

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de polinucleótidos que comprende un primero y un segundo sistema de expresión génica, en el que:

- 5 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,
- 10 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
- 15 empalme,

en donde

Cada uno de dichos factores de transcripción de

20 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,

25 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

30 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
5 de expresión génica es el mismo o diferente de dichos componentes de dicho segundo sistema de expresión génica.

2. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer factor de transcripción
10 de activación es el producto génico del primer gen letal dominante y/o el segundo factor de transcripción de activación es el producto génico del segundo gen letal dominante, de manera que dicho factor de transcripción también proporciona el efecto letal conferido por dicho gen
15 letal dominante.

3. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que una o ambas de la primera y la segunda secuencia de control de empalme media la expresión
20 específica de la hembra por el respectivo gen letal dominante, junto con un spliceosoma mediando el empalme de un transcripto de ARN del gen letal dominante respectivo para producir un mRNA que codifica una proteína funcional y al menos un mRNA que codifica una proteína no funcional, en
25 donde el mRNA que codifica una proteína funcional se produce en una hembra.

4. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que
30 cada uno de los promotores primero y segundo es sustancialmente inactivo en ausencia del factor de transcripción de activación capaz de activar dicho promotor.

5. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal es, independientemente, *tTA* o una variante del gen *tTAV*,
5 preferiblemente una variante del gen *tTAV*.

6. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal dominantes es, independientemente, uno de *tTAV* (SEQ ID NO: 26), *tTAV2* (SEQ ID NO: 27) y *tTAV3* (SEQ. ID NO: 28).
10

7. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un intrón *tra*, un
15 gen *dsx* o un gen *Actina-4*, preferiblemente un intrón *tra*.

8. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 7, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de un
20 Tephritid, preferiblemente de uno de los géneros *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* y *Rhagoletis*.

9. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8, en la que una o ambas de la primera y
25 segunda secuencia de control de empalme se derivan de *Ceratitis capitata*.

10. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8, en la que una de la primera y segunda
30 secuencias de control de empalme se deriva de *Ceratitis capitata* y la otra secuencia de control de empalme se deriva de una especie diferente.

11. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo sistemas de expresión de génica además comprende un potenciador asociado con el promotor
5 respectivo, y al menos uno de los factores de transcripción de activación actúa en el potenciador respectivo.

12. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el potenciador, o uno o ambos de
10 los potenciadores, es un elemento tetO que comprende una o más repeticiones de tetO.

13. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el potenciador o cada uno de
15 ellos es, independientemente, tetOx7, tetOx14 o tetOx21.

14. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo promotores se expresan durante
20 al menos el desarrollo embrionario.

15. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos de los promotores primero y segundo es un promotor
25 mínimo.

16. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15, en la que cada uno de los promotores primero y segundo es, independientemente, *Hsp70* o *srya*,
30 preferiblemente en el que uno es *Hsp70* y el otro es *srya*.

17. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno del primero y segundo sistemas de expresión génica comprende un tercer gen dominante letal y un tercer promotor
5 operativamente unido al tercer gen letal dominante, en el que el factor de transcripción de activación capaz de activar el promotor de dicho sistema de expresión génica también es capaz de activar el tercer promotor.

10 18. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 17, dependiente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho sistema de expresión génica comprende además un potenciador asociado con el promotor de dicho sistema de expresión génica, y el tercer
15 promotor está también asociado con dicho potenciador, preferiblemente en el que el promotor de dicho sistema de expresión génica está asociado con un extremo de dicho potenciador y el tercer promotor está asociado con el otro extremo de dicho potenciador.

20

19. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, en la que el tercer gen letal dominante es *VP16* y el tercer promotor es *Hsp70* o *srya*.

25 20. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la secuencia de polinucleótidos comprende además un marcador genético, preferiblemente en el que el marcador genético es un marcador fluorescente, más preferiblemente en el que el
30 marcador genético es *DsRed2*.

21. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el primer gen letal dominante es tTAV (SEQ ID NO: 26), el primer factor de transcripción de activación es el producto del gen tTAV, el primer promotor es *Hsp70*, la secuencia de control es Cctra,

El segundo gen letal dominante es tTAV3 (SEQ ID NO: 28), el segundo factor de transcripción de activación es el producto génico tTAV3, el segundo promotor es *srya* y la segunda secuencia control de empalme es Bztra,

El primer sistema de expresión génica comprende además un primer potenciador asociado con el primer promotor, en el que el primer potenciador es tetOx7,

El segundo sistema de expresión génica comprende además un segundo potenciador asociado con el segundo promotor, en el que el segundo potenciador es tetOx14,

La secuencia de polinucleótidos comprende además un tercer gen letal dominante operativamente unido a un tercer promotor, estando asociado el tercer promotor al segundo potenciador, en el que el tercer gen dominante letal es *VP16* y el tercer promotor es *Hsp70*, en el que el segundo promotor está asociado con un extremo del segundo potenciador y el tercer promotor está asociado con el otro extremo del segundo potenciador,

La secuencia de polinucleótidos comprende además un primer marcador genético, que es *DsRed2*.

30

22. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la

secuencia de polinucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1.

23. Un constructo genético para transformar un artrópodo,
5 que comprende una secuencia de polinucleótidos según se describe en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

24. Un constructo genético de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el constructo comprende además, al menos cuatro
10 repeticiones invertidas de transposón, formando al menos dos pares de repeticiones invertidas de transposón opuestas, en donde dicha secuencia de polinucleótidos está situada entre dos pares de repeticiones invertidas de transposón opuestas de tal manera que la escisión por una transposasa o
15 transposasas de dichos pares, *in situ*, es efectiva para poder dejar dicha secuencia de polinucleótidos integrada en el genoma del huésped, sin repeticiones invertidas del transposón flanqueante en el genoma del huésped.

20 25. Un constructo genético de acuerdo con la reivindicación 24, en la que cada una de las repeticiones invertidas del transposón que delimitan dicha secuencia de polinucleótidos es una repetición invertida terminal mínima, preferiblemente en la que las repeticiones invertidas del transposón son de
25 elementos transponibles Clase II, más preferiblemente piggyBac.

26. Un constructo genético de acuerdo con la reivindicación 24 ó 25, que tiene cuatro repeticiones invertidas de
30 transposón.

27. Un constructo genético de acuerdo con la reivindicación 26, en la que las cuatro repeticiones invertidas de transposón forman un primero y un segundo par de repeticiones invertidas opuestas, en donde

5

Las cuatro repeticiones invertidas del transposón son repeticiones invertidas piggyBac

El primer par consta de un extremo 3' piggyBac interno
10 proximal de la secuencia de polinucleótidos y un extremo 5' *piggyBac* externo distal de la secuencia de polinucleótidos, y el segundo par consiste en un extremo 5' piggyBac interno proximal de la secuencia de polinucleótidos y un extremo distal 3' *piggyBac* externo de la secuencia de
15 polinucleótidos, preferiblemente en la que:

El extremo interno 3' piggyBac consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 32

20 El extremo 5' piggyBac externo consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 30

El extremo 5' piggyBac interno consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 30, y

25

El extremo 3' piggyBac externo consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 31.

28. Un constructo genético de acuerdo con cualquiera de las
30 reivindicaciones 23-27, que comprende además, al menos un marcador genético entre las repeticiones invertidas de transposón de al menos un par de repeticiones invertidas de

transposón opuestas, que comprende preferiblemente al menos un marcador genético entre las repeticiones invertidas de cada uno de los al menos dos pares de repeticiones opuestas.

5 29. Un artrópodo que comprende una secuencia de polinucleótidos como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

30. Un artrópodo que comprende el constructo genético según
10 se describe en cualquiera de las reivindicaciones 23-28.

31. Un artrópodo de acuerdo con la reivindicación 29 ó 30, en el que el artrópodo es un Tephritidae, Drosophilidae, Lonchaeidae, Pallopteridae, Platystomatidae, Pyrogotidae,
15 Richardiidae o Ulidiidae, preferiblemente un Tephritidae.

32. Un artrópodo de acuerdo con la reivindicación 31, en el que el artrópodo es del género *Ceratitis*, siendo preferiblemente *Ceratitis capitata*.

20

33. Un artrópodo según cualquiera de las reivindicaciones 30-32, en el que el artrópodo comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 ó 3, preferiblemente la SEQ ID NO: 2.

25

34. Un método para detectar un artrópodo como el descrito en cualquiera de las reivindicaciones 30-33, que comprende las etapas de:

i) poner en contacto una muestra de ADN aislado de un
30 insecto con un par de primers específico para el insecto transformado, en el que el primer primer en el par es específico para la secuencia de polinucleótidos del

constructo genético del insecto y el segundo primer en el par es específico para una secuencia nucleótido genómico que flanquea la secuencia de polinucleótidos,

ii) amplificar la muestra de ADN, y

5 iii) detectar el ADN amplificado.

35. Un método de acuerdo con la reivindicación 34 como dependiente de la reivindicación 33, en el que el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la
10 SEQ ID NO: 6 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 7.

36. Un método de acuerdo con la reivindicación 34 como dependiente de la reivindicación 33, en el que el primer
15 primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 5.

37. Un método de acuerdo con la reivindicación 34 como
20 dependiente de la reivindicación 33, en el que el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 10 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 11.

25 38. Un método de acuerdo con la reivindicación 37, en el que la etapa i) comprende además poner en contacto la muestra de ADN con una sonda específica del producto de amplificación por PCR producido en la etapa ii), para la detección del producto de amplificación por PCR, preferiblemente en el que
30 la sonda es una sonda doblemente etiquetada que comprende una molécula reportera y una molécula de desactivación fluorescente, y en el que la molécula reportera es liberada

de la sonda por Taq polimerasa durante la amplificación por PCR, cuando dicha sonda se hibrida a dicho producto de amplificación por PCR.

5 39. Un método de acuerdo con la reivindicación 38, en el que la sonda tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12.

40. Un primer para uso en un método como se describe en la
10 reivindicación 34, que comprende la secuencia de nucleótidos representada por una de las SEQ ID NOs: 4, 5, 6, 7, 10 u 11.

41. Un primer para uso en un método como el descrito en la
15 reivindicación 38, que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 10 u 11.

42. Una sonda para uso en un método como el descrito en la
reivindicación 38 ó 39, que comprende la secuencia de
nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12.

20

43. Un método para controlar una población de artrópodos que comprende la liberación de un artrópodo como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 29-33, preferiblemente en el que el artrópodo es *Ceratitis capitata*.

25