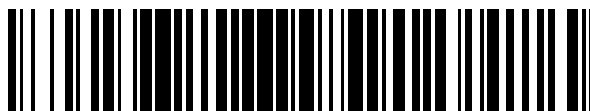


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 861**

51 Int. Cl.:
A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04732350 .6**
96 Fecha de presentación: **12.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1624749**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **Dilución de rasgos genéticos**

30 Prioridad:
12.05.2003 GB 0310880

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.04.2012

73 Titular/es:
**OXITEC LIMITED
2ND FLOOR, PARK GATE, 25 MILTON PARK
OXFORD OX14 4SH, GB**

72 Inventor/es:
ALPHEY, Luke

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 377 861 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

Dilución de rasgos genéticos

La presente invención se refiere a un método para controlar una población de insectos diana capaces de tener reproducción sexual, inhibiendo o revirtiendo la propagación de la resistencia a un pesticida en dicha población.

5 Continuamente se están buscando formas de controlar las plagas, y en especial las que atacan a cultivos importantes o que son capaces de propagar enfermedades. Con cada nueva estrategia descubierta para eliminar o neutralizar una plaga, se plantea el problema de que la plaga en cuestión desarrolle resistencia o se haga inmune a dicha estrategia.

10 Por ejemplo, la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* puede expresarse de manera satisfactoria en muchos cultivos importantes y es eficaz como pesticida, tanto cuando se utiliza como un pulverizado como cuando es expresada por la propia planta. Sin embargo, ya se han advertido casos de resistencia a la toxina *Bt* entre la población de las polillas de las coles (*Plutella xylostella*), por ejemplo. A medida que se propage la resistencia se tendrán que descubrir estrategias alternativas para controlar las poblaciones plaga.

15 Los genes de resistencia en general confieren un nivel de desventaja selectiva. Si éste no fuera el caso, entonces los genes ya estarían normalmente presentes a niveles sustanciales en la población, y se propagarían con muchísima rapidez en cuanto el uso de la toxina fuese algo habitual. Estos genes pueden ejercer su efecto bloqueando una vía concreta o evitando que una sustancia concreta atraviese la membrana celular, por ejemplo.

20 Incluso en el nivel más sencillo, en el que sólo un locus está asociado a la resistencia, la mayoría de los genes de resistencia muestran cierto grado de codominancia o dominancia parcial. Por tanto, las plagas que son heterocigóticas para el gen de resistencia siguen mostrando cierta resistencia a la toxina, en especial a nivel bajos de toxina. Este no siempre es el caso y cierta resistencia a *Bt*, por ejemplo, parece ser puramente recesiva, es decir, si el insecto no es homocigótico para la resistencia entonces no hay resistencia.

25 Por consiguiente, la propagación de la resistencia a menudo es difícil de detectar, puesto que solamente los insectos heterocigóticos para el gen de resistencia mostrarán sólo alguna ventaja selectiva en áreas en las que se emplea el pesticida y, para cuando el insecto homocigótico empieza a ser frecuente, una gran proporción de la población contendrá al menos un gen resistente, de forma que el efecto de hecho es que una población resistente ha aparecido "de la nada".

30 Se emplean diversas estrategias para minimizar la resistencia a pesticidas. Habitualmente, estas estrategias incluyen: procurar minimizar el uso, reduciendo con ello la presión selectiva para el desarrollo de la resistencia; el uso de diferentes toxinas en combinación, así como el desarrollo y la utilización de nuevos pesticidas, para no fomentar el desarrollo de resistencia frente a un pesticida concreto; el uso de toxinas en una formulación a alta concentración para aumentar el efecto sobre los individuos heterocigóticos o débilmente resistentes; y el uso de pesticidas dentro de un marco de gestión de plagas integrado.

35 Otros métodos para reducir el tamaño de la población plaga, tales como el uso de técnicas de insectos estériles (SIT) convencionales, también tienen el efecto de aumentar el nivel de endogamia, lo cual puede aumentar la tasa en que aparecen genotipos resistentes homocigóticos. Un problema concreto asociado con este técnica se relaciona con la aptitud, o la competitividad, de los insectos estériles, que puede ser tan baja como de una décima parte de la del tipo salvaje. Suponiendo que la cantidad eliminada en la siguiente generación mediante esta técnica puede ser sólo del 50%, por 100% de liberación por comparación numérica con la población salvaje, es necesario liberar una cantidad de varias veces en exceso la población indígena para que tenga un efecto significativo.

40 En fechas más recientes, en especial con el uso de los cultivos *Bt*, ha empezado a emplearse la "estrategia de dosis alta/refugio". En esta estrategia, se proporciona un "refugio" de plantas no transformadas, además de las plantas *Bt*. El objetivo es fomentar la proliferación de insectos sensibles, o de tipo salvaje, en las áreas refugio, de forma que los genes sensibles continúen fomentándose y propagándose por los insectos resistentes para diluir la aparición de resistencia. La "dosis alta" se refiere a las plantas, que proporcionan una dosis suficientemente alta de la toxina *Bt* como para matar a todos los insectos que son sólo heterocigóticos para la resistencia, obligando con ello a que la resistencia se convierta en un rasgo recesivo, es decir, sólo los insectos homocigóticos para el gen de resistencia sobrevivirán. Entonces, los genes sensibles que son portados por los insectos que se aparean en los refugios servirán para generar individuos heterocigóticos que no pueden sobrevivir en las plantas de dosis alta. El uso de la estrategia de dosis alta/refugio no excluye el uso complementario de pesticidas u otros métodos de control de plagas.

45 Los modelos de poblaciones demuestran que esta estrategia debería limitar en gran medida la propagación de la resistencia, pero en general sólo son eficaces para frenarla. Incluso con 50% de áreas refugio, la propagación completa de la resistencia sólo puede retrasarse en 10 años, tras lo cual puede esperarse que una resistencia sustancial o completa haya hecho que la toxina sea inservible.

55 Además, es probable que al usuario final le cueste mucho observar el cumplimiento de esta estrategia, ya que los

intereses comerciales inmediatos del agricultor no pasan por no utilizar ninguna estrategia de control de plagas o una estrategia subóptima, en un porcentaje significativo de la cosecha, para dejar que potencialmente 20% o más de la cosecha sea destruida por plagas, sólo para poder seguir utilizando esa misma toxina después de 10 años. Aunque este efecto puede mitigarse mediante el uso de otros pesticidas en los refugios, seguirá existiendo la tentación de no plantar refugios.

También existe la posibilidad de emplear una estrategia de “no dosis alta/refugio”, tal como se ha propuesto en fechas recientes con relación a un producto contra el gusano de la raíz del maíz, en la que algunos expertos han considerado que el tamaño apropiado del refugio debería ser 50%, puesto que el nivel de toxina *Bt* expresada sólo mata a aproximadamente la mitad de las larvas del gusano de la raíz. Por tanto, podría esperarse que cualquier tipo de resistencia se propagaría con rapidez. Sin embargo, no es probable que un refugio del 50% sea aceptable desde el punto de vista comercial en muchos sectores, lo cual ha conducido a requerir 20% de refugio que puede ser menos eficaz para detener la propagación de la resistencia.

El documento WO 01/39599 describe un método para controlar la población de una plaga, tal como un insecto, mediante la liberación de insectos que portan genes letales dominantes (RIDL). El gen letal dominante puede reprimirse bajo condiciones controladas pero tras su activación se expresa el fenotipo letal. Para que esta liberación de RIDL continúe siendo eficaz, el letal dominante generalmente es específico de sexo y suele elegirse para que mate a la progenie hembra. Sin embargo, con el tiempo puede surgir resistencia o tolerancia a cualquier gen específico utilizado en la técnica RIDL.

En la actualidad, cuando la resistencia comienza a aparecer, lo mejor que se puede hacer es frenar la propagación de la resistencia, siendo el cese del uso de la toxina o pesticida la única manera garantizada de detener la propagación de la resistencia. Resulta evidente la necesidad de nuevos métodos para frenar la propagación de la resistencia y, en particular, para prevenir o incluso reducir o eliminar una resistencia establecida.

De manera sorprendente, ahora se ha descubierto que, cuando una plaga se reproduce sexualmente, y en especial cuando los vehículos de los genes de resistencia tienen menos aptitud que el tipo salvaje bajo condiciones no selectivas para la resistencia, entonces la simple introducción del tipo salvaje en una población resulta suficiente para reducir o prevenir la propagación de la resistencia y, a unos niveles suficientemente altos, es incluso capaz de eliminar una resistencia establecida.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar una población de insectos diana capaz de tener reproducción sexual, comprendiendo dicho método:

inhibir o revertir la propagación, en dicha población, de un primer rasgo genético de resistencia a un pesticida, de tipo no salvaje, mediante la introducción de individuos sexualmente compatibles que son sustancialmente homocigóticos para un homólogo sensible de tipo salvaje del rasgo de resistencia en la población diana; teniendo la forma heterocigótica del rasgo de resistencia un nivel de aptitud asociado menor en comparación con los homocigóticos resistentes en presencia del pesticida, y teniendo ambas formas homocigótica resistente y heterocigótica un nivel de aptitud asociado menor en comparación con la forma homóloga homocigótica sensible en ausencia del pesticida;

comprendiendo además dicho método:

el tratamiento con el pesticida y el uso de plantas refugio para permitir la supervivencia de los miembros no resistentes de la población;

en el que los individuos liberados en la población diana son transgénicos modificados para que porten un segundo rasgo que es letal dominante, o que produce una aptitud media menor en al menos una generación posterior.

Este método se diferencia del simple uso de refugios porque se garantiza que los individuos liberados en la población diana están exentos, o sustancialmente exentos, de resistencia. En contraste, con el uso de refugios, no existe selección contra el fenotipo de resistencia que no sea la aptitud relativa del genotipo que porta. Por tanto, generalmente, niveles cada vez mayores de insectos que portan al menos una copia del gen de resistencia formarán la población que caracteriza al refugio de modo que, en último término, la resistencia será la norma.

En contraste, el método de la presente invención garantiza una afluencia pura, o sustancialmente pura, de individuos homocigóticos para el gen sensible, diluyendo con ello el acervo del gen de resistencia. Con el uso continuado del método, el simple hecho de que los individuos que portan genes de resistencia tienen unos niveles de aptitud menores en ausencia del agente selectivo, combinado con la simple dilución del alelo de resistencia, restringirá, evitará o incluso revertirá la propagación de la resistencia. Shelton, A.M. *et al.* (Nature Biotech., vol. 18, nº 3, marzo de 2000, pp. 339-342) describen ensayos de campo realizado en plantas que expresan *Bt* centrados en el uso de refugios y los efectos de diversos tamaños de refugios y pulverizaciones sobre poblaciones mixtas de insectos. Hubo insectos que “inmigraron hacia sus ensayos de campo” involuntariamente. A pesar de esto, no se indica que se liberasen individuos susceptibles de tipo salvaje en la población diana. La única mención a la liberación de insectos es en el contexto de “augmentar la frecuencia del alelo R (resistente)”. La presente invención reduce la frecuencia del

- alelo R (resistente) mediante la liberación de individuos de tipo salvaje sustancialmente homocigóticos. Las soluciones a los problemas del tamaño de los refugios se describen como “técnicamente difíciles” o requerirían “dos o más toxinas”, aumentando con ello los costes o la replantación. El documento WO 01/39599 (*supra*) indica el uso de letales dominantes en métodos de control de poblaciones. No se mencionan pesticidas y las toxinas se refieren a los propios genes letales, no a un factor externo contra el que pueda desarrollarse una resistencia. No se indica la liberación de individuos de tipo salvaje sustancialmente homocigóticos sensibles al pesticida, el tratamiento con pesticidas ni la utilización de refugios.
- Robinson, A.S. (*Mutation Res.*, vol. 511, nº 2, junio de 2002, pp. 113-132) proporciona un análisis inicial sobre pesticidas, pero después se centra en la inducción de genes estériles o letales dominantes produciendo mutaciones mediante irradiación o genética, y su uso en métodos de SIT. Las SIT implican la liberación de insectos, pero nadie ha pensado en liberar tipos salvajes sensibles sustancialmente homocigóticos. En Alphey, L. *et al.* (*Mol. & Biochem. Parasitology*, vol. 121, nº 2, mayo de 2002, pp. 173-178), se presenta un análisis de la técnica en ese momento, y analiza las SIT y promociona los métodos de RIDL. De nuevo, no se indica la liberación de tipos salvajes sensibles sustancialmente homocigóticos.
- Los individuos heterocigóticos para el gen o genes de resistencia en general tienen una aptitud mucho menor sobre la toxina que los homocigóticos que, combinado con el efecto de dilución que disminuye en gran medida el número de homocigóticos resistentes, tiende a reducir la aptitud global del alelo de resistencia. Sin la introducción de más individuos de tipo salvaje según la invención, la frecuencia de los individuos homocigóticos aumenta notablemente más allá de cierto punto. No obstante, el tipo salvaje introducido diluye a los heterocigóticos y los homocigóticos, evitando en gran medida el escalado del número de homocigóticos, estando los heterocigóticos menos aptos en desventaja en presencia de la toxina (frente a los homocigóticos) y en su ausencia (frente al tipo salvaje).
- Este efecto es el resultado no sólo de reducir la frecuencia del alelo, sino también porque evita que la población alcance el equilibrio de Hardy-Weinberg. Con el uso continuado del método, el simple hecho de que los individuos liberados no portan alelos de resistencia, y así se tiende a reducir a diluir a los alelos de resistencia dentro del población, y en particular la frecuencia relativa con la que surgen individuos homocigóticos resistentes, inhibirá e incluso revertirá la propagación de resistencia.
- Las poblaciones de insectos diana adecuadas en general serán poblaciones salvajes, tales como mosquitos, por ejemplo, pero pueden ser cualquier población adecuada en la que se desee controlar la propagación de un rasgo de resistencia a un pesticida.
- “Sexualmente compatible” significa que los individuos introducidos en la población son capaces de manifestar reproducción sexual con los miembros de la población diana. Los individuos son preferiblemente de la misma especie, pero esto no resulta fundamental, con la condición de que sea posible una descendencia fértil o parcialmente fértil.
- Tal como se emplea en la presente, “no apto” y las expresiones y los términos relacionados pueden referirse a la simple letalidad, o también pueden referirse a características que, aunque no matan al insecto, hacen que sea sustancialmente no apto para la reproducción, tales como ceguera, incapacidad de volar, y esterilidad, incluyendo la transformación sexual, o cualquier otra propiedad o característica que haga que no sean competitivos o que sean menos que totalmente vigorosos bajo al menos algunas circunstancias.
- El término “aptitud”, tal como se emplea en la presente, se refiere en general a la cantidad de progenie viable capaz de ser producida en la siguiente generación comparado con el tipo salvaje, que se considera que tiene una aptitud relativa de 1, en ausencia de cualquier agente selectivo. Las consideraciones de la aptitud pueden complicarse, por ejemplo, cuando se hereda un gen letal dominante que mata a una parte de la generación pero no a otra. Los que vivan pueden ser 100% aptos pero la aptitud global, o media, puede considerarse del 50% si la mitad de la siguiente generación muere como resultado de haber heredado el gen letal. Los rasgos de resistencia a pesticidas que tienen unos niveles de aptitud menor que 1 son dianas particularmente preferidas para la presente invención.
- El homólogo sensible de tipo salvaje será, en general, un gen o el gen que se encuentra en el tipo salvaje que no tiene una desventaja de aptitud, o que no tiene una desventaja de aptitud tan grande, en ausencia del pesticida para el cual se desea inhibir o revertir la propagación de su resistencia.
- Los heterocigóticos tendrán una aptitud menor comparada con los individuos homocigóticos para la resistencia, en presencia del pesticida. Esta menor aptitud en presencia del pesticida reducirá el acervo del gen para la resistencia, rellenándose el acervo por genes de tipo salvaje, o sensibles, en los individuos liberados, reduciendo o evitando con ello la propagación de la resistencia. La resistencia incluso puede eliminarse mediante este método.
- El homólogo sensible es el correspondiente tipo salvaje del rasgo que se va a inhibir o revertir, y está asociado con niveles mayores de aptitud bajo condiciones no selectivas para el rasgo (es decir, en ausencia del pesticida).
- El método puede ser lento a la hora de producir resultados en poblaciones que presentan un retraso significativo entre generaciones. Por tanto, se prefiere que las poblaciones a las que se dirija el método de la presente invención tengan al menos un ciclo de reproducción anual, y preferiblemente que tengan dos o más ciclos de reproducción

anuales.

5 Una ventaja concreta de la presente invención es que cualquier forma de resistencia a pesticidas puede mitigarse. Esto también puede incluir la resistencia al método de la presente invención, y las resistencias múltiples, incluso cuando no se ha reconocido una condición resistente, siempre que se incluya la presente resistencia a pesticidas. El efecto de la presente invención es particularmente notable cuando el individuo homocigótico, y en especial el heterocigótico, sufre una desventaja de aptitud en ausencia del pesticida al cual se confiere resistencia, comparado con el tipo salvaje.

10 Los métodos de la invención tienen la ventaja concreta de que pueden superarse múltiples resistencias de una vez (además de la presente resistencia a un pesticida), incluso cuando no se conozca o no se haya reconocido otra resistencia concreta puesto que, con la condición de que esté presente el homólogo de tipo salvaje para el otro gen de resistencia, se diluirá cualquier otro gen de resistencia presente. Cualquier otra resistencia puede tratarse, incluso la resistencia a los métodos de la invención.

15 De forma similar, el uso de los métodos de la invención en general también dará como resultado la represión de la propagación de cualquier nueva mutación que pueda aparecer, si esa mutación tiene una menor aptitud. Sin embargo, las mutaciones sin desventaja de aptitud también se verán diluidas.

20 La presente invención puede aplicarse a las resistencias complejas, que implican a dos o más genes, al igual que a las resistencias sencillas que implican sólo a un locus. Sólo es necesario que los individuos liberados en la población diana sean homocigóticos para un gen de resistencia a un pesticida de tipo salvaje. Sin embargo, se prefiere que los individuos liberados sean homocigóticos para los homólogos de tipo salvaje de dos, tres o más, y preferiblemente todas las resistencias complejas, o rasgos, que puedan observarse.

Se apreciará que los términos "resistencia" y "rasgo" se emplean de manera intercambiable en la presente, y que cualquier referencia al término "resistencia", o una expresión equivalente, incorpora la referencia a cualquier rasgo adecuado al que pueda dirigirse la presente invención, a menos que sea evidente de otra forma.

25 Los pesticidas adecuados contra los que pueda generarse resistencia incluyen pesticidas y agentes de control naturales y fabricados, tales como agente de represión o de control del crecimiento, e incluyen toxinas naturales, tales como la toxina Bt, tanto si la toxina es heteróloga u homóloga al cultivo. La presente invención puede dirigirse a cualquier forma de resistencia codificada genéticamente.

30 El método de la presente invención emplea refugios para permitir que los genes "sensibles" de tipo salvaje aumenten su frecuencia. El uso de refugios resulta particularmente ventajoso cuando el pesticida está presente en altas dosis y no existe otra fuente de alimento natural para la plaga.

En general, sólo serán necesarios refugios pequeños para una condiciones óptimas, y con frecuencia será suficiente no utilizar ningún refugio plantado deliberadamente, como cuando estén disponibles fuentes de alimento alternativas, tales como plantaciones domésticas, o cuando existe una afluencia significativa de individuos no resistentes.

35 Los refugios pueden tener cualquier tamaño apropiado, según lo determinen los expertos en la técnica. Como guía, unos tamaños adecuados, expresados como un porcentaje de área de plantación total, estarán entre 0,1% y 50%, más preferiblemente ente 1% y 20%, siendo preferido un tamaño de aproximadamente 5%.

40 El tamaño de cualquier refugio también puede depender de la localización y del tamaño de las matas. Por ejemplo, puede resultar suficiente simplemente mezclar 5% de semillas no-Bt con un suministro de semillas Bt, cuando el método sea para combatir la propagación de la resistencia a Bt. Cuando un refugio está diferenciado de la plantación principal, entonces puede resultar deseable un tamaño del 10% o mayor.

45 Los individuos que se van a liberar en las poblaciones diana preferiblemente son totalmente homocigóticos para el homólogo de tipo salvaje del gen de resistencia, pero se apreciará que existe cierta probabilidad de que pueda estar presente un nivel bajo del gen de resistencia en los individuos cultivados. Esto en general no resulta deseable, y puede eliminarse sustancialmente de forma completa mediante la elección adecuada de las variedades para la reproducción y de las condiciones de reproducción que preferiblemente deberían implicar la ausencia completa de la toxina apropiada para el gen de resistencia.

También pueden utilizarse métodos para controlar las variedades cultivadas para asegurarse de que el gen de resistencia se mantenga a niveles mínimos, o preferiblemente a un nivel cero.

50 En general, no resulta deseable liberar grandes cantidades de plagas de tipo salvaje, aunque el resultado final sea eliminar la resistencia a un pesticida concreto. Una gran cantidad de mosquitos, por ejemplo, o de plagas que se alimentan de cultivos, a menudo puede no considerarse ventajoso.

De manera sorprendente, se ha establecido que la liberación de individuos, o insectos, con genes letales dominantes pero que portan el homólogo de tipo salvaje de la presente invención para el rasgo diana no sólo

controla, o tiende a controlar, la población sino que también previene, reduce o revierte la incidencia de la resistencia en la población.

5 Por tanto, en el presente método, los individuos liberados en la población diana portan un rasgo letal dominante, o un rasgo que da como resultado una menor aptitud al menos en algunos individuos en al menos una generación posterior. No se prefiere una letalidad del 100% en la generación F₁.

10 Resulta particularmente preferido que el gen de tipo salvaje sensible no esté vinculado de forma apreciable al gen letal dominante. Preferiblemente, el gen sensible, o de tipo salvaje, está en un cromosoma diferente del gen letal dominante, o se retira sustancialmente del gen letal dominante si está en el mismo cromosoma. Por tanto, a medida que el gen es llevado a través de las generaciones, el rasgo de resistencia acabará asociado con el letal dominante en hasta la mitad de individuos que portan el letal dominante, de forma que las copias del gen serán eliminadas en las generaciones posteriores en que el gen letal mate a la progenie, tal como a toda la progenie hembra en el caso de un gen letal dominante específico de hembras 100% eficaz.

15 Por tanto, se ha descubierto que aumenta el control eficaz, de modo que la liberación de individuos que portan un gen letal dominante y que portan un gen de tipo salvaje adecuado proporciona un método sinérgico para controlar una población plaga.

20 Se prefiere que el rasgo letal no confiera una tasa de mortalidad del 100% a la generación inmediata posterior antes de que la generación tenga oportunidad de reproducirse sexualmente. Resulta aceptable que las tasas de mortalidad sean altas, quizás tanto como 99%, por ejemplo, pero si el gen homólogo de tipo salvaje sensible no ha pasado a las siguientes generaciones entonces no habrá ningún impacto sobre la propagación de la resistencia que no sea a través de la reducción de la población.

Por tanto, se apreciará que la SIT no se prefiere en general como vehículo para los genes homólogos de tipo salvaje sensibles, puesto que la SIT en general no produce una introgresión de ningún genotipo. Sin embargo, puede emplearse una técnica de SIT en la que los individuos simplemente tengan una capacidad comprometida, en lugar de totalmente eliminada, para reproducirse.

25 Otro método adecuado para combinarse con el método de la presente invención es el de la esterilidad de la F₁, que tiene un uso concreto con lepidópteros, en el que una dosis baja de radiación es suficiente para esterilizar a las hembras pero no a los machos. Sin embargo, con la selección correcta de la dosis de radiación, la progenie femenina de los machos irradiados también serán estériles.

30 En otra técnica, los individuos cultivados bajo condiciones controladas pueden ser homocigóticos para un gen letal y un represor apropiado para éste. En general se prefiere que éstos no estén vinculados de forma que, aunque la generación F₁ sobreviva, la generación F₂ tendrá una mortalidad del 25%, suponiendo un emparejamiento sólo con tipos salvajes.

Más preferiblemente, la presente invención contempla el uso de genes letales dominantes reprimibles, o condicionales, en combinación con los métodos de la invención.

35 Los genes letales dominantes adecuados en general son controlados por las condiciones ambientales, tales como la temperatura, el ciclo de luz diurna o los componentes en la dieta, tales como la tetraciclina. Los sistemas adecuados que pueden adaptarse para su uso en la presente invención incluyen los descritos por Heinrich *et al.* (PNAS (2000), 97, vol. 15, 8229-8232), y Thomas *et al.* (Science (2000), 287, 2474-2476). También se contempla la construcción o activación, antes de la liberación, de un gen letal, por ejemplo un gen letal específico de hembras, mediante el uso de recombinasas específicas de sitio, tales como Flp/FRT o cre/lox. Por tanto, también se contempla la construcción o la activación *in vivo* de un gen letal mediante el uso de recombinasas específicas de sitio u otros agentes modificadores del ADN.

40 En general, se prefiere que el gen letal dominante sea selectivo, y en general se prefiere que la selectividad sea hacia las hembras, para reducir la cantidad de progenie. Sin embargo, la presente invención también contempla genes letales dominantes específicos de machos.

45 En ciertas circunstancias, se apreciará que puede resultar deseable marcar el gen de tipo salvaje o el gen letal dominante, para seguir su avance a través de la población diana. Los marcadores adecuados son muy conocidos, tales como tintes o marcadores fenotípicos. Se apreciará que dichos marcadores deben estar lo más vinculados posible al gen, para asegurarse de que, en efecto, estén marcando la transferencia del gen. Así, se apreciará que el marcador preferiblemente esté inmediatamente adyacente al gen seleccionado.

50 Los individuos adecuados para la liberación en poblaciones diana pueden criarse mediante cualquier medio reconocido. Cuando los individuos portan un gen letal dominante, entonces éste en general debe reprimirse, en la medida de lo posible, durante la preparación de la población de liberación para maximizar el rendimiento. En algunas circunstancias, puede resultar apropiado retirar cualquier represión antes de la liberación para permitir que la generación final se vea afectada, tal como en el caso de genes letales específicos de hembras, de forma que sólo los "portadores" macho se liberen en la población diana. Esto resulta particularmente apropiado cuando las propias

ES 2 377 861 T3

hembras son la plaga, tal como en mosquitos y la mosca del Mediterráneo, por ejemplo.

Las poblaciones adecuadas que pueden tratarse incluyen las de las siguientes especies:

- 5 Mosca califórda australiana (*Lucilia cuprina*)
- Gusano barrenador del ganado del Nuevo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*)
- Gusano barrenador del ganado del Viejo Mundo (*Chrysomya bezziana*)
- Mosca tse-tsé (*Glossina spp.*)

- 10 Mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*)
- Mosca de la cara (*Musca autumnalis*)
- Otras especies de *Musca* (por ejemplo, *Musca domestica*)
- Mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*)

- 15 Mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*)
- Mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*)
- Mosquitos de la malaria (por ejemplo, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles funestus*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles dirus*, *Anopheles albimanus*)
- Otros mosquitos vectores de enfermedades (por ejemplo, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*)

- 20 Escarabo japonés (*Popilla japonica*)
- Gusano blanco del frejol (*Graphognathus spp.*)
- Gorgojo del algodón (*Anthonomus grandis*)
- Gusanos de la raíz del maíz: occidental (*Diabrotica virgifera virgifera*), norteño (*Diabrotica barberi*), sureño (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) y mejicano (*D. virgifera zea*)
- Picudo rojo (*Rhynchophorus ferrugineus*)
- Tetuán del boniato, gorgojo del camote (*Cylas formicarius*, *Euscepes postfasciatus*)
- Escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*)
- 25 Perforador de los pinos (*Tomicus piniperda*)
- Taladrador de las meliáceas (*Hypsipyla robusta*)
- Gorgojo de la harina (*Tribolium confusum*)
- Gorgojo del guisante (*Bruchus pisorum*)
- Barrenadores de los granos (*Prostephanus truncatus*, *Rhyzopertha dominica*)
- 30 Carcoma achatada (*Cryptolestes ferrugineus*)
- Gorgojos del granero y del arroz (*Sitophilus spp.*)

- 35 Mosca negra de los cítricos (*Aleurocanthus woglumi*)
- Mosca oriental de la fruta (*Dacus dorsalis*)
- Mosca del olivo (*Dacus oleae*)
- Mosca del melón, mosca de frutas tropicales (*Dacus cucurbitae*, *Dacus zonatus*)
- Mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*)
- Mosca de Natal (*Ceratitis rosa*)
- Mosca de la cereza (*Rhagoletis cerasi*)
- Mosca de Queensland (*Bactrocera tryoni*)
- Mosca del Caribe (*Anastrepha suspensa*)
- 40 Mosca de la carambola (*Bactrocera carambolae*)
- Mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*)
- Mosca de la cebolla (*Delia antiqua*)
- Moscas del champiñón (*Lycoriella mali*, *Lycoriella auripila* y *Megaselia spp.*)
- Otras moscas de la fruta (*Tephritidae*)

- 45 Lagarta peluda (*Lymantria dispar*)
- Carpocapsa del manzano (*Cydia pomonella*)
- Oruga del zurrón (*Euproctis chrysorrhoea*)
- Perforador amarillo del vástago (*Tryporyza incertulas*)
- Gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*)
- 50 Gusano de la naranja navelina (*Amyelois transitella*)
- Minadora del melocotonero (*Anarsia lineatella*)
- Poliilla pintada de la manzana (*Teia anartoides*)
- Gusano cogollero, gusano del maíz (*Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*)
- Perforador mayor de la bellota (*Heliothis virescens* - y otros heliotinos)
- 55 Gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*)
- Poliilla de la patata (*Phthorimaea operculella*)
- Barreneta (*Ectomyelois ceratoniae*)
- Poliilla oriental del melocotonero (*Grapholita molesta*)
- Poliilla de la col (*Plutella xylostella*)
- 60 Palomilla bandeada (*Plodia interpunctella*)

Moscas blancas de los invernaderos (por ejemplo, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*)

Garrapata común de los bovinos (*Boophilus microplus*) y otras garrapatas de importancia veterinaria

y

Piojos de los libros (*Liposcelis spp.*).

5 Las cantidades adecuadas para la liberación en general se calculan según el tamaño esperado de la población en la que se van a liberar. Con métodos tales como la SIT, estos tamaños generalmente son entre 5 y >100 veces el tamaño de la población diana. Utilizando el método de la presente invención, con un gen letal dominante específico de sexo y 50% de refugios, sólo es necesario liberar una cantidad de individuos que se corresponde con 0,3 (3/10 ó 30%) del tamaño de la población diana para revertir completamente la propagación de algunos tipos de resistencia.

10 Este número depende de muchos factores, incluyendo la aptitud relativa y el tamaño de los refugios, de modo que los tamaños de liberación variarán necesariamente y tendrán diferentes eficacias, según estos parámetros. Unas liberaciones del 10% y menores también tienen un efecto significativo sobre la propagación de muchos tipos de resistencia.

15 Los cálculos del tamaño a menudo serán aproximados, puesto que es posible que las densidades de las poblaciones sólo se conozcan aproximadamente y que no resulte evidente hasta dónde penetrarán los individuos liberados en la población diana.

Por consiguiente, cuando no haya un peligro inminente para el desarrollo de resistencia, por ejemplo, unas liberaciones tan bajas como 0,1%, por ejemplo, pueden ser suficientes para evitar el desarrollo de resistencia, aunque en general se prefiera una liberación del 1% y 10% con un objetivo de control. Cuando existe un peligro, o cuando la liberación se acompaña de otro medio de control, tal como RIDL, entonces se prefieren unas liberaciones entre 10% y 10.000%, siendo más preferidas del 30% al 5.000%, en especial del 50% al 1000%. Estas liberaciones pueden repetirse las veces que sean necesarias, generalmente una vez por cada generación, aunque serán evidentes otros regímenes para los expertos en la técnica.

20

Los valores utilizados para calcular los números de liberación dependen de diversos parámetros, en especial de la competencia relativa (C) de los individuos liberados, y de la tasa reproductora de la población salvaje (R_0). Ninguna es fácil de medir pero pueden obtenerse estimaciones, en particular a medida que se desarrolla el programa. En general, se prefiere que la tasa de liberación sea mayor, y preferiblemente mayor sustancialmente que $(R_0-1)/C$. La competitividad relativa puede ser en general de 0,1-0,5, mientras que R_0 varía según la especie, pero en general estará en el intervalo de 1,5-10. Entonces, unas tasas mínimas de liberación apropiadas serán de 1-90 (100% al 9.000%) para el control de la población, pero la gestión de la resistencia en general será eficaz a unas tasas considerablemente menores. El control de la población también será eficaz a unas tasas menores cuando se combina RIDL con otro método de control, tal como el uso de Bt u otra toxina, que a menudo será el caso cuando se empleen los métodos de la invención.

25

30

Tal como se emplea en la presente, R_0 es el máximo de la tasa reproductora media bajo condiciones normales, es decir, sin tomar en cuenta efectos dependientes de la densidad, y se reducirá en presencia de una toxina, por ejemplo. Si R_0 no fuera mayor que 1 bajo condiciones normales, la población no se expandiría y no es probable que se considerase una plaga.

35

Cuando en la presente se hace referencia a reducir o eliminar una resistencia, se entenderá que esto incluye el uso de los métodos de la presente invención en circunstancias en las que ya exista una resistencia significativa. Por ejemplo, la frecuencia de un alelo de resistencia en una población en la que ya alcanzado un nivel económicamente significativo, por ejemplo, 20%-99%, puede reducirse mediante la liberación de cantidades preferiblemente muy grandes de individuos sensibles. Esto puede realizarse de modo ventajoso junto con la reducción, por ejemplo hasta cero, del uso del tratamiento contra el cual se ha desarrollado la resistencia. El uso de la invención, en especial cuando los individuos liberados portan un gen letal dominante, siempre tiende a aumentar la tasa en que se elimina, o se elimina sustancialmente, el alelo de resistencia, o se reduce por debajo de un umbral económico en una población, y puede utilizarse para reducir la frecuencia del alelo de resistencia bajo circunstancias en las que, sin esta liberación, aumentaría su frecuencia.

40

45

Los métodos de la invención también son adecuados para asegurar, o estimular el cumplimiento por parte del agricultor, puesto que no es necesario que sea responsable del tratamiento, y los expertos en la técnica pueden determinar el mejor programa para la protección frente al desarrollo de resistencias en cualquier escenario geográfico.

50

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un ciclo de vida sencillo en el modelo básico de la selección de Bt.

La figura 2 muestra los genotipos en el modelo de liberación RIDL.

La figura 3 muestra un modelo de refugios y liberación RIDL.

La figura 4 es un ejemplo de los efectos de una proporción de liberación RIDL 1:10 sobre la evolución de la resistencia.

5 La figura 5 muestra diferentes tamaños de refugios y el impacto de diferentes proporciones de liberación RIDL requeridos para reducir la frecuencia del alelo r .

La figura 6 ilustra el efecto de la proporción de liberación RIDL.

La figura 7 ilustra los efectos de la frecuencia inicial de un alelo de resistencia.

La figura 8 ilustra la reversión de una resistencia establecida.

10 La figura 9 ilustra los efectos simultáneos de la liberación RIDL sobre (a) la dilución de la resistencia, y (b) la represión de la población bajo dos estrategias de liberación RIDL diferentes.

La invención se ilustrará a continuación más a fondo con respecto a los ejemplos no limitantes adjuntos, que sólo tienen un objetivo ilustrativo.

Ejemplo 1: Un marco de trabajo de genética de poblaciones para estudiar los efectos de los refugios y la liberación RIDL sobre la gestión de la resistencia a Bt en una población plaga

15 ***Estructura del modelo y suposiciones***

Se establece la suposición de que la población del insecto plaga está distribuida al azar a través de una población de cultivo fijada, expresando una proporción Φ de ésta las toxinas Bt . El tamaño del refugio del cultivo convencional (no- Bt) sería, por tanto, $1-\Phi$. Dentro de la población de insectos, la susceptibilidad a las toxinas Bt en la etapa larvaria se supone que es controlada por un único locus autosómico que existe en forma de dos alelos: sensible, S , y resistente, r . Por tanto, existen tres genotipos en la población salvaje: SS , Sr y rr .

20 También se supone que todos los costes de aptitud asociados con los alelos S y r en los cultivos Bt y no- Bt actúan antes de la etapa adulta, por ejemplo durante la etapa larvaria. Bajo la suposición de una distribución aleatoria de larvas a través de los cultivos Bt y no- Bt , la aptitud relativa media, Ω , de las larvas de genotipo i es:

$$\Omega_i = [\omega_i\Phi + \nu_i(1 - \Phi)], \quad (\text{ec. 1})$$

25 en la que ω_i es la aptitud relativa de las larvas en las raíces de los cultivos Bt , y ν_i es la aptitud relativa de las larvas en las raíces de los cultivos no- Bt (que se considera igual a 1 para el genotipo SS de tipo salvaje).

Si la frecuencia del alelo de resistencia r es p en la generación adulta t , entonces, suponiendo que no haya mutación, el cambio en la frecuencia del alelo en la generación $t+1$, Δp , viene dado por:

$$\Delta p = \frac{p_t^2\Omega_{rr} + p_tq_t\Omega_{sr}}{q_t^2\Omega_{SS} + 2p_tq_t\Omega_{sr} + p_t^2\Omega_{rr}} - p_t, \quad (\text{ec. 2})$$

30 en la que $q_t = 1 - p_t$. Un marco de trabajo conceptual sencillo para el modelo se muestra en la figura 1 que aparece a continuación.

Frecuencia del alelo en equilibrio

Considerando la ecuación 2 igual a cero y resolviéndola con respecto a p , se pone de manifiesto que existen tres puntos fijados de frecuencia, p^* , en los que $\Delta p = 0$. Estos puntos fijados son $p^* = 0$, p y 1, siendo:

$$p = \frac{(\nu_{sr} + \omega_{sr}\Phi - \nu_{sr}\Phi - \omega_{SS}\Phi + \Phi - 1)}{(2\nu_{sr} - 2\nu_{sr}\Phi + 2\omega_{sr}\Phi + \nu_{rr}\Phi - \omega_{rr}\Phi - \omega_{SS}\Phi - \nu_{rr} + \Phi - 1)}. \quad (\text{ec. 3})$$

35 La estabilidad de estos equilibrios depende de la aptitud relativa de los diferentes genotipos en los cultivos Bt (ω_i) y no- Bt (ν_i) y la proporción de cultivos que expresan Bt (Φ).

Equilibrio intermedio estable

De manera importante, p sólo existe como un equilibrio estable entre 0 y 1, si la proporción de *Bt* se encuentra entre un umbral crítico inferior, Φ_1 , y superior, Φ_2 , con la condición de que $\Phi_1 < \Phi_2$.

Los umbrales críticos inferiores pueden determinarse considerando p igual a 0 en la ecuación 3, y resolviéndola con respecto a Φ para producir:

$$\Phi_1 = \frac{(1 - v_{sr})}{(1 - v_{sr} + \omega_{sr} - \omega_{ss})} \quad (\text{ec. 4})$$

5

De manera similar, los umbrales críticos superiores pueden determinarse considerando p igual a 1 en la ecuación 3, y resolviéndola con respecto a Φ para producir:

$$\Phi_2 = \frac{(v_{rr} - v_{sr})}{(v_{rr} - v_{sr} + \omega_{sr} - \omega_{rr})} \quad (\text{ec. 5})$$

10 Cuando $\Phi_1 < \Phi_2$, entonces si la proporción de los cultivos *Bt* se encuentra entre Φ_1 y Φ_2 , la frecuencia del alelo *r* se asentará en un equilibrio estable, $p^* = p$, que es mayor que cero y menor que 1. Sin embargo, si la proporción de los cultivos *Bt* es menor que Φ_1 , la frecuencia del alelo de resistencia disminuirá hasta la extinción (es decir, $p^* = 0$). A la inversa, si la proporción de los cultivos *Bt* es mayor que Φ_2 , el alelo de resistencia finalmente se fijará (es decir, $p^* = 1$).

Equilibrio intermedio inestable

15 Sin embargo, el punto fijado p es inestable si $\Phi_1 \geq \Phi_2$, y así el alelo resistente finalmente se extinguirá o se fijará. Bajo condiciones inestables, el alelo resistente sólo se propagará si la frecuencia p es mayor que p . Por tanto, se puede derivar un tercer umbral para la proporción de los cultivos *Bt*, Φ_3 , que determina si el alelo resistente se fijará o se extinguirá, con la condición de que $\Phi_1 \geq \Phi_2$. Considerando que $p = p$ en la ecuación 3 y resolviéndola con respecto a Φ , se puede demostrar que:

$$\Phi_3 = \frac{(v_{sr} - 2pv_{sr} + pv_{rr} + p - 1)}{v_{sr} - \omega_{sr} + \omega_{ss} + p - 2pv_{sr} - p\omega_{rr} + pv_{rr} + 2p\omega_{sr} - p\omega_{ss} - 1} \quad (\text{ec. 6})$$

20

25 Así, cuando la frecuencia en equilibrio p es inestable (es decir, cuando $\Phi_1 \geq \Phi_2$), el alelo resistente se propagará hasta su fijación si la proporción de los cultivos *Bt* es mayor que Φ_3 . Si $\Phi < \Phi_3$, la frecuencia del alelo resistente disminuirá hasta la extinción. Por último, si $\Phi = \Phi_3$, la frecuencia permanecerá constante, aunque ligeras perturbaciones en Φ por encima o por debajo del umbral crítico Φ_3 provocarán la fijación o la extinción, respectivamente, del alelo *r*.

Recesividad completa

Si $\omega_{sr} = \omega_{ss}$ (o $\omega_{sr} = \omega_{ss} = 0$), y $v_{sr} = v_{ss} = 1$, entonces de nuevo se determina la fijación con respecto a Φ_3 . En este caso especial de recesividad completa en los fenotipos expresados en los cultivos *Bt* y no-*Bt*, entonces $\Phi_1 = \Phi_2$. Esto se puede demostrar sustituyendo en la ecuación 5 para dar:

$$\Phi_2 = \frac{1 - v_{rr}}{(1 - v_{rr}) + (\omega_{rr} - \omega_{sr})} \quad (\text{ec. 7})$$

30

De manera similar, se puede sustituir en la ecuación 6 para dar:

$$\Phi_3 = \frac{1 - 2p + pv_{rr} + p - 1}{1 - 2p + pv_{rr} + p - 1 + 2p\omega_{ss} - p\omega_{ss} - \omega_{ss} + \omega_{ss} - p\omega_{rr}} \quad (\text{ec. 8})$$

que puede simplificarse en:

$$\Phi_3 = \frac{1 - v_{rr}}{[(1 - v_{rr}) + (\omega_{rr} - \omega_{SS})]} \quad (\text{ec. 9})$$

Esto puede interpretarse de forma intuitiva como la diferencia en la aptitud entre recesivos de tipo salvaje y homocigóticos en los cultivos no-*Bt*, dividido entre la magnitud de la suma de las diferencias en aptitud en ambos cultivos *Bt* y no-*Bt*.

5 **Dominancia completa**

Nótese que si $\omega_{Sr} = \omega_{rr}$ y $v_{Sr} = v_{SS}$, entonces se determina la fijación con respecto a Φ_3 . En el caso especial de dominancia completa en los fenotipos expresados en ambos cultivos *Bt* y no-*Bt*, entonces $\Phi_1 = \Phi_3$. La ecuación 4 no puede simplificarse, pero como puede observarse, es igual a la diferencia en la aptitud entre los genotipos de tipo salvaje y resistente en los cultivos no-*Bt*, dividida entre la magnitud de la suma de las diferencias de aptitud en ambos cultivos *Bt* y no-*Bt*. Sustituyendo en la ecuación 6 se obtiene:

$$\Phi_3 = \frac{(v_{rr} - 2pv_{rr} + pv_{rr} + p - 1)}{v_{rr} - \omega_{rr} + \omega_{SS} + p - 2pv_{rr} - p\omega_{rr} + pv_{rr} + 2p\omega_{rr} - p\omega_{SS} - 1} \quad (\text{ec. 10})$$

que se simplifica para dar:

$$\Phi_3 = \frac{1 - v_{rr}}{[(1 - v_{rr}) + (\omega_{rr} - \omega_{SS})]} \quad (\text{ec. 11})$$

Equivalencia de la condición de umbral

15 Nótese que bajo los extremos completos de recesividad y dominancia, el umbral para la fijación/extinción, Φ_3 , es el mismo. Así, si $\Phi_1 > \Phi_3$, el alelo *r* se fijará independientemente de si el alelo es totalmente recesivo o totalmente dominante. Sin embargo, el tiempo que transcurre hasta la fijación dependerá de la magnitud de Φ .

Determinantes de la estabilidad en equilibrio de ρ

20 Si el alelo *r* es totalmente recesivo con respecto al fenotipo resistente, entonces $\omega_{Sr} = \omega_{SS}$, y así la condición del umbral inferior Φ_1 (ecuación 4) es igual a 1 (con la condición de que $v_{Sr} < v_{SS}$) lo cual provoca que siempre se satisfaga $\Phi_1 \geq \Phi_2$. Por tanto, la recesividad produce un ρ inestable y el alelo resistente se fijará si la proporción de *Bt* es mayor que el umbral crítico Φ_3 .

25 Si el alelo *r* es dominante con respecto al fenotipo resistente, entonces $\omega_{Sr} = \omega_{rr}$, y así el umbral superior Φ_2 (ecuación 5) es igual a 1 (con la condición de que $v_{Sr} > v_{rr}$), y el límite inferior Φ_1 es menor que 1 (puesto que $\omega_{Sr} > \omega_{SS}$ según la definición de resistencia), lo cual provoca que siempre se satisfaga $\Phi_1 < \Phi_2$. Por tanto, la dominancia siempre produce un ρ estable y el alelo resistente sólo se fijará si la proporción de *Bt* es mayor que el umbral crítico Φ_2 .

Por último, si el alelo *r* es parcialmente dominante con respecto al fenotipo resistente, entonces $\omega_{SS} < \omega_{Sr} < \omega_{rr}$, y puede satisfacerse $\Phi_1 < \Phi_2$, o $\Phi_1 > \Phi_2$, y así puede surgir o no un equilibrio estable intermedio.

30 Nótese que una estrategia de dosis alta/refugio es igual al modelo recesivo en términos de fenotipo resistente del individuo heterocigótico, es decir, $\omega_{Sr} = \omega_{SS}$. Así, ρ es inestable y la resistencia se fijará si $\Phi > \Phi_3$. Sin embargo, una estrategia de dosis baja es igual al modelo de dominancia parcial, es decir, $\omega_{SS} < \omega_{Sr} < \omega_{rr}$. Y así, dependiendo de los detalles, se puede llegar a $0 < \rho^* < 1$.

Ejemplo 2: Liberación RIDL

35 Se establece la suposición de que se liberan machos criados en masa a una proporción fijada a la población de tipo salvaje en cada generación (de forma que una proporción, α , de la población total de cada generación está formada por machos liberados). Todos los machos liberados modificados se supone que son homocigóticos sensibles a las toxinas *Bt*, y también homocigóticos en un autosoma para la construcción RIDL. El autosoma transformado que contiene RIDL se denomina L, que es equivalente a un autosoma no transformado *w* en la población salvaje (véase la figura 2), que se supone que es diferente al autosoma que porta el locus sensible a la toxina (o, más en general, que los loci resistente a *Bt* y RIDL están sustancialmente no vinculados).

Se establece la suposición de que la construcción RIDL también impone un coste de aptitud específico de sexo antes de la madurez sexual, por ejemplo en la etapa larvaria. Bajo la suposición de una distribución aleatoria de las larvas a través de los cultivos *Bt* y no-*Bt*, la aptitud relativa media Ω de las larvas del genotipo *i* es:

$$\Omega_i = (1 - \varepsilon_i) [\omega_i \Phi + \nu_i (1 - \Phi)]$$

en la que ε_i es el coste de aptitud relativa específico de sexo impuesto por RIDL, y ω_i y ν_i son la aptitud relativa de las larvas en los cultivos *Bt* y no-*Bt*, respectivamente.

5 Si RIDL fuese un gen letal totalmente dominante, entonces para todas las larvas hembra que contengan RIDL $\varepsilon_i = 1$, y así la aptitud media $\Omega_i = 0$. Bajo estas condiciones, tal como se muestra en la figura 2 y la figura 3, existe un total de siete machos y tres hembras de genotipo viable (definido en el autosoma *w/L* y el locus *S/r*). Nueve genotipos (seis machos y tres hembras) surgen de los apareamientos en el campo, mientras que el décimo (LLSS) es el macho RIDL modificado liberado (nota: se puede relajar la suposición de $\varepsilon = 1$ en la etapa larvaria en las hembras para permitir que surgan algunas hembras RIDL viables; esto obviamente aumenta el número de genotipos viables hasta 18 - *wwSS*, *wwSr*, *wrrr*, *LwSS*, *LwSr*, *Lwrr*, *LLSS*, *LLSr*, *LLrr* tanto hembras como machos).

10 La estructura del modelo de liberación RIDL es fundamentalmente la misma que la que aparece en la figura 1 pero adaptada para incluir los diferentes genotipos viables según se muestra en la figura 3.

15 Para cualquier conjunto dado de suposiciones sobre la aptitud relativa de los diferentes genotipos en cultivos *Bt* (ω_i) y no-*Bt* (ν_i), los costes de aptitud asociados con RIDL en la etapa larvaria (ε_i) y la frecuencia inicial del alelo resistente (p_0), se puede comparar la dinámica de la frecuencia del alelo *r* con y sin liberación RIDL, para cualquier combinación de la proporción de cultivos que expresan *Bt* (Φ) y la frecuencia de liberación RIDL (α).

Salidas del modelo

Liberación reactiva

20 La liberación de machos RIDL siempre reduce la tasa de propagación del alelo *r*, incluso con unas proporciones de liberación muy bajas (por ejemplo, 1 liberación RIDL por cada 10 tipos salvajes). Se pueden cuantificar formalmente los efectos de las estrategias de liberación RIDL con relación a una estrategia de un solo refugio, utilizando los parámetros definidos por Carrière y Tabashnik (Carrière, Y. y Tabashnik, B.E., 2001, Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants, Proc. Roy. Soc. (Lond.) B., 1475-1480) en su estudio del efecto de los refugios sobre la gestión de la resistencia en poblaciones plaga agrícolas. Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5, y en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 1. Valores de los parámetros utilizados para cuantificar las salidas del modelo que permiten una comparación con los hallazgos de Carrière y Tabashnik (2001)

Variable	Valor
Frecuencias iniciales del alelo <i>r</i> en la generación 0	
p_0	0,1
Aptitud relativa en cultivos no-<i>Bt</i> (ν)	
ν_{SS}	1
ν_{Sr}	1
ν_{rr}	0,7 ó 0,4
Aptitud relativa en cultivos <i>Bt</i> (ω)	
ω_{SS}	0 ó 0,01
ω_{Sr}	0 ó 0,01
ω_{rr}	0,1, 0,2 ó 0,4
Proporción de cultivos <i>Bt</i>	
Φ	0,5, 0,7, 0,9 ó 0,99
Coste de aptitud RIDL específica de sexo en larvas (ε)	
ε_{machos}	0,1
$\varepsilon_{hembras}$	1

La figura 4 muestra los efectos de una proporción de liberación RIDL 1:10 (es decir, 1 RIDL a 10 tipos salvajes) y sobre la evolución de la resistencia. Los valores de los parámetros se muestran en la tabla 1g, con $\nu_{Sr} = 1$, $\nu_{rr} = 0,4$,

$\omega_{SS} = \omega_{Sr} = 0$, $\omega_{rr} = 0,1$, y un 10% de refugios (es decir, $\Phi = 0,9$). Puede observarse que la frecuencia del alelo r alcanza 0,5 en 36 generaciones en los refugios en un escenario de refugios sin RIDL (como también predijeron Carrière y Tabashnik, 2001). Sin embargo, en el escenario de RIDL, incluso con una proporción de liberación de 1:10 se revierte la propagación de la resistencia. Las frecuencias de los fenotipos, suponiendo que el rasgo de resistencia es totalmente recesivo, también se muestran.

5

Tabla 2. Efecto de una proporción de liberación 1:10 por generación sobre el número de generaciones requeridas para que la frecuencia del alelo r alcance 0,5. Nótese que ∞ representa una disminución en la frecuencia del alelo r , es decir, una reversión de la resistencia. Al igual que Carrière y Tabashnik, los inventores suponen que la resistencia es recesiva (es decir, aptitud de $v_{SS} = v_{Sr} = 1$, $\omega_{SS} = \omega_{Sr} = 0$). Otros valores, a menos que se indique a continuación, son como en la tabla 1.

10

v_{rr}	ω_{rr}	Refugio, (1- Φ)					
		0,1		0,3		0,5	
		Actual	RIDL	Actual	RIDL	Actual	RIDL
0,7	0,1	19	31	∞	∞	∞	∞
0,7	0,2	9	11*	64	∞	∞	∞
0,7	0,4	5	6*	18	28*	104	∞
0,4	0,1	36	∞	∞	∞	∞	∞
0,4	0,2	11	13*	∞	∞	∞	∞
0,4	0,4	5	6*	33	∞	∞	∞

*Nota: el alelo r aumenta hasta un nivel de equilibrio estable no cero menor que 1.

Tabla 3a y 3b. Efecto de la liberación RIDL a diferentes proporciones de liberación sobre el número de generaciones requeridas para que la frecuencia del alelo r alcance 0,5 con un refugio de (a) 10%, es decir, $\Phi = 0,9$, y (b) 5%, es decir, $\Phi = 0,95$. Otras suposiciones de los parámetros son como en la tabla 2.

(a)

v_{rr}	ω_{rr}	Proporción de liberación RIDL (machos RIDL:tipos salvajes)					
		0	1:10	1:5	1:1	10:1	50:1
0,7	0,1	19	31	80*	∞	∞	∞
0,7	0,2	9	11*	12*	∞	∞	∞
0,7	0,4	5	6*	6*	9*	∞	∞
0,4	0,1	36	∞	∞	∞	∞	∞
0,4	0,2	11	13*	16*	∞	∞	∞
0,4	0,4	5	6*	7*	10*	∞	∞

(b)

v_{rr}	ω_{rr}	Proporción de liberación RIDL (machos RIDL:tipos salvajes)					
		0	1:10	1:5	1:1	10:1	50:1
0,7	0,1	9	10*	12*	∞	∞	∞
0,7	0,2	5	5*	6*	9*	∞	∞
0,7	0,4	3	3*	4*	5*	9*	13*
0,4	0,1	10	12*	15*	∞	∞	∞
0,4	0,2	5	6*	6*	9*	∞	∞
0,4	0,4	3	4*	4*	5*	9*	13*

*Nota: el alelo r aumenta hasta un nivel de equilibrio estable no cero menor que 1.

Tabla 4. Efecto de la liberación RIDL en diferentes proporciones sobre el número de generaciones requeridas para que la frecuencia del alelo r alcance 0,5 cuando el tamaño del refugio es sólo 1% (o $\Phi = 0,99$), que puede surgir cuando toda la producción agrícola en un área es de cultivos Bt pero existe una migración de la plaga desde fuera del área, o un cierto uso de plantas hospedantes alternativas. También se supone que existe una pequeña probabilidad de supervivencia de la plaga de tipo salvaje y heterocigótica en los cultivos transgénicos (es decir, $\omega_{SS} = \omega_{Sr} = 0,01$). Las otras suposiciones sobre parámetros son como en la tabla 2. Los resultados demuestran los efectos de dilución de la liberación RIDL en ausencia de un refugio significativo. Nótese que los efectos significativos sobre el desarrollo de resistencia sólo se observan a altas proporciones de liberación, caso en el cual podría esperarse que la estrategia de liberación RIDL tendría un importante efecto represivo sobre la población plaga. También nótese que en este caso se está analizando la frecuencia del alelo; un cultivo Bt muy eficaz, en especial cuando se combina con liberaciones RIDL, también tendría un efecto muy fuerte sobre el tamaño de la población plaga. Esta represión local fuerte de la población salvaje no es probable que afecte a la tasa de inmigración de una manera tan intensa, de modo que puede aumentar el tamaño del refugio eficaz, conduciendo a una situación más cercana a la ilustrada en las tablas 3a y 3b.

ν_{rr}	ω_{rr}	Proporción de liberación RIDL (machos RIDL:tipos salvajes)					
		0	1:10	1:5	1:1	10:1	50:1
0,7	0,1	4	5*	5*	7*	19*	>250
0,7	0,2	3	3*	3*	4*	7*	10*
0,7	0,4	2	2*	2*	3*	4*	6*
0,4	0,1	4	5*	5*	7*	20*	∞
0,4	0,2	3	3*	3*	4*	7*	10*
0,4	0,4	2	2*	2*	3*	4*	6*

*Nota: el alelo r aumenta hasta un nivel de equilibrio estable no cero menor que 1.

15 Será evidente que la disminución del tamaño de los refugios aumentará la proporción de liberación de machos RIDL transgénicos requerida para controlar la propagación del alelo resistente. Esto se muestra en las figuras 5a y 5b.

Las figuras 5a y 5b muestran los diferentes tamaños de refugios de (a) 10% (es decir, $\Phi = 0,9$), y (b) 5% (es decir, $\Phi = 0,95$) y el impacto de diferentes proporciones de liberación RIDL requeridas para reducir la frecuencia del alelo r . Todos los demás parámetros son como en la figura 4. Las proporciones de liberación RIDL a tipo salvaje se indican en las gráficas.

20 El efecto de la proporción de liberación RIDL se ilustra en la figura 6. La liberación de RIDL susceptibles reducirá, en todos los casos, la tasa de aumento en el alelo r . Sin embargo, por encima de cierto umbral crítico, la liberación revertirá la propagación. En la figura 6, los parámetros son como en la figura 4, excepto $\omega_{rr} = 0,4$. La frecuencia inicial del alelo r es 0,1, y el tamaño del refugio se ajusta a 10%. Puede observarse que unas proporciones de liberación de aproximadamente 5:1 o mayores revertirán la propagación del alelo resistente.

Liberación profiláctica

A unas frecuencias alélicas de aproximadamente 5-10% o mayores, la resistencia fenotípica será detectable mediante programas de vigilancia, y pueden utilizarse programas de liberación RIDL de una manera reactiva para controlar la propagación de la resistencia. A unas frecuencias alélicas más bajas, por ejemplo 1% o menores, no es probable que la resistencia fenotípica pueda detectarse mediante una vigilancia rutinaria. Sin embargo, la liberación RIDL puede utilizarse, por ejemplo, de manera profiláctica para evitar el desarrollo o la propagación de futuras resistencias. Los efectos de diferentes proporciones de liberación sobre el desarrollo de resistencia en una población plaga con una frecuencia del alelo r inicial de 1% se muestran en la figura 7. Puede observarse que, en contraste con la figura 6, una proporción de liberación tan baja como 1:10 mantendrá la frecuencia del alelo r por debajo del 50% en más de 80 generaciones, mientras que una proporción de liberación de 1:5 (RIDL a tipos salvajes) es suficiente para prevenir el desarrollo de resistencia.

La figura 7 muestra los efectos de la frecuencia inicial del alelo de resistencia. Todos los valores de los parámetros son como en la figura 6, aparte de un frecuencia inicial del alelo r que es de 0,01.

Reversión de una resistencia establecida

40 En el otro extremo de la liberación profiláctica, la invención también puede aplicarse a reducir el nivel de una resistencia bien establecida en una población plaga. Por ejemplo, la figura 8 muestra el impacto de diferentes proporciones de liberación sobre la trayectoria temporal de la frecuencia del alelo resistente desde un nivel inicial del

50%. El impacto de la estrategia es sensible a la aptitud relativa del genotipo resistente homocigótico sobre cultivos *Bt*, el parámetro ω_{rr} , tal como se muestra en las figuras 8a y 8b.

Las figuras 8a y 8b muestran la reversión de una resistencia establecida. En (a) $\omega_{rr} = 0,1$, y en (b) $\omega_{rr} = 0,4$. Todos los demás parámetros son como en la figura 4.

5 **Efectos sinérgicos de la represión de la población y la dilución de la resistencia**

Tal como se analizó anteriormente, la liberación de machos transgénicos que portan un construcción RILL que confiere una letalidad dominante específica de hembras dará como resultado una represión de la población, dependiendo el grado de represión de la proporción de liberación y de la ecología de la población diana (por ejemplo, el número reproductor básico y el grado de apareamiento no aleatorio). El marco de trabajo analítico descrito anteriormente puede adaptarse para permitir cambios en el número de la población plaga. Por consiguiente, la liberación de machos RIDL puede definirse de dos formas (1) como una proporción del tamaño de la población en la generación de liberación (es decir, si se reduce el tamaño de la población, se reduce el número de machos liberados, de modo que la proporción de machos liberados a tipos salvajes permanece constante), y (2) la proporción se define en relación con el tamaño de la población salvaje en la generación 0 (es decir, el número total de machos liberados RIDL permanece constante independientemente de los cambios en el tamaño de la población diana). Esta última estrategia se acerca más a la práctica real de los programas SIT. En ausencia de cualquier liberación RIDL, la tasa de crecimiento de la población diana se define mediante el número reproductor básico, R_0 , definido como el número de prole hembra por cada hembra.

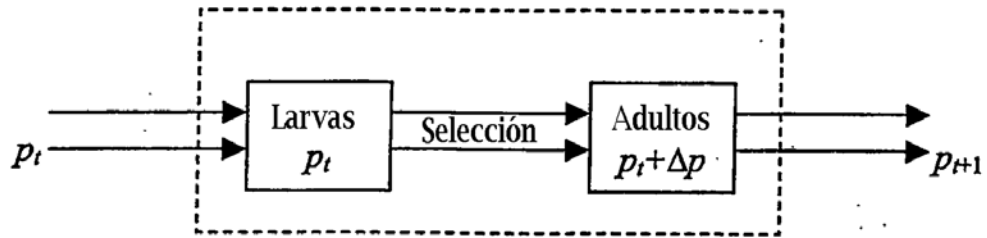
Resulta evidente que los efectos de dilución de la resistencia de la liberación RIDL son mucho más favorables cuando los efectos de represión de la población en el escenario de liberación RIDL fijada se toman en cuenta simultáneamente. Esto se ilustra en la figura 9, que muestra los efectos simultáneos de la liberación RIDL sobre (a) la dilución de la resistencia, y (b) la represión de la población bajo dos estrategias de liberación RIDL diferentes (una liberación variable, en la que la proporción es constante al tamaño de la población en cada generación, y una liberación fijada, en la que la proporción es constante con relación al tamaño de la población en la generación 0). Los valores de los parámetros son como en la figura 6. La R_0 de la población plaga es 4, y no se considera una dependencia de la densidad.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para controlar una población de insectos diana capaces de tener reproducción sexual, comprendiendo dicho método:
- 5 inhibir o revertir la propagación, en dicha población, de un primer rasgo genético de resistencia a un pesticida, de tipo no salvaje, mediante la introducción de individuos sexualmente compatibles que son sustancialmente homocigóticos para un homólogo sensible de tipo salvaje del rasgo de resistencia en la población diana; teniendo la forma heterocigótica del rasgo de resistencia un nivel de aptitud asociado menor en comparación con los homocigóticos resistentes en presencia del pesticida, y teniendo ambas formas homocigótica resistente y heterocigótica un nivel de aptitud asociado menor en comparación con la forma homóloga homocigótica sensible en ausencia del pesticida;
- 10 comprendiendo además dicho método:
- el tratamiento con el pesticida y el uso de plantas refugio para permitir la supervivencia de los miembros no resistentes de la población;
- 15 en el que los individuos liberados en la población diana son transgénicos modificados para que porten un segundo rasgo que es letal dominante, o que produce una aptitud media menor en al menos una generación posterior.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha aptitud media asociada con dicho segundo rasgo no es cero para la generación inmediatamente posterior.
- 3.- Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el segundo rasgo confiere un nivel de aptitud menor al menos a una proporción de individuos que portan ese rasgo en la forma heterocigótica u homocigótica.
- 20 4.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho segundo rasgo no está sustancialmente vinculado con el homólogo sensible.
- 5.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo rasgo puede reprimirse mediante un represor genético para con ello prevenir o reducir la expresión del rasgo en individuos que portan una o dos copias del represor, y en el que los individuos introducidos son homocigóticos para el segundo rasgo y dicho represor.
- 25 6.- Un método según la reivindicación 5, en el que el represor no está vinculado sustancialmente al segundo rasgo.
- 7.- Un método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el represor está vinculado al homólogo sensible del rasgo que se va a inhibir o revertir.
- 30 8.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el segundo rasgo actúa como letal dominante bajo circunstancias permisivas para ello.
- 9.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el gen letal dominante es controlado por las condiciones ambientales, el ciclo de luz diurna o los componentes en la dieta.
- 10.- Un método según la reivindicación 9, en el que el gen letal dominante es controlado por la tetraciclina.
- 35 11.- Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el gen letal dominante es específico de sexo.
- 12.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el segundo rasgo es selectivo para las hembras.
- 13.- Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que los miembros de la población se seleccionan del grupo que consiste en mosca califórda australiana (*Lucilia cuprina*); gusano barrenador del ganado del Nuevo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*); gusano barrenador del ganado del Viejo Mundo (*Chrysomya bezziana*); mosca tse-tsé (*Glossina spp.*); mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*); mosca de la cara (*Musca autumnalis*); otras especies de *Musca* (por ejemplo, *Musca domestica*); mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*); mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*); mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*); mosquitos de la malaria (por ejemplo, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles funestus*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles dirus*, *Anopheles albimanus*); otros mosquitos vectores de enfermedades (por ejemplo, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*); escarabo japonés (*Popilla japonica*); gusano blanco del frejol (*Graphognathus spp.*); gorgojo del algodón (*Anthonomous grandis*); gusanos de la raíz del maíz: occidental (*Diabrotica virgifera virgifera*); norteño (*Diabrotica barberi*); sureño (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) y mejicano (*D. virgifera zea*); picudo rojo (*Rhynchophorus ferrugineus*); tetuán del boniato, gorgojo del camote (*Cylas formicarius*, *Euscepes postfasciatus*); escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*); perforador de los pinos (*Tomicus piniperda*); taladrador de las meliáceas (*Hypsipyla robusta*); gorgojo de la harina (*Tribolium confusum*); gorgojo del guisante (*Bruchus pisorum*); barrenadores de los granos (*Prostephanus truncatus*, *Rhyzopertha dominica*); carcoma achatada (*Cryptolestes*

- ferrugineus*); gorgojos del granero y del arroz (*Sitophilus spp.*); mosca negra de los cítricos (*Aleurocanthus woglumi*); mosca oriental de la fruta (*Dacus dorsalis*); mosca del olivo (*Dacus oleae*); mosca del melón, mosca de frutas tropicales (*Dacus cucurbitae*, *Dacus zonatus*); mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*); mosca de Natal (*Ceratitis rosa*); mosca de la cereza (*Rhagoletis cerasi*); mosca de Queensland (*Bactrocera tryoni*); mosca del Caribe (*Anastrepha suspensa*); mosca de la carambola (*Bactrocera carambolae*); mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*); mosca de la cebolla (*Delia antiqua*); moscas del champiñón (*Lycoriella mali*, *Lycoriella auripila* y *Megaselia spp.*); otras moscas de la fruta (*Tephritidae*); lagarta peluda (*Lymantria dispar*); carpocapsa del manzano (*Cydia pomonella*); oruga del zurrón (*Euproctis chrysorrhoea*); perforador amarillo del vástago (*Tryporyza incertulas*); gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*); gusano de la naranja navelina (*Amyelois transitella*); minadora del melocotonero (*Anarsia lineatella*); polilla pintada de la manzana (*Teia anartoides*); gusano cogollero, gusano del maíz (*Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*); perforador mayor de la bellota (*Heliothis virescens* - y otros heliotinos); gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*); polilla de la patata (*Phthorimaea operculella*); barreneta (*Ectomyelois ceratoniae*); polilla oriental del melocotonero (*Grapholita molesta*); polilla de la col (*Plutella xylostella*); palomilla bandeada (*Plodia interpunctella*); moscas blancas de los invernaderos (por ejemplo, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*); garrapata común de los bovinos (*Boophilus microplus*) y otras garrapatas de importancia veterinaria; y piojos de los libros (*Liposcelis spp.*).
- 14.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la población diana es una especie de mosquito capaz de transmitir la malaria.
- 15.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la población diana es la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*).
- 16.- Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que rasgo genético que se va a inhibir o revertir comprende múltiples loci.
- 17.- Un método según cualquier reivindicación anterior para la inhibición o la reversión de múltiples rasgos genéticos.
- 18.- Un método según la reivindicación 1, que comprende proporcionar dicho refugio para permitir la supervivencia de miembros no resistentes de la población.
- 19.- Un método según la reivindicación 1 o 18, en el que el pesticida es expresado por un cultivo alimentario.
- 20.- Un método según la reivindicación 19, en el que el pesticida es la toxina de *Bacillus thuringiensis* expresada por el cultivo alimentario.
- 21.- Un método según la reivindicación 19 ó 20, en el que plantas individuales que forman el cultivo alimentario proporcionan refugios.
- 22.- Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el número de individuos introducidos se calcula para inhibir un rasgo que se está desarrollando en una población sustancialmente exenta del rasgo.
- 23.- Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el número de individuos introducidos es 10% o menos de la población.
- 24.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que el número de individuos introducidos se calcula para que revierta un rasgo que ya está presente en una población.
- 25.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o 24, en el que el número de individuos introducidos es al menos igual al número de individuos en la población.
- 26.- Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que los individuos que portan el homólogo también portan otro rasgo conferido a los heterocigóticos y/o homocigóticos para éste.
- 27.- Un método según la reivindicación 26, en el que el otro rasgo es la incapacidad para entrar en diapausa o una refractariedad a un patógeno.

Figura 1
Ciclo de vida sencillo utilizado en el modelo básico de selección Bt



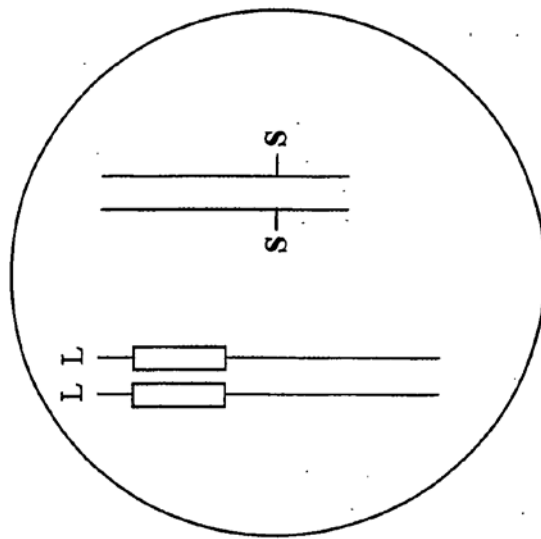
Una generación

Figura 2

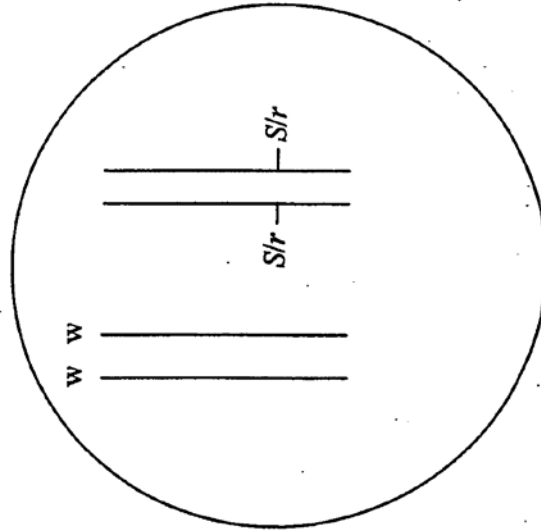
Genotipos en el modelo de liberación RIDL

Total de genotipos de 7 machos (1 tipo liberado modificado, 3 tipos salvajes y 3 tipos F2) y 3 hembras (todos tipos salvajes)

Genotipo modificado para la liberación (1) macho



"Tipos salvajes" (3) machos y (3) hembras



F2 (3) machos

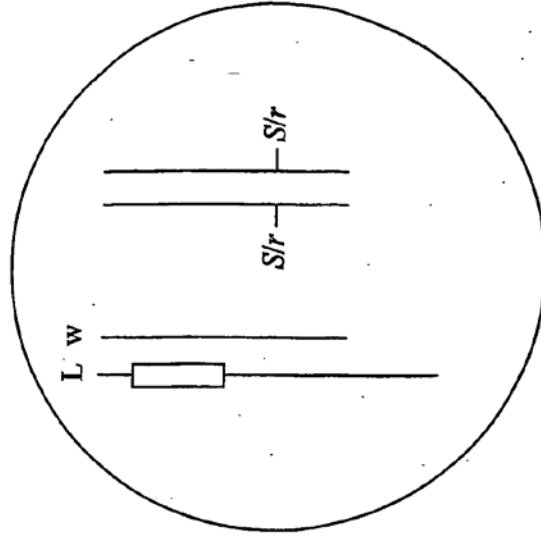


Figura 3
Modelo de refugios y liberación RIDL

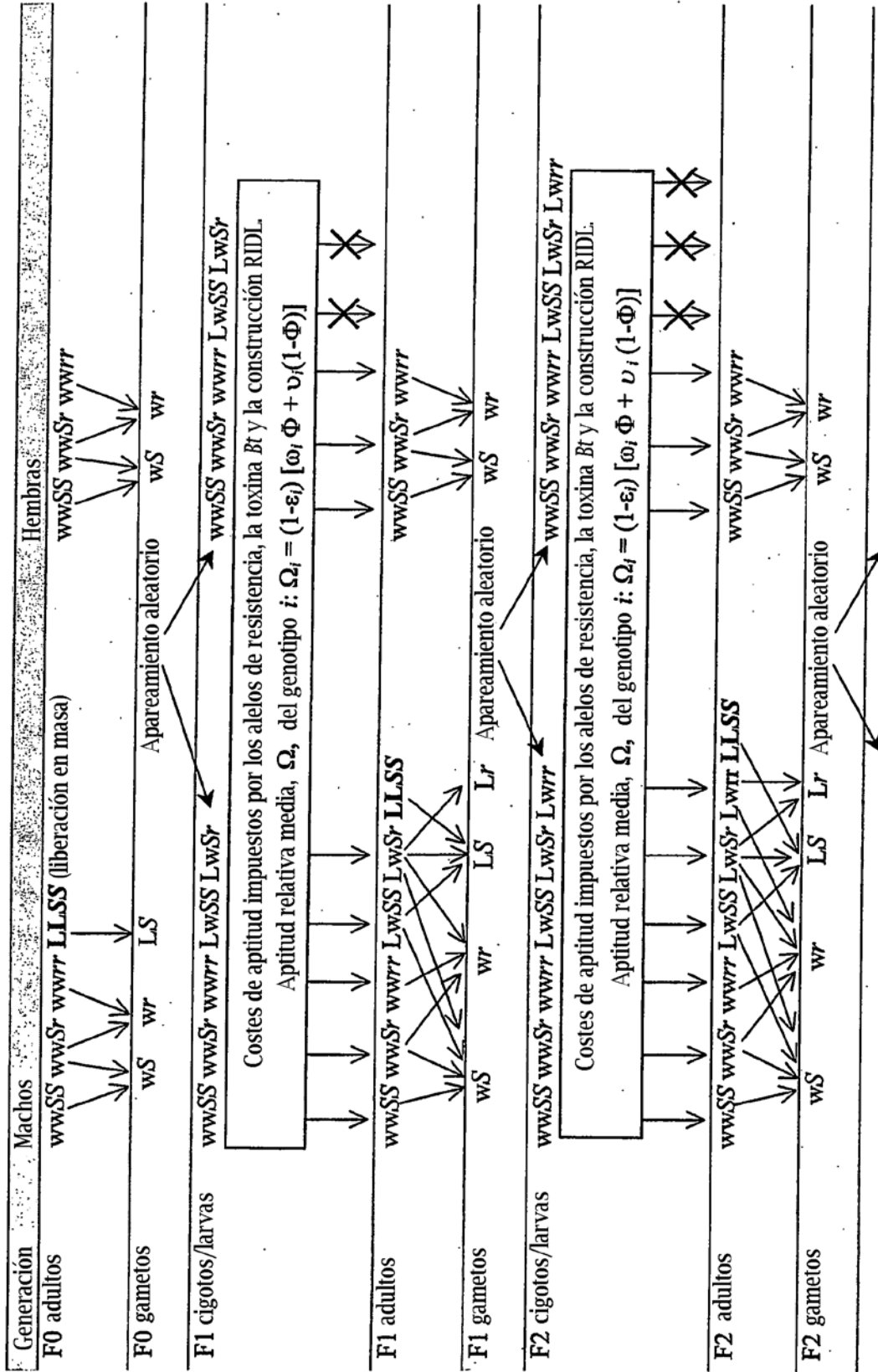


Figura 4

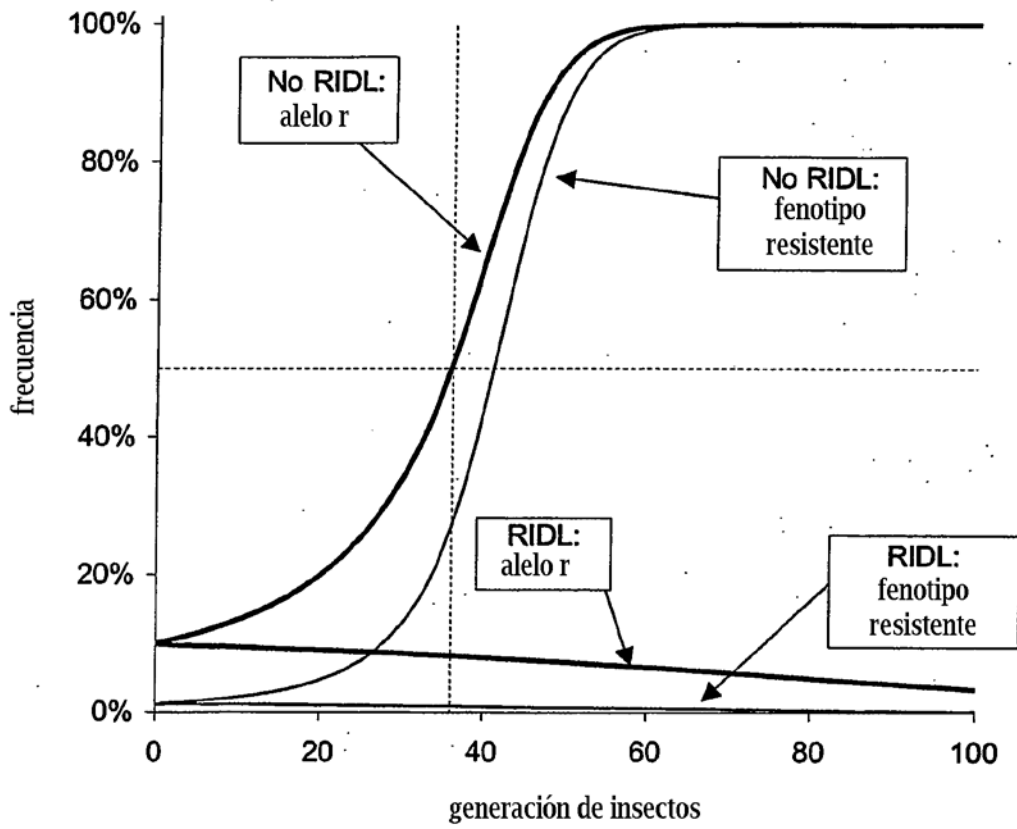


Figura 5a y 5b

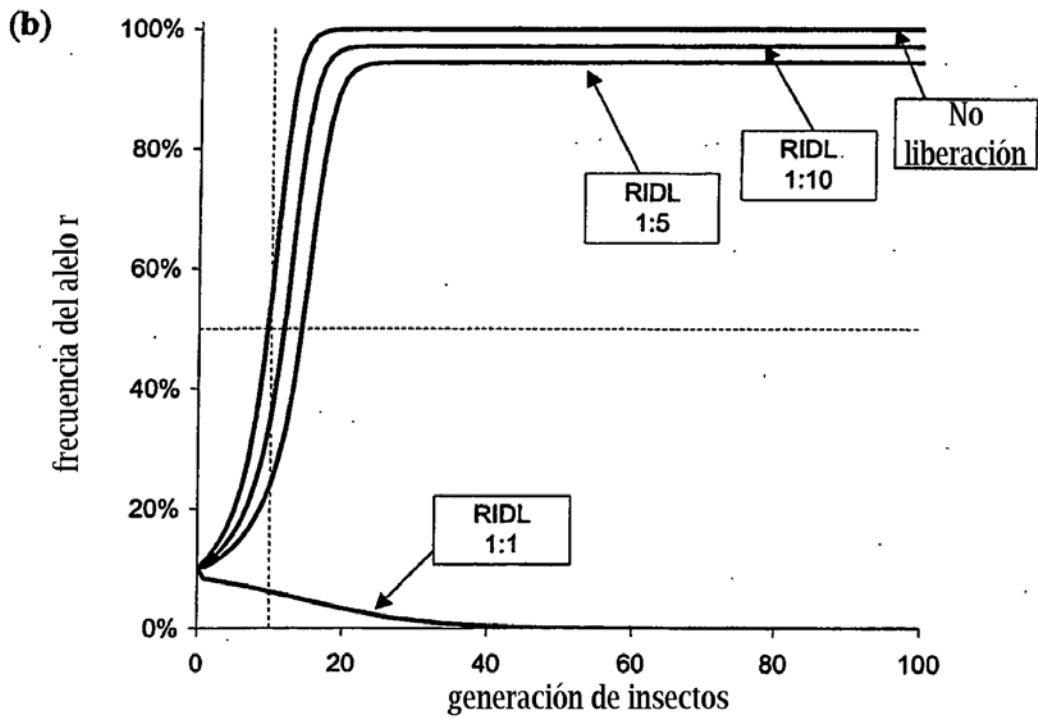
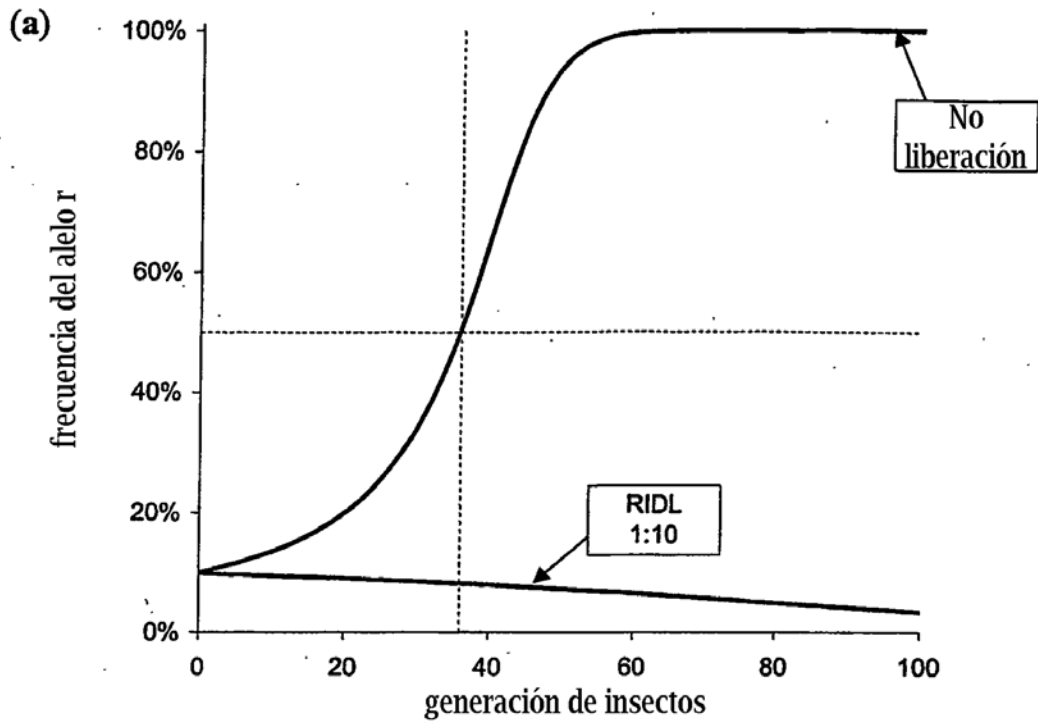


Figura 6

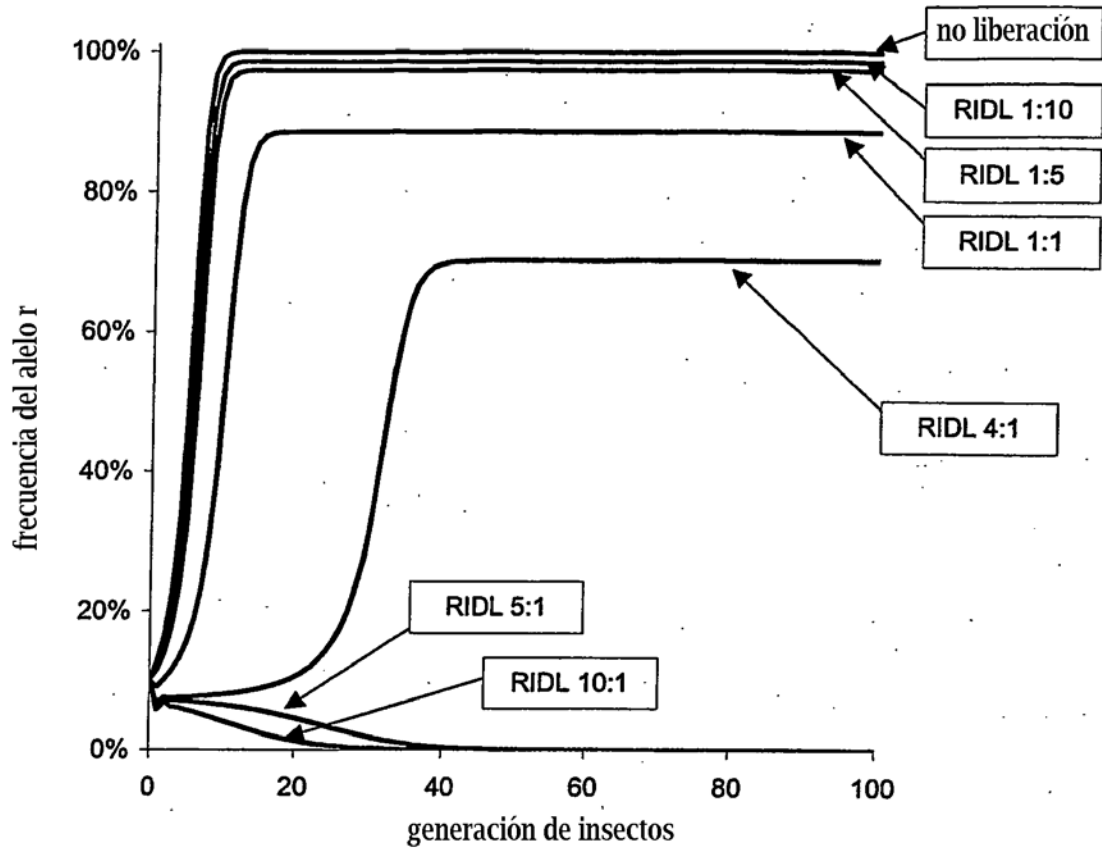


Figura 7

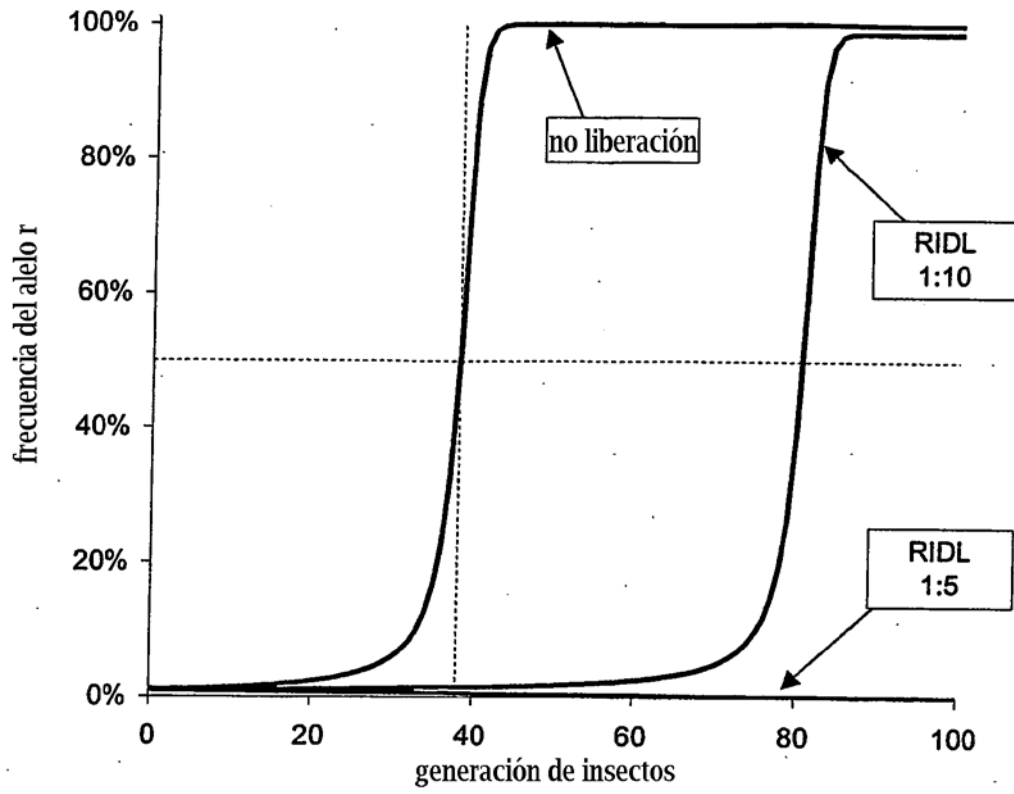


Figura 8a y 8b

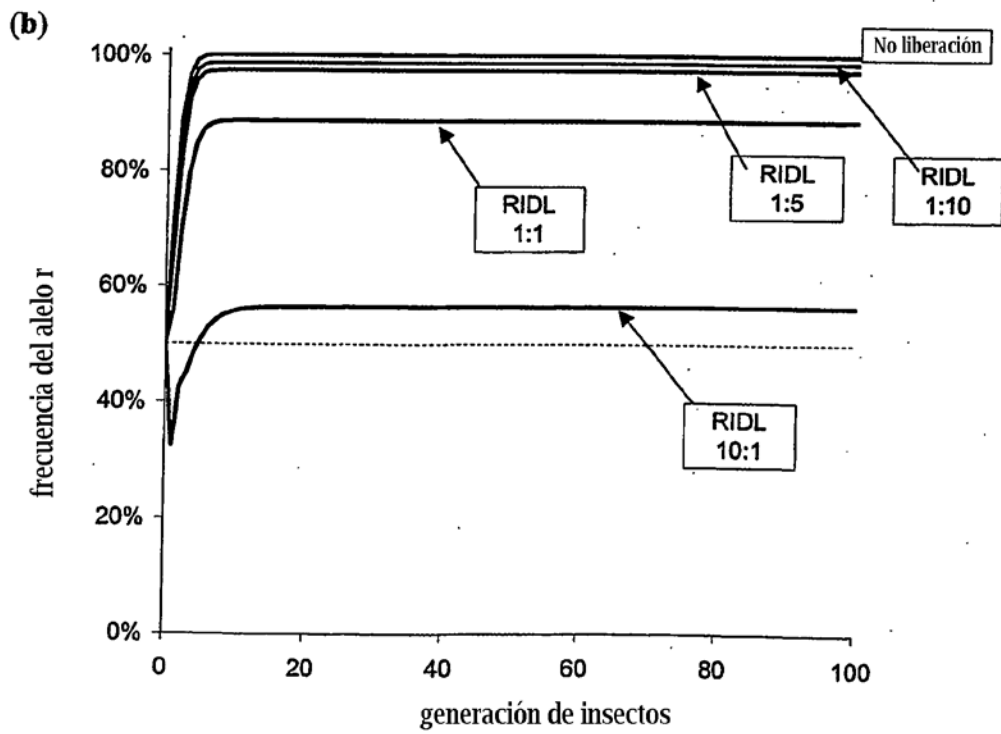
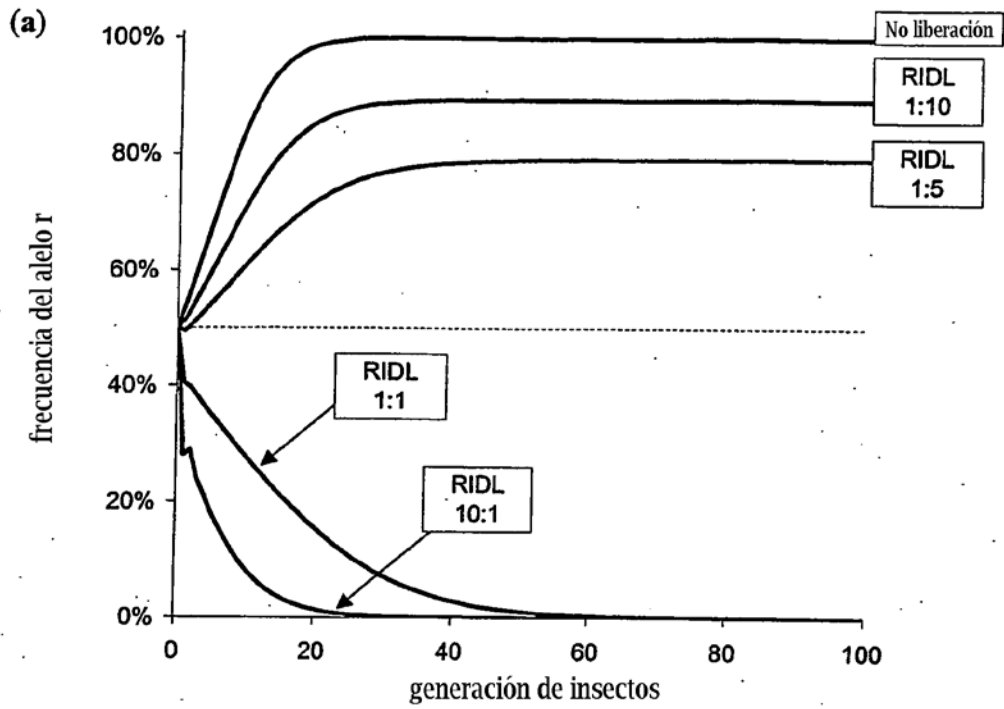


Figura 9

