220 machos tipo salvaje) y una relación de reclutamiento semanal de aproximadamente 15:1 OX3864A a los machos tipo salvaje). Una vez que las introducciones de OX3864A comenzaron, se hizo el retorno pupal a una jaula de tratamiento proporcional a su tasa de producción de pupas, con las jaulas de control proporcionando un coeficiente de retorno pupal semanalmente estable para este cálculo. Por ejemplo, en la semana 16 el número promedio de pupas recuperado de las jaulas de control fue de 300. Como los retornos a las jaulas de control se establecieron a una

constante de 230 por semana, el número de pupas para a
retornar a todas las jaulas, fuera de todas aquellas
desarrolladas se establece por un coeficiente de ($230/300 =$
 $0,76$). Por ejemplo, en la misma semana una de las jaulas de
5 tratamiento produjo un total de 126 pupas. El número de pupas
que fueron devueltas a esta jaula (usando el coeficiente),
fue por lo tanto 96 (126×0.76). Esta metodología permitió
un retorno pupal dinámico que dependía de la producción de
huevos y la supervivencia pupal, y refleja el número de
10 huevos puestos y la acción de RIDL en la supervivencia larval
de las hembras. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Se observaron disminuciones dramáticas en la producción
semanal de huevos a las 7 semanas después de la liberación de
15 RIDL (PR) en jaulas de tratamiento, en comparación con una
tasa estable continuada de producción de huevos en jaulas de
control y continuada hasta la extinción eventual de la
población tipo salvaje en ambas jaulas de tratamiento
(Evaluado por dos semanas de ausencia de producción de
20 huevos) en la semana 22 (Figura 8A). Esto se debió a la
proporción de progenie devuelta que transporta el transgén
OX3864A aumentando en las jaulas de tratamiento, lo que
resulta en un rápido descenso en la población en hembras
(Figura 8B). La frecuencia de transgenes en las poblaciones
25 de jaulas de tratamiento se monitorizó tamizando la pupa de
retorno (elegida de todas las pupas producidas al azar) para
la presencia del marcador fluorescente *DsRed2*. La frecuencia
del transgén en la progenie de retorno de las jaulas de
tratamiento fue de 100% a la semana 8 PR (Figura 8C), con
30 ambas jaulas consideradas extintas a la semana 14 PR
(extinción definida como cero producción de huevos durante
dos semanas consecutivas).

Ejemplo 4. Protocolo para la detección de transgén OX3864

Este ensayo se usó para detectar la presencia o ausencia del
5 transgén OX3864 en una variedad de muestras de insectos
OX3864 (campo, cría en masa y laboratorio). El mismo
protocolo puede usarse también para proporcionar evidencia de
estabilidad del transgén OX3864 en el tiempo. La
amplificación exitosa del transgén OX3864 a lo largo del
10 tiempo proporciona evidencia de su estabilidad, ya que un
primer se hibrida al transgén y el otro a la secuencia
genómica flanqueante, de modo que la movilización del
transgén da como resultado una PCR negativa.

15 a. Materiales

Kit de extracción genómica Purelink (suministrado por
Invitrogen)
BioTaq DNA Polomerasa (PCR Biosystems)
Primers - descrito en la sección C (sintetizado por Life
20 Technologies)
Albúmina de suero bovino 10x (BSA, New England Biolabs)
Escala inteligente 200bp-1 Okb (Eurogentec)
Agua pura desionizada Milli-Q
Agarosa (Web Scientific)
25 Solución de Tris-acetato-EDTA (10x TAE)
Bromuro de etidio
Solución de gel de carga 6x (que comprende 30% de glicerol,
0,25% de azul de bromofenol)

30 b. Equipo

Termocicladores Biometra (T3000)
Pipetas Gilson,

Puntas para pipeta,

Placas de microtitulación de 96 pozos o tubos de PCR de 0,2 ml,

Tapas de placas adhesivas o tapas de tira de 8 pozos,

5 Tubos de microcentrífuga de 2 ml,

Depósito de electroforesis en gel, fuente de poder, moldes y peines.

Sistema de visualización ultravioleta (UV).

10 c. Métodos

i. Extracción de ADN genómico

Se aisló ADN genómico de insectos individuales usando el protocolo siguiente (también encontrado en TD/SOP/00142) usando el kit de extracción genómica Invitrogen Purelink.

15 1. Añadir etanol del 96-100% al Buffer 1 de Lavado Genómico PureLink™ y al Buffer 2 de Lavado Genómico PureLink™ de acuerdo con las instrucciones de cada etiqueta. Mezclar bien. Marcar en las etiquetas que se agrega etanol. Almacenar ambos buffer de lavado con
20 etanol a temperatura ambiente.

2. Colocar un baño de agua o un bloque de calor a 55°C.

3. Añadir 180 µl de Buffer de Digestión Genómico PureLink™ y 20 de µI Proteinasa K a cada grupo de
25 abdómenes. Romper las muestras de insectos con un mazo estéril. Después del uso, poner los pilones en un vaso de Virkon durante al menos 24 horas antes de lavar y autoclavar. Asegurar de que el tejido este completamente sumergido en la mezcla buffer.

4. Incubar a 55°C con vórtex ocasional hasta que la
30 lisis esté completa (1 -4 horas). Puede realizar la digestión durante la noche.

5. Eliminar cualquier material en partículas, centrifugar el lisado a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga.
- 5 6. Añadir 20 μ I de ARNasa A para lisar, mezclar bien mediante vórtice brevemente e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Añadir 200 μ l de Buffer de lisis Genómica/unión y mezclar bien por vórtex para obtener una solución homogénea.
- 10 8. Añadir 200 μ I de etanol 96-100% al lisado. Mezclar bien mediante agitación en vortex para obtener una solución homogénea. El buffer de lisis/unión y el Etanol al 100% se pueden mezclar antes de añadir.
- 15 9. Retirar una columna de centrifugación PureLink™ en un tubo de recolección del kit. Añadir el lisado (-640 μ I) preparado con el buffer de lisis genómica/unión PureLink™ y el etanol a la columna de centrifugación.
- 20 10. Centrifugar la columna a 10.000 $\times$ g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Desechar el tubo de recogida y colocar la columna de centrifugación en un tubo de recolección PureLink™ limpio suministrado con el kit.
- 25 11. Añadir 500 μ I de buffer 1 de lavado preparado con etanol a la columna. Centrifugar la columna a 10.000 $\times$ g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Desechar el tubo de recogida y colocar la columna de centrifugación en un tubo de recogida PureLink™ limpio suministrado con el kit.
- 30 12. Añadir 500 μ I de buffer 2 de lavado preparado con etanol a la columna. Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente. Desechar

el flujo y volver a centrifugar durante un minuto adicional a 10.000 x g.

13. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. Añadir 100 µl de
5 buffer de elusión genómica PureLink™ a la columna.

14. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente.

16. Retirar y desechar la columna. Utilizar ADN para la
10 aplicación corriente abajo deseada o almacenar el ADN purificado a 4°C (a corto plazo) o a -20°C (a largo plazo).

17. Registrar todos los detalles en el libro de laboratorio.

15

ii. Protocolo de PCR

Los primers son del catálogo Oxitec; los números se refieren al catálogo de primer interno de Oxitec y se sintetizan fuera del sitio por Life Technologies

20

Las secuencias génicas endógenas específicas del transgen y de la Actina 4 se amplificaron por PCR usando PCR BIO polimerasa como sigue:

25 Primers transgénicos OX3864:

1087) FRTNheF (GGTGTGGCTAGCTCGAAGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCC; SEQ
ID NO: 7) y 1272) 3864FRTFIF (CAACGAGTGACAGCAATGATATTCCTTAC;
SEQ ID NO: 6) da un producto de 532 pb. El FRTNheF hibrida al
30 transgén, mientras que 3864FRTFIF hibrida a la secuencia genómica que flanquea el transgén. Este conjunto de primers

solo amplificará las muestras que contienen el transgén OX3864.

Primers de control Adh:

5

Se incluyó un conjunto de primers para comprobar la amplificación del ADN genómico de *Ceratitis capitata*, como control interno. Los primers son 1131) CcAdh2RTF (GAAAGCTGTTCGGGCTTCAGGC; SEQ ID NO: 8) y 1132) CcAdh2RTR (CTTGGAGGTGATGTCTGAATTTGGTG; SEQ ID NO: 9) dan un producto de 491 pb.

10

Se preparó una mezcla maestra de PCR (suficiente para el número de muestras más 1-5 extras, para permitir el error de pipeteo), añadiendo los siguientes ingredientes a un tubo de microcentrífuga, en el orden en que aparecen a continuación:

15

X (n + 1)	
H ₂ O	12.3µI
20 Buffer Biotaq	4µI
BSA 10x	0.5µI
Primers 1087 u 1131	0,5µI
Primers 1272 u 1132	0.5µI
Polimerasa Biotaq	0.2µI

25

Se pipeteó una mezcla maestra de 18 µl en cada tubo de PCR o pozo de la placa de 96 pozos.
Se añadieron 2 µI de gADN molde.
Los moldes incluyen un control positivo conocido de la muestra de gADN homocigoto OX3864 (del stock de cría en masa, o previamente demostró ser positivo) un control negativo de

30

una muestra de gADN de tipo salvaje y un control negativo de agua mili-Q.

Las PCR se corrieron en un termociclador Biometra T3000

5 usando el siguiente programa:

1. 94°C 2 min
2. 94°C 15s
3. 60°C 30s (reduce la temperatura en 0.5°C cada ciclo)
4. 72°C 15s ir al paso 2 x 10 ciclos
- 10 5. 94°C 15s
6. 55°C 30s
7. 72°C 15s ir al paso 5 x 25 ciclos
8. 72°C 7 min
9. 4°C de retención.

15

Se mezclan 8 µI del producto de PCR con 1.5 µl de buffer de gel de carga (30% glicerol con azul de bromofenol al 0,25%) y se corren sobre un gel de agarosa al 1% (ver más adelante) a 120 V durante 25 minutos para visualización. La Eurogentec

20 Smart Ladder se carga en cada extremo del gel. Los geles son visualizados y fotografiados usando un sistema de visualización de gel Uvitec.

iii. Preparación de gel de agarosa

25 1 g de agarosa mezclada con 100 ml de buffer 1x TAE, disuelto por microondas durante aproximadamente 2 minutos, enfriado con agua corriente fría durante 30 segundos, se añade 1,5 µl de bromuro de etidio al 1%, luego se vierte en un molde y se deja que se fije.

30

REFERENCIAS

Caceres, C. (2002). "Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*)". *Genetica*, 116: 107-116.

Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. (2002). "Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?" *J Cell Sci.*, 115(24):4727-34.

Cayol J. P., et al. 2002. "Recent findings on Medfly sexual behaviour: Implications for SIT". *Florida Entomologist*, 85(1): 171-181.

Choi J. and Guarino A. (1995). "The Baculovirus Transactivator IE1 Binds to Viral Enhancer Elements in the Absence of Insect Cell Factors". *Journal of Virology*, 69(7): 4548-4551.

Dafa'alla T.H., Condon G.C., Condon K.C., Phillips C.E., Morrison N.I., Jin L, Epton M.J., Fu G.L., Alphey L. (2006). "Transposon-free insertions for insect genetic engineering". *Nat Biotechnol*, 24(7), 820-821. (doi:10.1038/nbt1221).

FAO/IAEA/USDA. 2003 Product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies. *Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency IAEA.*

Fu G.L, Condon K.C., Epton M.J., Gong P., Jin L, Condon G.C., Morrison N.I., Dafa'alla T.H., Alphey L. (2007). "Female-specific insect lethality engineered using alternative

splicing. *Nat Biotechnol*, 25(3), 353-357. (doi: 10.1038/nbt1283).

Gong P., Epton M.J., Fu G.L, Scaife S., Hiscox A., Condon
5 K.C., Condon G.C., Morrison N.I., Kelly D.W., Dafa'alla T.,
et al. (2005). "A dominant lethal genetic system for
autocidal control of the Mediterranean fruitfly". *Nat
Biotechnol*, 23(4), 453-456.

10 Handler A. M. and Harrel R. A. (2001) "Polyubiquitin-
Regulated DsRed Marker for Transgenic Insects". *Biotechniques*
31, 820-828

Harris A.F., Nimmo D., McKemey A.R., Kelly N., Scaife S.,
15 Donnelly C.A., Beech C, Petrie W.D. & Alphey L. (2011).
"Field performance of engineered male mosquitoes". *Nature
Biotechnology* 29(11): 1034-1037

Horn C, Wimmer EA. (2003). "A transgene-based, embryo-
20 specific lethality system for insect pest management". *Nat
Biotechnol.*, 21 (1):64-70.

Huang, Q., Deveraux, Q.L., Maeda, S., Salvesen, G.S.,
Stennicke, H.R., Hammock, B.D. and Reed, J.C. (2002).
25 "Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms:
Lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins
are inhibitor of mammalian caspase-9". *Agricultural Sciences*
97(4): 1427-1432.

30 McInnis, D.O., Rendon P., Komatsu J. (2002) Mating and
remating of medflies (Diptera: Tephritidae) in Guatemala:

individual fly marking in field cages". *Florida Entomologist* 85(1): 126-137

Mumford, J. (2012). "Science, Regulation, and Precedent for
5 Genetically Modified Insects". *PLoS Negl Trop Dis*, 6(1).

Olson, M.R., Holley, C.L., Gan, E.C., Colon-Ramos, D.A., Kaplan, B. and Kornbluth, S. (2003). "A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and
10 induction of IAP degradation". *J. Biol. Chem.*, 278 (45): 44758-44768.

Pane, A., Salvemini, M., Delli Bovi, P., Polito, C, and Saccone, G. (2002). "The *transformer* gene in *Ceratitidis capitata* provides a genetic basis for selecting and
15 remembering the sexual fate". *Development*, 129, 3715-3725.

Simmons G.S., McKemey A.R., Morrison N.I., O'Connell S., Tabashnik B.T., Claus J., Fu G., Tang G., Sledge M., Walker
20 A. S., Phillips C.E., D. Miller, Rose R. I., Staten R.T., Donnelly C.A., Alphey L. (2011) Field Performance of a Genetically Engineered Strain of Pink Bollworm *PLoS ONE* 6(9): e24110

25 Valdez de M.R.W., Nimmo D., Betz J., Gong H.F., James A.A., Alphey L, Black W.C. (2011). "Genetic elimination of dengue vector mosquitoes". *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12), 4772-4775.

30 Vernooy, S.Y., Copeland, J., Ghaboosi, N., Griffin, E.E., Yoo, S.J. and Hay, B.A. (2000). *J. Cell Biol.* 150(2):F69-F75.

White, K., Tahoaglu, E. and Steller, H. (1996). "Cell killing by the Drosophila gene reaper". *Science*, 271 (5250): 805-807.

Wing, J. P., Zhou, L, Schwartz, L.M. and Nambu, J.R. (2001).

5 "Distinct cell killing properties of the Drosophila reaper, head involution defective, and grim genes". *Cell Death Diffn* 5(11); 930–939.