



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 167**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00979774 .7**
86 Fecha de presentación : **29.11.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1246927**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.2002**

54 Título: **Control biológico mediante un sistema genético letal dominante condicional.**

30 Prioridad: **29.11.1999 GB 9928181**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **ISIS INNOVATION LIMITED**
2 South Parks Road
Oxford, Oxfordshire OX1 3UB, GB

72 Inventor/es: **Alphey, Luke y**
Thomas, Dean

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 298 167 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Control biológico mediante un sistema genético letal dominante condicional.

5 La presente invención se refiere a un método para el control de la población de un organismo.

Antecedentes de la invención

10 Existen métodos conocidos de control biológico para insectos y plantas. Un método utilizado actualmente para el control de las poblaciones de insectos se conoce como la “técnica del insecto estéril” (SIT), o también como el “método de liberación de insectos estériles” (SIRM). En este método, machos estériles son liberados en el entorno, donde compiten con los machos de tipo salvaje (fértil) por una pareja. Las hembras que se reproducen con los machos estériles no producen vástagos, y la liberación de un gran número de machos estériles, por lo tanto, conduce a un decrecimiento en el tamaño de la siguiente generación. Así se controla el tamaño de la población salvaje.

15 La SIT requiere de algún mecanismo para la esterilización de insectos. Además, la SIT generalmente también utiliza la separación de machos y hembras, con la liberación de sólo un sexo. Esto es deseable en el caso de una peste agrícola, como la mosca de la fruta mediterránea, donde las hembras dañan la fruta, incluso si las hembras son estériles. De forma parecida, sólo el mosquito hembra pica a los humanos. En estos casos, pues, preferiblemente se evita la liberación de insectos hembra.

20 Las técnicas actuales para conseguir tanto la esterilización como la separación de sexos tienen todas inconvenientes. En algunos casos es posible separar machos y hembras bajo el criterio de la masa crisálida o del tiempo de eclosión, pero estos métodos son poco fiables para conseguir una población totalmente de un único sexo. La separación de machos y hembras generalmente implican el uso de variedades mutantes, que han sido mutadas para inducir una diferencia visible o selectiva entre los sexos, pero tales mutaciones pueden reducir la idoneidad de la reserva resultante con respecto a los de tipo salvaje, situación que es indeseable.

25 La idoneidad puede verse reducida más adelante en el proceso de esterilización, en el que los insectos son sometidos a una dosis esterilizante de radiación (rayos X o rayos gamma), o son químicamente esterilizados. Frecuentemente, las dosis de productos químicos o las dosis de radiación requeridas para inducir la esterilización son muy parecidas a aquellas que son letales para el organismo. Así pues, los organismos estériles están frecuentemente discapacitados en su habilidad de reproducirse. Además, ambos métodos químico y de irradiación utilizan tecnologías que no son específicas para el organismo objetivo, con consecuente potencial dañino para los trabajadores. Ambos métodos producen un entorno de riesgo, ya que se debe disponer de la fuente de la radiación o los productos químicos. Además, hay peligros inherentes y costes laborables adicionales en el uso de una fuente radioactiva como una fuente de estroncio.

30 Fryxell y Millar (Journal of Economic Entomology, Vol 88, No 5, páginas 1221-1232) revela una estrategia alternativa para el control de insectos, utilizando *Drosophila* que contenga un gen letal condicional dominante que se expresa bajo las adecuadas condiciones frías en su hábitat natural. Sin embargo, este método puede ser inefectivo debido a condiciones variables de campo, donde el entorno no provea de condiciones frías adecuadas. Además, los organismos que viven en hábitats con un rango de temperaturas pueden no ser controlables bajo todas las condiciones.

35 Asburner y col., (Insect Molecular Biology, 1998, 7(3), 201-213) revela métodos de transformación de especies de insectos con ADN extraño, para producir especies transgénicas.

40 DeVault y col., (Biotechnology, Vol 14, Enero 1996, páginas 46-49) revelan un proceso de dos etapas que es una modificación del procedimiento de la SIT. Inicialmente se separan los insectos por la expresión de un promotor específico femenino insertado establemente ligado a un gen letal, que se expresa matando hembras y obteniendo un solo sexo. Los machos restantes se pueden entonces esterilizar por irradiación o tratamiento químico, y liberados en el entorno. Sin embargo, este método tiene el inconveniente ya antes comentado arriba en que las moscas liberadas tienen la idoneidad reducida debido al tratamiento de esterilización. Alternativamente, el artículo de DeVault revela el uso de este paso genético para separar los sexos en combinación con un segundo sistema genético que puede servir para esterilizar o retardar la dureza de la población natural.

45 Bello y col., al que se hace referencia en los Ejemplos, revelan la expresión condicional de Antp. Derepression, llevando a la expresión de Antp, teniendo un efecto letal en embriones de *Drosophila*. Burchin y col., (Frontiers in Bioscience, vol. 3, 1 Marzo 1998, páginas C1-17) también discute un sistema regulador basado en tetraciclinas para la expresión de genes.

50 Aún hay una necesidad en el estado de la técnica de un método de control de poblaciones que evite los problemas de los métodos arriba mencionados.

55 La presente invención se propone superar tales problemas.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de control de población de un animal multicelular no-humano en un entorno natural, por tanto, constanding de:

5 i) cría de reserva del animal,

llevando el animal un sistema genético letal dominante, el efecto letal del sistema letal siendo condicional y ocurriendo en el dicho entorno natural por medio de la expresión de un gen letal,

10 la expresión de dicho gen letal estando bajo el control de una proteína transactivadora reprimible,

siendo dicha cría bajo condiciones permisivas en la presencia de cierta sustancia, estando la sustancia ausente de dicho entorno natural y capaz de reprimir dicho transactivador.

15 ii) distribuyendo dichos animales en reserva en el entorno en una localización para el control de población; y

20 iii) consiguiendo el control de la población a través de letalidad embrionica por la expresión del sistema letal en embriones de las crías que resulten del cruce de dichos individuos en reserva con individuos del sexo contrario de la población salvaje.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un método de control de población de un animal invertebrado multicelular en un entorno natural del mismo, que comprende:

25 i) cría de una reserva del animal,

llevando el animal un sistema genético letal dominante, el efecto letal del sistema letal siendo condicional y ocurriendo en el dicho entorno natural vía la expresión de un gen letal,

30 la expresión de dicho gen letal estando bajo el control de una proteína transactivadora reprimible,

llevándose a cabo dicha cría bajo condiciones permisivas en la presencia de cierta sustancia, estando la sustancia ausente del dicho entorno natural y capaz de reprimir dicho transactivador.

35 ii) distribuyendo dichos animales de reserva en el entorno en un emplazamiento para el control de población; y

40 iii) consiguiendo el control de la población a través de la expresión del sistema letal en embriones de las crías que resulten del cruce de dichos individuos de reserva con individuos del sexo contrario de la población salvaje.

45 El animal es viable en un laboratorio bajo condiciones controladas. Condiciones controladas son condiciones que no se producen en el entorno natural del organismo. Como tales, las condiciones son típicamente artificiales. La eliminación de las condiciones controladas permite la expresión del sistema genético letal. El organismo puede ser autocida, de modo que será eliminado después de su liberación en el entorno. De forma adecuada el organismo puede transmitir un elemento letal a al menos algunas de sus crías, para que al menos algunas de estas crías también sean eliminadas.

50 La solicitud de patente WO 94/03619A se refiere a un método para contener plantas de cultivo, para que los ácidos nucleicos transgénicos no se diseminen entre plantas de tipo salvaje. WO 97/30162A revela, en el Ejemplo 3, la expresión inducida químicamente del anti-LacIq ARN, que bloquea la inhibición de la expresión del gen 35S-RNA-CaMV-B* modificado. La acumulación de este producto del gen en órganos florales inhibe la función del gen letal. WO 96/04393 revela tecnologías terminativas clásicas en plantas. Estas revelaciones se refieren a plantas y no se hace ninguna mención de una proteína transactivadora como en la presente invención.

55 El organismo puede ser usado en el control de la población para pasar el sistema genético letal vía el apareamiento, y también para bloquear el apareamiento potencialmente productivo de organismos de tipo salvaje. La distribución del organismo de la presente invención en el entorno inicia de este modo un sistema de control biológico. El organismo de la presente invención no necesita ser esterilizado por medio de irradiación y pérdida de idoneidad genética.

60 Preferiblemente no hay ninguna etapa de esterilización específica para organismos liberados.

65 Además, hemos descubierto un nuevo método para el control biológico, aplicable a organismos capaces de reproducirse sexualmente, en donde sólo es necesario un sistema genético letal, la expresión del cual se usa tanto en la separación de sexos como en el control biológico. En este caso el sistema genético letal es diseñado para ser específico del sexo. El sistema genético letal es preferiblemente un sistema genético letal específico del sexo dominante condicional, que se expresa en las condiciones restrictivas del entorno natural de un organismo. Sin embargo, la expresión del sistema genético letal puede ser controlada bajo condiciones permisivas en un laboratorio, fábrica u otro sistema regulado, por ejemplo, para permitir el crecimiento de una población normal, por ej. reserva de insectos de

ambos sexos. Antes de la liberación de la reserva del laboratorio o fábrica en el entorno las condiciones pueden ser manipuladas para asegurar que sólo poblaciones de un solo sexo del organismo sean distribuidas en el entorno. Ninguna irradiación adicional del organismo es requerida y la ordenación elimina cualquier requerimiento para el uso de dos sistemas genéticos separados (esto es, aquellos empleados por De Vault y *col.*, para la separación de sexos y, por ejemplo, la esterilización). Sólo se necesita construir e insertar un solo sistema genético en el organismo, que hace que la metodología sea más fácil y rápida.

Así pues, en una posterior realización de la invención, el organismo multicelular lleva un sistema genético letal específico del sexo dominante que es condicional, y no tiene un sistema genético letal específico del sexo dominante que sea incondicional y que se manifieste en todos los individuos.

Específicamente, bajo condiciones permisivas, el sistema genético letal en los organismos de esta invención no es expresado, y puede criarse una reserva de los organismos. La imposición de condiciones restrictivas permite entonces eliminar un sexo (por ejemplo, hembras). El sexo restante (machos) puede ser liberado en el entorno, y el sistema genético es transmitido a al menos algunas crías que resulten de cualquier reproducción sexual entre dichos machos y un organismo de tipo salvaje de la misma especie. El sistema genético letal dominante condicional se selecciona de tal manera que la expresión del sistema letal se produzca en el entorno natural. Como resultado, para un sistema genético letal femenino específico, todas las hembras que resulten del apareamiento son entonces eliminadas o se vuelven no viables por la acción del sistema genético, mientras que los machos sobreviven para transmitir el sistema a la siguiente generación en una proporción de los casos. De esta manera, se consigue un control biológico.

Si se desea, la reserva de organismos criados bajo condiciones permisivas puede ser liberada en el entorno, sin imponer las condiciones restrictivas para eliminar un sexo antes de la liberación. Esta variación permite las posibilidades de utilizar un mecanismo de tiempo, por ejemplo un ciclo de vida, en la creación de un agente de control biológico. Esto es, la imposición de la condición restrictiva es programada por otro evento como, por ejemplo, un cambio pre-determinado en las condiciones de fábrica/laboratorio previas a la liberación en el entorno. Por ejemplo, la liberación de una población normal de larvas crea un dispersor de tiempo útil o un agente de liberación retrasado. Con esto se quiere decir que larvas individuales pueden empezar a madurar a diferentes ritmos y por lo tanto la liberación de una población genéticamente manipulada de un solo sexo podría ocurrir a lo largo de un periodo de tiempo y de ahí crear una máxima probabilidad de interacción con poblaciones salvajes sexualmente activas durante ese periodo. Este aspecto puede tener ventajas sobre una liberación única en un momento concreto del tiempo de una población de un solo sexo de los adultos genéticamente manipulados. Hay otras ventajas, principalmente que la última (mayor) generación no tiene que ser criada en la fábrica, laboratorio u otro entorno regulado, por lo tanto ahorrando espacio y comida y resultando así un proceso más económico. Además, las larvas liberadas competirán con las larvas de la población salvaje, aumentando la mortalidad a través de mecanismos dependientes de la densidad. A modo de ilustración, esta variación puede ser útil con mosquitos, donde las larvas son inofensivas para los humanos, pero no con la mosca de la fruta mediterránea ni con la palomilla del manzano, donde las larvas comen fruta.

Por lo tanto, en un aspecto posterior la presente invención proporciona un método de control biológico para un organismo, el organismo teniendo entidades sexuales discretas, el método consistiendo en los pasos de:

- 1 producción de una reserva de un organismo genéticamente manipulado;
- 2 liberación del organismo genéticamente manipulado en el entorno como
 - a) una población normal (esto es, conteniendo ambos sexos) en un cierto estado del ciclo de vida del organismo, por ejemplo larvas, con el conocimiento de que las hembras morirán y sólo los machos madurarán a adultos, o
 - b) una población de un único sexo, esto es después de que el efecto letal dominante específico se haya expresado antes de la liberación.

La invención depende de la expresión de un sistema genético letal dominante condicional capaz de letalidad específica en función del sexo, para eliminar una entidad sexual. La expresión condicional del gen letal es tal que el efecto letal ocurre en el entorno natural del organismo que causa el control biológico.

En un todavía aspecto adicional de la invención, la invención como corresponde implica un tercer paso;

- 3 permitiendo que ocurra el control biológico.

La invención proporciona además un método de control biológico, consistiendo en:

la cría de una reserva de organismos hembra y macho bajo condiciones permisivas, permitiendo la supervivencia de los machos y hembras, para dar un agente de control biológico sexual dual;

opcionalmente, antes del siguiente paso, imponiendo o permitiendo que condiciones restrictivas causen la muerte de individuos de un sexo y de esta manera proporcionando un agente de control biológico de un único sexo consistiendo en que individuos del otro sexo lleven el sistema genético letal dominante condicional;

liberando el agente de control biológico dual o de un único sexo en el entorno en un emplazamiento para el control biológico, y

5 consiguiendo el control biológico a través de la expresión del sistema genético en crías resultantes del apareamiento entre individuos del agente de control biológico e individuos del sexo contrario de la población salvaje.

10 La invención también se refiere a organismos que comprenden un sistema genético letal dominante condicional para usar en un método combinado de separación de sexos y control biológico, tal como se define en la presente invención.

15 La invención proporciona además un sistema letal de fases múltiples que tiene letalidad en más de una fase de ciclo de vida. Específicamente, la invención proporciona un organismo o una población de un único sexo para su uso en control biológico, en donde el organismo o la población de un único sexo producen progenie no viable cuando se aparean con el sexo contrario de tipo salvaje bajo condiciones restrictivas, por ejemplo en el entorno natural. Por ejemplo, la invención proporciona una población macho que produce progenie macho o hembra no viable. Esto contrasta con la situación en la que sólo una población macho produce una progenie hembra no viable pero una progenie macho viable.

20 La invención proporciona además un método para la separación por sexos de los organismos, en donde la expresión de un sistema letal condicional dominante específico del sexo es usado para matar uno de los sexos para así dejar una esencialmente pura población de machos o de hembras, o una población en que los organismos consistan bien de tejidos macho o bien de tejidos hembra, o una población en que los organismos sean incapaces de producir gametos funcionales macho o hembra (o ambos) que hubieran sido capaces de producir si no fuera por la expresión del sistema genético letal.

25 La invención proporciona además un método de control biológico en que el crecimiento de una reserva de organismos bajo condiciones permisivas, una vez iniciado, es auto-sostenible y no requiere de un grupo adicional de organismos para su mantenimiento.

30 La invención proporciona además un método de control biológico en que la expresión del sistema genético letal ocurre en la ausencia de una sustancia que no se encuentra en el entorno natural del organismo, así asegurando un control biológico efectivo cuando el organismo es liberado.

35 La invención proporciona además un vector para su uso en la transformación de un organismo para producir un organismo de acuerdo con la presente invención, adecuado para su uso en un esquema de control biológico.

Descripción general de la invención

40 Las características generales de la invención son primero esbozadas en términos generales para su facilidad de comprensión, antes de ser específicamente detalladas. La invención es tratada aquí con respecto tanto a los organismos para ser usados en un método de control biológico como a métodos de control biológico. La referencia a un organismo pues generalmente se sobreentiende que incluye un método de control biológico que utiliza dicho organismo, y viceversa.

45 El organismo no humano de la presente invención es preferiblemente un organismo recombinante, en el que el sistema genético letal dominante ha sido transformado. El organismo es también al menos capaz de reproducirse sexualmente o intentar reproducirse sexualmente, para que así el sistema genético letal dominante pueda ser transmitido a la población nacida naturalmente de ese organismo, o el organismo puede competir con organismos de tipo salvaje en el apareamiento.

50 El sistema genético letal consiste convenientemente en un gen letal y elementos controladores y/o reguladores. Sin embargo, en una variante, el sistema letal puede consistir simplemente en un gen letal, suficiente para producir el efecto letal.

55 El sistema genético dominante incluye de forma adecuada un gen dominante cuyo efecto se expresa fenotípicamente en el estado heterocigótico. Este efecto dominante asegura que, si el organismo sólo recibe una copia del sistema genético letal, entonces el efecto letal del sistema se ejercerá no obstante en el huésped en el entorno natural del organismo.

60 El sistema genético letal puede ser específico del sexo o no serlo, lo primero siendo generalmente preferible. En el caso de un sistema letal específico del sexo es posible llevar a cabo una selección de sexos genética antes de la liberación de los organismos para el control biológico.

65 Cuando se desea un agente de control biológico de un único sexo, la separación de las entidades sexuales se consigue normalmente en el método por el retiro de condiciones permisivas mientras una reserva del organismo es criado, resultando en la expresión del efecto letal específico del sexo del sistema genético. Entonces puede aislarse una población de un único sexo restante.

Preferimos que el efecto letal sea específico de las hembras. Sin embargo, en ciertas situaciones puede requerirse un efecto letal específico de los machos.

5 Con respeto a insectos y otros animales, la distribución del organismo se hace típicamente mediante la liberación del organismo en el entorno.

10 Se observa el efecto condicional del sistema genético letal dominante excepto bajo condiciones permisivas definidas. En la presente invención las condiciones restrictivas se producen en el entorno natural del organismo, y son aquellas condiciones que permiten la expresión del efecto letal del sistema letal. Las condiciones permisivas que permiten la supervivencia del organismo están sólo presentes cuando se adoptan las condiciones permisivas en el entorno regulado de crecimiento.

15 Preferiblemente la expresión del sistema genético letal está condicionada a la presencia de una sustancia o condición que no se encuentra en el entorno natural, tal como un compuesto sintético o artificial, convenientemente un antibiótico, un análogo a un antibiótico o un derivado. Dicha sustancia o estado artificial siempre está convenientemente ausente del entorno natural, esto es, nunca o raramente está presente en el entorno natural en suficiente abundancia o concentración como para inactivar o reprimir la funcionalidad del sistema genético letal. La ausencia preferida de la sustancia o condición resulta en la expresión del efecto letal del sistema letal.

20 El entorno natural del organismo es generalmente el entorno en que la población a controlar está localizada, o donde pueda sobrevivir. De forma adicional, el entorno natural es también un entorno que proporciona las condiciones restrictivas necesarias. La naturaleza universal de la invención permite la aplicación universal de los métodos usados en la invención, y el entorno natural puede pues ser cualquier entorno del mundo en que se requiera de un control biológico, sin restricción.

25 **Descripción detallada de la invención**

30 El sistema genético letal de la presente invención puede ser cualquier elemento genético o combinación de elementos que sea capaz de producir un efecto letal. Preferimos que el sistema genético letal consista de una secuencia de ADN codificando un gen producto potencialmente letal (un gen letal) y elementos de control tales como promotores, potenciadores o componentes transactivadores. Los elementos que regulan el gen pueden ser localizados en el mismo cromosoma que el gen letal, lo cual es preferible, o en un cromosoma diferente. Particularmente preferimos que el sistema letal sea un gen letal la expresión del cual está bajo el control de una proteína transactivadora reprimible. En una variante alternativa el sistema letal puede ser simplemente el gen letal por sí solo, o en combinación con su promotor nativo.

40 Preferiblemente el organismo de la presente invención tiene un solo sistema genético letal, siendo el sistema condicional bajo factores ambientales. Más preferiblemente el sistema tiene un solo gen letal condicional. El uso de un sistema genético simple minimiza la posibilidad de una complicación genética cuando se produce o se lleva a cabo la invención. Típicamente el organismo no contiene transgenes ni otros genes no naturales o distribuciones de ADN, diferentes de los del sistema genético letal de la invención.

45 El efecto letal del sistema letal puede afectar a todo el organismo, o puede ser dirigido a tejidos específicos dentro del organismo.

50 El efecto letal puede ser también dirigido a un estado específico del ciclo de vida del organismo. Cuando se busca una especificidad en el ciclo de vida, preferimos que la letalidad de la invención sea específica del embrión. La fase letal termina de forma adecuada antes de la fase de desarrollo en la que los organismos son liberados, o podrían perder idoneidad o morir después de la liberación. En el caso de insectos, la letalidad embrionaria asegura que ninguna larva surja y dañe a animales o cosechas. Mientras esto es menos importante en el caso de vectores de enfermedad como los mosquitos, donde solo los estados adultos transmiten la enfermedad, es importante en el caso de muchas plagas de cosecha donde son las larvas las que causan daño económico. La letalidad específica del embrión permite que la última y mayor generación criada en masa sea criada con comida a la que le falta el represor, reduciendo costes. La letalidad específica del embrión puede también combinarse después con letalidad específica del sexo, por ejemplo letalidad específica de las hembras. En esta caso demostraremos que esto permite la construcción de un variedad en la que la separación de sexos y la esterilización, ambas sean consecuencia automática de la retirada de condiciones permisivas en la última generación antes de su liberación.

60 También es preferible, en ciertas circunstancias, la letalidad de acción tardía, que toma ventaja de la característica de la selección negativa densidad-dependiente, en que las posibilidades de que un individuo sobreviva para reproducirse depende negativamente de la parte que supone del número total de individuos en la población. El mecanismo para esto es típicamente la competencia entre individuos para los recursos limitados, como la comida. A manera de ilustración, en el caso de los mosquitos, esta competencia puede actuar en larvas compitiendo por comida. Si la fase letal es posterior a esta fase de competencia de las larvas, entonces los individuos (por ej. larvas hembra) que serán matados por el sistema letal competirán no obstante por recursos durante su fase larval y así indirectamente reducirán el número de conoespecíficos, incluso aquellos que no llevan el sistema letal.

ES 2 298 167 T3

Por tanto, se prefiere un sistema letal que sea letal en una fase del ciclo de vida que permita que se produzca la competencia entre organismos de la invención y organismos de tipo salvaje.

Preferiblemente la expresión letal es tal que los individuos mueren antes de que causen el daño que se intenta prevenir. A manera de ilustración, en el caso de los mosquitos es deseable reducir la transmisión de enfermedades. Lo más temprano que un mosquito hembra puede transmitir enfermedades es en la segunda ingesta de sangre (habiendo cogido el parásito/virus en la primera ingesta de sangre y así pasando a ser infeccioso). Por tanto, el mosquito puede ser matado hasta como muy tarde poco después de la primera ingesta de sangre.

El gen letal del sistema genético letal puede ser cualquier elemento genético que sea capaz de causar o de llevar a la muerte al huésped. En particular, el término cubre fragmentos de gen capaces de ejercer un efecto letal, y no está limitado a genes de longitud completa. Cualquier elemento capaz de ejercer un efecto letal que pueda ser condicionalmente controlado es cubierto por este término.

La elección del gen letal dominante no es crítica para la invención. Hay una amplia gama de productos del gen adecuados, con toxicidades varias. Por ejemplo, formas mutantes dominantes de genes de comunicación celular o de ciclo celular son apropiados para su uso en la presente invención. Las construcciones que resulten en la sobre-expresión de tales genes pueden también ser letales. Las construcciones parecidas que resulten en la expresión inadecuada de cualquier gen esencial también serían letales. Esto se puede conseguir con la expresión de una secuencia inhibidora, por ejemplo el ARN antisentido, el ARN sentido (actuando por silenciamiento de gen), el ARN de doble cadena ("ARN interferente" o ARNI) o otras moléculas ARN inhibitorias. La sobre-expresión de inhibidores de funciones esenciales de proteínas podrían también llevar a cabo esta función letal. Otros objetivos adecuados para construcciones manipuladas incluyen genes que interrumpen el metabolismo o la regulación de la célula hasta un punto fatal, como el trastorno o la sobre-expresión de factores señaladores extracelulares tales como homólogos funcionales de la Wnt, Shh o TGF β . Los genes letales preferibles son aquellos descritos en los Ejemplos incluidos en la presente invención, el gen *hid* [ver Heinrich y Scout, P.N.A.S Julio 18 2000, volumen 97, 15, 8229-8232], y el gen *Nipp1Dm*, una *Drosophila* homóloga del NIP1 de mamífero (ver Ejemplo 7). Otras posibilidades para genes letales incluyen los genes determinantes del sexo que pueden actuar para cambiar el sexo del organismo. En este caso, la transformación de hembras en machos estériles también permitirían conseguir el control biológico, y el gen letal es letal a la población como tal y no específicamente al organismo. Cuando se utilicen productos de gen altamente tóxicos, como la toxina de la difteria y la ricina A, preferimos que los genes se manifiesten sólo a niveles suficientes para matar al organismo, pero con el mínimo impacto ambiental.

Un gen letal preferido para su uso en la invención tiene un umbral de toxicidad -por debajo de un cierto nivel es inofensivo mientras que por encima es letal. Adicionalmente, para reducir la posibilidad de resistencia, el gen letal tiene preferiblemente múltiples objetivos esenciales. *Nipp1Dm* generalmente satisface estos criterios. Codifica una proteína altamente conservada presente en toda célula en un nivel significativo. Una sobre-expresión modesta es por tanto poco probable que tenga alguna consecuencia adversa. Es un potente inhibidor de los tres genes esenciales en la *Drosophila*, cada uno de los cuales tiene efectos altamente pleiotrópicos. De acuerdo con lo dicho, debido al alto nivel de conservación de esta proteína entre *C. elegans*, *D. Melanogaster* y mamíferos, el *Nipp1Dm* es un gen letal preferido para su uso en esta invención.

La naturaleza condicional del sistema letal permite la cría de organismos recombinantes bajo condiciones permisivas para la supervivencia del organismo, por ejemplo en una fábrica o laboratorio, y entonces liberados en el entorno natural. El efecto letal del sistema letal es controlado para que los organismos liberados sean capaces de criar, y la reproducción sexual permite al sistema letal ser transmitido a la población de tipo salvaje, matando a todos o a un grupo definido de esta población. Preferimos que el efecto letal resulte en la muerte de más del 90% de la clase objetivo de la progenie de los apareamientos entre organismos liberados y la población salvaje. La clase objetivo puede ser, por ejemplo, hembras, esto es el 50% de la progenie. Preferiblemente aún el efecto letal resulta en la muerte de más del 95% de la clase objetivo, aún más preferible el 99% y lo más preferible el 100% de los organismos objetivo en el entorno.

La naturaleza condicional del sistema letal puede ser condicional a cualquier factor conveniente, como la temperatura, el ciclo diurno (siendo factores la duración de la luz y/o la intensidad) o feromonas, por ejemplo. En este caso, la reserva recombinante puede ser criada a la temperatura permisiva, y liberados en el entorno teniendo una temperatura restrictiva. Convenientemente el efecto letal ocurre a una temperatura al menos de 5°C, más preferible 10°C, aún más preferible 20°C, dentro de los extremos conocidos del rango de temperaturas que ocurren en el entorno del organismo alrededor del mundo, para que siempre haya expresión del efecto letal en el entorno.

Preferiblemente el efecto letal del sistema letal es inherentemente insensible a las variaciones o fluctuaciones de temperatura que ocurren en el entorno natural del organismo.

Donde la expresión del sistema letal no es condicional a la temperatura pero es sensible a la temperatura hasta cualquier punto significativo, preferimos que más de un 90% de los organismos sean eliminados en el entorno natural, más preferible al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% o más.

Los sistemas genéticos letales de la presente invención generalmente no son susceptibles a la temperatura hasta un punto significativo, así que por ejemplo, la diferencia en el efecto letal a 18°C y a 29°C es de menos del 5%, preferi-

ES 2 298 167 T3

blemente menos del 1%. Los sistemas genéticos letales preferibles de la invención son convenientemente funcionales en un amplio margen de temperaturas, tal como puede ocurrir naturalmente en el entorno donde se encuentra el organismo. Ejemplos de típicos rangos de temperatura son de 0°C a 50°C, más típico entre 10°C y 45°C, tal como de 15°C, 20°C o 25°C a 30°C, 35°C o 40°C. Preferiblemente el efecto letal es visto en al menos el 95% de los organismos dentro
5 de todo este rango de temperaturas, en que el 95% de los organismos son eliminados en cualquier temperatura del rango, más preferible el 98%, 99% o incluso más. En general, la tasa de supervivencia más alta a cualquier temperatura es preferiblemente menor del 10%, convenientemente 5%, 2%, 1% o menor.

El efecto letal del sistema letal se expresa preferiblemente en el entorno natural cuando el organismo es distribuido
10 dentro de su entorno natural o cualquier entorno natural, con independencia de las condiciones naturales que puedan ocurrir o predominar en ese entorno.

Preferimos que el efecto letal del sistema letal sea condicional a un aditivo alimenticio, tal como un aditivo de la comida o el agua, que no es un componente normal de la comida de la especie objetivo. Esto permite que la reserva recombinante sea criada con comida y agua conteniendo este aditivo, lo cual previene el efecto letal. Cuando son liberados en el exterior, el organismo ya no tiene ninguna exposición al aditivo, y el efecto letal del sistema letal se expresa en la progenie del apareamiento con un organismo recombinante de la invención. También se puede expresar en el organismo de los padres bajo ciertas circunstancias, aunque el organismo liberado debe sobrevivir lo suficiente como para aparearse.
20

Los factores preferibles sobre los cuales se puede condicionar la expresión del sistema letal incluye los antibióticos tales como el tetraciclina y análogos y derivados del tetraciclina no-antibiótico, que funcionan con el sistema reprimible del tetraciclina preferible en la presente invención. Los compuestos no-antibióticos son especialmente preferibles para evitar potenciales problemas con la acumulación de antibióticos en el entorno. Análogos convenientes incluyen la epioxitetraciclina y la anhidrotetraciclina, aunque pueden utilizarse otros análogos convenientes, como sea oportuno.
25

Donde el efecto letal sea condicional a un aditivo alimenticio, podría ser que la progenie sobreviviera sin que ellos ingieran o absorban el aditivo alimenticio. Por ejemplo, la progenie podría retener suficiente aditivo de sus padres o de una fase del ciclo de vida anterior sin alimentarse, o al menos el aditivo puede perderse poco a poco en la progenie.
30 Este efecto podría transmitirse a través de una o más generaciones antes que el efecto letal se manifieste totalmente bajo condiciones restrictivas.

Preferimos que el organismo multicelular recombinante de la presente invención contenga un sistema letal dominante el efecto letal del cual sea condicionalmente reprimible. De esta manera, el efecto letal es suprimido bajo condiciones controladas, pero no suprimido en el entorno natural del organismo. Sin embargo, puede haber otras maneras de conseguir la expresión condicional (por ejemplo, activación condicional), cualquiera de las cuales puede ser usada en la presente invención.
35

Particularmente preferimos que el sistema de expresión preferible sea un sistema reprimible por la tetraciclina en el que la tetraciclina, o un análogo o derivado de la misma, sea utilizada para inhibir la expresión del sistema letal. Un sistema adecuado se describe en detalle en los ejemplos de la presente invención, en insectos. Este sistema de tetraciclina también se ha visto que funciona con plantas (ver Zuo y Chua, 2000, Curr. Opin. Biotech. 11:146 y referencias en él).
40

Este sistema represor *lac* reprimible es menos preferible, ya que el inductor (IPTG) es menos difundible y más tóxico que la tetraciclina.
45

Por vía del contraste, un sistema inducible puede estar basado en la expresión constitutiva de una toxina y la expresión inducible de un represor de la toxina.
50

Convenientemente, puede utilizarse el promotor A9 específico de tapetum. El tapetum es un tejido necesario para la producción de polen funcional. El sistema está entonces "apagado" en todos los tejidos excepto en el tapetum. En el tapetum, se expresan la toxina y el factor de transcripción. En la presencia del inductor (aquí dexametasona), el antídoto también se expresa. Así que las plantas tratadas con dexametasona son normales, pero aquellas que no son tratadas con dexametasona no producen polen.
55

Convenientemente la barnasa y el barstar (Hartley, RW, 1988, J. Mol. Biol. 202:914, Hartley, RW, T.I.B.S. 14:450-454, 1989) pueden usarse como toxina y antídoto, respectivamente. Sin embargo, mientras que la barnasa y el barstar son ejemplos convenientes de un par toxina/represor, la invención no está tan limitada, y un represor conveniente podría actuar a un nivel transcripcional (u otro), y la toxina misma no tiene porqué ser una proteína.
60

Es el efecto letal del sistema letal lo que es condicional, y no solamente la expresión del gen letal. Por lo tanto, la invención incluye la posibilidad de un control condicional tanto a nivel de la expresión del gen letal, como el control de la actividad del producto del gen letal. De este modo, la invención incluye el caso en que el producto del gen letal está siendo producido pero el efecto del cuál está siendo enmascarado de alguna manera.
65

Preferimos que el método de la invención use sólo animales con un sistema genético letal uni-condicional dominante. Además, preferimos que el sistema sea el único elemento recombinante presente en el animal. Particularmente

preferimos que el animal contenga sólo un tipo de gen letal, pero es posible prever múltiples genes letales bajo el mismo control regulador, dando el concepto de construcción genética integrada pero también una mayor eficiencia letal del sistema. Este único gen letal puede estar bajo el control de sólo un promotor en el sistema genético, o más de un promotor.

5 El animal de la invención es preferiblemente recombinante, lo cual hace referencia generalmente a cualquier animal cuyo material genético haya sido alterado por manipulación genética. Preferimos que el animal sea modificado por la inserción de un gen, fragmento de gen o elemento genético (como un promotor o un potenciador) de otra especie, para producir un animal transgénico. El componente transgénico es generalmente el sistema letal que produce un efecto letal condicional. Sin embargo, un efecto letal condicional puede ser también generado usando componentes genéticos derivados de la misma especie (del huésped). Por ejemplo, un promotor derivado de un gen diferente de la misma especie, cuando se coloca delante de un gen que se expresa normalmente sólo a bajo nivel, puede resultar en un efecto letal. El animal recombinante es pues o bien un animal transgénico o uno en que el material genético del huésped ha sido modificado para producir un sistema letal.

15 El organismo multicelular es un animal. Efectivamente, la invención está generalmente sólo limitada a aquellos animales con una componente sexual en su ciclo de vida, lo que permite la transmisión del sistema letal de un organismo a otro. Por ejemplo, la invención es aplicable también a los peces, como la lamprea marina, contra la que técnicas de liberación de machos estériles han sido utilizadas. Particularmente preferimos que el animal de la invención sea un insecto, con plagas de insectos siendo particularmente preferibles. Una plaga de insectos puede ser bien una plaga directa o indirecta. Las plagas directas son aquellos insectos que causan daños en una o más fases de su ciclo de vida mediante, por ejemplo, comiendo las cosechas o dañando animales. La mosca gusanera *Cochliomyia hominivorax* del nuevo mundo, por ejemplo, es una plaga directa del ganado. Las plagas indirectas son aquellos insectos que son vectores de enfermedades humanas, como los mosquitos que transmiten la malaria. También se conocen plagas indirectas que afectan organismos diferentes de los humanos, como a las plantas o al ganado.

Los insectos objetivo preferibles para la presente invención incluyen las plagas de los cultivos (tanto cultivables como de silvicultura), las plagas de animales y vectores de enfermedad. Ejemplos de organismos específicos que pueden ser potencialmente usados en la presente invención incluyen, pero no está limitada a: la mosca de la oveja australiana (*Lucilia cuprina*), el mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*), el escarabajo japonés (*Popilla japonica*); los escarabajos de borde blanco (*Graphognathus spp.*), mosca prieta de los cítricos (*Aleurocanthus woglumi*), mosca de la fruta tropical (*Dacus cucurbitae*, *Dacus zonatus*), la mosca de la fruta mediterránea (*Ceratitis capitata*), mosca natal de la fruta (*Ceratitis rosa*), mosca de la cereza (*Rhagoletis cerasi*), mosca de la fruta de Queensland (*Bactrocera tryoni*), mosca de la fruta del Caribe (*Anastrepha suspensa*), hormigas de fuego importadas (*Solenopsis richteri*, *Solenopsis invicta*), polilla gitana (*Lymantria dispar*), palomilla de la manzana (*Cydia pomonella*), polilla de cola marrón (*Euproctis chrysorrhoea*), el mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*), mosquitos de la malaria (*Anopheles gambiae*, *Anopheles stephansi*), el gusano barrenador del nuevo mundo (*Cochliomyia hominivorax*), el gusano barrenador del viejo mundo (*Chrysomya bezziana*), la mosca Tsetse (*Glossina spp.*), el picudo del algodónero (*Anthonomus grandis*), cabalitos del diablo (*Énallagma hageni*), libélulas (*Libellula luctuosa*), y la plaga del arroz (*tryporyza incertulas*). Estudios que discuten la conveniencia de la mayoría de los mencionados aquí son: C. Boake y col., (1996) Annu. Rev. Entomol. 41:211-219, J. Meyers y col., (1998) Annu. Rev. Entomol. 43:471-491, C. Calkins y col., (1994) Fruit flies and the sterile insect technique. CRC Press. ISBN 0849348544, E. Krafur y col., (1997) Annu. Rev. Entomol. 42:503:523 y R. de Shazo y col., (1994) J. Allergy Clin. Immunol. 93(5):847-850. Se entenderá que la presente invención es en general aplicable a todos los animales multicelulares.

45 Los principios de la invención tal y como son expuestos en relación a una especie pueden ser aplicados a otra especie por una persona experta en la materia.

50 La invención es preferiblemente tal que la expresión del sistema genético letal siempre ocurrirá en el entorno en el que el organismo es liberado para el control biológico, y no está afectado por una variación natural en los factores del entorno. De esta manera, el control biológico siempre es alcanzable usando la presente invención, sin consideración al lugar específico de la liberación, tiempo de la liberación, o cualquier otra condición del entorno. Donde el factor que controla la expresión condicional es artificial, entonces es inmediatamente evidente que tal factor no puede, por definición, ocurrir en el entorno natural. La presente invención es esencialmente pandémica, en el sentido que puede ser universalmente aplicada sobre todo un país o el entorno mundial.

60 Esencialmente cualquier entorno natural proporciona por si mismo las condiciones restrictivas para el organismo, resultando en el control biológico. Como tales, está garantizado que ocurran las condiciones restrictivas al liberar el organismo, y no hay que preocuparse de que las condiciones del entorno local afecten a la acción del sistema letal. Preferiblemente el entorno natural del organismo proporciona la ausencia de un factor o condición de control, que luego resulta en la expresión del sistema genético letal en el entorno.

65 El animal de la presente invención preferiblemente tiene un sistema letal homocigoto en una o más localizaciones. En la situación en la que sólo hay una copia homocigoto del sistema letal, entonces al menos una copia del sistema se transmitirá a cualquier cría durante la reproducción sexual. Por lo tanto, el efecto letal dominante se ejercerá, excepto bajo condiciones permisivas. La presente invención puede llevarse a cabo usando un heterocigoto para el sistema letal dominante. Sin embargo, en este caso, no todas las crías tendrán una copia del sistema letal, y el efecto en la población se reduce.

Es preferible que todos los elementos del sistema genético estén presentes en el mismo cromosoma, a mucha proximidad. De esta manera, es probable que todos los elementos del sistema letal se transmitan a generaciones subsecuentes. Sin embargo, el sistema letal puede también funcionar cuando los elementos de control están presentes en localizaciones genéticas diferentes al gen letal, si los efectos de control de estos elementos son ejercidos en *trans*, por ejemplo. En ese caso, el sistema genético aún es efectivo si los elementos letales y de control son también homocigotos, y al menos una copia de cada es transmitida a la progenie.

En un aspecto la invención se refiere a un sistema no específico del sexo, en que tanto machos como hembras son eliminados por el sistema genético letal. Este enfoque es preferible en ciertos organismos. En tal caso, una ventaja de la invención recae en evitar la esterilización por irradiación. A manera de ilustración, liberaciones de sexo mixto son preferibles con el gusano rosado (una plaga lepidopterana del algodón), pero se ha estimado que las mariposas irradiadas sufren al menos una reducción en una décima parte de la efectividad como consecuencia de la irradiación debido a la pérdida de vigor y reducción de la vida útil. Ventajas similares se predicen en otros organismos. En la mosca de la fruta, los machos irradiados son aproximadamente un 50% menos efectivos que los equivalentes no irradiados en los ensayos de apareamiento competitivo y viven de 3 a 5 días en vez de los 10 a 15 de los no irradiados. Esto da un resultado de una mejora de entre 4 y 10 veces del potencial de actuación de los organismos al evitar la irradiación.

El método de la invención utiliza alternativamente un sistema letal específico del sexo para conseguir la separación de sexos antes o después de la liberación de los organismos en el entorno. En una realización preferible, el organismo multicelular es un insecto que contiene un sistema letal dominante homocigoto, el efecto letal del cual es letal sólo para hembras. En esta presentación los machos liberados en el entorno natural no serán eliminados. Después de aparearse con hembras, las crías hembra contendrán al menos una copia del sistema dominante y serán eliminadas. Sin embargo, las crías macho, el 50% de las cuales tendrán el sistema dominante, son viables y pueden aparearse con otras hembras. De esta manera, el sistema dominante puede transmitirse a generaciones subsecuentes, aunque sin posteriores introducciones artificiales el sistema eventualmente se perderá del acervo genético.

En el caso en que el macho tenga el sistema genético letal con un efecto letal hembra-específico, los machos liberados en el entorno no serán eliminados. Sin embargo, el efecto letal del sistema letal se expresa aún en el entorno natural -incluso si el efecto se limita a las hembras.

Puede conseguirse letalidad específica del sexo de diferentes maneras; por ejemplo es posible utilizar un gen letal específico del sexo como parte del sistema letal cuyo producto génico es tóxico sólo en un sexo. Esta aproximación permitiría la eliminación de un solo sexo incluso si la expresión del gen letal del producto génico no es específica del sexo. Los candidatos para genes letales específicos del sexo incluyen genes del esquema de determinación del sexo, por ejemplo normalmente sólo en machos y tóxicos en hembras, o genes derivados de sistemas de diferenciación sexual o gametogénesis.

De forma alternativa puede controlarse la expresión del gen letal o producto génico de modo que este se exprese o se produzca sólo en un sexo (o en sólo un gameto u órgano sexual de un hermafrodita). Por ejemplo, pueden utilizarse promotores o intensificadores específicos del sexo, tanto en combinación con genes letales específicos del sexo como con genes letales no-específicos. La escisión específica del sexo proporciona otro modo para la expresión de genes específicos del sexo. Todas las posibles combinaciones de genes letales no-específicos, genes letales específicos del sexo, promotores no-específicos y promotores específicos del sexo se encuentran incluidos en la presente invención. Además, se encuentran incluidos en la presente invención otros factores específicos del sexo que controlan el efecto letal del gen letal.

La presente invención también incluye un método de control biológico en el que el efecto letal puede ser específico del sexo en una etapa del ciclo de vida pero ser letal para ambos sexos en otra etapa. Por ejemplo, el sistema letal puede ser específico de hembra en un organismo adulto pero ser letal tanto para machos como para hembras en el estado de larva. En dicho caso, un sexo puede ser matado por la expresión del sistema letal en la forma adulta. Cuando el organismo se reproduce en la naturaleza transmitiendo la construcción genética, entonces tanto los machos como las hembras pueden ser eliminados. Dicho efecto puede conseguirse mediante un promotor que sea específico del sexo en una fase del ciclo de vida, pero no en otro, o por situación del gen letal bajo control, por ejemplo, de dos promotores diferentes. También puede utilizarse sistemas letales múltiples.

Por ejemplo, un efecto letal manifestado en un estado embrionario o de larva no afectará a los organismos adultos, si estos crecen bajo condiciones permisivas durante esta fase. Como tales, los organismos distribuidos en el entorno después de la fase del ciclo de vida letal, permitiendo que el sistema letal pase a la población de tipo salvaje por medio de la reproducción sexual. También puede constituir un objetivo otras fases del ciclo de vida, tales como el estado adulto, por selección de genes o promotores expresados en fases del ciclo de vida específicos, en el caso que sea apropiado.

Preferimos que el organismo multicelular de la presente invención tenga una copia del sistema genético en un más de una localización. Preferiblemente el sistema letal es homocigótico en más de una localización.

Las copias múltiples del sistema letal son útiles para intensificar el efecto de la invención. Por ejemplo, si el organismo es homocigótico en una localización para un sistema letal específico de la hembra, cualquier hembra que

resulte del apareamiento del organismo con las hembras de tipo salvaje será eliminada. La progenie macho sobrevivirá, y tendrá una copia del sistema. Sólo el 50% de la siguiente generación (segunda) de la progenie macho llevará el sistema letal.

5 La aproximación será claramente más efectiva si más del 50% de esta siguiente generación (segunda) de progenie macho heredan el sistema genético letal. Hay diferentes maneras de conseguir esto. Por ejemplo, si el sistema genético letal es homocigótico en más de una localización, no estrechamente unida, por ejemplo, en más de un cromosoma, entonces la proporción de estos machos que llevan el sistema genético letal se incrementará. De forma específica, con el sistema genético letal homocigótico en dos localizaciones no enlazadas, la primera generación de machos
10 será heterocigótica en ambas localizaciones. El 75% de la segunda generación de machos llevará al menos una copia del sistema genético letal. De forma correspondiente, bajo condiciones restrictivas, todas las hembras de la primera generación y el 75% de las hembras de la segunda generación morirán.

Otro modo de conseguir este efecto es utilizar un sistema de distorsión, conducción meiótica de segregación. En
15 el sistema de *Drosophila* SD el cromosoma SD es heredado de forma preferencial de los machos heterocigóticos para el SD y un cromosoma sensible de (+)SD normal. Los machos SD/+ transmiten el soporte SD, hasta la exclusión virtual de los homólogos de soporte +-; Tanto como el 99% del esperma funcional puede llevar SD. Los sistemas de distorsión/conducción meiótica de segregación son conocidos en un amplio grupo de insectos y de especies de no-insectos.

20 Un tercer modo de asegurar >50% de herencia del sistema genético letal en la segunda generación es unir el sistema genético letal a la resistencia insecticida y utilizar el insecticida para eliminar parte o toda de la segunda (y subsiguiente) progenie de generación que no lleva el sistema genético letal y por tanto, que no lleva el gen de resistencia unido.

25 El sistema letal puede estar localizado en cualquier cromosoma, tanto un autosoma o un cromosoma sexual. En especies en las que el sexo se determine por el contenido de cromosoma X o Y y cuando se desee la eliminación del transgen a partir del grupo de genes, entonces preferimos que el sistema letal está localizado en el cromosoma X. Considerar el caso en el que el sistema letal sea específico para hembras. Un organismo macho (XY) que tenga
30 el sistema letal en el cromosoma X se aparee en la naturaleza con un organismo hembra de tipo salvaje (XX). La progenie macho debe derivar su cromosoma Y del macho recombinante y su cromosoma X de su madre. Estos machos son viables y no tienen gen letal. La progenie hembra debe derivar un cromosoma X del macho recombinante y, de este modo, contiene el sistema genético letal -que es eliminado. De este modo, el sistema letal es eliminado del grupo de genes, lo cual puede ser preferible si este elemento es un transgen.

35 La presente tecnología también proporciona para la selección de machos o hembras *per se*, que comprende la producción de un organismo tal como se ha descrito en la presente invención que contiene un sistema letal dominante condicional, en donde el efecto letal del sistema letal es específico del sexo. La selección del sexo se consigue permitiendo la expresión del efecto letal del sistema letal, para eliminar un sexo. Entonces la población macho o hembra
40 individual puede ser utilizada para cualquier objetivo deseado no estando limitado al control biológico. La presente invención también se refiere a un método para producir un organismo unicelular recombinante para uso en la presente invención, en donde el organismo sea transformado con un vector o vectores que contengan un sistema letal dominante, o una secuencia adecuada para la mutación específica de la localización.

45 La presente invención se refiere además a un vector o vectores que comprenden un sistema letal dominante tal como se ha descrito en la presente memoria.

50 Preferimos que todos los elementos requeridos para controlar la expresión del gen letal dominante estén presentes en una construcción de transformación única (vector). De este modo, se requiere sólo una etapa de transformación única, y un marcador de transformación único. Además, el uso de una construcción de transformación única ayuda a prevenir la recombinación de elementos separados del sistema genético letal. Por consiguiente, se prefiere un vector único que comprenda cualquier sistema genético letal dominante condicional de la invención.

55 Además se prefieren los vectores que comprenden el sistema genético letal dominante condicional de la invención, en donde los componentes del vector (tal como los genes o elementos reguladores, en particular el gen letal) son aislados de forma genética a partir de otro vector. Preferiblemente no hay interferencia cis entre los diferentes elementos del sistema genético letal del vector. Se prefieren los vectores en los que los componentes del sistema genético letal están separados entre sí por secuencias aislantes derivadas del ADN vertebrado que previene dicha interferencia. Se ha descrito que dichos aislantes funcionan en la *Drosophila*, por ejemplo [Namciu, S. J., y col., (1998) Mol. Cell. Biol.
60 18:2383-92 y Cheng, HH, y col., (1993) Cell 74:505-514], y por extensión es probable que sean efectivos al menos en otras especies de insectos.

65 En una realización preferida el vector de la invención comprende un sistema reprimible de tetraciclina. Preferiblemente se localiza un gen letal en la misma secuencia de ADN o vector que en este sistema, opcionalmente con un gen reportero. Un adecuado sistema letal basado en tetraciclina comprende dos componentes clave, un gen letal y un gen tTA que activa la expresión del gen letal. La tetraciclina, o un análogo de la misma, bloquea entonces la activación del gen letal por el tTA. En este caso, preferimos que los aislantes que bloquean el intensificador sean utilizados para aislar un componente del siguiente, principalmente el gen letal del tTA, el gen letal del reportero y el tTA del gen reportero.

ES 2 298 167 T3

Un vector particularmente preferido, en el que los elementos genéticos están separados y son modulares, es presentado en el ejemplo 7 de la presente invención. Este vector comprende un sistema genético reprimido de la tetraciclina, en donde al menos algunos de los componentes genéticos del sistema están separados por secuencias del aislante genético. El gen letal es el gen Nipp de la *Drosophila*.

Este vector modular puede ser adaptado por sustitución del promotor BmA³ con cualquier promotor adecuado para permitir que la construcción sea utilizada en cualquier organismo de interés. De este modo la invención proporciona un vector patrón modular tal como se ha descrito en la presente invención, en donde el módulo del promotor BmA³ puede estar sustituido por cualquier promotor, para uso en cualquier organismo adecuado.

La invención también se extiende a variantes de este vector modular específico, en los que los elementos funcionales han sido sustituidos con otros elementos que realizan funciones equivalentes, al igual que otros aislantes o genes letales, y para que el ADN codifique dichas variantes.

La invención también se refiere a un método de construcción de un vector apropiado para proporcionar un sistema genético letal dominante a un organismo, que comprende las etapas de:

- i proporcionar al menos un sistema genético letal condicional;
- ii seleccionar un promotor apropiado para la expresión del sistema en el organismo; y
- iii ligar el promotor y el sistema genético letal condicional, opcionalmente con otros componentes, para producir un vector funcional adecuado para la transformación;

en donde la transformación del vector en el organismo produzca un organismo para el control biológico de acuerdo con la invención.

Preferiblemente el sistema genético letal del vector es modular de modo que hay componentes que pueden ser sustituidos de forma individual por componentes genéticos funcionalmente equivalentes, apropiado para que el sistema letal funcione en un organismo de interés. Por ejemplo, dicho vector modular permite que las secuencias del gen letal o del promotor puedan ser sustituidas, por ejemplo, sin la necesidad de generar un vector enteramente nuevo. Los componentes genéticos individuales pueden ser separados de forma adecuada por las secuencias del aislante y todavía funcionar juntos para causar un efecto letal. Preferiblemente el vector comprende al menos una secuencia de aislante, preferiblemente dos de dichas secuencias.

La invención también se refiere a vectores obtenidos y obtenibles por el método anterior.

La presente invención también se extiende a las secuencias de polinucleótidos que codifican un sistema genético letal dominante condicional de acuerdo con la presente invención, siendo preferiblemente una secuencia de ADN. En particular, la invención se refiere al ADN que codifica el sistema genético letal de los Ejemplos, en particular el vector de transformación modular del ejemplo 7 de la presente invención, y a mutantes y a variantes de dicho ADN que tienen mínimos cambios tales como sustituciones, eliminaciones o adiciones, pero en los que la función del vector o del sistema genético letal no están afectados de forma sustancial, y el vector es capaz de causar el efecto letal de la invención tal como este es requerido.

De forma alternativa, pueden utilizarse múltiples vectores para transformar el organismo con los elementos necesarios del sistema letal, en el caso en que sea necesario. También es posible que los elementos de control y los intensificadores utilizados para controlar, por ejemplo, un factor de transcripción que actúa en el gen letal, también puedan interferir con la propia expresión del gen letal. Por consiguiente, puede ser necesario separar los componentes utilizando elementos silenciadores, u otros elementos aislantes genéticos para evitar los problemas de expresión del gen indeseados.

El efecto de un promotor o intensificador en un gen requiere normalmente que los elementos estén presentes en la misma fracción de ADN. Sin embargo, el efecto de un factor de transcripción puede ser ejercido en *trans*, y puede estar localizado en, por ejemplo, un cromosoma diferente. La invención no está limitada a la integración de los elementos de control en el mismo cromosoma.

La construcción de un organismo multicelular recombinante puede requerir el uso de un sistema de transformación para las especies objetivo (las especies que van a ser controladas). La naturaleza específica del sistema de transformación no es una característica crítica de la invención, y ya son conocidos protocolos de transformación para un número de, por ejemplo, insectos.

Los vectores pueden ser construidos utilizando técnicas de biología molecular estándar en bacterias tales como la *E. Coli*. Preferimos que el vector utilizado para la transformación contenga un marcador seleccionable tal como los genes que producen resistencia al G418 o resistencia a la higromicina. También pueden utilizarse genes alternativos distintos de aquellos relacionados con las características de resistencia a los antibióticos, tales como la proteína fluorescente verde (GFP). Expresada bajo el control de un promotor adecuada, esta proteína puede ser visualizada simplemente por iluminación con un longitud de onda excitadora adecuada (por ejemplo azul) y observando la fluorescencia. Dicho

ES 2 298 167 T3

marcador también permitiría la fácil identificación de los insectos atrapados en los experimentos de liberación y recaptación.

Otros marcadores adecuados para la transformación son bien conocidos por el experto en la materia.

La invención también se extiende a células tales como células bacterianas, transformadas con un vector de la invención. Las líneas celulares adecuadas para el mantenimiento y/o la propagación de dichos vectores, por ejemplo, son bien conocidas por el experto en la materia.

Preferimos que la eliminación de todo o parte del sistema genético letal de la presente invención dé un organismo no de una ventaja selectiva respecto un organismo que contenga el sistema en condiciones permisivas. El uso de un sistema genético letal tal como se ha descrito en la presente invención tiene ventajas significativas con respecto a la estabilidad de la variedad. En general, la movilización cruzada entre transposones relacionados y/o otros mecanismos desconocidos puede significar que las inserciones del transposón pueden no ser tan estables como los genes "reales". Cuando se hace una cría a un nivel de billones/semana, tal como se requiere para el control biológico, incluso sucesos extremadamente raros sucederán de forma repetida. Esto es un factor principal con las variedades actuales de sexo de la mosca de la fruta, en donde las ubicaciones trans del cromosoma de las que dependen se rompen (a una frecuencia baja). Desafortunadamente, las moscas resulten tienen una idoneidad significativamente que el resto de la reserva y de este modo sus números tienden a incrementar de forma rápida. Sin embargo, en el sistema presente el producto de rotura (eliminación de todo o parte del transposón) no tiene una mayor ventaja respecto la reserva pretendida, cuando son criados en un medio conteniendo Tc. Además, cuando hay múltiples inserciones, puede necesitar varios sucesos independientes (es decir, pérdida de cada inserto), para hacer que la reserva sea completamente inefectiva.

En el caso en que sea necesario, el complejo genético letal puede ser estabilizado de forma adicional. Métodos adecuados incluyen la eliminación de una terminación del transposón después de la integración o movilización secundaria del sistema fuera del transposón en otro sitio, utilizando un sistema de recombinación específica dla SITio tal como FRT/Flp o cre/lox. Ambos sistema son conocidos por funcionar en la *Drosophila*.

La presente invención se ilustrará ahora respecto a los siguientes Ejemplos, que son sólo para objetivos ilustrativos y que no son limitativos de la presente invención, en donde:

La Figura 1 ilustra un vector modular para la transformación del organismo;

La Figura 2 ilustra un modelo de un sistema de conducción meiótico de la presente invención;

La Figura 3 ilustra un modelo de control de población utilizando localizaciones no unidas múltiples;

La Figura 4 ilustra un modelo de un sistema de conducción meiótico de acuerdo con la presente invención;

La Figura 5 ilustra un modelo de control de población utilizando localizaciones no unidas múltiples;

La Figura 6 ilustra un modelo adicional de un sistema de conducción meiótico de la presente invención;

La Figura 7 ilustra un modelo de control de la población utilizando localizaciones no unidas múltiples; y

La Figura 8 ilustra modelos de control de población utilizando los parámetros de las Figuras 2, 6 y 7, pero en donde las primeras dos liberaciones son dobles en tamaño.

Ejemplos

Control biológico en un modelo de Drosophila

Introducción

En una realización preferida, puede utilizarse un sistema de dos partes para producir un efecto letal condicional. Este sistema está basado en el represor (tetR) del operon de resistencia a la tetraciclina (Tc) derivado del transposón-1 de la *E. coli*. El uso de este represor para la expresión del gen reprimible en eucarióticas ha sido desarrollado por Manfred Gossen y Hermann Bujard (revisado en Gossen, y *col.*, TIBS 18 471-475 1993). En este sistema, el producto del gen tetR fusionado al dominio ácido del VP16, para crear un transactivador reprimible del Tc altamente eficiente (tTA).

La primera parte del sistema es el tTA expresado bajo el control de un promotor adecuado, y la segunda parte es un gen letal dominante expresado bajo el control del tTA. De forma global esto da la expresión del letal dominante de un modo reprimible por la Tc. Cuando la tetraciclina no está disponible, el tTA activa el gen letal. Cuando la tetraciclina está presente, se une al tTA y previene la activación del gen letal por el tTA. Este sistema letal está bajo control de un promotor de selección. Puede ejercerse un nivel de control adicional mediante la selección de dicho análogo de Tc para utilizar para la represión: diferentes análogos tendrán diferentes vidas medias en el insecto conduciendo a la inducción del gen exterminador de modo más o menos presto después de que sea eliminado el represor de la dieta.

Preferimos que se utilice un análogo no bactericida, de modo que no se promueva la resistencia a la tetraciclina en micro-organismos del ambiente. El uso de un análogo no bactericida es en cualquier caso esencial para especies tales como la mosca tse-tse, que tiene bacterias simbióticas esenciales para la reproducción de la mosca que es eliminada por los antibióticos.

Incluso este sistema puede variarse para proporcionar una herramienta flexible para el control de la población. Puede conseguirse una mayor flexibilidad por combinación de dos o más promotores o intensificadores. Por ejemplo, el control de la mosca de la fruta mediterránea puede utilizar la expresión en el hembra adulto (para prevenir la liberación de hembras de huevos), y en el desarrollo embrionario temprano (para prevenir el crecimiento de larvas en el fruto). Debido a que esto significa la expresión antes de que empiece el embrión a alimentarse por sí mismo, sería importante para el crecimiento de la reserva que se utilizara un análogo de Tc relativamente estable, de modo que el embrión sobreviviera debido a la contribución maternal del Tc. También puede utilizarse la expresión de las larvas como una alternativa, pero con un mayor daño para la fruta.

El uso del anterior sistema para controlar el efecto letal del gen letal es sólo un ejemplo de cómo puede conseguirse un efecto, y hay numerosos promotores, transactivadores y genes letales, por ejemplo, que pueden ser utilizados para conseguir el efecto deseado.

En el anterior escenario puede requerirse la expresión a más de una etapa. Esto puede conseguirse mediante la utilización de dos construcciones de tTA separadas, o por combinación de los intensificadores específicos de la etapa en una construcción única. Los promotores apropiados para la expresión específica de la etapa pueden ser identificados por la hibridación substractiva o por otros métodos conocidos.

La inserción del gen letal o sistema en el cromosoma del organismo transgénico puede ser en cualquier punto adecuado. No es necesario determinar la situación del gen letal en el cromosoma. Aunque los elementos insertados puedan responder a los elementos control en la cromatina adyacente, esto no es una cuestión para las líneas eliminadoras de tRE, en donde las líneas que proporcionen la expresión inapropiada probablemente no sobrevivirán.

La presente invención ha sido ejemplificada en las especies de insecto del modelo *Drosophila melanogaster*. Aunque el *D. melanogaster* no es una peste económicamente importante, es experimentalmente tratable. El sistema de tTA en general ha sido demostrado en *Drosophila* (B. Bello, y col., 1998, Development 125: 2193-2202). El Hsp26-tTA y el tRE-lacZ utilizados a continuación, y algunos vectores [que se describen a continuación], proceden de dicha publicación.

Componentes

Componente del transactivador (promotor - tTA)

Hsp26-tTA: Proteína de reserva de calor 26-tTA. Nivel basal bajo, reserva de calor inducible al nivel superior, no específica del sexo.

Obtenido de Bruno Bello (NIMR; Londres). Tal como se ha detallado en Bello y col., (1998) Development 125, 2193-2202. La región del promotor Hsp26 con una parte de la región traducida (secuencias de entre -1917 a +490) se fusionó a una región de codificación tTA aislada como un fragmento EcoRI/BamHI a partir de pUHD 15-1.neo seguido por la secuencia de terminación de transcripción del gen Hsp 70.

Act5C-tTA: Actina 5C-tTA. Promotor fuerte, constitutivo, ubicuo, no específico del sexo.

Se escindió la región de codificación del tTA como un fragmento EcoRI/PvuII y se rellenó utilizando polimerasa de ADN de T4. El p CaSpeR {Actina 5C GFP} (Reichhart y Ferrandon, (1998), D. I. S. 81: 210-202) se digirió con XbaI/BamHI para separar el fragmento de GFP entonces terminación rellena utilizando la polimerasa T4. Entonces estos dos fragmentos fueron ligados. Se seleccionaron los clones resultantes utilizando una ingesta de SmaI/EcoRV para seleccionar un clon de la orientación correcta, situando la región de codificación del tTa bajo el control del promotor de Actina 5C.

Stwl-tTA: Stonewall-tTa. Específico de hembra en embriones, pero expresado después en ambos sexos.

Se escindió la región de codificación del tTA a partir del plásmido pUHD 15-1.neo por digestión con EcoRI y PvuII. A continuación este fragmento fue ligado en el vector pstw1^{tmCa} (K. A. Clark y D. M. McKearin (1996), Development 122 (3): 937-950) digerido con EcoRI/PvuII de modo que el tTA se situó bajo el control transcripcional de 1,7 kb de ADN genómico del promotor stwl.

Sx1^{pe}-tTA: tTA-letal de sexo. Promotor inicial (PE) a partir de Sx1. Pensado para ser expresado solo en embriones de hembra iniciales.

Se escindió la región de codificación a partir del plásmido pUHD 15-1.neo (M. Gossen y H. Bujard (1992); PNAS, 89, 5547-51) por digestión con EcoRI/PvuII. A continuación se ligó este fragmento en el 5-1 sx1^{pe}: bluescript (conteniendo secuencias Sx1^{pe} (L. N. Keyes, y col. (1992) Cell. 6; 68(5): 933-43) digerido con EcoRI y EcoRV para crear

ES 2 298 167 T3

bluescript de *sxl*pe tTa. Se subclonó un fragmento CPU/NotI conteniendo la región de codificación del tTa y el promotor *sxl*pe en el vector pP de transformación del elemento P {W8} (Klemenz y col., (1987) Nucleic Acids Res. 15: 3947-3959) digerido con CPU/NotI para crear p(*sxl*^{pe} tTa).

- 5 Yp3-tTA: Proteína de yema 3-tTA. Intensificador del cuerpo graso femenino (FBE) de la proteína de yema 3, con promotor mínimo de hsp 70. Expresado en el cuerpo graso de hembras en larvas y adultos.

Se escindió la región de codificación del tTa a partir del plásmido pUHD 15-1.neo por digestión con EcoRI y PvuII. A continuación se clonó este fragmento entre los sitios EcoRI/PvuII de la construcción pFBE de expresión del yp 3 (M. Bornes, comunicación personal) de modo que estuvo bajo el control transcripcional del Intensificador del Cuerpo Graso de la Hembra (FBE) (E. Ronaldson, y col. Genet Res. 1995, Agosto; 66(1): 9-17) y un promotor viral mínimo.

Gen sensible al tRE

15 tRe-lacZ: gen de *E. coli lacZ*, que codifica la β -galactosidasa. Utilizado como reportero. Obtenido de Bruno Bello (NIMR, Londres). Tal como se ha detallado en Bello y col. (1998) Development 125, 2193-2202. Se aisló la repetición heptamérica del operador tet como un fragmento de EcoRI/CPU a partir de pUHC 13-3 (M. Gossen y H. Bujard (1992); PNAS, 89, 5547-51) y clonado "corriente arriba" de la fusión P-lacZ del vector del ensayo del intensificador CPLZ (KA Wharton y ST. Crews (1994) Development, 120 (12): 3563-9). El CPLZ contiene el promotor de transposasa (de hasta -42 a partir de la localización de cabeza) y la secuencia de transposasa N-terminal fusionada en estructura con lacZ y la señal de poliadenilación de SV40.

WTP-2 (promotor de blanco-tetO-P-vector conteniendo las secuencias de tRe)

25 Obtenido de Bruno Bello (NIMR, Londres). Tal como se ha detallado en Bello y col. (1998) Development 125, 2193-2202. Este vector del elemento P se construyó para expresar cualquier gen bajo el control del promotor responsable de tetraciclina. Contiene el esqueleto del vector de CPLZ, la repetición heptamérica del operador tet, el promotor del elemento P y las secuencias líder a partir de Carnegie 4 (GM Rubin y AC Spradling (1983) Nucleic Acids Res Sep 24; 11 (18): 6341-51) y la señal de poliadenilación de SV40.

30

WTP-3 (modificado de WTP-2)

Se modificó el vector WTP-2 por la adición de dos oligos cortos complementarios 5' UAS ATG + (AATTGCCAC-CATGGCTCATATGGAATTCAGATCTG) y 3' UAS ATG- (GGCCGCAGATCTGAATTCCATATGAGCCATGGTG GGC) EN EL wtp-2 mcs. Se dejó que los oligos se templaran y ligaran al WTP-2 digerido con EcoRI/NotI. Estos oligos introdujeron un inicio de traducción de consenso y varios sitios de clonación adicionales en la SITio de clonación múltiple de WTP-2 (MCS).

40 tRe-EGFP. Codifica una versión mutante de la Proteína Fluorescente Verde (GFP), un gen de la medusa (*Aequoria*) que codifica una proteína fluorescente. El mutante de EGFP tiene dos cambios de amino ácidos, que dan una proteína más brillante, más soluble. Se utiliza como un reportero. Se aisló la región de codificación de la *proteína fluorescente verde intensificada* (EGFP, un F64L, derivado mutante de S65T de GFP) (Craven y col. (1998) Gene 9; 221 (1): 59-68) como un fragmento de NcoI/EcoRI a partir del vector pP{UAS-EGFP}, a continuación se llenó la terminación con la polimerasa T4. Se construyó el pP{UAS-EGFP} del modo siguiente.

45

Se eliminó la localización *NdeI* único de pP{UAST} por digestión, llenado de la terminación y nuevo ligado, con el fin de poder utilizar el *NdeI* en los sitios de clonación múltiples. A continuación utilizamos dos oligonucleótidos (UAS-ATG+ = 5' AATTGCCACCATGGCTCATAGGAATTCAGATCTGC y UAS-ATG- = 5' GGCCGCAGATCT-GAATTCCATATGAGCCATGGTGGC) permitiéndoles que se templaran y ligaran al *EcoRI-NotI* digerido pP{UAST} (a partir del que se separó la localización *NdeI*) para hacer pP{UAS-LP}. Se amplificaron los insertos a partir de pGEM-T-EGFP [Craven, 1998, *supra*] utilizando la polimerasa *Pfu* y los oligonucleótidos 5' TAGGAGTAAAGGA-GAAGAAC y 5' TAGGAGTAAAGGAGAAGAAC y 5' AATTCCATATGTTTGTATAGTTCA. A continuación se incubó cada producto de la PCR purificado sobre gel con polimerasa de ADN T4 en la presencia de dGTP y dCTP pero no dATP o dTTP. Esto creó una terminación cohesiva compatible con *NdeI* en una terminación del fragmento y una terminación cohesiva compatible con *EcoRI* en el otro extremo. A continuación estos fragmentos fueron subclonados en pP{UAS-LP} púas-EGFP} digerido de *NdeI-EcoRI*.

55

A continuación se digirió el vector WTP-3 con EcoRI y la terminación se llenó con polimerasa T4 y los fragmentos se ligaron juntos. A continuación se utilizó una digestión de diagnóstico utilizando PvuII/BamHI, para seleccionar un clon de la orientación correcta.

60

tRe-Ras64B^{V12}. Versión mutante de la *Drosophila melanogaster* Ras64B, implicada en la señalización de la célula. El mutante es constitutivamente activo, haciéndolo tóxico a la célula si se expresa a un nivel suficientemente alto. La toxicidad no es específica del sexo. Se clonó el cADN Ras64B^{V12} con un fragmento de EcoRI/NotI a partir del p {sevRas64B^{V12}} (Matsuo y col., (1997), Development 124(14): 2671-2680), en el WTP-2 digerido con EcoRI/NotI.

65

tRe-Ms1-1^{Mpu}. Versión mutante de *Drosophila melanogaster* Ms1-1. El Ms1-1 es un componente del proceso de determinación del sexo que normalmente se expresa sólo en machos, siendo expresado en hembras por un producto

ES 2 298 167 T3

del gen *letal del Sexo*. La actividad del mutante es independiente del letal del Sexo, haciéndolo tóxico a las hembras si se expresa a un nivel suficientemente alto. Por consiguiente la toxicidad es específica del sexo. Se clonó el cADN de *msl-1^{M^{PU}}* como un fragmento EcoRI a partir de M1-ECTOPIC (Chang y Kuroda, (1998) Genetics 150 (2): 699-709) en el vector WTP-2 digerido con EcoRI. A continuación se utilizó un digesto de diagnóstico utilizando Hindi/NotI, para seleccionar un clon de la orientación correcta, situando el cADN del *msl-1^{M^{PU}}* bajo el control de las secuencias del tRe.

tRe-Msl-2^{N^{OPU}}. Versión mutante de la *Drosophila melanogaster* Msl-2. El Msl-2 es otro componente del proceso de determinación del sexo que normalmente es expresado sólo en machos, siendo reprimido en hembras por un producto del gen *letal del Sexo*. La actividad del mutante es independiente del letal del Sexo, haciéndolo tóxico para las hembras si se expresa a un nivel suficientemente alto. Por consiguiente la toxicidad es específica del sexo. Se clonó el cADN *msl-2* como un fragmento NotI/XbaI a partir de pM2 NOPU (Kelly y col., (1995), Cell 81; 867-877) y se clonó en WTP-2 digerido con NotI/XbaI.

Ejemplo 1

Cruces de cromosomas únicos

En los “cruces de cromosomas únicos” a 25°C, se situaron sobre alimento de diez a quince homocigotos de hembras vírgenes para la construcción del tTA y de cinco a diez homocigotos machos jóvenes para la construcción de tRe contenido o careciendo de un suplemento de tetraciclina. Se dejó que su progenie se desarrollara en este alimento.

Sx1^{PC}

Tetraciclina conc. µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0 ^A ,0 ^B ,0 ^C ,0 ^F ,0,0,0,0	0	58,47,60,51,46,60,52,54	428
0.1	46,49,50,51,52,50,41,40	379	56,42,72,41,56,72,61,34	434
1	52,40,60,0,60,72,50,52	386	50,51,55,3,63,54,57,56	389
5	41,55,49,52,48,47,40,51	383	36,47,42,55,36,55,52,52	375

Sx1^{PC} tTa^(A,B,C,F) x tRe Ras64B^{V12(B,C)}

Formato para los datos: los 8 números son los resultados de los cruces con inserciones independientes de cada elemento (para controlar el efecto de la posición). Aquí, se utilizaron 4 inserciones de Sx1^{PC}-tTA (A, B, C, y F) y dos de tRe-Ras64B^{V12} (B y C). El orden de los datos fue: hembras de Sx1^{PC}-tTA^(A) con machos de tRe-Ras64B^{V12(B)}, a continuación Sx1B x rasB, Sx1C x rasB, Sx1F x Rasb, Sx1A x RasC, Sx1B x RasC, Sx1C x RasC y finalmente Sx1F x RasC. Los datos se presentaron de un modo similar en las otras tablas.

Tetraciclina conc. µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0,0,0	0	59,57,62,51,73,69,57, 55	483
0.1	61,52,47,46,22,31,36,15	296	60,62,56,71,69,75,55, 72	520
1	59,57,63,59,31,21,15,21	326	47,56,49,62,63,67,71, 58	473
5	61,47,52,56,38,22,16,12	304	68,72,67,92,58,54,61, 63	535

Sx1^{PC} tTa^(A,B,C,F) x tRe Msl-1^{M^{PU}(A,B)}

ES 2 298 167 T3

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0,0,0,0,0	0	56,72,81,69,62,63,56, 47,82,57,55,61	761
0.1	79,56,47,42,51,61,52,52, 49,51,53,54	647	58,41,40,35,50,67,71, 39,52,62,40,70	562
1	42,45,56,48,52,61,57,54, 55,56,57,61	644	60,39,61,60,69,49,59, 38,64,69,71,35	674
5	58,61,52,53,54,61,29,31, 55,50,49,62	615	61,59,57,56,55,48,91, 63,54,50,81,67	742

Sxlpe tTa^(A,B,C,F) x tRe Msl-2^{Nopu(B,C,D)}

Stwl

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0	0	0,0,0,0,0,0	0
0.1	36,62,71,41,49,58	317	43,44,2,63,35,68	315
1	58,37,58,41,55,58	307	47,70,51,51,39,70	328
5	36,38,56,43,34,64	271	57,71,68,53,44,42	335

Stwl tTa^(A,B,C) x tRe Ras64B^{V12(B,C)}

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0	0	50,44,45,56,40,67	302
0.1	67,56,37,23,16,12	211	56,53,50,61,42,74	336
1	69,64,41,13,31,18	236	33,70,39,45,40,70	257
5	52,42,49,19,20,41	223	37,80,41,48,80	291

Stwl tTa^(A,B,C) x tRe Msl-1^{Mpu(A,B)}

ES 2 298 167 T3

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0,0,0	0	38,53,47,68,38,70,52,60, 55	481
0.1	54,57,41,64,40,63,39, 42,36	436	59,58,49,73,48,69,45,47, 43	491
1	46,34,35,63,47,70,64, 39,41	439	55,40,40,71,50,72,74,46, 42	490
5	52,70,37,34,35,57,49, 50,50	434	54,71,41,42,41,66,56,55, 55	481

Stwl tTa^(A,B,C) x tRe Msl-2^{Nopu(B,C,D)}

Actina5C

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0	0	0,0,0,0,0,0	377
0.1	77,57,69,50,45,63	361	50,70,71,67,53,61	372
1	86,59,60,80,70,72	427	46,89,72,45,76,55	383
5	46,49,87,63,59,71	375	75,83,58,83,72,82	400

Actin5C tTa^(B,C,E) x tRe Ras64B^{V12(B,C)}

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0	0	83,73,65,69,53,80	423
0.1	72,74,80,68,72,46	412	82,52,57,66,86,59	402
1	61,83,48,66,65,57	321	74,69,85,58,48,61	351
5	70,57,50,62,61,86	386	48,68,52,62,84,87	401

Actin5C tTa^(B,C,E) x tRe Msl-1^{Mpu(A,B)}

ES 2 298 167 T3

Tetraciclina conc. µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0,0,0	0	63,52,67,71,88,55,46,86, 75	603
0.1	84,85,83,73,48,48,46,71, 58	548	62,54,48,81,85,74,78,77, 78	637
1	70,70,66,81,50,52,69,81, 51	590	69,87,47,64,66,59,58,47, 52	549
5	67,70,87,61,54,54,67,74, 81	615	71,61,57,53,51,65,45,68, 51	522

Actin5C tTa^(B, C, E) x tRe Msl-2^{Nopu (B, C, D)}

Hsp26

Tetraciclina conc. µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0	0	0,0,0,0	0
0.1	47,56,71,61	235	46,52,53,59	210
1	60,46,52,41	199	79,71,68,56	274
5	2,51,71,32	156	0,49,62,43	154

Hsp26 tTa^(A) x tRe Ras64B^{V12(B,C)}

Tetraciclina conc. µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0	0	64,58,33,66,55,42	318
0.1	45,44,72,56,62,49	328	53,54,80,57,66,58	368
1	70,35,61,50,57,37	310	78,36,70,56,61,42	343
5	44,58,58,59,42,52	313	46,68,66,64,48,55	347

Hsp26 tTa^(A) x tRe Msl-1^{Mpu(A,B)}

ES 2 298 167 T3

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0	0	56,47,56	159
0.1	48,49,62	159	56,68,49	159
1	43,45,51	135	36,39,47	122
5	55,3,66	124	61,5,54	120

Hsp26 tTa^(A) x tRe Msl-2^{Nopu(A,B)}

Yp3

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0	0	65,70,61,65,47,42	350
0.1	33,54,50,72,63,50	322	42,64,52,74,67,54	352
1	56,56,61,69,57,43	342	59,64,65,75,64,49	376
5	46,51,73,65,42,39	316	44,56,79,74,52,49	354

Yp3 tTa^(A) x tRe Ras64B^{V12(B,C)}

Tetraclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,2,0,0,0	2	49,58,39,65,35,51	297
0.1	36,65,71,37,59,68	336	46,73,77,46,66,71	379
1	42,65,67,57,35,53	319	49,72,68,59,41,58	347
5	55,55,43,58,36,60	307	63,64,49,63,45,64	348

Yp3 tTa^(A) x tRe Msl-1^{Mpu(A,B)}

Tetraciclina conc.: µg/ml	Hembra	Total	Macho	Total
0	0,0,0,0,0,0	0	35,35,72,52,45,37	276
0.1	34,68,42,51,33,40	268	35,72,45,56,36,44	248
1	41,39,42,60,70,72	324	51,49,46,61,78,77	362
5	70,55,56,65,43,61	349	74,58,64,73,51,66	386

Yp3 tTa^(A) x tRe Msl-2^{Nopu(A,B)}

Conclusión

Estos datos muestran que uno o ambos sexos pueden ser eliminados de forma eficiente, mientras que puede conseguirse una buena represión de esta letalidad mediante la adición de concentraciones modestas de tetraciclina al alimento. Esta represión es efectiva en un amplio margen de concentraciones de tetraciclina.

ES 2 298 167 T3

Ejemplo 2

Cruces de reportero

5 En los “cruces de reportero” a 25°C, se cruzaron homocigotos hembras que llevaban un inserto de $Sxlp^c$ tTa en su cromosoma X ($Sxlp^c$ tTa^(A)) con machos que llevaban varias construcciones de reportero. Al igual que con los “cruces de cromosomas únicos”, se situaron de diez a quince homocigotos hembras vírgenes para la construcción de tTA y de cinco a diez homocigotos machos jóvenes para la construcción del tRe en alimento conteniendo o careciendo del suplemento de tetraciclina. Se dejó que su progenie se desarrollara en este alimento.

10

lacZ

Se tiñeron los embriones para el lacZ utilizando un método histoquímica estándar.

15

Tetraciclina conc.: µg/ml	LacZ positivo	Total	LacZ negativo	Total
0	60,85,99,60	304	78,89,85,93	345
0.1	0,0,0,0	0	176,174,178,181	709
1	0,0,0,0	0	188,190,181,180	739
5	0,0,0,0	0	156,151,159,185	651

(Hembra) $Sxlp^c$ tTa^(A) x tRe lacZ^(III) (Macho)

30

Tetraciclina conc.: µg/ml	LacZ positivo	Total	LacZ negativo	Total
0	57,82,97,45	281	61,74,59,82	276
0.1	0,0,0,0	0	131,165,132,90	518
1	0,0,0,0	0	170,161,181,195	707
5	0,0,0,0	0	126,190,190,196	702

(Macho) $Sxlp^c$ tTa^(A) x tRe lacZ^(III) (Hembra)

50

Tetraciclina conc. µg/ml	LacZ positivo	Total	LacZ negativo	Total
0	0,0,0,0	0	189,200,153,169	711
0.1	0,0,0,0	0	164,175,190,179	708
1	0,0,0,0	0	182,190,195,167	737
5	0,0,0,0	0	199,151,169,164	683

(Macho) $Sxlp^c$ tTa^(A) tRe lacZ^(I) x C(1)DX (Hembra)

65

EGFP

Se puntuaron los embriones por fluorescencia. En el caso de embriones en medios libres de tetraciclina, éstos se separaron, se dejaron desarrollar en medios libres de tetraciclina y se puntuó el sexo de los adultos emergentes.

ES 2 298 167 T3

Tetraciclina conc.: µg/ml	Fluorescencia	Hembra	Macho	Sin Fluorescencia	Hembra	Macho
0	89,100,53,55	200	0	99,86,46,51	0	232
0.1	0,0,0,0	-	-	199,182,188, 153	-	-
1	0,0,0,0	-	-	170,135,163, 196	-	-
5	0,0,0,0	-	-	186,159,127, 200	-	-

(Hembra) $Sxlp^c tTa^{(A)} \times tRe EGFP^{(II)}$ (Macho)

Tetraciclina conc.: µg/ml	Fluorescencia	Hembra	Macho	Sin Fluorescencia	Hembra	Macho
0	60,91,62,83	243	0	102,56,79,72	1	256
0.1	0,0,0,0	-	-	196,170,165, 162	-	-
1	0,0,0,0	-	-	182,200,197, 161	-	-
5	0,0,0,0	-	-	182,161,188, 182	-	-

(Macho) $Sxlp^c tTa^{(A)} \times tRe EGFP^{(II)}$ (Hembra)

Tetraciclina conc.: µg/ml	Fluorescencia	Macho	Hembra	Sin Fluorescencia	Macho	Hembra
0	0,0,0,0	-	-	196,179,165, 164	-	-
0.1	0,0,0,0	-	-	179,197,198, 188	-	-
1	0,0,0,0	-	-	198,187,190, 164	-	-
5	0,0,0,0	-	-	170,177,199, 165	-	-

(Macho) $Sxlp^c tTa^{(A)} ; tRe EGFP^{(II)} \times C(1)DX$ (Hembra)

El C(1)DX es un cromosoma de un compuesto X; se unen de forma efectiva dos cromosomas X. Por consiguiente, el cromosoma X de machos cruzado con C(1)DX de hembras es heredado por los hijos, más que por las hijas.

ES 2 298 167 T3

Conclusiones

Los datos demuestran que, tal como se esperaba, la expresión del gen reportero es eliminada en presencia de tetraciclina en un amplio margen de concentraciones.

Ejemplo 3

Experimentos de cromosoma recombinante

Se dejaron aparear 40-45 hembras jóvenes y 20-25 machos jóvenes a 25°C con alimento con el suplemento indicado de tetraciclina, transfiriéndose a continuación a alimento normal (libre de tetraciclina) después de 3-4 días. Estas moscas se transfirieron a viales nuevos de comida normal cada día durante 12 días, eliminándose a continuación en el día 13. Se incubaron todos los viales a 25° mientras se desarrollaba la progenie. Se registró el número de la progenie de machos y hembras que se transformaron en adultos en cada vial.

Concentración de tetraciclina

Sx1^{pe}

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
µg/ml	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	103	0	98	0	89	0	92	0	105	0	95	0	110	0
1	128	0	137	0	150	0	136	0	111	0	87	0	100	0
5	110	0	111	0	95	0	90	0	144	0	93	0	138	0
20	131	0	126	0	133	0	120	0	93	0	99	0	111	0
100	139	0	127	0	145	0	110	0	149	0	128	0	94	0
500	95	11	133	12	145	1	137	1	86	0	112	0	128	0
1000	140	12	133	24	119	8	94	2	92	1	137	1	129	1
2000	110	35	97	25	94	16	138	12	115	2	128	1	145	1

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
µg/ml	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	106	0	131	0	148	0	86	0	99	0	1262	0
1	106	0	109	0	97	0	124	0	114	0	1399	0
5	106	0	89	0	148	0	148	0	87	0	1359	0
20	87	0	149	0	104	0	113	0	132	0	1398	0
100	93	0	125	0	99	0	121	0	139	0	1469	0
500	142	0	129	0	114	0	131	0	126	0	1478	25
1000	89	0	94	0	97	0	138	0	87	0	1349	49
2000	94	0	137	0	99	0	141	0	143	0	1439	92

Sx1^{pe} - tTA, tRE-Ras64B^{V12} en el cromosoma X.

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
µg/ml	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	103	0	98	0	149	0	121	0	134	0	150	0	117	0
1	149	0	86	0	111	0	112	0	126	0	148	0	136	0
5	104	0	99	0	148	0	128	0	142	0	134	0	93	0
20	121	0	106	0	97	0	127	0	142	0	131	0	107	0
100	94	0	142	0	115	0	131	0	114	0	103	0	131	0
500	140	34	148	23	100	14	95	1	122	0	120	0	115	0
1000	110	29	87	12	138	22	145	17	91	5	106	1	102	1
2000	123	42	145	37	131	43	139	15	126	12	118	7	100	4

ES 2 298 167 T3

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	138	0	142	0	147	0	130	0	112	0	1541	0
1	129	0	123	0	91	0	99	0	131	0	1441	0
5	99	0	106	0	95	0	144	0	129	0	1421	0
20	149	0	150	0	89	0	128	0	140	0	1487	0
100	93	0	119	0	143	0	87	0	144	0	1416	0
500	98	0	129	0	90	0	124	0	107	0	1388	72
1000	92	0	150	0	145	0	107	0	143	0	1416	87
2000	92	1	120	0	89	0	106	0	149	0	1438	161

Sx1^{pe} - tTA, tRE-Ras64B^{V12} en el tercer cromosoma.

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	97	0	136	0	152	0	130	0	108	0	114	0	88	0
1	102	0	99	0	134	0	171	0	171	0	118	0	91	0
5	130	0	159	0	156	0	91	0	84	0	127	0	110	0
20	76	0	129	0	126	0	79	0	89	0	98	0	94	0
100	112	0	145	0	130	0	124	0	79	0	109	0	134	0
500	136	2	79	0	161	0	102	0	171	0	151	0	161	0
1000	92	15	83	9	150	3	149	2	146	0	92	0	115	0
2000	127	21	95	14	153	3	164	4	135	1	97	1	144	0

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	140	0	104	0	141	0	173	0	81	0	1464	0
1	104	0	120	0	171	0	102	0	144	0	1527	0
5	116	0	123	0	155	0	163	0	121	0	1535	0
20	122	0	103	0	126	0	123	0	78	0	1243	0
100	127	0	133	0	79	0	157	0	154	0	1483	0
500	164	0	95	0	160	0	154	0	91	0	1625	2
1000	168	0	153	0	80	0	95	0	79	0	1402	29
2000	158	0	103	0	129	0	141	0	97	0	1543	44

Sx1^{pe} - tTA, tRE-Msl-2^{N_{opu}} en el cromosoma X.

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	111	0	108	0	130	0	69	0	101	0	110	0	130	0
1	89	0	106	0	119	0	70	0	87	0	117	0	138	0
5	112	0	80	0	68	0	130	0	78	0	93	0	78	0
20	92	0	83	0	129	0	127	0	66	0	69	0	95	0
100	72	0	90	0	72	0	66	0	106	0	122	0	100	0
500	78	0	118	0	69	0	67	0	88	0	83	0	135	0
1000	122	2	107	1	133	0	116	0	115	0	107	0	119	0
2000	134	12	79	14	123	5	130	1	102	0	114	0	83	0

ES 2 298 167 T3

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	127	0	92	0	79	0	77	0	133	0	1267	0
1	71	0	104	0	81	0	124	0	65	0	1171	0
5	106	0	84	0	135	0	119	0	82	0	1165	0
20	101	0	71	0	108	0	74	0	112	0	1127	0
100	136	0	104	0	116	0	77	0	107	0	1168	0
500	128	0	104	0	73	0	106	0	88	0	1137	0
1000	101	0	115	0	86	0	96	0	92	0	1309	3
2000	130	0	105	0	120	0	104	0	101	0	1325	32

Sx1^{pe} - tTA, tRE-Msl-2^{Nopu} en el tercer cromosoma.

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	93	0	137	0	84	0	66	0	114	0	107	0	114	0
1	73	0	90	0	99	0	120	0	118	0	85	0	85	0
5	84	0	122	0	131	0	93	0	104	0	90	0	133	0
20	127	0	128	0	80	0	105	0	81	0	122	0	108	0
100	72	0	80	0	87	0	128	0	78	0	92	0	86	0
500	98	0	78	0	94	1	105	0	138	0	77	0	92	0
1000	117	1	105	2	130	1	130	1	82	0	88	0	113	0
2000	91	16	70	11	69	13	70	4	108	1	90	0	115	0

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	117	0	78	0	123	0	125	0	121	0	1279	0
1	91	0	90	0	68	0	88	0	82	0	1089	0
5	89	0	70	0	138	0	85	0	100	0	1239	0
20	95	0	118	0	70	0	114	0	114	0	1262	0
100	66	0	137	0	85	0	109	0	93	0	1113	0
500	68	0	70	0	109	0	86	0	136	0	1151	1
1000	95	0	137	0	99	0	120	0	66	0	1282	5
2000	84	0	98	0	83	0	128	0	131	0	1137	45

Sx1^{pe} - tTA, tRE-Msl-1^{Mpu} en el cromosoma X.

Hsp26

ES 2 298 167 T3

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	153	0	154	0	127	0	130	0	81	0	151	0	147	0
1	138	0	98	0	74	0	88	0	150	0	123	0	115	0
5	140	0	132	0	119	0	129	0	87	0	156	0	157	0
20	115	0	113	0	92	0	92	0	129	0	77	0	119	0
100	150	0	127	0	126	0	114	0	78	0	93	0	98	0
500	119	1	148	0	154	0	132	0	112	0	97	0	80	0
1000	77	5	109	2	105	2	85	0	84	0	127	0	91	0
2000	156	18	101	6	149	3	115	1	134	0	139	0	151	0

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	117	0	81	0	106	0	135	0	141	0	1523	0
1	152	0	89	0	105	0	146	0	89	0	1367	0
5	79	0	148	0	120	0	92	0	119	0	1478	0
20	69	0	78	0	149	0	72	0	116	0	1221	0
100	121	0	126	0	157	0	141	0	143	0	1474	0
500	142	0	103	0	104	0	144	0	129	0	1462	1
1000	75	0	147	0	105	0	97	0	123	0	1225	9
2000	86	0	97	0	98	0	131	0	76	0	1433	28

Hsp26-tTA, tRE-Msl-2^{N_{opu}} en el segundo cromosoma.

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	120	0	87	0	127	0	115	0	121	0	80	0	100	0
1	84	0	153	0	100	0	88	0	93	0	71	0	126	0
5	134	0	95	0	122	0	141	0	80	0	77	0	108	0
20	135	0	137	0	140	0	135	0	107	0	141	0	89	0
100	146	1	146	0	82	0	106	0	118	0	118	0	82	0
500	124	12	144	8	99	2	154	1	137	0	96	1	75	0
1000	72	27	85	17	76	15	87	12	102	5	93	5	69	3
2000	132	67	96	45	119	38	135	35	104	22	90	17	149	12

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	151	0	79	0	108	0	69	0	107	0	1264	0
1	78	0	95	0	105	0	112	0	154	0	1259	0
5	135	0	84	0	152	0	145	0	142	0	1413	0
20	79	0	157	0	92	0	73	0	139	0	1424	0
100	96	0	135	0	86	0	108	0	157	0	1378	1
500	139	0	142	0	145	0	84	0	136	0	1475	24
1000	114	1	145	0	130	0	136	0	152	0	1261	85
2000	149	2	81	0	127	0	146	0	88	0	1416	238

Hsp26-tTA, tRE-Msl-1^{M_{pu}} en el segundo cromosoma.

ES 2 298 167 T3

Yp3

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	93	0	119	0	112	0	141	0	100	0	126	0	89	0
1	117	0	135	0	122	0	121	0	127	0	101	0	136	0
5	112	0	116	0	128	0	111	0	136	0	113	0	130	0
20	89	0	107	0	107	0	98	0	88	0	102	0	107	0
100	129	0	136	0	128	0	127	0	135	0	144	0	107	0
500	136	2	88	0	113	0	113	0	87	0	94	0	109	0
1000	107	13	140	5	110	0	141	0	98	0	129	0	88	0
2000	119	32	102	15	107	12	109	9	109	8	140	2	127	0

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	105	0	133	0	93	0	131	0	121	0	1363	0
1	90	0	119	0	94	0	98	0	100	0	1360	0
5	119	0	96	0	88	0	144	0	91	0	1384	0
20	135	0	126	0	143	0	123	0	141	0	1366	0
100	96	0	92	0	104	0	94	0	115	0	1407	0
500	141	0	144	0	123	0	104	0	124	0	1376	2
1000	138	0	105	0	124	0	115	0	114	0	1409	18
2000	114	0	123	0	132	0	115	0	107	0	1404	78

Yp3-tTA, tRE-Ras64B^{V12} en el segundo cromosoma.

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	121	0	94	0	103	0	93	0	96	0	119	0	119	0
1	95	0	123	0	79	0	78	0	130	0	103	0	112	0
5	109	0	110	0	118	0	124	0	86	0	122	0	90	0
20	81	0	89	0	127	0	82	0	81	0	79	0	128	0
100	112	0	87	1	87	1	113	0	95	1	91	1	84	1
500	84	21	96	16	86	15	124	9	123	5	86	3	106	1
1000	100	47	110	12	109	8	103	13	102	9	97	2	82	6
2000	127	63	130	54	128	34	117	21	89	12	87	11	90	4

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	84	0	127	0	104	0	76	0	95	0	1231	0
1	94	0	106	0	83	0	93	0	113	0	1209	0
5	132	0	126	0	76	0	128	0	102	0	1323	0
20	119	0	99	0	90	0	106	0	87	0	1168	0
100	85	1	122	0	114	0	90	0	126	0	1206	6
500	85	1	93	0	111	0	111	0	104	0	1209	71
1000	95	0	113	0	110	0	85	0	87	0	1193	97
2000	131	1	128	0	91	0	95	0	82	0	1295	200

Yp3-tTA, tRE-Msl-2^{Nopu} en el segundo cromosoma.

ES 2 298 167 T3

Tet. Conc.	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	91	0	84	0	107	0	80	0	88	0	92	0	99	0
1	117	0	92	0	128	0	80	0	104	0	116	2	8	0
5	82	0	123	0	116	0	120	2	89	0	90	0	95	0
20	92	1	101	0	87	0	109	0	81	0	121	0	83	1
100	108	13	130	9	131	5	99	7	109	3	123	1	107	1
500	78	22	85	16	80	12	106	15	130	11	91	10	118	7
1000	130	35	86	42	78	26	116	14	80	12	82	17	77	15
2000	116	79	130	72	78	44	101	29	132	32	94	22	89	16

Tet. Conc.	Dia 8		Dia 9		Dia 10		Dia 11		Dia 12		Total	
$\mu\text{g/ml}$	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
0.1	88	1	135	0	123	0	128	0	114	0	1229	1
1	101	0	127	2	84	0	101	0	79	0	1137	4
5	80	0	94	0	127	0	128	3	86	0	1230	5
20	132	0	81	0	88	0	112	0	127	0	1214	2
100	106	1	132	0	81	0	115	0	107	0	1348	40
500	115	2	98	0	86	0	82	4	115	0	1184	99
1000	131	3	104	1	99	0	125	0	108	0	1216	165
2000	91	8	88	2	85	5	114	0	80	0	1198	309

Yp3-tTA, tRE-Msl-1^{Mpu} en el segundo cromosoma

Conclusiones

Estos datos muestran que la alimentación de las madres con altas concentraciones de tetraciclina tiene algún efecto protector, pero que todos estos cromosomas recombinantes trabajan de forma extremadamente eficiente respecto a un amplio intervalo de concentraciones de tetraciclina (parenterales), con la única excepción de “Yp3 tTA, tRE Msl-1^{Mpu} en el 2º cromosoma, que tiene algunos fugas (< 1%) incluso a concentraciones bajas de tetraciclina. Debido que no hay ninguna recombinación meiótica en los machos de la *Drosophila melanogaster*, puede utilizarse cualquiera de estos cromosomas recombinantes en un programa de determinación genética del sexo o de control de insectos, en el caso en que se requiera. En la práctica, la *Drosophila melanogaster* no es una peste agrícola o un vector de la enfermedad pero estos datos demuestran que puede conseguirse la eliminación efectiva de un sexo por medio de este método.

Ejemplo 4

Uso de análogos de tetraciclina no antibióticos

Las reservas de cromosomas recombinantes pueden ser mantenidas fácilmente a 25°C en concentraciones de epioxitetraciclina de 1 $\mu\text{g/ml}$ o en concentraciones de anhidrotetraciclina de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, mostrando que estos análogos de tetraciclina no antibióticos son efectivos en la represión de la expresión del gen responsable del tTA.

Epioxitetraciclina

Se utilizó un intervalo estándar de concentraciones aditivas en los siguientes experimentos (0,05-20 $\mu\text{g/ml}$). Fuimos incapaces de mantener la reserva a las dos concentraciones más bajas, que se han señalado como n.d. (= “no determinado”)

ES 2 298 167 T3

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1306
5	0	1581
20	0	1495

Sx1p^c tTa, tRe Ras64B^{V12} en el cromosoma X

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1165
5	0	1279
20	0	1257

Sx1p^c tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 3^{er} cromosoma

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1076
5	0	1119
20	0	1159

Sx1p^c tTa, tRe Msl-2^{Nopu} en el cromosoma X

ES 2 298 167 T3

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1250
5	0	1300
20	0	1364

Sxlp^e tTa, tRe Msl-2^{Nopu} en el 3^{er} cromosoma

Epioxytetraciclina Conc µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1483
5	0	1585
20	0	1565

Sxlp^e tTa, tRe Msl-1^{Mpu} en el cromosoma X

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1362
5	0	1181
20	0	1403

Hsp26 tTa, tRe Msl-2^{Nopu} en el 2^o cromosoma

ES 2 298 167 T3

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1243
5	0	1409
20	0	1373

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} en el 2º cromosoma

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	, 1431
5	0	1424
20	0	1387

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 2º cromosoma

Epioxytetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	n.d.	n.d.
0.1	n.d.	n.d.
1	0	1350
5	0	1308
20	0	1343

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} en el cromosoma X

ES 2 298 167 T3

Anhidrotetraciclina

5

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1452
0.1	0	1528
1	0	1614
5	0	1448
20	5	1592

20 Sx1p^c tTa, tRe Ras64B^{V12} en el cromosoma X

25

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1381
0.1	0	1304
1	0	1121
5	0	1269
20	1	1247

30 Sx1p^c tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 3^{er} cromosoma

40

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1114
0.1	0	1120
1	0	1130
5	0	1148
20	0	1128

45 Sx1p^c tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el cromosoma X

60

65

ES 2 298 167 T3

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1331
0.1	0	1431
1	0	1309
5	0	1359
20	1	1362

Sx1p^e tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el 3^{er} cromosoma

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1582
0.1	0	1499
1	0	1474
5	0	1619
20	5	1533

Sx1p^e tTa, tRe Msl-1^{M^{pu}} en el cromosoma X

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	707
0.1	0	1457
1	0	1437
5	0	773
20	5	1447

Hsp26 tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el 2^o cromosoma

ES 2 298 167 T3

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1492
0.1	0	1426
1	0	1418
5	0	1457
20	8	1499

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} en el 2° cromosoma

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1449
0.1	0	1411
1	0	1397
5	0	1430
20	2	1428

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 2° cromosoma

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1339
0.1	0	1263
1	0	1265
5	0	1284
20	0	1297

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} en el cromosoma X

ES 2 298 167 T3

Anhidrotetraciclina Conc: µg/ml	Hembra	Macho
0.05	0	1316
0.1	0	1358
1	0	1354
5	0	1344
20	1	1312

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{Nopu} en el 2º cromosoma

Conclusiones

Estos datos muestran que pueden utilizarse los análogos no antibióticos de análogos de tetraciclina en lugar de tetraciclina. En el caso de epioxitetraciclina, se requieren concentraciones ligeramente mayores para reprimir la expresión del gen. Ninguno tiene características de transmisión parenteral sustancialmente diferentes de la tetraciclina, permitiendo diferentes concentraciones efectivas diferentes.

Ejemplo 5

efecto de la temperatura

Todos los experimentos anteriores se realizaron a 25°C, la temperatura estándar para el cultivo de Drosophila. Sin embargo, los insectos en su estado salvaje claramente estarían expuestos a temperaturas variables, de modo que hemos investigado la extensión a la cual la eficiencia del sistema está afectada por la temperatura. Al igual que con los experimentos de cromosoma recombinante, se dejaron aparear de 40-45 hembras vírgenes jóvenes y de 20-25 machos jóvenes alcanzar la temperatura de 25°C con comida con el suplemento de tetraciclina indicado, a continuación fueron transferidas a alimento normal (libre de tetraciclina) después de 3-4 días. Estas moscas fueron transferidas a viales nuevos con comida normal cada día. Se registró el número de la progenie macho y hembra que alcanzaron el estado adulto en cada vial. Estos experimentos se llevaron a cabo tanto a 18°C como a 29°C.

18°C

Macho

Tetraciclina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	8	982
1	10	912
5	7	871

Sx1p^e tTa, tRe Ras64B^{V12} en el cromosoma X

ES 2 298 167 T3

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	6	1065
1	9	1124
5	7	989

Sx1p^e tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 3^{er} cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	6	695
1	8	816
5	8	785

Sx1p^e tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el cromosoma X

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	2	973
1	9	985
5	5	983

Sx1p^e tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el 3^{er} cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	8	840
1	5	927
5	8	837

Sx1p^e tTa, tRe Msl-1^{M^{pu}} en el cromosoma X

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	8	832
1	7	879
5	4	818

Hsp26 tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el 2^o cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	6	628
1	3	614
5	5	712

ES 2 298 167 T3

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} en el 2° cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	8	1152
1	12	1122
5	3	1225

Yp3 tTa, tRe Msl-2^{Nopu} en el 2° cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	5	1303
1	14	1218
5	7	1386

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} en el cromosoma X

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	2	1190
1	4	1213
5	0	1058

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 2° cromosoma

29°C

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	716
1	0	711
5	0	715

Sx1p^e tTa, tRe Ras64B^{V12} en el cromosoma X

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	781
1	0	749
5	0	741

Sx1p^e tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 3^{er} cromosoma

ES 2 298 167 T3

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	682
1	0	804
5	0	648

Sx1p^e tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el cromosoma X

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	732
1	0	771
5	0	816

Sx1p^e tTa, tRe Msl-1^{M^{pu}} en el cromosoma X

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	749
1	0	737
5	0	718

Sx1p^e tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el 3^{er} cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	696
1	0	658
5	0	711

Hsp26 tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el 2^o cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	733
1	0	776
5	0	728

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{M^{pu}} en el 2^o cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	765
1	0	702
5	0	773

ES 2 298 167 T3

Yp3 tTa, tRe Msl-2^{N^{opu}} en el 2° cromosoma

Tetracilina Conc. µg/ml	Hembra	Macho
0.1	0	799
1	0	749
5	0	744

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{M^{pu}} en el cromosoma X

Tetracilina Conc. µg/m	Hembra	Macho
0.1	0	718
1	0	753
5	0	757

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{V12} en el 2° cromosoma

Conclusiones

A bajas temperaturas hay un ligero goteo, pero sólo a un nivel de <1% de fugas. Todas las versiones son extremadamente efectivas a 29°C. Esto es importante ya que la mayoría de las especies objetivo para el control son tropicales y han crecido en cultivos de aproximadamente a 28°C, por ej., *Ceratitis capitata*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*.

Ejemplo 6

El ejemplo ilustra la transmisión maternal de letalidad reprimible por Tc y TC utilizando un promotor específico de embriones.

Materiales y Métodos

Construcción del plásmido

Se amplificó un fragmento de promotor *bnk* de aproximadamente 2 kb a partir del fragmento de rescate del plásmido pW⁺2,8 kb *bnk* (Schejter y Wieschaus, (1993), Cell 75, 373-385) utilizando primeros de oligonucleótidos

5'-GCCGAGCTCTTGACGGTTGAAGTACGAATG-3' y 5'-CGGCCAATTCATATGCGTATATTCAGTATG-3'. Se digirió este fragmento con y se subclonó como un fragmento de *SacI-XhoI* en pUHD15-1 (Gossen y Bujard, (1992), Proc Natl Acad Sci USA 89, 5547-51). Se subclonó un fragmento de *XhoI-HpaI* conteniendo *bnk-tTa* a partir de este en pW8 (Klemenz y col., (1987), Nucl. Acids Res. 15, 3947-59) digerido con *XhoI* y *HpaI* para crear pP {*bnk-tTa*}.

El W.T.P-2 (Bello y col., (1998), Development 125, 2193-2201) se modificó mediante la adición de dos oligonucleótidos complementarios (5'-AATTGCCACCATGGCTCATATGGAATTCAGATCTG-3' y 5'-GGCCGCA-GATCTGATTCCATATGAGCCATGGTGGGC-3') entre las localizaciones *EcoRI* y *NotI* para proporcionar una secuencia de inicio de traducción de consenso (Kozak, (1987), Nucleic Acids Res 15, 8125-48). Se aisló un cADN conteniendo la región de codificación entera de un homólogo de *Drosophila* de Nipp1 (Van Eynde y col., (1995), J. Biol. Chem. 270, 28068-74) en pNB40 (Brown y Kafatos, (1988), J. Mol. Biol. 203, 425-437) utilizando el método de (Alphey, (1997), BioTech. 22, 481-486) basado en una secuencia parcial obtenida por una selección de dos-híbridos para las proteínas de unión PP1c de la *Drosophila* (Alphey y col., (1997), J. Cell Biol. 138, 395-409). La región de codificación entera y la 3'UTR se clonaron entre los sitios *NdeI* y *NotI* de W.T.P-2 modificado tal como se ha indicado anteriormente, para crear pP{tR-Nipp1Dm}.

Cultivo de *Drosophila*

Las moscas fueron criadas con alimento estándar levadura/maíz/agar con una concentración de levadura de 45-50 gl⁻¹. Se preparó comida conteniendo Tc con la misma receta con la adición de solución de clorhidrato de tetraciclina (Sigma-Aldrich) hasta la concentración final apropiada.

Histoquímica

Se recogió la progenie embrionica de los cruces *bnk-tTA/tRe-lacZ* a intervalos de 12 h y a continuación se tiñeron con β -galactosidasa tal como se ha descrito en Ashburner, (1989), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

*Resultados**Transmisión maternal de tetraciclina*

Un homocigoto de una variedad de insectos criados en masa para un gen letal dominante o sistema genético no tendrá progenie cuando se aparee con insectos salvajes. En este respecto el tiempo de acción del gen letal es irrelevante. Sin embargo, para que los insectos criados en masa sean útiles como un agente de control consideramos que el tiempo de acción del letal dominante puede ser altamente importante. Una fase letal en la edad adulta puede eliminar o al menos reducir la idoneidad de los adultos liberados para aparearse. Esto sería claramente contra productivo. Muchas plagas agrícolas dañan las cosechas mediante la alimentación de sus estados de larvas. Por consiguiente sería deseable eliminar la progenie tan pronto como fuera posible, preferiblemente en estado embrionario. Sin embargo, los embriones no se alimentan y no tomarán una dieta represora (tetraciclina) del sistema genético letal. Los embriones de los insectos también son impermeables a la mayoría de las macromoléculas, de modo que la tetraciclina exógena no penetrará. A la vista de las ventajas de una fase letal embrionica, ensayamos si la ingesta de tetraciclina por una hembra de *Drosophila* pasaría a sus huevos y por tanto a su progenie a una concentración suficiente para suprimir el fenotipo del gen reprimible por Tc.

Hemos utilizado una variedad de *Drosophila* en la que las hembras, pero no los machos, requieren Tc para su viabilidad. La letalidad específica de las hembras es debida a la expresión de un gen tóxico (*Ras64B*^{V12}, (Matsuo y col., (1997), *Development* 124, 2671-80) en el cuerpo graso de las larvas de las hembras y adultos (Thomas y col., (2000), *Science* 287, 2474-2476). El crecimiento de esta variedad en comida suplementada con 0,1 μ g/ml de Tc es suficiente para suprimir la expresión del gen tóxico, permitiendo que tanto los machos como las hembras sobrevivan. Hemos razonado que si la Tc ingerida por una hembra de *Drosophila* puede pasar a sus huevos y por tanto a su progenie, puede ser posible cargar los huevos con una concentración suficientemente alta para permitir la supervivencia de la progenie incluso en un medio carente de Tc. Hemos encontrado que permitiendo a los padres que se alimenten de una comida suplementada con Tc a 500 μ g/ml o más se consigue la supervivencia de una pequeña proporción de progenie hembras (Tabla 1). Hemos ensayado otras varias líneas y otras combinaciones de genes eliminadores del promotor con resultados similares (los datos no se muestran). Hemos concluido que es posible por medio de la alimentación a una hembra con Tc el introducir suficiente Tc en su progenie como para reprimir la expresión del gen dependiente de tTa.

Expresión del tTa específica de los embriones

De los muchos genes conocidos para ser expresados en los embriones de *Drosophila*, la enorme mayoría son también expresados posteriormente. Por ejemplo, los genes del desarrollo bien conocido implicados en establecer el cuerpo del plan de los embriones son re-utilizados más tarde para diseñar los apéndices y los discos de imágenes que formarán las estructuras adultas. Para otros muchos genes embrionicos no se ha investigado rigurosamente la posibilidad de una expresión posterior. *bottleneck* (*bnk*) es uno de un número de genes relativamente del que se ha descrito que se expresa exclusivamente en embriones. Se requiere el *bnk* para la reorganización del filamento de actina durante la celularización de los embriones de *Drosophila* entre los ciclos nucleares 13 y 14 (Schejter y Wieschaus, (1993), *Cell* 75, 373-385). Su transcrito está presente a niveles elevados sólo a partir de los ciclos nucleares 11 a 14. Hemos construido líneas transformadas estables de moscas que llevan el tTa de estructura de lectura abierta bajo el control de un fragmento de promotor de *bnk*. La capacidad del *bnk-tTa* para activar la transcripción en el embrión y en otras etapas del desarrollo fue monitorizado mediante la utilización de unas construcciones de reportero responsables del tTa, tRe-lacZ (Bello y col., (1998), *Development* 125, 2193-2202). Hemos encontrado que la proteína tTa fue expresada en el embrión y que pudo dirigir la expresión de la construcción del reportero.

La activación transcripcional dependiente del tTa está reprimida por la Tc. El tTa se une a una secuencia de ADN específica, el elemento responsable de la tetraciclina (tRc). El Tc se une al tTa y esto previene que la proteína tTa se una al ADN. Por consiguiente hemos intentado reprimir la expresión del gen reportero tanto por suplementación de la comida de los padres con Tc como por sembrado de los embriones en medio suplementados con Tc. Se consiguió la represión efectiva de los genes reporteros colocando los padres en medios conteniendo 1 μ g/ml de Tc durante al menos dos días antes de la recolección de embriones. La siembra de embriones en los medios conteniendo Tc no pareció afectar la expresión del gen reportero. Estos datos sugieren que el Tc puede entrar en el huevo a través de la madre durante la oogenénesis y puede afectar la transcripción mediada por tTa a las primeras etapas del desarrollo, pero el Tc no puede difundirse en los embriones desde el sustrato en el que se ha depositado.

Un "gen eliminador" activo en embriones

Con el fin de construir un sistema genético letal dominante dependiente de Tc, cruzamos moscas que llevaban inserciones estables de *bnk-tTa* con moscas que llevaban inserciones de tRe-Ras64B^{V12}. Nuestros estudios previos han mostrado que el tRe-Ras64B^{V12} es tóxico en posteriores etapas en combinación con un margen de líneas de tTa específicas de las hembras y no específicas del sexo (Thomas y col., (2000), *Science* 287, 2474-2476). Para nuestra

ES 2 298 167 T3

sorpresamente, los embriones que llevan *bnk-tTa* y *tRe-Ras64B^{V12}* sobreviven a la edad adulta con independencia de la exposición parenteral o cigótica al Tc (Tabla 2 y datos no mostrados). A la vista de la anterior expresión del gen reportero embrionario concluimos que la expresión de *Ras64B^{V12}* no es tóxica, o no suficientemente tóxica, durante el periodo en el que el *bnk-tTa* está activo para causar letalidad embrionaria.

Debido a que el *Ras64B^{V12}* ectópico carece de la toxicidad embrionaria bajo las condiciones que estamos utilizando, colocamos un gen tóxico diferente bajo el control de *tRe*. Seleccionamos el utilizar *Nipp 1 Dm*, un homólogo de la *Drosophila* de mamífero *NIPP-1*, un inhibidor nuclear de la fosfatasa de la proteína de tipo 1 (Beullens y col., (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 16538-16544; Van Eynde y col., (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 28068-74). El *NIPP1* tiene varias ventajas como un "gen eliminador" en este sistema. Se cruzaron moscas que llevan inserciones homocigóticas de *bnk-tTa* o *tRe-Nipp1* entre sí. Las moscas alimentadas en medios suplementados con Tc produjeron una progenie de F_1 viable; aquellas que estuvieron en medios no suplementados con Tc no (Tabla 2). Además, la supervivencia de F_1 no estuvo afectada por la presencia o ausencia de Tc en los medios en los que se alcanzó el F_1 . Por consiguiente hemos construido un sistema genético letal dominante eficiente reprimible por Tc en la dieta de los padres.

TABLA 1

Las dosis altas de Tc maternal pueden suprimir el tTa en la progenie

Tc conc. µg/ml	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7		Día 8		Día 9		Día 10		Día 11		Día 12		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0.1	93	0	119	0	112	0	141	0	100	0	126	0	89	0	105	0	133	0	93	0	131	0	121	0	1363	0
1	117	0	135	0	122	0	121	0	127	0	101	0	136	0	90	0	119	0	94	0	98	0	100	0	1360	0
5	112	0	116	0	128	0	111	0	136	0	113	0	130	0	119	0	96	0	88	0	144	0	91	0	1384	0
20	89	0	107	0	107	0	98	0	88	0	102	0	107	0	135	0	126	0	143	0	123	0	141	0	1366	0
100	129	0	136	0	128	0	127	0	135	0	144	0	107	0	96	0	92	0	104	0	94	0	115	0	1407	0
500	136	2	88	0	113	0	113	0	87	0	94	0	109	0	141	0	144	0	123	0	104	0	124	0	1376	2
1000	107	13	140	5	110	0	141	0	98	0	129	0	88	0	138	0	105	0	124	0	115	0	114	0	1409	18
2000	119	32	102	15	107	12	109	9	109	8	140	2	127	0	114	0	123	0	132	0	115	0	107	0	1404	78

Se ensayó una variedad de homocigoto para las inserciones del segundo cromosoma tanto de *Yp3-tTA* y de *tRe-Ras64B^{V12}* para determinar el efecto de Tc de la dieta de los padres. Entre 40-45 hembras jóvenes y entre 20-25 machos jóvenes criados a 25°C con comida con el suplemento indicado de tetraciclina se dejaron aparear, transfiriéndose a continuación a comida normal (libre de tetraciclina) después de 3-4 días. Estas moscas se transfirieron a viales nuevos de comida normal cada día durante 12 días, y a continuación se separaron en el día 13. Se incubaron todos los viales a 25°C mientras se desarrolló la progenie. Se registró el número total de progenie de machos y de hembras que alcanzaron el estado de adultos. La supervivencia de la progenie de hembras depende claramente de la concentración de Tc a la que se criaron sus padres, y de la duración del tiempo entre la separación de los padres de los medios de Tc y de la puesta de huevos.

TABLA 2

Letalidad reprimible con Tc utilizando un promotor específico de embriones

	Tc (µg / ml)	Machos	Hembras
<i>bnk-tTa</i> x <i>tRe-Nipp1Dm</i>	0	0	0
	0.1	60	58
	1.0	78	82

Se aparearon homocigotos de machos para *bnk-tTa* con homocigotos de hembras tanto para *tRe-Ras64B^{V12}* como *tRe-Nipp 1 Dm*. Se criaron estas moscas en medios carentes de Tc, pero antes de la cría se colocaron con alimento conteniendo varias concentraciones de Tc. Se dejaron reposar los embriones en este alimento durante 9 días, y a continuación se eliminaron los padres. Se contabilizó su progenie adulta de cada sexo. En combinación con *bnk-tTa*, *tRe-Nipp 1 Dm* produce letalidad reprimible de Yc de ambos sexos, pero el *tRe-Ras64B^{V12}* no.

Ejemplo 7

Vector de transformación modular

5 Este ejemplo detalla la construcción de un vector adecuado para transformación para producir un organismo conteniendo el sistema genético letal de la invención.

10 El objetivo de este vector modular es permitir la creación rápida de una construcción de transformación adecuada para unas especies dadas. En este ejemplo, la intención es crear un letal reprimible dominante. Esto se consigue mediante la inserción de un promotor adecuado en esta construcción, utilizándolo a continuación para transformar las especies objetivo. El promotor está derivado de forma típica de las propias especies objetivo, que es probablemente la manera más directa y segura de asegurar que el promotor tiene la especificidad deseada (por ej., específica de las hembras) en las especies objetivo. Sin embargo, esto no es necesario y, efectivamente, en el ejemplo de a continuación hemos utilizado un promotor de gen de actina modificado a partir de la mariposa nocturna de seda *Bombyx mori*, con la intención de utilizarla en el gusano rosado, una peste del algodón.

15 El PiggyBac ha sido utilizado con éxito para transformar un amplio grupo de insectos, incluyendo Díptero, Coleóptero y Lepidóptero, pero no es necesariamente óptimo, ni la Act5C-EGFP será el marcador de transformación óptimo en cada caso. El plásmido ha sido construido de modo que los elementos del núcleo del sistema (tTa, tRe-Nipp 1 y aislantes) estén flanqueados por sitios únicos para enzimas de restricción de corte poco frecuente (*NotI* y la localización de clonación múltiple *SbfI-PmeI-AscI*) para facilitar la subclonación de estos elementos en un vector de nueva transformación. De forma similar, los aislantes alternativos pueden ser utilizados o un aislante adicional insertado en la posición 5' del nuevo promotor, para proteger contra los efectos de posición de la cromatina flanqueante.

20 La distribución general del vector se muestra en la Figura 1, y los elementos son los siguientes:

tTa comprende: tTa de estructura de lectura abierta y la señal SV40 poliA, ambos de pUHD15-1neo (Gossen y Bujard, 1992) como EcoRI-BamHI. Se digirió el pUHD15-1 con Soy y EcoRI y se insertó un par oligo que destruyó ambos sitios y creó un sitio AscI. Se digirió este plásmido con HpaI y BamHI y otro oligo par insertado:

30 tTa 3' conector+
5'-gcgccgc ac gggccc a ctcgag cac aagctt c ggtacc ac gaattc-3' (SEC ID NO. 2)

35 tTa 3' conector-
5'-agct gaattc gt ggtacc g aagctt gtg ctcgag a gggccc gt gcgccgc-3' (SEC ID NO. 3)

40 para crear pUHD15Asc3'enzalador#42.

tRe-Nipp1Dm comprende: el vector tRe W.T.P-2 de Bruno Bello (Bello y col., (1998), *Development* 125, 2193-2202) modificado por inserción del oligo par "Kozak Spe +/-" entre los sitios EcoRI y NotI para dar pWTP-KozakSpe. Esto proporciona una secuencia de inicio de traducción.

45 Kozak Spe+/-: 5'-aattgccaccatggaattcactagtc-3' (SEC ID NO. 4)
3'-cggtgttacctaagtgatcacgccgg-5' (SEC ID NO. 5)

50 Nipp1Dm cADN en pNB40 (Brown y Kafatos, (1988), *J. Mol. Biol.* 203, 425-437) modificado para tener la localización EcoRI en el codón de inicio, subclonado a continuación como EcoRI-{terminación llenada de NotI} en pWTP-KozakSpe corato con EcoRI y StuI. El fragmento de tRe-Nipp1Dm-hsp70 poliA escindido como XhoI-HindIII parcial y subclonado en pUHD15Asc3' conector #43 cortado con XhoI y HindIII para dar ptTatReNipp1#77. La secuencia predicada completa de este fragmento se adjunta como un apéndice. El Nipp1Dm ADN puede ser fácilmente preparado por RT-PCR o PCR a partir de ADN genómico utilizando esta secuencia.

55 *piggyBac* y el vector del plásmido derivado de p3E1.2-blanco (Handler y col., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7520-5) de Al Handler. El gen *blanco* de mosca de la fruta mediterránea, insertado de forma original como un fragmento NotI en la localización HpaI de piggyBac, utilizando conectores fue eliminado por digestión con NotI y recircularización. Se eliminó un grupo de secuencias del vector de los sitios de restricción (fuera de piggyBac) por digestión con EcoRI y SalI, llenado final y recircularización, dando p3E1ΔRI-Sal. Este plásmido fue digerido a continuación con BgIII y NotI y un oligo par insertado para añadir sitios de restricción útiles:

60 conector piggy 2+/-: 5'-ggcc ctcgag aga aggctt gcgccgc tgt ggccgcc aga gtaaac agt cctgcagg-3' (SEQ ID NO.6)
3'-gagctc tct tccgga cgccggcg aca ccgccgg tct caaattg tca ggacgtcc ctgag-5' (SEQ ID NO.7)

El plásmido resultantes es pPB-conector2#93.

ES 2 298 167 T3

Se añadió el marcador de transformación de *Act5C-EGFP* por subclonación como un fragmento de 4,2 kb XhoI-EcoRV a partir de Act5C-EGFP en pP{CaSpeR} (Jean-Marc Reichhart) en el corte de XhoI-StuI, pPB-conector2 para dar pPB-Act5CECFP#181.

5 Se añadió el *aislante HS4* por corte de pJC13-1 (Cheng y col., (1993), Cell 74, 505-14) de Gary Felsenfeld con BamHI y recirculación, para eliminar el reportero neo, escindiéndose entonces un dímero HS4 (2 x 1,2 kb = 2,4 kb en total) como {terminación llena SaII}-CPU y subclonación en ptTatReNipp 1#77 incubado de forma secuencial con Hindi, polimerasa de ADN Klenow y CPU (es decir, terminación cohesiva de CPU - terminación llena HindII) para dar ptTatReNipp1HS4#101.

10 Se añadió el *aislante apon* por cambio dla SITio SpeI de *apoB3'MAR* (Namciu y col., (1998), Mol Cell Biol 18, 2382-91) desde Stephanie Namciu hasta ApaI utilizando el oligo SpeI-ApaI: SpeI-ApaI: CTAGAAGGGCCCTT (SEQ ID NO.8)

15 A continuación se subclonó el aislante apon como un fragmento ApaI-NotI de 0,8 kb en ApaI-NotI digerido ptTatReNipp1HS4#101.

Se subclonó un fragmento de AscI-NotI a partir de ptTatReNipp1HS4#101 en pPB-Act5CEGFP#181 para dar pRIDL#204.

20 *Ejemplos de insertar un promotor*

1) Se amplificó un fragmento del *promotor BmA³* de aproximadamente 190 bp por PCR a partir de pJP88 (John Peloquin) (Peloquin y col., (2000), Insect. Mol. Biol. 9, 323-33) utilizando polimerasa de Platinum Pfx (Life Technologies) y los oligos:

BmA3 5':

5' -aaacAATTCTGATAGCGTGCGGTTAC-3' (SEQ ID NO. 10)

30

BmA3 3'Asc-2:

5'-ggtaggcgccc TGGCGACCGGTGGATCCGAATG-3'

35

Este producto de la PCR fue digerido con AscI y subclonado en AscI-PmeI digerido pRIDL#204 para dar pRIDL-BmA³

2) Un fragmento del *promotor Aedes aegypti Vg1*, que habíamos utilizado previamente para dar expresión específica de hembra en el mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti*, utilizando polimerasa de Platino Pfx (Life Technologies) y los oligos:

Aedes vg5'

45 Aaac gaattcaccaccaggcagtg (SEQ ID NO.11)

Aedes vg3' AscI

50 Ggaggcgcgcc tcaagatccggcagctgttc (SEQ ID NO.12)

Este producto de la PCR fue digerido con AscI y subclonado en AscI-PmeI digerido pRIDL#204 para dar pRIDL-A.a.Vg1.

55 *La secuencia predicha de tRe-Nipp1. (XhoI-HindIII)*

El nt 1-543 derivado de W.T.P.-2 (Bello y col., (1988), Development 125:2193), del que de 1-309 contienen 7 repeticiones de la secuencia del operador tet (tetO), seguido por 98 nt del promotor del núcleo de transposasa del elemento P, de Carnegie 4, -52/+51 con relación al inicio de la transcripción, conectado por un conector SmaI-PstI (oligonucleótido sintético, GGGCTGCAG) para la secuencia líder de hsp70 a partir de CaSpeR-hs (Thummel y Pirota, (1991), Dros. Inf. News. 2) hasta la localización EcoRI de su policonector. La siguiente sección es derivada de un oligonucleótido sintético y proporciona un inicio de la traducción de consenso y algunos sitios de restricción, seguido por la región de codificación de *Drosophila* Nipp 1 y 3' UTR para la secuencia de poliA a partir de un cADN no publicado en pNB40 (Brown y Kafatos, (1988), J. Mol. Biol. 203:425) hasta la localización NotI, que ha sido llenado en su terminación y clonado en una localización StuI. La localización StuI y la secuencia subsiguiente es desde W.T.P.-2 y está derivada de CaSpeR-hs, es principalmente una secuencia remolque (3' UTR) desde hsp70 flanqueada por algunos sitios de restricción.

60

65

CTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATC
 AGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGT
 CGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTAGGAGTCCCTATCAG
 5 TGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCG
 AGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGCTCGGTACGCTTACCGAAGT
 ATACACTTAAATTCAAGTGCACGTTTGCTTGTGAGAGGAAAGGTTGTGTGCGGACGAATTTTTT
 TTTGAAAACATTAACCCTTACGGGCTGCAGTAAAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTAAGTA
 10 ACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTACTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAA
 GAAGAGAACTCTGAATAGGGAATTGGGAATTGCCACCATGGCTCATATGGAATTCATGGCTAAC
 AGCTACGACATACCCAGTTGGGCTGGAAAACCGCCACTGGCTTACATCTGGATGTGCTAAAGG
 ACGACAACTAGTACAAAACTGATGGTGGATGAAAAAGATGCTATCTATTTGGTTCGCAACAG
 TCAATGAACGACTTCTGCATAGACCATGCCTCTTGTTCGCGGGTCCACTCGGCGTTTGTCTAC
 15 CACAAGCACCTCAACATAGCCTACCTCGTGGATCTGGGGTCCACTCATGGCACCTTTATTGGAA
 CACTCAGATTGGAAGCGCACAAAGCCACACAGCTGCAGATTAATAGCACCTTCCACTTTGGGGC
 TTCTACCCGGAAC TACATACTCAGGGAACGACCTCTGGCCACCACAGCAACATCATGGAAGAC
 CTGCCGCTCAGTGAAACCAGCGATGGCGCTCTCCTGGGCCTGCCCGAAAGCCAAACGGAGCTTG
 20 ATAATCTTACAGAATACAACACGGCCACAATCGGCGCATCTCAATGCTGGGCATCGATGATGA
 TACCAATATGCGAAAGCAAAACGCCTTGAAACAGGGACGGCGCACTCGAAAATGTCACATTTAAC
 GATGAGGAGATTGTCATCAATCCTGAGGATGTGGATCCTAATGTGGGACGCTTCAGGAAC TTGG
 TACAAACCACTGTGGTGCCTGCCAAGAGGGCTCGCTGCGACGTCAACCATATGGGCATCCATTC
 GGGCAACAGCAGTTTGTCCAGTGCCAATGCCGCACATGTACACCAATGTTCCAGCAGAGCCTA
 25 GTTGACATGAAGCAGCAGCATAGGGAAATGCCTCCGCCAATGCGGTGCTCCACTCGCCTACTA

ATTCCTATATCAAGGTCTACCGGCCGAAATGCATGGCAAGGGTGACCTAGAGCCCATCTCCCC
 GCTGAGCATTTGGTTCCAAGTTGGGCTTATTGCTCCCGAATCCTGCGCCTGAAGTGTGCGCCAGTC
 30 TATGACGAAGCTGTGGAGACCTCGACATTTGGCTCAAAGTTGGCCGTGCTAATGCAAACGTTT
 GTCGCTTCGGTGAGGATCCGCATGACTCGAGTGGCGAGGGCGATTGCTGTGCCACAGAAAAA
 GAAATACGCCAAGGAAGCATGGCCAGGTCGCAAGCCCATGTTGGGGCAGCTGTAATTGCGTATT
 AACAAAATAATTAAGATTCCACCTACGATTTTCTCAAGCATA TGATTGACAACACACTCTGGAG
 35 TAATATTTGTTTATTAGACTTTTAAACGTAACAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAACGAATGCTGCGGCCCTAATTCCAGCTGAGCGCCGGTGCCTACCATTACCAGTTGGTCT
 GGTGTGCGGGATCCGTCGACTAAGGCCAAGAGTCTAATTTTGTTCATCAATGGGTTATAACA
 TATGGGTTATATTATAAGTTTGTTTTAAAGTTTGTGAGACTGATAAGAATGTTTCGATCGAATAT
 40 TCCATAGAACAACAAATAGTATTACCTAATTACCAAGTCTTAATTTAGCAAAAATGTTATTGCTT
 ATAGAAAAAATAAATTTATTTTAAAGTTTAAAGTCAACTGTCAATTTAATGTCTTTGATAGACT
 TTTGAAAGTCTTACGATACATTAGTATCTATATACATGGTTTATTCTACATTCTATATTAGTGA
 TGATTTCTTTAGCTAGTAATACATTTAATTTATTTTCGGCTTTGATGATTTTCTGATTTTTTCC
 45 GAACGGATTTTCGTAGACCCTTTTCGATCTCATAATGGCTCATTTTATTGCGATGGACGGTCAGG
 AGAGCTCGAATTAACGGGGATCCGTCGACCTGCAGCCCAAGCTT

Ejemplo 8

Modelos de control de insectos

Métodos

Thomas y col. (Science 287, 2474-2476, 2000) presentaron un modelo matemático único para la efectividad de los programas de control de insectos incluyendo SIT y varias formas de “RIDL” (= “liberación de insectos que llevan un letal dominante” - utilizado en la presente invención para indicar el organismo y el método de la presente invención), y mencionaron que también podían considerarse los sistemas incrementados, incluyendo los machos liberados que eran homocigóticos para los letales de hembras dominantes (DFLs) en múltiples localizaciones no conectadas y conectando el DFL a un sistema de distorsión de conducción/segregación (Thomas y col., 2000, Science 287, 2474-2476). Ahora consideramos el impacto de estos y de otros sistemas de incrementados de la efectividad del control de insectos.

En general, asumimos que todos los programas de control liberan un número constante de machos por generación de peste (ver a continuación). Este número (“input”) se da en relación a la población de peste macho inicial. El modelo considera generaciones discretas.

Hemos asumido que las hembras seleccionan apareamientos de forma proporcional a su abundancia e idoneidad de modo que una hembra seleccionará un tipo de apareamiento i con una probabilidad p_i , de modo que:

ES 2 298 167 T3

$$p_i = n_i r_i / (S_j n_j r_j)$$

en donde n_i es el número de insectos macho del tipo i y r_i es la idoneidad del tipo i en relación con los machos de tipo salvaje tomados para tener una idoneidad de 1. El tipo de insecto puede depender de su genotipo así como de su generación - en particular, consideramos escenarios en los que las moscas liberadas tienen una idoneidad reducida pero su progenie macho, independientemente del genotipo, tiene la misma idoneidad que los machos de tipo salvaje.

Consideramos dos escenarios para la fertilidad. En el caso dependiente de la densidad, asumimos que cada apareamiento de hembra con un macho fértil produce vástagos hembras R_0 - de los que la proporción s_i sobrevive a la edad adulta en donde s_i viene dada por:

$$S_i = 1 / (1 + (a o_i)^b)$$

en donde o_i es el número de vástagos que sobreviven al punto en el que actúa la dependencia de la densidad (Maynard Smith y Slatkin, 1973 Ecology 54, 384-391), y a y b son parámetros. Rogers y Randolph (1984 Insect Sci. Applic. 5, 419-23) consideran dicho sistema dependiente de la densidad con un programa SIT y muestran que la efectividad del programa SIT está largamente determinado por la resistencia de la población de insectos objetivo, caracterizada por el parámetro b (Rogers y Randolph, 1984 Insect Sci. Applic. 5, 419-23). Una consideración importante es el tiempo de mortalidad dependiente de la densidad, en particular, si los machos liberados son liberados antes o después de que el mecanismo dependiente de la densidad actúe y de si la mortalidad inducida por RIDL se consigue antes o después de que el mecanismo dependiente de la densidad actúe. En ausencia de control, dicha población permanecerá constante si está a su capacidad de transportar ($s_i = 1/R_0$) y tenderá a volver al nivel si es perturbado. Este sería un modelo apropiado para una población establecida. Esto no significa necesariamente que no se haya intentado ningún control - métodos de control tales como la eliminación de la SITio de reproducción reducirán el nivel estable de la población, más que el tamaño de la población con relación al nivel estable.

En el caso independiente de la densidad, asumimos que cada hembra apareada con un macho fértil produce vástagos hembras R_0 todas las cuales sobrevivirán hasta el estado adulto en la siguiente generación. Esto es esencialmente el límite del caso dependiente de la densidad - en el que la población es tan pequeña que esencialmente no hay mortalidad dependiente de la densidad y $s_i \approx 1$. De este modo, en ausencia de control, si R_0 es mayor que 1, la población se expandirá de forma exponencial. Esto sería un modelo apropiado para una nueva introducción o brote de unas especies de pestes, o una población recuperada de una severa depleción, por ej., debido a un programa de control intensivo diseñado para reducir los números de la especie objetivo antes de un programa de RIDL o SIT.

Por ejemplo, para un sistema muy simple sin dependencia de la densidad, R_0 igual a 2 y una aportación de 1,5 machos estériles a cada generación, el modelo trabajaría del modo siguiente:

- (i) La población inicial consiste por igual de machos de tipo salvaje y de hembras de tipo salvaje. Todos los números son contabilizados de forma relativa a la población femenina inicial, de modo que esto es 1,0 por definición y la población de machos de tipo salvaje es aquí también 1,0. Ya que sólo estamos considerando poblaciones que normalmente tienen números iguales de machos y de hembras, la población inicial de machos es siempre de 1,0 en estos ejemplos.
- (ii) Se hace una aportación de machos estériles de 1,5, lo cual significa 1,5 veces tantos machos como hembras en la población inicial.
- (iii) El 60% de las hembras se aparean con machos estériles (debido a que 2,5 machos, el 60% son estériles) y no producen vástagos ($0,8 = R_0 * (0,4*1)$ hembras se aparean con machos de tipo salvaje). También producen 0,8 machos vástagos.
- (iv) De este modo la segunda generación consiste igualmente en machos y hembras de tipo salvaje (0,8 de cada).
- (v) Se hace una aportación de 1,5 machos estériles.
- (vi) El 65% de las hembras se aparean con machos estériles (ya que de los 2,3 machos, el 65% son estériles) y no producen vástagos. El 35% de las hembras se aparean con machos de tipo salvaje para producir 0,56 vástagos hembras ($0,56 = R_0 * (0,35*0,8)$ hembras se aparean con machos de tipo salvaje). También producen 0,56 machos vástagos.

y así hasta que se elimina la población

SIT

En cada caso comparamos la efectividad de diferentes versiones del sistema de RIDL con el de la SIT. Para la SIT consideramos un caso óptimo con una perfecta separación de sexos, y un 100% de esterilidad. Dicha SIT es en sí mismo un método de control altamente efectivo, y también consideramos el nivel que alcanzaría la población en ausencia de cualquier control, pero mostramos que diferentes versiones de RIDL son mucho más efectivas, y

hay muchas situaciones en las que el RIDL puede controlar una población de peste en donde la SIT no puede. Estos modelos no tienen en cuenta algunas ventajas adicionales del RIDL, como por ejemplo la mayor facilidad de transporte del sistema nuevas especies (ver vector del Ejemplo 7).

5 *Aportación*

En general asumimos que todos los programas de control liberan un número constante de machos por generación de peste. Este número (“aportación” o “entrada”) se da en relación a la población de peste de machos inicial. Una estrategia de RIDL potencial implica la liberación de una población de mezcla de sexos, en el conocimiento de que un sexo será eliminado por el efecto letal de un sistema genético letal específico del sexo en algún punto posterior en su ciclo de vida, por ej., antes de la madurez sexual. En el caso en que estos individuos puedan inducir mortalidad dependiente de la densidad en sus conespecíficos, (Figuras 6a y 7a) asumimos que se liberan un número igual de hembras además de los machos.

La capacidad para liberar en cualquier estado del ciclo de vida permite otra estrategia en la que los individuos son almacenados en un estado inactivo liberando a continuación de forma simultánea, permitiendo una mayor liberación que de otra manera sería el caso. Por ejemplo, los embriones de muchas especies de mosquito pueden ser almacenados durante meses en condiciones relativamente secas con poca pérdida de viabilidad, incubando a continuación y desarrollando las larvas inducidas simplemente por colocación de las mismas en un entorno acuoso. Una mayor ventaja de esta aproximación es que una facilidad de la masa criada puede continuar operando durante el invierno, mientras que los insectos objetivo están en diapausa y por tanto insensibles a una liberación estéril. En la primavera, puede utilizarse entonces una liberación mucho mayor, utilizando los embriones almacenados durante varias generaciones. Aquí, modelamos las consecuencias de almacenar el valor de dos generaciones de producción de fábrica y utilizando esto doblar el tamaño de estas primeras dos generaciones de liberación (Figura 8). Aunque la habilidad para almacenar embriones no es específica al RIDL, se precisaría un programa de la SIT para hacer crecer estos embriones hasta un estadio de desarrollo posterior con el fin de esterilizarlos por irradiación. Debido a que el espacio de cría de fábrica, más que la disponibilidad de los embriones, es probable que sea el factor limitante, el potencial de un programa de RIDL para liberar a cualquier etapa del ciclo de vida es crítico para esta nueva estrategia. No obstante, en la Figura 8 hemos considerado la ventaja tal que una estrategia de liberación conferiría en un programa de la SIT convencional. Cada una de las representaciones en la Figura 8 está basada en una representación inicial con una liberación de tamaño doble en las primeras dos generaciones. Para comparar con la SIT convencional sin dicha liberación de doble tamaño, se comparan estas representaciones con las figuras iniciales a partir de las que derivan.

Fase letal y uso de un sistema letal de múltiples fases (MPLS)

Si el requerimiento es simplemente eliminar toda la progenie, o toda la progenie de un sexo, entonces la fase letal no es importante. Sin embargo, consideramos que hay varias ventajas para diseñar por ingeniería genética letalidad específica de embriones. La fase letal debe terminar antes de la etapa de desarrollo a la que son liberados los insectos, o pueden perder idoneidad o morir una vez el represor ha sido abandonado, por ej. Después de la liberación. La letalidad embrionaria asegura que ninguna larva emerge para dañar cosechas o animales. Esto puede no ser importante en el caso de vectores de enfermedad tales como mosquitos, en donde sólo las etapas adultas transmiten la enfermedad, pero es claramente crítico en el caso de muchas plagas de cosechas en donde son las voraces larvas las que causan el daño económico. La letalidad específica de embriones permite la última y mayor generación de masa criada para ser criada con alimento carente del represor, reduciendo costes y cualquier daño medioambiental asociado con mayores cantidades de Tc. La letalidad específica de los embriones (u otra letalidad temprana) también puede ser combinada con letalidad específica del sexo posterior, por ej., letalidad específica de las hembras. Hemos demostrado que esto permite la construcción de una variedad en la que tanto la separación por sexos como la “esterilización” son consecuencias automáticas del abandono del Tc a partir de la última generación antes de la liberación. Denominamos este sistema como un sistema letal de múltiples fases (MLPS), para indicar que has dos fases letales diferentes con diferentes propiedades. En muchos escenarios de cría/distribución, las genéticas de dicho sistema parecen similares a los de una liberación de un único sexo de machos esterilizados por radicación, en que sólo los machos son alcanzados y no tienen progenie viable cuando se aparean con machos salvajes en el entorno natural. Sin embargo, hay dos ventajas mayores que son observadas en los modelos de a continuación. En primer, naturalmente, los machos de MPLS que no han sido irradiados, y de este modo no sufren la pérdida de idoneidad y la consecuente longevidad con la erradicación. En segundo lugar, debido a que el requerimiento es sólo que las dos (o más) fases letales no se solapan no que uno de ellos es específico para los embriones, podemos organizar que la primera fase letal esté después de una fase de mortalidad dependiente de la densidad en la población salvaje. Por ejemplo, en el caso de mosquitos, con el fin de prevenir la transmisión de la mayoría de las enfermedades transmitidas por los mosquitos (por ej., malaria, fiebre del dengue, fiebre amarilla) es solo necesario para prevenir que las hembras tomen su segunda comida de la sangre. Por consiguiente, sería adecuado eliminar las hembras en la fase de crisálidas, los adultos emergentes o sólo seguir su primer alimento de la sangre. La primera fase letal no específica del sexo tiene que más temprana que ésta, y por consiguiente pudiera ser tan tardía como un primer estado adulto, por ejemplo. De forma alternativa, sería posible una primera fase letal de desarrollo de larva/crisálida tardía. Los promotores adecuados para todas estas etapas son bien conocidos - los genes inducibles de alimento de la sangre para eliminar la comida después de la sangre, etc. Utilizando una fase letal que actúa en primer lugar más tarde que una fase de mortalidad dependiente de la densidad en la población salvaje significa que individuos que morirán más tarde debido al efecto letal del sistema de RIDL compiten, no obstante, por los recursos con sus conespecíficos de tipo salvaje y de este modo tienden a incrementar la mortalidad de estos conespecíficos de tipo salvaje.

En los gráficos que se muestran a continuación, SIT y MPLS dan las mismas producciones, excepto en donde se indica de otro modo.

Unión del DFL al sistema de distorsión de conducción/segregación meiótica

5

El sistema de conducción meiótica actúa para intensificar la efectividad del sistema de RIDL (Figura 2).

Los sistemas de conducción meiótica de efectividad variable son conocidos en una amplia variedad de especies, incluyendo *Drosophila* y mosquitos. En la herencia Mendeliana normal, cada uno de los dos homólogos de un cromosoma dado es igualmente probable que sea heredado, es decir, cada uno tiene una probabilidad del 50% de ser heredado por cada vástago individual. La consecuencia de un sistema de distorsión de conducción/segregación meiótica en que preferencialmente se hereda un cromosoma. Hemos explorado el efecto de esto por consideración de sistemas en los que se hereda, de forma preferencial, el cromosoma que lleva el sistema RIDL por la progenie de heterocigotos que llevan este cromosoma y su homólogo a partir de la población salvaje. Debido a que los sistemas de distorsión de conducción/segregación meiótica varían en efectividad, consideramos frecuencias de herencia del 50% (es decir, distorsión de conducción/segregación no meiótica), del 60%, 70%, 80%, 90% y del 100%. Las frecuencias de herencia superiores también hacen el sistema de RIDL más efectivo.

Machos liberados que son homocigóticos para los DFLs en cromosomas múltiples

20

A diferencia de la SIT, el impacto de un sistema de RIDL puede ser incrementado de forma potencial mediante el incremento del número de copias del sistema en los individuos liberados. Hemos considerado las consecuencias de los homocigotos de los machos liberados para un letal específico de hembra dominante a una, dos o tres, localizaciones no conectadas. Encontramos que los machos liberados con cromosomas de DFL múltiples controlarán de forma más efectiva el tamaño de la población (Figura 3).

25

Idoneidad reducida

Las Figuras 4 y 5 demuestran los efectos de la idoneidad reducida en sistemas de la SIT y RIDL (con conducción meiótica y sistemas de cromosomas múltiples). Obviamente, la idoneidad reducida en los machos liberados disminuye la efectividad de estos sistemas de control. En las Figuras 4b y 5b asumimos que los machos de RIDL tienen una doble idoneidad para aparearse de forma competitiva que los machos de la SIT. Esto es un estimado muy conservador. La radiación reduce la capacidad de apareamiento competitiva de los insectos irradiados (por un estimado de dos veces en el caso de la mosca de la fruta mediterránea) y también reduce su longevidad (en un estimado de 2 a 5 veces en el caso de la mosca de la fruta mediterránea). Esto reduce la capacidad de apareamiento competitivo global en un estimado de 4 a 10 veces en el caso de la mosca de la fruta mediterránea, más en el caso del gusano rosado, menos en el caso de la mosca del gusano barrinador. Por consiguiente una ventaja global de dos veces para las moscas de RIDL no irradiadas respecto a sus equivalentes de SIT irradiados es un estimado muy conservador. Hemos encontrado que incluso esta ventaja es extremadamente significativa en términos del coste y la efectividad de un programa de control (Figuras 4b y 5b).

40

Mecanismo dependiente de la densidad

Consideramos dos escenarios

45

(a) la mortalidad dependiente de la densidad actúa antes que la mortalidad inducida por RIDL y actúa en los insectos de RIDL o SIT nuevamente liberados,

(b) la mortalidad dependiente de la densidad actúa antes que la mortalidad inducida por RIDL pero no actúa en los insectos nuevamente liberados, y

50

(c) la mortalidad dependiente de la densidad actúa después de la mortalidad inducida por RIDL pero no actúa en los insectos nuevamente liberados de RIDL.

Una fase letal de adultos de los modelos del escenario (a) y la mortalidad dependiente de la densidad actúan al nivel de los adultos. Una fase letal de adulto para RIDL puede ser apropiado para los vectores de la malaria, en donde las hembras sólo necesitan ser eliminadas en una semana o similar después de su primera comida de sangre para prevenir la transmisión de la enfermedad. De forma alternativa, este escenario también modela una liberación inicial y la etapa dependiente de la densidad, que es asequible por RIDL, en donde la población liberada puede ser liberada en cualquier etapa del ciclo de vida, pero no para la SIT en donde la separación de sexos (en el caso en que se utilice) y la irradiación tienen que ser llevadas a cabo antes de la liberación, restringiendo el intervalo de etapas del ciclo de vida que puede ser liberado.

60

El escenario (b) es un caso muy importante y nuevo. Esto representa una mortalidad dependiente de la densidad que actúa antes de la mortalidad inducida por RIDL. En el caso de los mosquitos, la competición entre las larvas por los recursos es una etapa probable para los efectos dependientes de la densidad. La mortalidad inducida por RIDL puede ser asegurada con posterioridad, ya que sólo las hembras adultas transmiten la enfermedad. Dicha mortalidad puede ser conseguida utilizando un promotor de actuación posterior, tal como el del gen de vitellogenin (para la mortalidad

65

específica de hembras) en el vector del Ejemplo 7. Esta estrategia también es posible utilizando un sistema letal de fases múltiples (MPLS) en el que la etapa letal no específica del sexo es posterior que la mortalidad dependiente de la densidad. No hay ninguna estrategia equivalente para la SIT.

5 El escenario (c) representa la liberación en una etapa del ciclo de vida posterior, por ej., en adultos, y una letalidad inducida por RIDL inicial, por ej., tal como embriones. La mortalidad dependiente de la densidad queda entre estos. Esto puede representar algunas pestes de la agricultura que comen las cosechas, en donde las etapas de larvas provocan el daño y de este modo sería inapropiado liberar estas etapas o arreglar para que la mortalidad inducida por RIDL fuera más tarde, de modo que las larvas ya hubieran hecho el daño antes de morir. A diferencia de los escenarios (a) y (b) el RIDL no tiene una ventaja especial derivada del ciclo de vida respecto a la SIT bajo este escenario.

10 Las Figuras 6 y 7 ilustran los beneficios de la mortalidad inducida por RIDL retrasada hasta después de la mortalidad dependiente de la densidad, así como el adicional beneficio potencial de los insectos liberados (tanto machos como hembras) antes de la mortalidad dependiente de la densidad. Estos gráficos ilustran además los beneficios a conseguir a partir de los sistemas de conducción meióticos incrementados y los sistemas de DFL de cromosomas múltiples. Las Figuras 6b, 6c, 7b y 7c revelan que la SIT puede realmente conducir a una población estable mayor que la que habría en el caso de ausencia del programa de control. Este efecto ha sido señalado previamente por Rogers y Randolph (Rogers y Randolph, 1984 *Insect Sci. Applic.* 5, 419-23).

20 *Puntos generales*

Para un modelo asumido de productividad y de mortalidad, es fácil predecir que incrementos en la conducción meiótica mejorarán la efectividad, incrementos en el número de localizaciones con DFLs mejorarán la efectividad y reducirán la idoneidad en machos liberados, en relación con los machos de tipo salvaje, disminuirán la efectividad. Sin embargo, el modelo demuestra el impacto relativo de estos cambios y demuestra de forma más importante que la idoneidad reducida puede actuar simplemente para reducir el control de una población de insectos, pero también puede significar que la población de insectos no puede ser eliminada sin una mayor entrada de machos de RIDL o SIT. De forma similar, las conducciones meióticas incrementadas pueden actuar para mejorar un sistema dado de modo suficiente como para eliminar una población de insectos que no habría sido eliminada con una conducción meiótica del 50%. Además, no todas las producciones son intuitivamente obvias. La posibilidad de que la SIT pueda conducir realmente a una mayor población estable que la que hubiera habido en el caso de la ausencia del programa de control ya ha sido mencionada anteriormente. De forma adicional, está claro que bajo algunas circunstancias la población salvaje puede realmente aumentar durante las etapas iniciales del programa de control e incluso pueden ser erradicadas a largo plazo. Por ejemplo, en la Figura 2b con una conducción meiótica del 70%, la población es superior a la de su nivel inicial desde la generación 1 a la generación 7, aunque esté controlada en última instancia.

Hay que señalar que en varios de los gráficos la línea de guiones largos mostrada en la clave aparece en la representación como unas líneas continuas o segmentadas. Sin embargo, está claro, del contexto, qué línea en cuál.

40 En detalle, las Figuras se explican a continuación:

Figura 2: Sistema de conducción meiótico. 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% para un sistema de localización simple sin idoneidad disminuida. La línea negra en negrilla es el sistema de la SIT en cada caso. El sistema RIDL está representado con líneas grises.

- 45 a. R_0 es 1,5 y la entrada es 0,5 (en relación con la población inicial). La SIT mantiene la población a un nivel constante, mientras que los sistemas RIDL reducen de forma rápida la población. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 esperaríamos $(1,5)^{15} = 438$ veces tantos insectos como la población inicial.
- 50 b. R_0 es 2,25 y la entrada es 1 (en relación con la población inicial). La población no está controlada por la SIT o el RIDL con un 50% o 60% de conducción meiótica. En la generación 15 tienen 8000, 2200 y 360 veces tantos insectos como en la población inicial, respectivamente. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 se esperaría $(2,25)^{15} = 191751$ veces tantos insectos como la población inicial. Las poblaciones son traídas rápidamente bajo control con unos niveles de conducción meiótica superiores.

55 Figura 3: Sistema RIDL utilizado en las localizaciones no conectadas múltiples. La línea negra en negrilla es el sistema de la SIT en cada caso. El sistema RIDL está representado con líneas grises.

- 60 a. R_0 es 1,5 y la entrada es 0,5 (en relación con la población inicial). La SIT mantiene la población a un nivel constante, mientras que los sistemas RIDL reducen de forma rápida la población. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 esperaríamos $(1,5)^{15} = 438$ veces tantos insectos como la población inicial.
- 65 b. R_0 es 2,25 y la entrada es 1 (en relación con la población inicial). La población no está controlada por la SIT o el RIDL con 1 o 2 localizaciones. En la generación 15 tienen 8000, 2200 y 34 veces tantos insectos como en la población inicial, respectivamente. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 se esperaría $(2,25)^{15} = 191751$ veces tantos insectos como la población inicial. Las poblaciones son traídas rápidamente bajo control con un sistema RIDL de 3 localizaciones.

ES 2 298 167 T3

Figura 4: Sistema de conducción meiótico. 50%, 60%, 70%, 80% 90% y 100% para un sistema de localización único con idoneidad disminuida. La línea negra en negrilla es el sistema de la SIT en cada caso. El sistema de RIDL está representado con líneas grises.

- 5 a. R_0 es 1,5 y la entrada es 0,5 (en relación a la población inicial). La idoneidad de los insectos de la SIT y RIDL liberados es del 80% la de los insectos de tipo salvaje. Se asume que las generaciones subsiguientes tienen una idoneidad igual a la de los insectos de tipo salvaje sea cual sea su origen. La población no está controlada por la SIT o el RIDL con un 50% de conducción meiótica. En la generación 15 hay 44 y 1,5 veces tantos insectos como en la población inicial, respectivamente. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 esperaríamos $(1,5)^{15} = 438$ veces tantos insectos como la población inicial. Las poblaciones son rápidamente traídas bajo control con niveles de conducción meiótica superiores, a pesar de la idoneidad reducida.
- 10
- 15 b. R_0 es 1,5 y la entrada es 1,75 (en relación con la población inicial). La idoneidad de la SIT es del 25% de la de los insectos de tipo salvaje, mientras que los insectos de RIDL liberados tienen un 50% de la idoneidad de los insectos de tipo salvaje. Se asume que las generaciones subsiguientes tienen una idoneidad igual a la de los insectos de tipo salvaje sea cual sea su origen. La población no está controlada por la SIT. En la generación 15 hay 23 veces tantos insectos como en la población inicial, respectivamente. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 esperaríamos $(1,5)^{15} = 438$ veces tantos insectos como la población inicial. Las poblaciones son rápidamente traídas bajo control con sistemas RIDL, a pesar de la idoneidad reducida.
- 20

Figura 5: Localizaciones no conectadas múltiples utilizadas en el sistema RIDL con idoneidad reducida. La línea negra en negrilla es el sistema de la SIT en cada caso. El sistema RIDL está representado con líneas grises.

- 25 a. R_0 es 1,5 y la entrada es 0,5 (en relación a la población inicial). La idoneidad de los insectos de la SIT y RIDL liberados es del 80% la de los insectos de tipo salvaje. Se asume que las generaciones subsiguientes tienen una idoneidad igual a la de los insectos de tipo salvaje sea cual sea su origen. La población no está controlada por la SIT o el RIDL con un 50% de conducción meiótica. En la generación 15 hay 44 y 1,5 veces tantos insectos como en la población inicial, respectivamente. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 esperaríamos $(1,5)^{15} = 438$ veces tantos insectos como la población inicial. Las poblaciones son rápidamente traídas bajo control con niveles de conducción meiótica superiores, a pesar de la idoneidad reducida.
- 30
- 35 b. R_0 es 1,5 y la entrada es 1,75 (en relación con la población inicial). La idoneidad de la SIT es del 25% de la de los insectos de tipo salvaje, mientras que los insectos de RIDL liberados tienen un 50% de la idoneidad de los insectos de tipo salvaje. Se asume que las generaciones subsiguientes tienen una idoneidad igual a la de los insectos de tipo salvaje sea cual sea su origen. La población no está controlada por la SIT. En la generación 15 hay 23 veces tantos insectos como en la población inicial, respectivamente. Si la población no estuviera sujeta a control, en la generación 15 esperaríamos $(1,5)^{15} = 438$ veces tantos insectos como la población inicial. Las poblaciones son rápidamente traídas bajo control con sistemas RIDL, a pesar de la idoneidad reducida.
- 40

Figura 6: Sistema de conducción meiótico. 50%, 60%, 70%, 80% 90% y 100% para un sistema de localización único con idoneidad no disminuida - en un sistema dependiente de la densidad. La línea negra en negrilla es el sistema de la SIT en cada caso. El sistema de RIDL está representado con líneas grises. En todos los casos $a = 1$, $b = 2$, R_0 es 4,5 y la entrada es 1 (en relación con la población inicial).

- 45 a. La mortalidad dependiente de la densidad actúa antes de la mortalidad inducida por RIDL y actúa en los insectos de RIDL nuevamente liberados. La SIT mantiene la población a un nivel constante de 0,8 en relación con la población inicial, mientras que los sistemas de RIDL reducen de forma rápida las poblaciones. Si las poblaciones no están sujetas a control, esperaríamos que la población permaneciera estable en el tamaño inicial.
- 50
- 55 b. La mortalidad dependiente de la densidad actúa antes de la mortalidad inducida por RIDL pero no actúa en los insectos de RIDL nuevamente liberados. La población es eliminada por la SIT o RIDL con una conducción meiótica del 50% o el 60%. Estabiliza la población a los niveles de 1,2, 0,4 y 0,3, en relación con la población inicial, respectivamente. Las poblaciones son traídas rápidamente bajo control con niveles de conducción meiótica superiores. Si la población no está sujeta a control, esperaríamos que la población permaneciera estable en el tamaño inicial.
- 60
- 65 c. La mortalidad dependiente de la densidad actúa después de la mortalidad inducida por RIDL pero no actúa en los insectos de RIDL nuevamente liberados. La población es eliminada por la SIT o RIDL con un 50%, 60% o 70% de conducción meiótica. Estabiliza la población a los niveles de 1,2, 0,75, 0,7 y 0,6, en relación con la población inicial, respectivamente. Las poblaciones son traídas rápidamente bajo control con mayores niveles de conducción meiótica, a pesar de la idoneidad reducida. Si la población no estuviera sujeta a control, esperaríamos que la población permaneciera estable en el tamaño inicial.

ES 2 298 167 T3

Figura 7: Las localizaciones no conectadas múltiples utilizadas en el sistema de RIDL con idoneidad no disminuida - en un sistema dependiente de la densidad. La línea negra en negrilla es el sistema de la SIT en cada caso. El sistema de RIDL es representado con líneas grises. En todos los casos $a = 1$, $B = 2$, R_0 es 4,5 y la entrada es 1 (en relación con la población inicial).

- 5
- a. La mortalidad dependiente de la densidad actúa antes de la mortalidad inducida por RIDL y actúa en los insectos de RIDL nuevamente liberados. La SIT mantiene la población a un nivel constante de 0,8 en relación con la población inicial, mientras que los sistemas de RIDL reducen las poblaciones. Si la población no está sujeta a control, esperaríamos que la población permaneciera estable en el tamaño inicial.
- 10
- b. La mortalidad dependiente de la densidad actúa antes de la mortalidad inducida por RIDL pero no actúa en los insectos de RIDL nuevamente liberados. La población es eliminada por la SIT o RIDL con 1 localización. Estabiliza la población a los niveles de 1,2 y 0,4, en relación con la población inicial, respectivamente. Las poblaciones son eliminadas con 2 o 3 sistemas de localización. Si la población no está sujeta a control, esperaríamos que la población permaneciera estable en el tamaño inicial.
- 15
- c. La mortalidad dependiente de la densidad actúa después de la mortalidad inducida por RIDL pero no actúa en los insectos de RIDL nuevamente liberados. La población es mantenida a un nivel constante por la SIT o RIDL con 1, 2 o 3 localizaciones. Estabiliza la población a los niveles de 1,2, 0,75, 0,63 y 0,5, en relación con la población inicial, respectivamente. Si la población no estuviera sujeta a control, esperaríamos que la población permaneciera estable en el tamaño inicial.
- 20

Figura 8:

25 Las representaciones a-d están basadas en el escenario de la Figura 2, con las primeras dos liberaciones dobladas en tamaño.

(a) $R_0 = 1,5$, entrada posterior = 0,5 (b) $R_0 = 2,25$, entrada posterior = 1

30 (c) $R_0 = 1,5$, entrada posterior = 0,5 (d) $R_0 = 2,25$, entrada posterior = 1

Las representaciones e-g están basadas en el escenario de la Figura 6, con las primeras dos liberaciones dobles en tamaño.

35 (e) ver Figura 6

(f) ver Figura 6b

40 (g) ver Figura 6c

Las representaciones h-j están basadas en el escenario de la Figura 7, con las dos primeras liberaciones dobles en tamaño.

45 (h) ver Figura 7a

(i) ver Figura 7b

50 (j) ver Figura 7c

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de control de la población de un animal multicelular no humano en un entorno natural del mismo, que comprende:

i) alimentar una reserva del animal,

10 llevando el animal un sistema genético letal dominante, siendo el efecto letal del sistema letal condicionado y produciéndose en dicho entorno natural por medio de la expresión de un gen letal,

estando la expresión de dicho gen letal bajo control de una proteína del transactivador reprimible,

15 siendo dicha cría bajo condiciones permisivas en presencia de una sustancia, estando la sustancia ausente en el entorno natural y siendo capaz de reprimir dicho transactivador;

ii) distribuyendo dichos animales de reserva en el entorno en una localización para el control de la población; y

20 iii) consiguiendo el control de la población por medio de la letalidad embrionica por expresión del sistema letal en embriones de vástagos que resultan de la inter-crianza de dichos individuos de reserva del sexo opuesto de la población salvaje.

25 2. Un método de control de la población de un animal multicelular invertebrado en un entorno natural del mismo, que comprende:

i) alimentar una reserva del animal,

30 llevando el animal un sistema genético letal dominante, siendo el efecto letal del sistema letal condicionado y produciéndose en dicho entorno natural por medio de la expresión de un gen letal,

estando la expresión de dicho gen letal bajo control de una proteína del transactivador reprimible,

35 siendo dicha cría bajo condiciones permisivas en presencia de una sustancia, estando la sustancia ausente en el entorno natural y siendo capaz de reprimir dicho transactivador;

ii) distribuyendo dichos animales de reserva en el entorno en una localización para el control de la población; y

40 iii) consiguiendo el control de la población por medio de la letalidad embrionica por expresión del sistema letal en embriones de vástagos que resultan de la inter-crianza de dichos individuos de reserva del sexo opuesto de la población salvaje.

45 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el sistema genético letal dominante condicional es el único elemento recombinante presente en el animal.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde la expresión del sistema genético letal se produce en la ausencia de una sustancia que está ausente del entorno natural del animal.

50 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la sustancia es un aditivo alimenticio que no es un componente de la comida normal para el animal.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el aditivo alimenticio es un compuesto artificial o sintético, un antibiótico, análogo de antibiótico o derivado.

55 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el efecto letal del sistema letal no es dependiente del intervalo de temperaturas que se produce en el entorno natural del animal.

60 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones en donde el efecto letal del sistema letal dominante es condicionalmente eliminable.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el sistema de expresión es un reprimible por tetraciclina o un análogo o derivado de la misma.

65 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el sistema letal está presente en más de una localización.

ES 2 298 167 T3

11. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el sistema letal está localizado en el cromosoma X.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el sistema letal tiene objetivos esenciales múltiples.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el sistema genético letal comprende todo o parte del gen Nipp 1 Dm de la *Drosophila*, o un equivalente funcional del mismo.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el gen letal es una secuencia inhibitoria seleccionada entre el grupo que comprende: ARN anti-sentido, ARN con sentido, y ARN de doble hebra.
15. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el animal multicelular no humano o invertebrado es un insecto.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el animal multicelular no humano o invertebrado está seleccionado entre el grupo de: la mosca de la oveja australiana (*Lucilia cuprina*), el mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*), el escarabajo japonés (*Popilla japonica*); los escarabajos de borde blanco (*Graphognathus spp.*), mosca prieta de los cítricos (*Aleurocanthus woglumi*), mosca oriental de la fruta (*Dacus Dorsalis*) mosca del olivo (*Dacus oleae*) mosca de la fruta tropical (*Dacus cucurbitae*, *Dacus zonatus*), la mosca de la fruta mediterránea (*Ceratitis capitata*), mosca natal de la fruta (*Ceratitis rosa*), mosca de la cereza (*Rhagoletis cerasi*), mosca de la fruta de Queensland (*Bactrocera tryoni*), mosca de la fruta del Caribe (*Anastrepha suspensa*), hormigas de fuego importadas (*Solenopsis richteri*, *Solenopsis invicta*), polilla gitana (*Lymantria dispar*), palomilla de la manzana (*Cydia pomonella*), polilla de cola marrón (*Euproctis chrysorrhoea*), el mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*), mosquitos de la malaria (*Anopheles gambiae*, *Anopheles stephansi*), el gusano barrenador del nuevo mundo (*Cochliomyia hominivorax*), el gusano barrenador del viejo mundo (*Chrysomya bezziana*), la mosca Tsetse (*Glossina spp*), el picudo del algodónero (*Anthonomus grandis*), caballitos del diablo (*Enallagma hageni*), libélulas (*Libellula luctuosa*), y la plaga del arroz (*tryporyza incertulas*).
17. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-16, en donde el animal es un animal multicelular no humano y el efecto letal del sistema genético letal es específico del sexo en dicho embrión.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el efecto letal del sistema genético letal es específico para un tejido sexual en dicho embrión.
19. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 17 o 18, en donde el efecto letal es específico para las hembras.
20. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en donde el animal es un animal multicelular invertebrado y el efecto letal del sistema genético es específico del sexo.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el efecto letal del sistema genético letal es específico para un tejido sexual.
22. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en donde el animal es un animal multicelular invertebrado y el efecto letal es específico en una etapa del ciclo de vida del animal multicelular invertebrado, pero no es específico a otra etapa.
23. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en donde el animal es un animal multicelular invertebrado y el efecto letal es específico del sexo en una etapa del ciclo de vida del animal multicelular invertebrado, pero no es específico de otra etapa.
24. Un método de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en donde el efecto letal es específico del embrión.
25. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20, 21 o 23, en donde el efecto letal es específico para las hembras.
26. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-25, en donde el animal multicelular no humano o invertebrado no tiene un sistema genético letal específico del sexo que sea incondicional y que esté expresado en cada individuo.
27. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde tanto los machos como las hembras están distribuidos.
28. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde un sexo está distribuido.
29. Un método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde hay separación de sexos antes de la distribución del animal multicelular no humano o invertebrado por expresión de un sistema genético letal específico del sexo de un animal multicelular no humano o invertebrado tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 17-26.

ES 2 298 167 T3

30. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el efecto letal resulta en la eliminación de más del 90% de la clase objetivo de la progenie de apareamientos entre los organismos liberados y la población salvaje.

5 31. Un método de separación de animales por el sexo, en donde tal como se ha definido en las reivindicaciones 1 o 2, en donde se utiliza la expresión de un sistema letal condicional dominante específico del sexo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-20, 22 y 24-25 en el animal para eliminar un sexo para dejar el otro: una población pura o predominante de machos o de hembras; una población en la que los animales comprenden tanto tejidos machos como hembras; o una población en la que los animales son incapaces de producir gametos machos o
10 gametos hembra funcionales o ambos.

32. Una secuencia de polinucleótidos que codifica un sistema genético letal dominante condicional de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, que codifica el gen *Nipp1*.

15 33. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende la SEC ID NO. 1.

34. Una secuencia de polinucleótidos que codifica un sistema genético letal dominante condicional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, en donde el gen letal es una secuencia inhibitoria seleccionada entre el grupo que comprende: ARN antisentido, ARN con sentido, y ARN de doble hebra.
20

35. Un vector o vectores que comprenden una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 32 o 34.

36. Un vector de acuerdo con la reivindicación 35, que comprende un gen letal dominante o un sistema genético reprimible por la tetraciclina.
25

37. Un vector de acuerdo con la reivindicación 35 o 36, que comprende al menos una secuencia de aislante.

38. Un vector de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la secuencia de aislante es derivada del ADN de vertebrados.
30

39. Un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, en donde el vector comprende elementos genéticos modulares.

40. Una célula de huésped no humano que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-39.
35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Fig 1

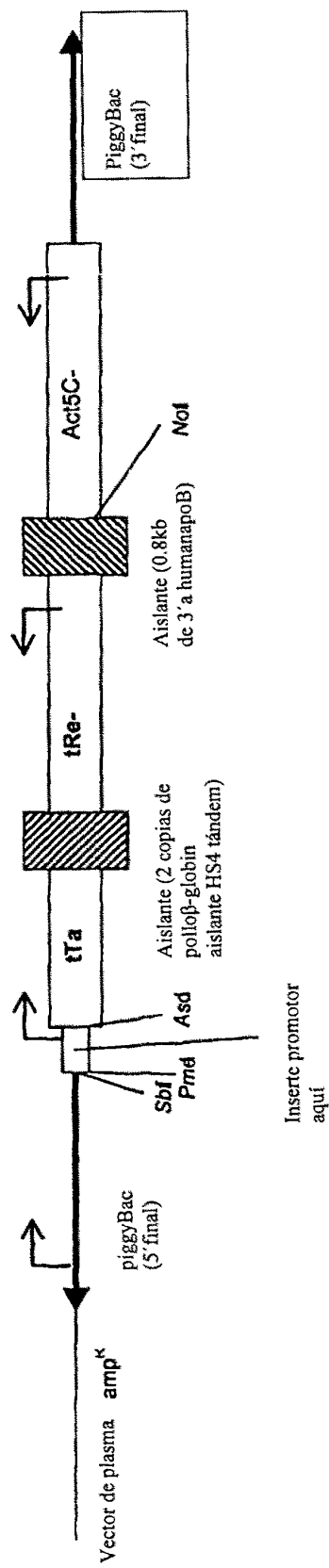


Fig 2a

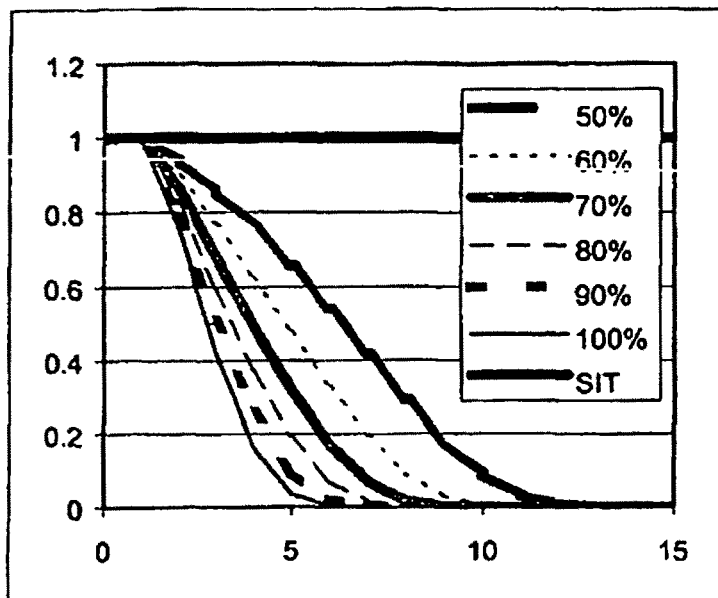


Fig 2b

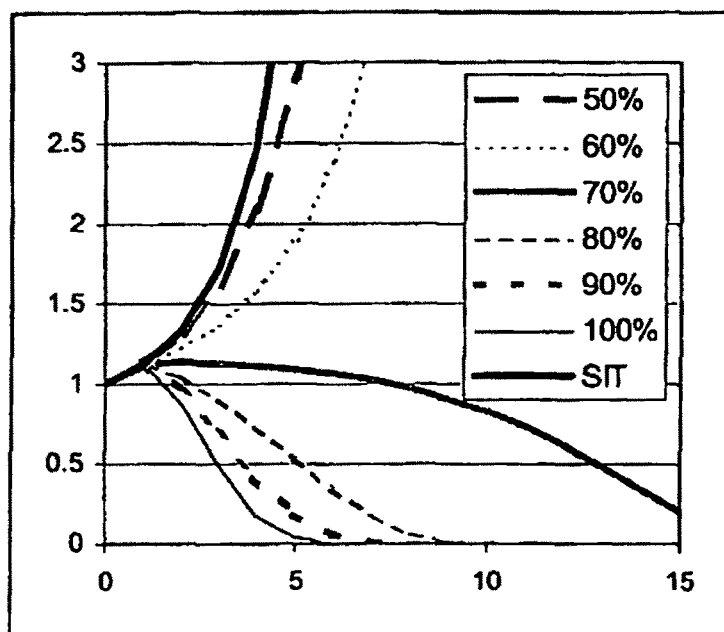


Fig 3a

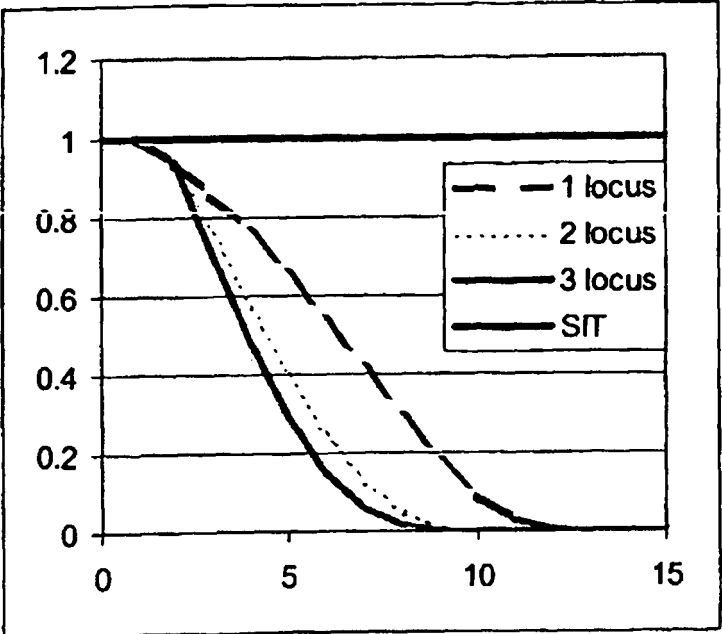


Fig 3b

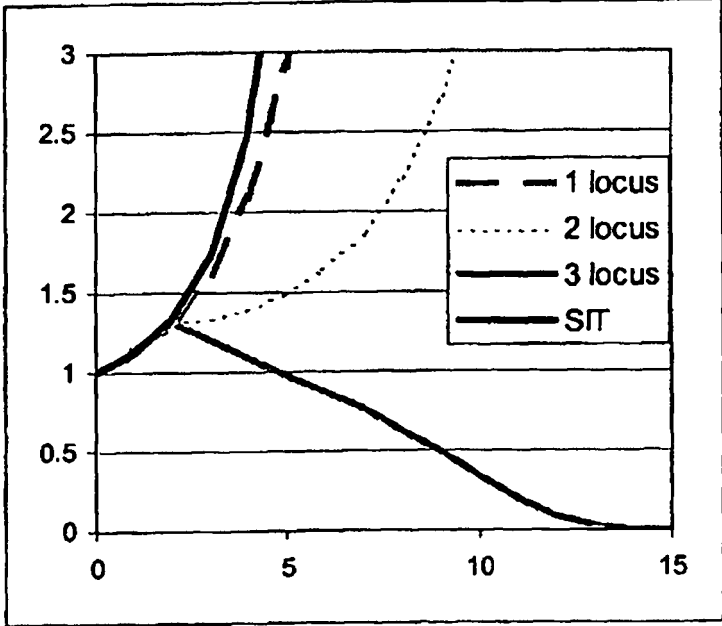


Fig 4a

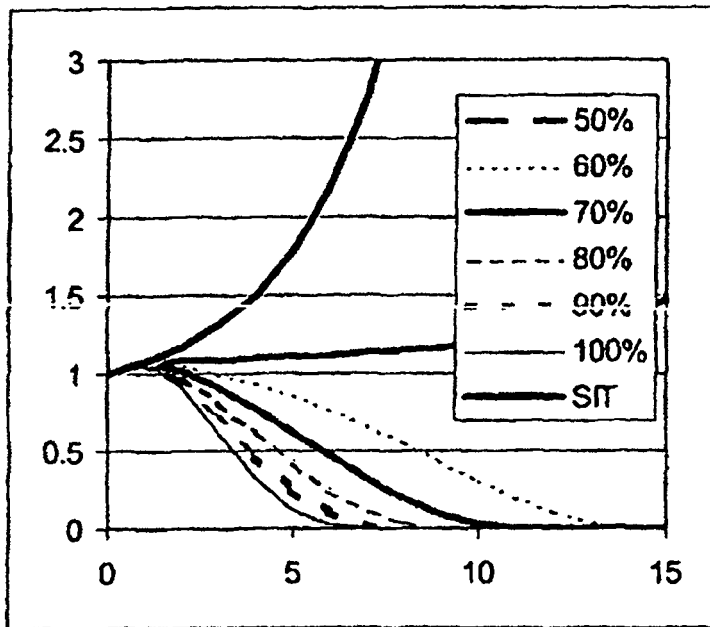


Fig 4b

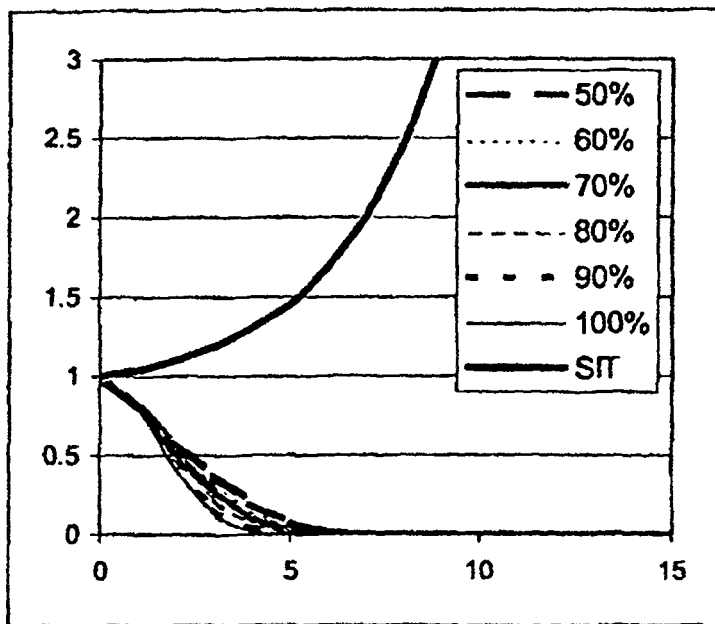


Fig 5a

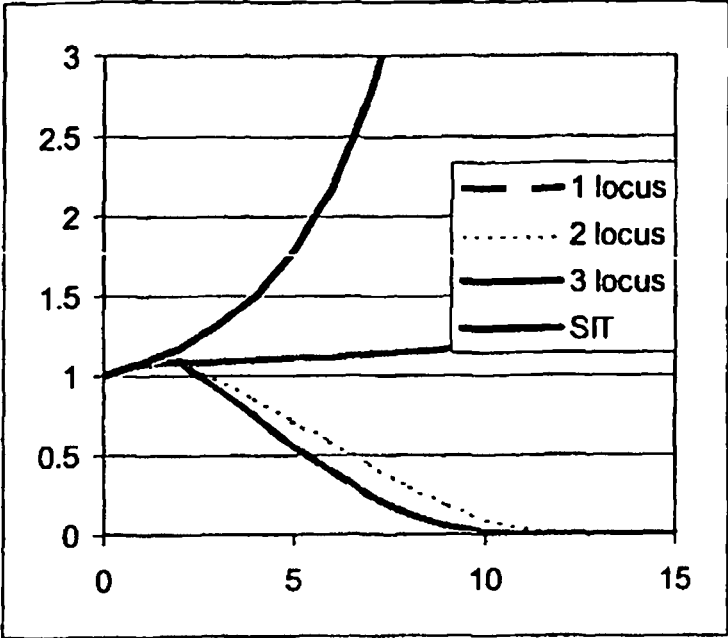


Fig 5b

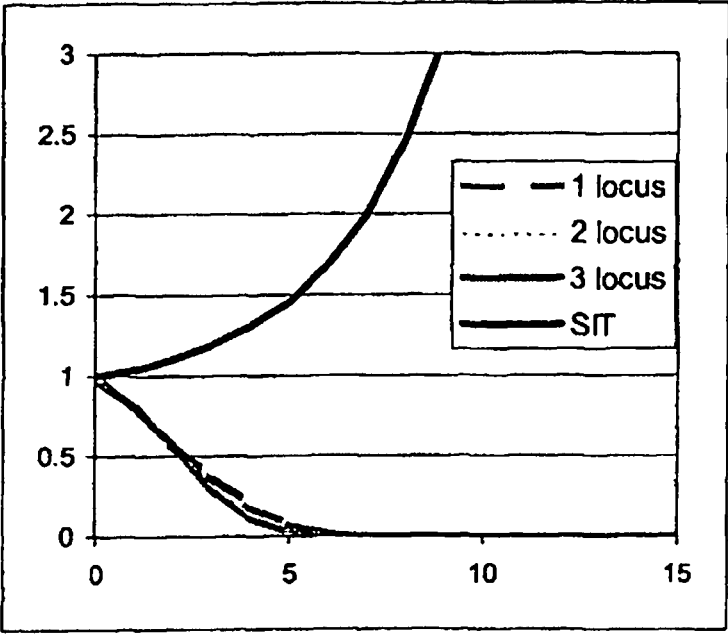


Fig 6a

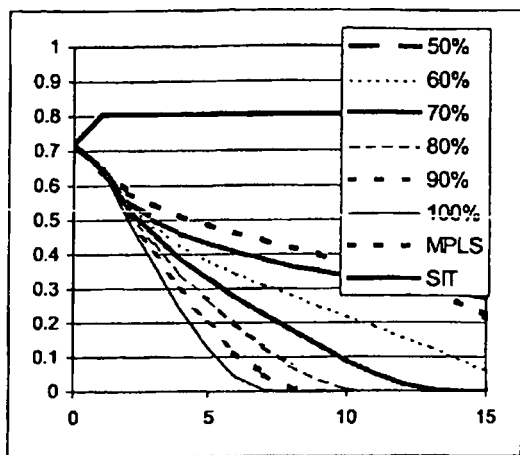


Fig 6b

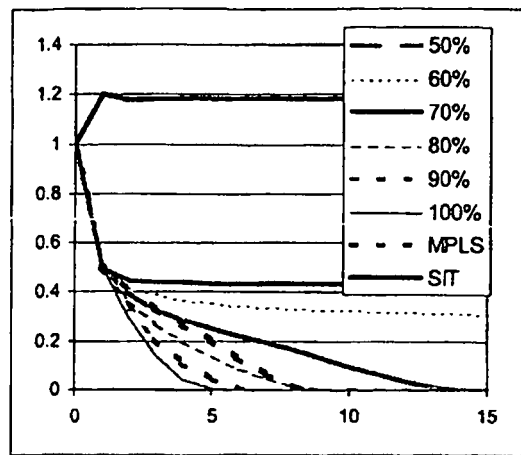


Fig 6c

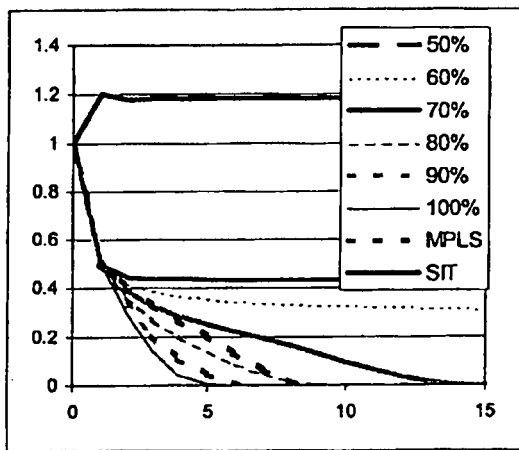


Fig 7a

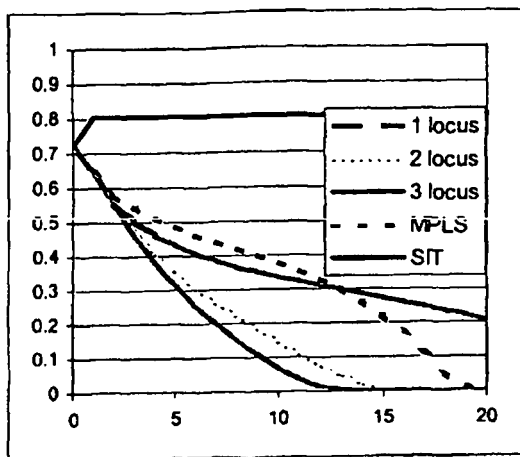


Fig 7b

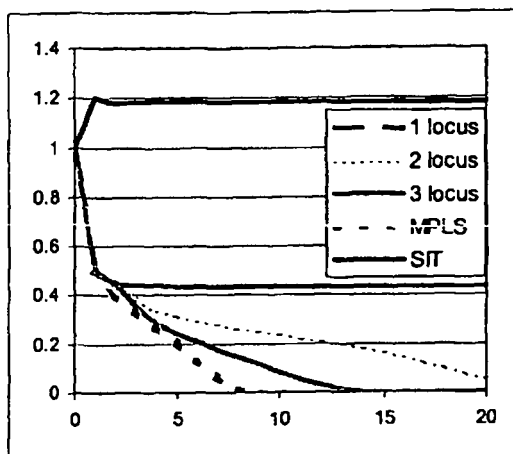


Fig 7c

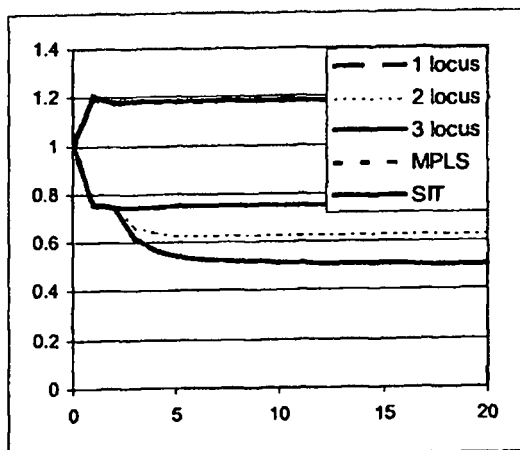


Fig 8a

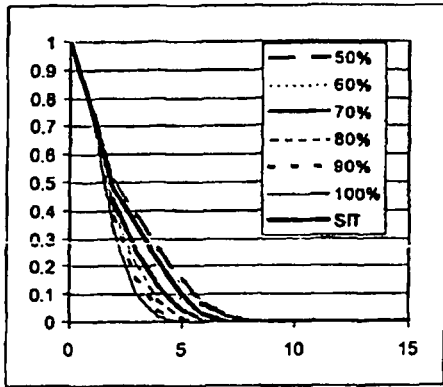


Fig 8b

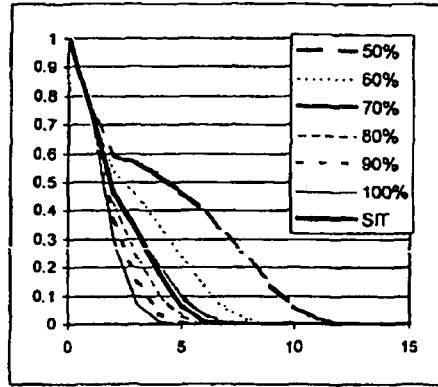


Fig 8c

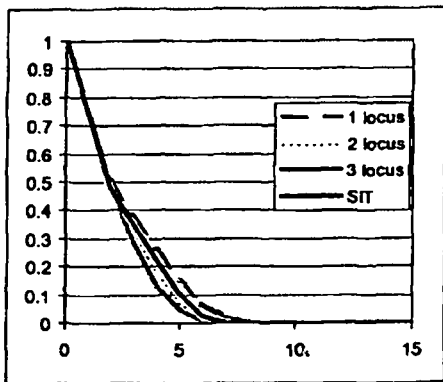


Fig 8d

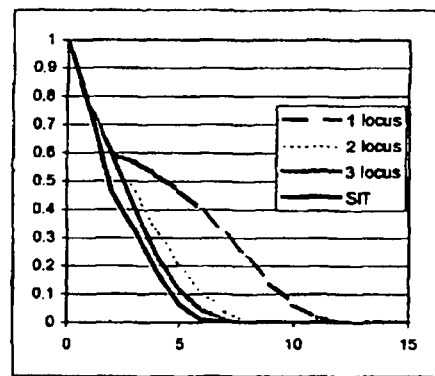


Fig 8e

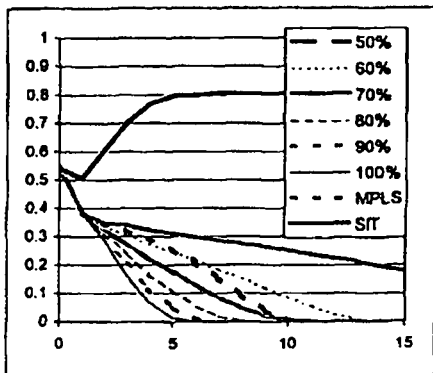


Fig 8f

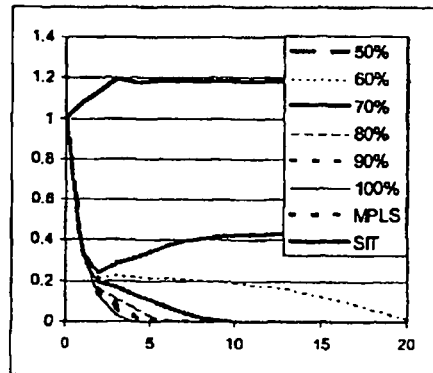


Fig 8g

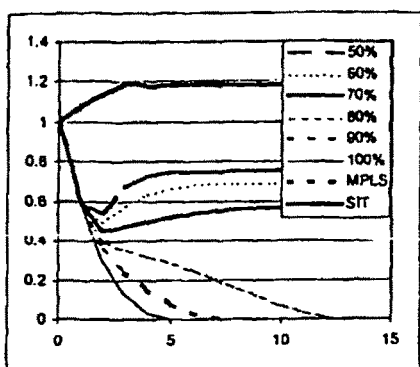


Fig 8h

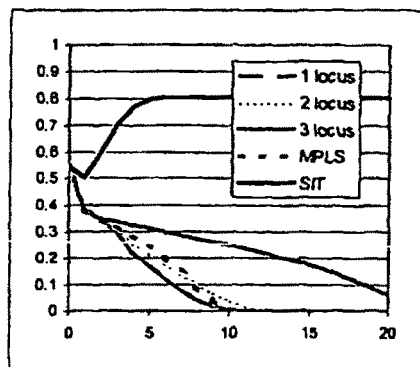


Fig 8i

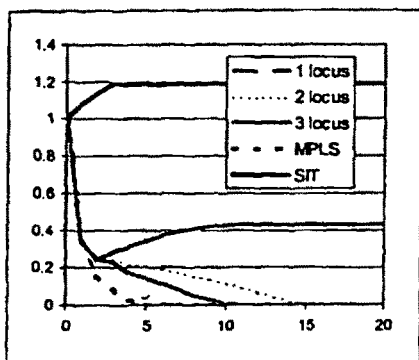
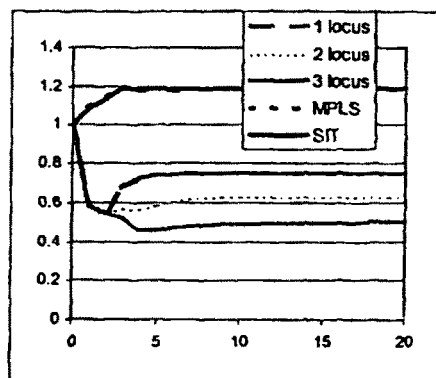


Fig 8j



ES 2 298 167 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Isis Innovation limited
5 <120> Control biológico
<130> wpp80474
<140> PCT/GB00/04541
<141> 29-11-2000
10 <150> GB 9928181.8
<151> 29-11-1999
<160> 12
15 <170> PatentIn versión 3.0
<210> 1
<211> 2412
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> ninguno
<222> (1)..(2412)
25 <223> ninguno

<400> 1
30 ctcgcgagttta ccactcccta tcagtgatag agaaaagtga aagtcgagtt taccactccc 60
 tatcagtgat agagaaaagt gaaagtcgag ttaccactc cctatcagtg atagagaaaa 120
 gtgaaagtcg agtttaccac tcctatcag tgatagagaa aagtgaaagt cgagtttagg 180
35 agtccctatc agtgatagag aaaagtgaaa gtcgcgagttta ccactcccta tcagtgatag 240

40

45

50

55

60

65

ES 2 298 167 T3

	agaaaagtga aagtcgagtt taccactccc tatcagtgat agagaaaagt gaaagtcgag	300
	ctcggtagcg ttaccgaagt atacacttaa attcagtgca cgtttgcttg ttgagaggaa	360
5	aggttgtgtg cggacgaatt ttttttgaa aacattaacc cttacgggct gcagtaaagt	420
	gcaagttaa gtgaatcaat taaaagtaac cagcaaccaa gtaaatcaac tgcaactact	480
	gaaatctgcc aagaagtaat tattgaatac aagaagagaa ctctgaatag ggaattggga	540
10	attgccacca tggctcaiai ggaattcatg gctaacagct acgacatacc cagt.tgggct.	600
	ggaaaaccgc cacttgctt acatctggat gtgctaaagg acgacaaact agtacaaaa	660
15	ctgatgggtg atgaaaaaag atgctatcta tttggtcgca acagtcaat gaacgacttc	720
	tgcatagacc atgcctcttg ttcgcggtc cactcggcgt ttgtctacca caagcacctc	780
	aacatagcct acctcgtgga tctggggctc actcatggca cctttattgg aacactcaga	840
20	ttggaagcgc acaagcccac acagctgcag attaatagca ccttccactt tggggcttct	900
	acccggaact acatactcag ggaacgacc tctggccacc acagcaacat catggaagac	960
	ctgccgctca gtgaaaccag cgatggcgct ctctgggcc tgcccgaag ccaaaccggag	1020
25	cttgataatc ttacagaata caacacggcc cacaatcggc gcatctcaat gctgggcatc	1080
	gatgatgata ccaatatgcy aaagcaaac gccttgaac agggacggcg cactcgaaat	1140
30	gtcacattta acgatgagga gattgtcatc aatcctgagg atgtggatcc taatgtggga	1200
	cgcttcagga acttggtaca aaccactgtg gtgcccgcca agagggtcg ctgcgacgtc	1260
	aaccatatgg gcatccattc gggcaacagc agtttgcca gtccaatgc cgcacatgta	1320
35	caccaaagt tccagcagag cctagttgac atgaagcagc agcatagga aatgcctccg	1380
	ccaatgcgg tgctccactc gctactaat tccctatata aaggtctacc ggccgaaatg	1440
	catggcaagg gtgacctaga gcccatctcc ccgctgagca ttggttcaa gttgggccta	1500
40	ttgtcccga atcctgcgcc tgaagtgtcg ccagtctatg acgaagctgt ggagacctcg	1560
	acattggctc aaaagttggc cgtcgctaat gcaaacgttc gtcgcttcgg tgaggatccg	1620
	catgactcga gtggcgaggg cgattcgtg tgcccacaga aaaagaaata cgccaaggaa	1680
45	gcatggccag gtcgcaagcc catgttgggg cagctgtaat tgcgtattaa caaataatt	1740
	aagattccac ctacgatttt ctcaagcata tgattgacaa cacactctgg agtaatattt	1800
	gtttattaga cttttaacgt aaaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1860
50	acgaatgctg cggcccctaa ttccagctga ggcgggtcg ctaccattac cagttggtct	1920
	ggtgtcgggg atccgtcgac taaggccaaa gagtctaatt tttgttcac aatgggttat	1980
55	aacatatggg ttatattata agtttgtttt aagtttttga gactgataag aatgtttcga	2040
	tcgaatattc catagaacaa caatagtatt acctaattac caagtcttaa tttagcaaaa	2100
	atgttattgc ttatagaaaa aataaattat ttattgaaa tttaaagtca actgttcatt	2160
60	taatgtcttg tagacttttg aaagtcttac gatacattag tatctatata catggttcat	2220

65

ES 2 298 167 T3

	tctacattct atattagtga tgatttcttt agctagtaat acattttaat tatattcggc	2280
	tttgatgatt ttctgatttt ttccgaacgg attttcgtag accctttcga tctcataatg	2340
5	gctcatttta ttgcgatgga cggtcaggag agctcgaatt aacggggatc cgtcgacctg	2400
	cagcccaagc tt	2412

<210> 2

10 <211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> ninguno

<222> (1)..(47)

<223> ninguno

20

<400>

gcggccgcac gggcccactc gagcacaagc ttcggtacca cgaattc

47

25

<210> 3

<211> 51

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> ninguno

<222> (1)..(51)

35

<223> ninguno

<400> 3

40

agctgaattc gtggtaccga agcttgtgct cgagagggcc cgtgcggccg c

51

<210> 4

<211> 27

45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <221> ninguno

<222> (1)..(27)

<223> ninguno

55

<400> 4

aattgccacc atggaattca ctagtgc

27

60

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<221> ninguno

ES 2 298 167 T3

	<222> (1)..(27)	
	<223> ninguno	
5	<400> 5	
	ggccgcacta gtgaattcca tgggtggc	27
10	<210> 6	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> ninguno	
	<222> (1)..(60)	
20	<223> ninguno	
	<400> 6	
25	ggccctcgag agaaggcctg cggccgctgt ggcgcgccag agtttaaaca gtcctgcagg	60
	<210> 7	
	<211> 60	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> ninguno	
35	<222> (1)..(60)	
	<223> ninguno	
	<400> 7	
40	gatccctgca ggactgttta aactctggcg cgccacagcg gccgcaggcc ttctctcgag	60
	<210> 8	
45	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<221> ninguno	
	<222> (1)..(14)	
	<223> ninguno	
55	<400> 8	
	ctagaagggc cctt	14
60	<210> 9	
	<211> 27	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> ninguno	

ES 2 298 167 T3

	<222> (1)..(27)	
	<223> ninguno	
5	<400> 9	
	aaacaattct gatagegtgc gcgttac	27
10	<210> 10	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> ninguno	
	<222> (1)..(34)	
20	<223> ninguno	
	<400> 10	
25	ggtaggcgcg cctggcgacc ggtggatccg aatg	34
	<210> 11	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> ninguno	
35	<222> (1) .. (24)	
	<223> ninguno	
	<400> 11	
40	aaacgaattc accaccaggc agtg	24
	<210> 12	
45	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<221> ninguno	
	<222> (1)..(32)	
	<223> ninguno	
55	<400> 12	
	ggaggcgcgc ctcaagtac cggcagctgt tc	32
60		
65		