

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 134**

51 Int. Cl.:

C12R 1/01 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2016** **PCT/GB2016/051683**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016** **WO16198852**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2016** **E 16731956 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 3307914**

54 Título: **Sistema de control de plagas**

30 Prioridad:

11.06.2015 GB 201510154

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.06.2020

73 Titular/es:

SWANSEA UNIVERSITY (100.0%)
Singleton Park
Swansea SA2 8PP, GB

72 Inventor/es:

DYSON, PAUL y
WHITTEN, MIRANDA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 764 134 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

Sistema de control de plagas

5 Campo de la invención

La invención se refiere a una célula bacteriana transfectada o transformada genéticamente que es un simbiote intestinal de un insecto que pertenece al orden *Thysanoptera*, en la que dicha célula se transforma para expresar ARN de cadena doble (dsARN) activo contra al menos un gen de insecto seleccionado; un vector para transformar o
10 transfectar dicha célula bacteriana; un insecto que incluye dicha célula bacteriana transformada y un procedimiento de control de plagas que emplea el uso de dicha célula bacteriana y/o dicho insecto.

Antecedentes de la invención

15 Los invertebrados y otras plagas son vectores comunes para los organismos patógenos, típicamente microorganismos que son responsables de diversas enfermedades que pueden afectar los cultivos.

En los últimos 30 años, insectos como el tisanóptaro occidental de las flores (WFT), *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), se han convertido en una de las plagas agrícolas más importantes a nivel
20 mundial. La condición de plaga se puede atribuir a diversos factores, entre ellos el potencial reproductivo, la capacidad de invasión (endémica en el oeste de América del Norte, ha invadido muchos países de Europa, África y Asia), la variedad de cultivos huéspedes, la capacidad de transmitir virus de plantas y la resistencia a insecticidas. Todos estos factores están interrelacionados, y están vinculados con el ciclo vital y la estrategia de la historia de vida de la especie. Es una plaga importante de los cultivos de invernadero y de campo y de los frutos rojos en Europa, y de alimentos
25 básicos como frijoles, caupís y cacahuets en África y Asia, y esto puede tener efectos devastadores para los seres humanos y los animales que dependen de esos cultivos para su alimentación.

El daño directo a los cultivos se debe tanto a la alimentación como al daño de las plantas por oviposición. Los tisanóptaros también transmiten varios tospovirus diferentes, incluidos el virus de la mancha anular del cacahuete
30 (GRSV) y el virus del bronceado del tomate (TSWV), y se ha calculado que el TSWV solo provoca más de mil millones de dólares en pérdidas por año. Más de 1,000 especies de plantas en 84 familias son susceptibles al TSWV, lo que le proporciona uno de los intervalos de hospedadores más amplios entre los patógenos vegetales.

En consecuencia, existe un interés continuo para desarrollar procedimientos de control dirigidos a la reducción o la
35 erradicación de la incidencia de las plagas agrícolas anteriores. Esto se suele lograr ya sea mediante el direccionamiento al propio patógeno (GRSV/TSWV) o al vector (WFT) asociado comúnmente a la transmisión. Los procedimientos para controlar las infestaciones y la infección por insectos típicamente se han encontrado en forma de; barreras físicas que impiden la transmisión; composiciones químicas, tales como insecticidas, fármacos químicos y repelentes; y también controles biológicos.

40 Los avances recientes en genética han permitido comprender mejor el desarrollo de una amplia gama de organismos y allanado el camino para las nuevas vías de control biológico de plagas. El estudio de la función génica de los insectos constituye una etapa crucial para comprender la fisiología, el comportamiento, la inmunología e incluso la transmisión de enfermedades en este grupo de organismos tan diverso y exitoso. Gracias a este conocimiento es posible
45 desarrollar formas para luchar contra los daños a los cultivos y desarrollar estrategias para controlar las poblaciones de insectos plaga.

La interferencia de ARN (iARN) es una técnica poderosa de regulación por disminución específica de secuencia de la expresión génica para interrogar la función génica eucariota basándose en un gen individual.

50 La iARN es una forma de silenciamiento génico postranscripcional, en la que un ARNm específico de un gen particular se destruye o se bloquea, lo que impide la traducción y la formación de un producto génico activo. La iARN se produce naturalmente dentro de las células vivas para modular la actividad génica, y también es importante en la defensa contra los parásitos y la infección viral. Por ejemplo, cuando una célula se inyecta con ARN en una forma de cadena
55 doble (cd), una proteína llamada Dicer (o ARNsa III) escinde las moléculas de dsARN en fragmentos cortos de ARN (20-25 nucleótidos), denominados ARN interferente pequeño (ARNip) debido a su capacidad de interferir con la expresión de un gen específico. Estas moléculas de ARNip se desenrollan para formar ARN de cadena simple (cs), después de lo cual la denominada cadena guía se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). A menudo, esta cadena guía formará pares de bases con una secuencia complementaria de ARNm en la célula que
60 induce su escisión por el componente catalítico del complejo RISC. El ARNm no se traduce y no se produce ninguna proteína funcional, y por lo tanto los efectos del gen que codifica el ARNm específico son "silenciados". Este procedimiento se denomina iARN autónomo celular, en el que el silenciamiento génico se limita a la célula en la cual

se introduce el dsARN. Alternativamente, el iARN ambiental y sistémico son las dos formas de iARN autónomo no celular, en los que el efecto de interferencia se produce en células/tejidos diferentes del lugar donde se introdujo/produjo el dsARN. En este caso, el dsARN es absorbido por múltiples células (iARN ambiental tal como en las infecciones virales), o la señal de silenciamiento se transporta desde la célula en la cual el dsARN se aplica o se expresa a otras células donde se observa el efecto (iARN sistémico).

Al sintetizar artificialmente el dsARN (o las moléculas de ARNip) con una secuencia conocida complementaria de un gen de interés, e introducirlo en las células diana, es posible comprender la función de un gen específico mediante la observación de las consecuencias de su pérdida de actividad. El iARN y otras denominadas técnicas de genética inversa están revolucionando las ciencias biológicas, con aplicaciones en genómica, biotecnología y medicina.

El iARN en los invertebrados es una tecnología establecida, en la que se administra dsARN más comúnmente mediante inyección. Sin embargo, este procedimiento suele tener tasas de mortalidad altas debido al traumatismo por la inyección y la anestesia, y también requiere cantidades altas de muestras. Los insectos grandes también requieren la síntesis de cantidades costosas de dsARN. Además, como se estableció, esto produce silenciamiento génico autónomo celular que logra efectos de iARN transitorios y, por lo tanto, no se puede aplicar para el control de las plagas de insectos en el campo. Como resultado, para el control de plagas de insectos eficaz, se requiere iARN autónomo no celular, que se ha demostrado que se logra mediante la alimentación de insectos con una fuente biológica tal como bacterias modificadas genéticamente o material vegetal. Por lo tanto, esto comienza con la absorción de dsARN de manera ambiental en el lumen intestinal del insecto, desde donde se extiende a tejidos de otras partes (iARN sistémico). El logro del iARN depende de un procedimiento confiable de administración, o absorción, de una copia de dsARN de parte de un gen diana al insecto. Para algunas especies de insectos esto se ha logrado mediante la inclusión en su alimentación de células de *E. coli* vivas o muertas que expresan dsARN. Las bacterias se digieren en el intestino y el dsARN es absorbido y se administra sistémicamente a diferentes tejidos, en los que puede mediar el iARN transitorio. El documento EP2374462A2 establece que el iARN se puede introducir mediante la ingesta de: dsARN desnudo, alimentos contaminados con *E. coli* que expresan dsARN, por ejemplo, mediante la pulverización con bacterias transformadas, o material vegetal modificado genéticamente que expresa dsARN. El documento WO2011017137A2 establece un procedimiento a través del cual un cebo alimenticio del insecto se contamina con bacterias modificadas genéticamente que expresan dsARN y el cebo se devuelve a una colonia para su alimentación por los insectos. Además, el documento WO2011025860A1 presenta el uso de iARN contra insectos que se alimentan con plantas, en los que las bacterias que infectan plantas específicas están modificadas genéticamente para expresar un dsARN específico. de manera similar, el documento WO2011036536A2 presenta dianas de genes de iARN específicos que son silenciadas por la administración de dsARN mediante la pulverización de bacterias muertas en las plantas de cultivo.

Sin embargo, muchas de las técnicas desarrolladas actualmente suelen ser poco prácticas o tienen poca eficacia y no están dirigidas a organismos que provocan un daño específico al ambiente. Por ejemplo, la contaminación de fuentes de alimentos (plantas u otros) con bacterias modificadas genéticamente puede ser perjudicial para otros insectos que pueden ser alimentadores ocasionales. Además, la pulverización de composiciones químicas que contienen dsARN desnudo sobre insectos o su fuente de alimentación también puede tener consecuencias en otros organismos no plagas. Lo que es más importante, todos los procedimientos existentes solo presentan procedimientos de administración mediante los cuales se observan efectos de silenciamiento génico transitorios. Muchas de las técnicas empleadas actualmente solo presentan duraciones de silenciamiento cortas, que a menudo son demasiado transitorias para determinadas dianas, por ejemplo, aquellas para estudios hormonales y del desarrollo. Por lo tanto, a menudo se requiere la reaplicación de dsARN (u otras construcciones de iARN), lo cual es costoso y requiere mucho tiempo. Además, como las técnicas empleadas actualmente no son transferibles, ha resultado difícil demostrar el control eficaz de plagas. Por lo tanto, la tecnología en su estado actual es inadecuada para muchas especies de insectos y se necesita una eficacia y procedimientos de aplicación mejorados.

Por lo tanto, hemos desarrollado una nueva técnica de iARN eficaz contra los insectos pertenecientes al Orden *Thysanoptera* que se basa en la síntesis *in vivo* de dsARN por bacterias intestinales simbióticas transgénicas de una especie que reside naturalmente en el insecto. Además, desarrollamos una nueva técnica de iARN que destruye los insectos en la etapa de larva y adulta, pero particularmente la etapa de larva, por lo tanto, de manera conveniente, antes de que se produzca la reproducción de plagas de insectos y la alimentación y antes de la transmisión de patógenos de plantas entre las plantas individuales.

Declaraciones de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona, por lo tanto, una célula bacteriana transfectada o transformada genéticamente, en la que dicha bacteria es un simbiote intestinal de un insecto que pertenece al orden *Thysanoptera*, caracterizada porque dicha célula bacteriana se transforma para expresar dsARN contra al menos una parte del gen de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento del insecto.

En una realización preferida de la invención, dicha célula bacteriana se transforma para expresar dsARN contra al menos una parte del gen de la cadena alfa 1 de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.

5

La referencia en la presente al gen de cadena de tubulina alfa 1 es al gen que tiene el número de acceso GT305545 (GenBank; NCBI), y la referencia en la presente al gen del factor de alargamiento 1 alfa es al gen que tiene el número de acceso GT303726 (GenBank; NCBI).

- 10 En una realización preferida de la invención, dicho dsARN comprende una cadena de ARN que comparte un 50 % de complementariedad con al menos una parte de dicho gen de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento. Preferentemente, dicho dsARN comprende una cadena de ARN que comparte al menos el 75 % de complementariedad con al menos uno de dichos genes de dicho insecto y, en orden creciente de preferencia, al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de complementariedad con al menos uno de dicho gen diana de dicho insecto.

- 15 Más idealmente aún, dicho dsARN activo contra dicho gen de cadena de tubulina alfa 1 o dicho gen del factor de alargamiento 1 alfa del insecto es complementario a al menos una parte de la estructura de la secuencia que se muestra en la figura 13 o 14, respectivamente. Preferentemente, dicho dsARN comprende una cadena de ARN que
20 comparte al menos el 75 % de complementariedad con al menos una parte de la estructura de la secuencia que se muestra en la figura 13 o 14 y, en orden creciente de preferencia, al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de complementariedad con al menos una parte de la estructura de la secuencia que se muestra en la figura 13 o 14.

- 25 De manera más ideal, dicha bacteria se refiere al género *Pantoea*, que es un simbiote intestinal de dicho insecto, idealmente, dicha bacteria es BFo2, con una secuencia de genoma que tiene el número de acceso SAGS00000000 (GenBank, NCBI). Alternativamente, dicha bacteria pertenece al género *Erwinia*, que es un simbiote intestinal de dicho insecto, idealmente, dicha bacteria es BFo1, con una secuencia de genoma que tiene el número de acceso LAGP00000000 (GenBank, NCBI).

30

Más preferentemente, dicho insecto es un miembro de la Familia *Thripidae*. Más preferentemente aún, dicho insecto pertenece al género *Frankliniella*, tal como la especie *Frankliniella occidentalis*.

- En otra realización preferida adicional de la invención, se proporciona un vector de expresión para transformar o
35 transfectar dicha célula bacteriana en el que dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico que expresa dsARN contra al menos una parte de dicho gen de tubulina o al menos una parte de dicho gen de factor de alargamiento del insecto.

- En una realización preferida de la invención, dicho vector de expresión expresa dsARN contra al menos una parte del
40 gen de la cadena alfa 1 de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.

- Más preferentemente aún, dicho vector de expresión para transformar o transfectar dicha célula bacteriana comprende al menos un promotor constitutivo, por ejemplo, *Ptac*. Más preferentemente aún, múltiples, tal como un par, de dichos promotores se proporcionan y están configurados para accionar la transcripción de manera convergente para
45 garantizar la transcripción de ambas cadenas complementarias de ácido nucleico que expresan dicho dsARN. Más preferentemente aún, dicho vector de expresión para transformar o transfectar dicha célula bacteriana está configurado como se muestra en la figura 1, es decir, configurado según el vector Pex-A. Más idealmente aún, dicho vector de expresión para transformar o transfectar dicha célula bacteriana es pTub3 o pElong1. De manera conveniente, pTub3 o pElong1 comprenden secuencias de ácido nucleico que son plantillas para la síntesis de dsARN que están
50 flanqueadas por promotores de *Ptac* convergentes para garantizar la transcripción constitutiva de dos cadenas de ARN complementarias, las cuales se hibridan para generar el ARN de cadena doble deseado.

- En una realización preferida de la invención, dicha célula bacteriana se transforma o modifica genéticamente de modo tal que el ADN recombinante se integra de manera estable en el genoma de la célula huésped. Esto garantiza de
55 manera conveniente el silenciamiento del gen diana a largo plazo y garantiza la expansión en las poblaciones de insectos. Idealmente, la integración estable se logra mediante integración específica del sitio, típicamente después del uso de sitios de integración específicos del sitio convencionales. Preferentemente, la integración específica del sitio se logra en el gen de la *ARNsa III*.

- 60 Los expertos en la materia sabrán que dicho insecto causa una enfermedad en las plantas, típicamente por la transmisión del organismo patógeno que pertenece a los *tosspovirus*, incluyendo el virus de mancha de maní o el virus de la marchitez de tomate.

El trabajo de la invención es particularmente eficaz porque el insecto realiza transferencia intestinal horizontal, es decir, la adquisición de bacterias de flora intestinal mediante la ingesta de una fuente ambiental. Por lo tanto, el trabajo de la invención es particularmente eficaz porque dicha transferencia intestinal horizontal se logra mediante la ingesta de heces o excremento de otros insectos. Más idealmente aún, la ingesta de heces o excremento es específica del género, y se cree que es específica de la especie, por lo tanto, la generación progenitora de una especie transfiere el simbionte intestinal modificado genéticamente a una generación de descendientes. De este modo, dicho insecto puede adquirir dicha célula bacteriana transfectada o transformada de heces o excremento contaminado en el ambiente, lo que evita la necesidad del manejo de insectos y la mortalidad asociada. Además, de manera conveniente, esto permite la transferencia horizontal de dsARN que media iARN a lo largo de al menos una colonia de insectos y, típicamente, muchas colonias de insectos.

Además, o alternativamente a la integración específica del sitio mencionada anteriormente, en otra modalidad preferida de la invención, dicha célula bacteriana transfectada o transformada también se modifica genéticamente de modo que no produzca proteínas que degraden el ARN funcional, incluidas, entre otras, la ARNsa III. de manera conveniente, esto reduce el riesgo de la degradación enzimática de dicho dsARN codificado por la célula bacteriana transformada. Idealmente, esto se logra mediante la eliminación de la totalidad o parte del gen de la ARNsa III nativo e, idealmente, su reemplazo por un gen resistente a antibióticos, por ejemplo, un gen de resistencia a la apramicina.

De manera conveniente, el direccionamiento del gen de cadena de tubulina alfa 1 o el gen del factor de alargamiento 1 alfa produce una mortalidad temprana de dicho insecto. De este modo, se reduce la capacidad del insecto de transmitir un microorganismo patógeno y se limita el daño al follaje debido a la alimentación o la puesta de huevos.

En la práctica, el insecto adquiere la célula bacteriana de simbionte intestinal transfectada o transformada genéticamente por dsARN del ambiente mediante ingesta. Dicha célula bacteriana de este modo se establece como una población viva en el intestino del insecto, en la que la misma divide y transcribe activamente el dsARN que codifica. de manera conveniente, esto, por lo tanto, media el iARN en el insecto indefinidamente. El dsARN se direcciona idealmente contra el gen de cadena de tubulina alfa 1 o el factor de alargamiento 1 alfa, lo que produce su modulación y, más específicamente, su regulación por disminución. Dada la importancia de estos genes, el insecto resulta afectado adecuadamente y, por lo tanto, muere.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un insecto perteneciente al Orden *Thysanoptera*, caracterizado porque dicho insecto comprende una célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada en la que dicha bacteria es un simbionte intestinal de dicho insecto y se transforma para expresar dsARN contra al menos una parte del gen de cadena de tubulina alfa 1 o al menos una parte del gen del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.

En una realización preferida de la invención, dicha bacteria se transforma o se transfecta para expresar dsARN contra al menos una parte del gen de la cadena alfa 1 de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona el uso de la célula bacteriana descrita anteriormente en un procedimiento para modular la expresión de un gen diana de un insecto perteneciente al Orden *Thysanoptera* que comprende:

contaminar una composición que va a ser ingerida por el insecto con dicha célula bacteriana; después de lo cual la ingesta de dicha célula bacteriana por dicho insecto produce que dicha célula bacteriana colonice el intestino de dicho insecto, en el que sintetiza dsARN contra al menos una parte del gen de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento para modular dicha expresión del gen del insecto.

En un uso preferido de dicha invención, dicha célula bacteriana se transforma o transfecta para expresar dsARN contra al menos una parte del gen de la cadena alfa 1 de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.

En una realización preferida de la invención, dicha composición comprende una fuente de alimento para el insecto. Más preferentemente aún, dicha composición son las heces o el excremento de dicho insecto, o una fuente de alimentación del insecto joven, tal como, entre otras, una fuente de planta.

En una realización preferida adicional del tercer aspecto de la invención, la modulación de dicha expresión génica mata a dicho insecto, idealmente en la etapa larval y, por lo tanto, es un procedimiento eficaz de control o eliminación de plagas.

En las reivindicaciones a continuación y en la descripción anterior de la invención, salvo donde el contexto requiera lo

contrario debido al lenguaje expreso o una implicación necesaria, la palabra “comprende”, o variaciones tales como “comprenden” o “que comprende” se usa en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero no para excluir la presencia o adición de características adicionales en diversas realizaciones de la invención.

5

Las características preferidas de cada aspecto de la invención pueden ser como se describió con relación a cualquiera de los otros aspectos.

Otras características de la presente invención serán evidentes a partir de los ejemplos a continuación. En términos generales, la invención se extiende a cualquier característica novedosa, o cualquier combinación novedosa, de las características presentadas en la presente memoria descriptiva (incluidas las reivindicaciones y los dibujos adjuntos). Por lo tanto, los elementos, los números enteros, las características, los compuestos o los restos químicos descritos junto con un aspecto, modalidad o ejemplo específico de la invención se deben entender como aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente, a menos que sean incompatibles.

15

Además, a menos que se especifique lo contrario, cualquier característica descrita en la presente se puede reemplazar por una característica alternativa que tenga el mismo propósito o uno similar.

La invención se describirá únicamente a modo de ejemplo con respecto a las siguientes figuras, en las que:-

20

Figura 1 muestra la configuración de un casete de tisanóptaros. Los promotores convergentes están indicados con rojo. Cabe señalar que los promotores *Ptac* no contienen una secuencia operadora, por lo tanto, no están sujetos a la represión de *Lacl*.

25

Figura 2: muestra un mapa vectorial de Pex-A (Eurofins, <http://www.operon.com/products/gene-synthesis/ListOfVectors.aspx>).

Figura 3: muestra un mapa del casete de tisanóptaros pEX-A.

30

Figura 4: muestra mapas de plásmidos de pElong1 y pTub3. Las flechas rojas indican promotores *Ptac* y la sección azul indica la posición de la secuencia de la plantilla de dsARN.

Figura 5: muestra mapas de plásmidos de pRN1 y pRN2. El gen de *ARNsa III* se muestra en verde. Los recuadros celestes indican los terminadores de transcripción T4 y la flecha negra indica la posición del gen de resistencia a la apramicina.

35

Figura 6: muestra la expresión de tubulina relativa en *F. occidentalis* normalizada al control endógeno (18S ARN). Las barras representan la abundancia de transcripciones relativa media de tubulina en insectos jóvenes 48 horas después de la alimentación con bacterias (Bfo2) que expresan agarosa de cadena doble (control) y tubulina de cadena doble (tubulina KD). Las barras representan la abundancia de transcripciones media, las barras de error representan la desviación estándar alrededor de la media. El eje Y representa la abundancia de transcripciones de tubulina relativa normalizada a 18S ARN. Cada panel representa un experimento separado que usa un grupo de aproximadamente 22 insectos de *F. occidentalis* por tratamiento.

40

45

Figura 7: muestra el panel superior: Composición de poblaciones de *F. occidentalis* después de 4 días de exposición oral a cepas de Bfo2 modificadas que expresan dsARN de control o Tubulinacd, muestra un fenotipo de mortalidad significativa en las etapas de larva y adulta expuestas a Tubulinacd. Datos recogidos de 7 experimentos independientes; cantidad de insectos alimentados = 234 (control), 150 (muertos por calor [HK] Tubulinacd), 220 (Tubulinacd). Nota: las etapas de pre-pupa y pupa de los tisanóptaros son sin alimentación. Se observó un fenotipo de mortalidad de inactivación de tubulina altamente significativo entre las larvas de tisanóptaros, y específicamente en la primera (L1) etapa de larva. También se observó una mortalidad baja, pero significativa entre las *F. occidentalis* adultas. Las Bfo2 muertas por calor (HK) que expresan Tubulinacd no provocaron el fenotipo de mortalidad, lo que resalta la importancia de la reintroducción de bacterias que expresan dsARN vivas en contraposición con simplemente dsARN previamente sintetizado. **Panel inferior: Experimentos adicionales que identifican que la 1ª etapa de larva es la más susceptible al fenotipo de mortalidad.** Datos recogidos de 4 experimentos independientes; cantidad de insectos alimentados = 134 (control), 95 (TubulinacdHK) y 81 (Tubulinacd).

50

55

60

Figura 8: muestra el daño de la hoja en plántulas de pepino provocado por *F. occidentalis* con y sin iARN administrado por simbiote. Los grupos de plántulas de pepino se expusieron a larvas de WFT y adultos que habían sido infectados oralmente con bacterias (Bfo2) que expresan ARN de Agarosacd (control) o ARN de Tubulinacd (Tubulina KD). Se produjo un daño significativamente inferior en las plantas expuestas a *F. occidentalis* que recibieron la inactivación de Tubulinacd en comparación con los controles.

Figura 9: muestra la estructura de la secuencia del vector de pEX-A (2450 pb).

Figura 10: muestra la estructura de la secuencia de la secuencia del promotor Ptac.

Figura 11: muestra la estructura de la secuencia del casete de tisanóptaros (138 pb, construcción sintética, secuencia Ptac subrayada).

Figura 12: muestra la estructura de la secuencia del casete de tisanóptaros pEX-A (2588pb).

Figura 13: muestra la estructura de la secuencia del gen de la cadena de tubulina alfa 1.

Figura 14: muestra la estructura de la secuencia del gen del factor de alargamiento 1 alfa.

Figura 15: muestra la estructura de la secuencia del plásmido de pTub3 (2898 pb).

Figura 16: muestra la estructura de la secuencia del plásmido de pElong1 (2982).

Figura 17: muestra la estructura de la secuencia de BFo2 de ARNs III (amplificada por RCP).

Figura 18: muestra la estructura de la secuencia del plásmido de ARNp1.

Figura 19: muestra la estructura de la secuencia del plásmido de ARNp2.

Ejemplo 1

El procedimiento comprende establecer iARN mediado por simbionte como un medio nuevo, sólido y manejable para el silenciamiento génico prolongado sistémico, la supresión o la inactivación en WFT, lo que proporciona una herramienta de investigación vital para complementar el proyecto de secuenciación del genoma de WFT en curso (<https://www.hgsc.bcm.edu/western-flower-thrips-genome-project>) y una potencial estrategia de biocontrol novedosa.

Los WFT contienen dos especies de bacterias intestinales, una que pertenece al género *Erwinia*, llamada BFo1, y la segunda se relaciona con el género *Pantoea*, llamada BFo2, que también puede crecer fuera del insecto huésped. Las bacterias presentes en el intestino de los tisanóptaros se transmiten a la progenie a través de las hojas que los adultos y las larvas comen y sobre las que defecan. En las larvas de segundo estadio, todos los tisanóptaros se infectan con la bacteria y hay hasta 10^5 células bacterianas presentes por cada tisanóptaro. Las bacterias alcanzan poblaciones altas en las larvas, se pueden cultivar en placas y son manejables para la manipulación genética. Los genomas de BFo1 y BFo2 se han secuenciado. El control de la transcripción es similar al de la *E. coli*.

La síntesis de dsARN estable depende de (i) la inactivación de ARNs III bacteriana, y (ii) la integración del casete de expresión de dsARN en el genoma bacteriano. Esto se logra mediante la modificación genética del casete de expresión en un plásmido adecuado y la eliminación del gen de BFo2 de la ARNs III. Se aíslan recombinantes en los cuales el gen de la ARNs III nativo se elimina y se reemplaza por un gen de resistencia a la apramicina. Se introducen plásmidos que expresan dsARN (optimizados para iARN) para dirigirse a los siguientes genes de WFT: cadena de tubulina alfa 1 (número de acceso GT305545; GenBank, NCBI); o factor de alargamiento 1 alfa (número de acceso GT303726; GenBank, NCBI). La inactivación de cualquiera de los dos genes diana deshabilita gravemente a las larvas e indica que la tecnología es eficaz contra los WFT. La síntesis de dsARN estable para cada casete se determina para cada cepa bacteriana recombinante por Q-RTRCP.

Las infecciones experimentales se realizaron en diferentes etapas de desarrollo de los WFT al alimentarlos con ARN recombinante que expresa las cepas de *Erwinia* TAC, resuspendidas en una mezcla de alimentación artificial. Los tisanóptaros se alimentaron por membrana con esta mezcla como la única fuente de alimentación durante 2-4 días. Se incluyó tinta en la mezcla para identificar de manera no invasiva los WFT que se habían alimentado. Se confirmó el crecimiento bacteriano y la viabilidad en la mezcla de alimentación en el comienzo y el final de cada experimento mediante el cultivo en medios selectivos. El contenido del intestino de los WFT también se cultivó en medios selectivos para verificar la viabilidad y la población de bacterias de BFo2 recombinantes ingeridas. La retención de las características simbióticas de las bacterias se evaluó siguiendo el desarrollo de los WFT en los insectos repoblados que expresan Agarase (control negativo) y Tubulinase, la correlación de estas mediciones con la presencia de bacterias recombinantes en el intestino y mediante Q-RTRCP de ARNm de tubulina presente en las preparaciones de ARN de los insectos.

Los insectos poblados con cepas de BFo2 que expresan dsARN dirigidos a los genes de tubulina se compararon con

los insectos poblados con las bacterias que expresan dsARN de control negativo. Se determinaron los datos de mortalidad de los insectos en cada caso. Estos datos se correlacionaron con los ensayos de Q-RTRCP para medir la abundancia de ARNm de los genes diana respectivos.

- 5 Esta nueva estrategia de iARN puede prevenir la infección de plantas por tospovirus (matando insectos juveniles antes de que puedan volar, atacando los genes de la competencia vectorial del insecto, por ejemplo, codificando una proteína de unión para el virus [Kikkert M., Meurs C., van de Wetering F., Dormüller S., Peters D., Kormelink R., Goldbach R., 1998. *Phytopathology* 88: 63-69.]y/o la expresión de genes virales), y proporciona una plataforma para diseñar una estrategia efectiva de protección de cultivos usando las bacterias recombinantes como bioplaguicidas.

10 Las bacterias típicamente expresan una enzima, ARNsa III, que degrada específicamente dsARN. De hecho, hemos establecido que el dsARN es inestable después de que se expresa en BFo2. Para eludir este problema, hemos diseñado una cepa mutante de BFo2, en la cual el gen codificante de la ARNsa III se altera, y que expresa de manera estable el dsARN.

15 **Materiales y procedimiento**

Cepas bacterianas y medios

- 20 Los procedimientos de clonación se realizaron en *E. coli* JM109. La alteración del gen de la ARNsa III se realizó en una BFo2 que contiene pIJ790 para permitir la recombinación mediada por rojo Lambda (Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF (2003) *Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos*, 18 de febrero; 100(4):1541-6.)). El cultivo de cepas de *E. coli* fue como se recomendó en Sambrook y Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ra ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-577-4). Se cultivó BFo2 a 30 °C en cultivo líquido (LB, con agitación) y en la superficie de placas de agar L. La identidad del mutante de alteración de la ARNsa III fue confirmada por RCP.

Sistema de expresión de dsARN

- 30 **Construcción del vector de expresión para accionar la expresión constitutiva de ARN de cadena doble en BFo2.**

Se usó un casete de expresión sintética de 138 pb (Eurofins), que contenía varios sitios de restricción flanqueados por dos copias del promotor constitutivo modificado *Ptac*. Se diseñaron las secuencias promotoras para accionar la transcripción de manera convergente (figura 1), para garantizar la transcripción de ambas cadenas complementarias de fragmentos de ADN subclonados en el sitio MC. El casete de expresión sintético se clonó entre los sitios NotI del plásmido resistente a la ampicilina pEX-A (Eurofins, La figura 2), lo que genera el casete del plásmido tisanóptaros pEX-A.

Para ayudar a predecir los genes de *F. occidentalis* usados como candidatos diana para la interferencia mediada por ARN bicatenario, se usó Deqor (Henschel y col., 2004, *Nucleic Acids Research*, 32(problema del servidor web):W113-20). Las secuencias consideradas como candidatas adecuados se obtuvieron mediante síntesis (Eurofins), flanqueadas por sitios XbaI. Estos fragmentos de ADN se proporcionaron como insertos clonados en los vectores pEX-A o RCP2 (Tabla 2).

45 Los fragmentos de ADN a usar como plantillas para la síntesis de dsARN se subclonaron en el sitio XbaI del casete pEX-A-tisanóptaros y, por lo tanto, se flanquearon mediante promotores *Ptac* convergentes para asegurar la transcripción constitutiva de dos cadenas de ARN complementarias que se hibridarían para generar el ARN bicatenario deseado. Los plásmidos resultantes fueron pElong1 y pTub3. Estas construcciones se verificaron mediante restricción y secuenciación de ADN (La figura 4).

50 **Generación de un mutante de alteración de BFo2.**

El gen de ARNsa III se amplificó por RCP a partir de BFo2 de tipo salvaje usando los cebadores RIIBfo2F1 y RIIBfo2R1 (Tabla 1). El producto (759 pb de longitud) se digirió con EcoRI/HindIII y se ligó en pIJ2925 previamente digerido con el plásmido de ARNp1 generador de EcoRI/HindIII. La alteración de esta copia del gen de la ARNsa III se logró mediante digestión de EcoRV de ARNp1 e inserción del gen de resistencia a la apramicina (flanqueado por terminadores de transcripción T4) extirpado del plásmido pQM5062 mediante digestión de restricción de HindIII y extremo romo usando ADN polimerasa T4 en presencia de dNTP 1 mM, lo que dio lugar a la ARNp2 (La figura 5). Para facilitar la transformación mediada por rojo lambda, se crearon células BFo2 electrocompetentes, como se recomienda para la *E. coli* (Sambrook y Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ra ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-577-4) y se las transformó por electroporación con el plásmido pIJ790 (Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF (2003) *Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos*, 18 de

febrero;100(4):1541-6.)). - Creación de la cepa BFo2/pIJ790. El gen alterado de la *ARNsa III* se extirpó del ARNp2 mediante digestión de BglII y después se introdujo purificación en gel en BFo2/pIJ790 electrocompetentes mediante electroporación. Se seleccionaron transformantes de cruzamiento doble mediante colocación en placas de réplica en medios selectivos que contenían ampicilina o apramicina. Se evaluaron colonias viables para detectar la presencia de la alteración por RCP de colonias usando los cebadores BFo2RNasetestF y BFo2RNasetestR. Todos los plásmidos se confirmaron mediante digestión de restricción y secuenciación.

Evaluación de la funcionalidad del sistema de expresión de dsARN

10 Se sedimentaron cultivos nocturnos de BFo2 que contenían los plásmidos de expresión de dsARN mediante centrifugado (13.000 X g durante 10 min) y se mezclaron con volúmenes iguales de RNAProtect (Qiagen). Se aisló el ARN total usando el kit de aislamiento de ARN RNeasy mini (Qiagen). Se digirió el ADN genómico usando el tratamiento ADNsa I en columna durante 45 minutos a temperatura ambiente. La transcripción inversa específica de la cadena se realizó en 1 ug de ARN total usando el kit de transcripción inversa iscript select (Biorad) que incluye el
15 potenciador del cebador específico del gen (GSP) y uno de los siguientes pares de cebadores específicos del gen: tubulina - TubFoF1 y TubFoR1, factor de alargamiento - EFFoF1 y EFFoR1, (secuencias mostradas en la Tabla 3). Los ADNc se diluyeron 1/3 en agua libre de nucleasas (proveedor). Se realizó amplificación en tiempo real específica de cadena por triplicado usando Sybr-Green Supermix (Biorad) y los dos cebadores específicos de genes enumerados en la Tabla 1. No se usaron controles de plantilla (NTC, transcripción no inversa) para evaluar el grado de arrastre de
20 ADN genómico.

Infección de tisanóptaros con cepas de BFo2

Se sedimentaron cultivos nocturnos de BFo2 que contenían los plásmidos de expresión de dsARN mediante
25 centrifugado (3.000 X g durante 2 min) y se lavaron mediante resuspensión en caldo Luria, después se resuspendieron a 5×10^6 /ml en una mezcla de alimentación artificial (20 % (v/v) de caldo Luria, 2,4 % (p/v) de sucrosa, 0,32 % (p/v) de NaCl y 0,03 % (p/v) de azul de metileno). Las *Frankliniella occidentalis* de todas las etapas de desarrollo se alimentaron por membrana con esta mezcla como la única fuente de alimentación durante 2 a 4 días desde un depósito de un frasco Bijou invertido, cubierto con Parafilm estirado. Se incluyó azul de metileno para identificar de manera no invasiva
30 los WFT que se habían alimentado (el color azul en el intestino resultó visible a través de la cutícula del insecto bajo un aumento de baja potencia en los WFT anestesiados por CO₂). Se confirmó el crecimiento bacteriano y la viabilidad en la mezcla de alimentación en el comienzo y el final de cada experimento mediante el cultivo en agar LB complementado con 1,5 % (p/v) de sucrosa y el antibiótico selectivo adecuado (apramicina para BFo2 que expresa Agarosac; apramicina y ampicilina para BFo2 que expresa Tubulinac). El contenido del intestino teñido de WFT
35 seleccionados aleatoriamente, esterilizados en la superficie también se cultivó en medios selectivos para verificar la viabilidad y la población de cepas de BFo2 ingeridas. Se prepararon controles adicionales usando cultivos nocturnos de BFo2 que expresan Tubulinac, que se sometieron a muerte por calor mediante incubación a 65 °C durante 20 min antes de la incorporación en las mezclas de alimentación como se describió anteriormente.

40 Eficacia del iARN en los insectos infectados

Se tomaron muestras de los tisanóptaros juveniles (1^{er} y 2^d estadio) 48 horas después de la infección con BFo2 recombinante, se extrajo el ARN y se cuantificaron los niveles de ARNm de tubulina alfa1 (La figura 6). Se aisló el ARN total de los grupos de aproximadamente 22 insectos jóvenes usando el kit *ZR Tissue and insect RNA microprep*
45 *kit* (Zymo Research). Se realizó el tratamiento de ADNsa en columna a temperatura ambiente usando ADNsa libre de ARNsas (Qiagen). Para cada aislamiento, se realizó la transcripción inversa de 500 ng de ARN usando el kit de síntesis Iscript Select y cebadores oligodT (BioRad). Se realizaron Q RT-RCP por triplicado usando Sybr Green Supermix (BioRad). Se realizaron diluciones en serie de ADNc agrupado por duplicado y se usaron para generar curvas estándar y para evaluar la eficacia de la reacción de q RT RCP. Se calculó la abundancia de transcripciones relativa de tubulina
50 alfa mediante la normalización a 18S. Todos los cebadores de Q RT RCP se enumeran en la Tabla 3.

Mortalidad de los insectos infectados

Las poblaciones de *Frankliniella occidentalis* se criaron en plantas de crisantemo y frijoles *ad libitum* del 70 % al 80 %
55 de humedad relativa, de 26 a 27 °C, con un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 horas respectivamente. Poblaciones de WFT de muestra que contenían todas las etapas de desarrollo de *F. occidentalis* se infectaron oralmente con BFo2 recombinante que expresaba ARN de Agarosac (control) y Tubulinac, y se monitorearon para detectar un fenotipo de inactivación después de 4 días. Se incluyó un control adicional que comprendía alimentar BFo2 muertas por calor que expresaban Tubulinac.

60

Protección de plantas

Los grupos de tres plántulas de pepino de 15 días se expusieron a 50 larvas y 15 adultas jóvenes de *F. occidentalis* que habían sido infectadas oralmente con BFo2 que expresaban ARN de Agarascad (control) o ARN de Tubulinacd (Tubulina KD). Después de 5 días, se evaluó el porcentaje de la superficie de la hoja que estaba cubierta con lesiones mediante el software de análisis de imagen Assess 2.0 para la cuantificación de enfermedades (Lamari, Sociedad 5 Fitopatológica Amer; 2008; <http://www.apsnet.org/press/assess>); (la figura 5).

Tabla 1: Cepas y plásmidos.

Cepas	genotipo/comentarios	Fuente
<i>E. coli</i> JM109	F'traD36 proA ⁺ B ⁺ lacIqΔ(lacZ)M15/Δ (lac-proAB) glnV44 e14-gyrA96 recA1relA1endA1 thi hsdR17	Yanish-Perron y col., 1985
Plásmidos		
pIJ2925	bla, lacZ	Kieser y col., 2000
ARNp1	pIJ2925 que contenía ~759 pb de producto de RCP de ARNsa III de BFo2	Este estudio
ARNp2	pIJ2925 que contenía producto de RCP de ARNsa III de BFo2 alterada de apramicina	Este estudio
pIJ790	λ-RED (gam, bet, exo), cat, araC, rep101ts	Gust y col., 2003
pQM5062	pMOD+Tn5062, Ampicillina ^R y Apramicina ^R	Bishop y col., 2004

10 Tabla 2: dianas de genes usadas para generar fragmentos de ADN sintético para usar como plantilla para la síntesis de dsARN.

Gen diana (Genebank)	Nombre del plásmido	Longitud de secuencia sintética
Factor de alargamiento 1A (GT303726.1)	pEX-A-Factor de alargamiento 1A	400 pb
Cadena de tubulina alfa 1 (GT305545.1)	pEX-A-tubulina alfa 1	316 pb

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para RCP y Q RT-RCP.

15

Oligonucleótidos	
RIIBfo2F1	TTAGAATTCGTTGATACAGCCCTGTTTCATGTGC
RIIBfo2R1	TTTAAGCTTTTAGTCAGTGCTTGCTCTGCAGC
BFo2RNasetestf	AGC GGA TAC CGT AGA AGC AC
BFo2RNasetestR	TAG GCC GGT AAC GGT AAG TG
TubFoF1	AGG ATG CTG CTA ACA ACT A
TubFoR1	GAT GCG GTC CAA TAC AAG
EFFoF1	CTC CAG GTC ACA GAG ATT
EFFoR1	CAC CAA TGA GGA TAG C
Fo18SF	GAA GGA TTG ACA GAT TGA
Fo18SR	TAG AGT CTC GTT CGT TAT
FoTubF	TTG AAG CAT CCT AAC
FoTubR	TTG AGA AGT TGA GAT

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Swansea; Dyson, Paul; Whitten, Miranda

5 <120> Sistema de control de plagas

<130> 0179AP/WO

<150> GB1510154.6

10 <151> 11/06/2015

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 34

<212> ADN

<213> Frankliniella occidentalis

20

<400> 1

ttagaattcg ttgatacagc cctgtttcat gtgc

34

25 <210> 2

<211> 32

<212> ADN

<213> Frankliniella occidentalis

30 <400> 2

tttaagcttt tagtcagtgc ttgctctgca gc

32

<210> 3

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Frankliniella occidentalis

<400> 3

40

agcggatacc gtagaagcac

20

<210> 4

<211> 20

45 <212> ADN

<213> Frankliniella occidentalis

<400> 4

taggccggta acggttaagtg

20

50

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

55 <213> Frankliniella occidentalis

<400> 5

aggatgctgc taacaacta

19

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> Frankliniella occidentalis
 <400> 6
 gatgcggtcc aatacaag 18
 10
 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Frankliniella occidentalis
 15
 <400> 7
 ctccaggtca cagagatt 18
 20
 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Frankliniella occidentalis
 25
 <400> 8
 caccaatgat gaggatagc 19
 <210> 9
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Frankliniella occidentalis
 <400> 9
 35 gaaggattga cagattga 18
 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Frankliniella occidentalis
 <400> 10
 tagagtctcg ttcgttat 18
 45
 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Frankliniella occidentalis
 50
 <400> 11
 ttgaagaagc atcctaac 18
 55
 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Frankliniella occidentalis
 60 <400> 12

ttgagaagta gttgagat

18

<210> 13
5 <211> 2450
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 13

acctgcggcc gcaagcttgg atccgaattc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc	60
cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggtagcctaa tgagtgaagt	120
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc	180
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt	240
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag	300
ctcactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca	360
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcggttt	420
tccataggct ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc	480
gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgctgcgt	540
ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg	600
tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca	660
agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact	720
atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta	780
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta	840
actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct	900
tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcggtaggt	960
tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga	1020
tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggtca	1080
tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat	1140
caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg	1200
cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt	1260
agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag	1320
accacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc	1380
gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag	1440
ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca	1500
tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggatatg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa	1560
ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga	1620
tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata	1680
attctcttac tgtcatgcc a tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca	1740

ES 2 764 134 T3

agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg 1800
 ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg 1860
 ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg 1920
 caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaaacag 1980
 gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac 2040
 tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg agcggataca 2100
 tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag 2160
 tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta 2220
 tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc 2280
 agctcccga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc 2340
 agggcgcgtc agcgggtggt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcacagagc 2400
 agattgtact gagagtgcac catatgggta ccgagctcgc ggccgcaagc 2450

<210> 14

<211> 40

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 14

10 gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg 40

<210> 15

<211> 138

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> casete de tisanóptaros que comprende la secuencia PTAC

20 <400> 15

cagctggagc tgttgacaat taatcatcgg ctcgtataat gtgtgggaat tcgagctcgg 60

atcctctaga ctcgagggaa gcttccacac attatacgag ccgatgatta attgtcaaca 120

gctcgatatc atcagctg 138

<210> 16

25 <211> 2588

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Casete de pEX-A-Tisanóptaros

<400>16

ES 2 764 134 T3

acctgcggcc gcaagcttgg atccgaattc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc	60
cacacaacat acgagccgga agcataaaagt gtaaagcctg gggcgcctaa tgagtgagct	120

aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	180
agctgcatta	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	tttgcgtatt	gggcgctctt	240
ccgcttcctc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgttcg	gctgcggcga	gcggtatcag	300
ctcactcaaa	ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	360
tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcgtttt	420
tccataggct	ccgccccctt	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagagggtggc	480
gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tggaagctcc	ctcgtgcgct	540
ctcctgttcc	gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	600
tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	gttcgctcca	660
agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccggtt	agcccgaccg	ctgcgcctta	tccggtaact	720
atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	780
acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tggtggccta	840
actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	900
tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctggg	agcggtggtt	960
tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaaag	atctcaagaa	gatcctttga	1020
tcttttctac	ggggctctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	acgttaaggg	attttgggtca	1080
tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	ttaaaaatga	agttttaaat	1140
caatctaaag	tatatatgag	taaacttggg	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtgagg	1200
cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcgtt	catccatagt	tgcctgactc	cccgtcgtgt	1260
agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	1320
accacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	1380
gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	1440
ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	gctacaggca	1500
tcgtgggtgtc	acgctcgtcg	tttggtatgg	cttcattcag	ctccggttcc	caacgatcaa	1560
ggcgagttac	atgatcccc	atgttgtgca	aaaaagcggg	tagctccttc	ggtcctccga	1620
tcgttgtcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	gcactgcata	1680
attctcttac	tgtcatgcc	tccgtaagat	gcttttctgt	gactgggtgag	tactcaacca	1740
agtcattctg	agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaatacggg	1800
ataataccgc	gccacatagc	agaacttta	aagtgtcat	cattggaaaa	cgttcttcgg	1860
ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccactcgtg	1920
cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	1980
gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	gggcgacacg	gaaatgttga	atactcatac	2040

tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg agcggataca	2100
tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag	2160
tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta	2220
tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc	2280
agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc	2340
agggcgcgtc agcgggtggt ggccgggtgc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc	2400
agattgtact gagagtgcac catatgggta ccgagctcgc ggccgcaagc cagctggagc	2460
tgttgacaat taatcatcgg ctctgtataat gtgtgggaat tcgagctcgg atcctctaga	2520
ctcgagggaa gcttccacac attatacgag ccgatgatta attgtcaaca gctcgatatc	2580
atcagctg	2588

<210> 17

5 <211> 316

<212> ADN

<213> Frankliniella occidentalis

<400> 17

10

tctagagcag atgccatcag acaagacaat tggaggaggt gatgattctt ttaacacatt	60
cttcagcgag acgggcgctg gcaaacacgt cccaggggct gtctttgttg acctggaacc	120
cactgtagtt gatgagggtcc gcactggtac ctaccgccag ctcttccacc ctgagcagct	180
tatcaccggc aaggaggatg ctgctaacaa ctatgctcgt ggtcactaca ccattggcaa	240
ggaaattgtc gaccttgtat tggaccgcat ccgcaagttg gctgaccagt gcacaggtct	300
tcaaggcttc tctaga	316

<210> 18

<211> 400

15 <212> ADN

<213> Frankliniella occidentalis

<400> 18

ES 2 764 134 T3

tctagaggtt ctcgacaagc tgaaggctga gcgtgaacgt ggtatcacca ttgacattgc	60
tctctggaag ttcgaaactc caaagtacaa cgtcactgtc atcgatgctc caggtcacag	120
agatttcatt aagaacatga ttactgggtac ctcccaagct gactgcgcta tcctcatcat	180
tggtgggtggg gttgggtgaat tcgaagctgg tatctccaag gatgggtcaaa ccagagaaca	240
cgctctttctc tctttcaccc tcggtgtcag acaactcatt gtcgccgtca acaagatgga	300
caccactcaa tactctgaag cccgtttcac tgaaattatc aaggaaaccc aaaacttcat	360
caaggagggg cggttacaac cctaagacac cgcctctaga	400

<210> 19

<211> 2898

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTub3

10

<400> 19

acctgcggcc gcaagcttgg atccgaattc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc	60
cacacaacat acgagccgga agcataaagt gttaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgagct	120
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc	180
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt	240
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag	300
ctcactcaaa ggcgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca	360
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt	420
tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc	480
gaaacccgac aggactataa agataaccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgctgcgct	540
ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ttttctccct tcgggaagcg	600
tggcgctttc tcatagctca cgctgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca	660
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact	720
atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta	780
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta	840
actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct	900
tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggtt	960
tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga	1020
tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggtca	1080
tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat	1140
caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg	1200
cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt	1260
agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag	1320
accacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc	1380
gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag	1440
ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca	1500
tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa	1560
ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga	1620
tcgttggtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat gggtatggca gcactgcata	1680

ES 2 764 134 T3

attctcttac	tgatcatgcca	tccgtaagat	gcttttctgt	gactggtgag	tactcaacca	1740
agtcattctg	agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaatacggg	1800
ataataccgc	gccacatagc	agaactttta	aagtgtcat	cattggaaaa	cgttcttcgg	1860
ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccactcgtg	1920
cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	1980
gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	ggcgacacg	gaaatgttga	atactcatac	2040
tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	ttgtctcatg	agcggataca	2100
tatttgaatg	tatttagaaa	aataaacaaa	taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaag	2160
tgccacctga	cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	aacctataaa	aataggcgta	2220
tcacgaggcc	ctttcgtctc	gcgcgtttcg	gtgatgacgg	tgaaaacctc	tgacacatgc	2280
agctcccgga	gacggtcaca	gcttgtctgt	aagcggatgc	cgaggagcaga	caagcccgtc	2340
agggcgcgtc	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggctggct	taactatgcg	gcatcagagc	2400
agattgtact	gagagtgcac	catatgggta	ccgagctcgc	ggccgcaagc	cagctggagc	2460
tgttgacaat	taatcatcgg	ctcgtataat	gtgtgggaat	tcgagctcgg	atcctctaga	2520
gcagatgcca	tcagacaaga	caattggagg	aggtgatgat	tcttttaaca	cattcttcag	2580
cgagacgggc	gctggcaaac	acgtccccag	ggctgtcttt	gttgacctgg	aacctactgt	2640
agttgatgag	gtccgcactg	gtacctaccg	ccagctcttc	cacctgagc	agcttatcac	2700
cggcaaggag	gatgctgcta	acaactatgc	tcgtggtcac	tacaccattg	gcaaggaaat	2760
tgatgacctt	gtattggacc	gcatccgcaa	gttggctgac	cagtgcacag	gtcttcaagg	2820
cttctctaga	ctcgagggaa	gcttccacac	attatacgag	ccgatgatta	attgtcaaca	2880
gctcgatatc	atcagctg					2898

<210> 20

<211> 2982

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pElongI

10

<400>20

ES 2 764 134 T3

acctgcggcc gcaagcttgg atccgaattc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc 60
cacacaacat acgagccgga agcataaagt gttaaagcctg gggcgcctaa tgagtgagct 120
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 180
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg ttgcggtatt gggcgctcct 240
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag 300

20

ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca	360
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcggtttt	420
tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc	480
gaaacccgac aggactataa agataaccagg cgtttccccc tggaaagctcc ctcggtgcgt	540
ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg	600
tggcgctttc tcatagctca cgctgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca	660
agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcccta tccggtaact	720
atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta	780
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta	840
actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct	900
tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctgggt agcggtggtt	960
tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga	1020
tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggtca	1080
tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat	1140
caatctaaag tatatatgag taaacttgggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg	1200
cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt	1260
agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag	1320
accacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc	1380
gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag	1440
ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca	1500
tcgtgggtgc acgctcgtcg tttgggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa	1560
ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcgggt tagctccttc ggtcctccga	1620
tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata	1680
attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca	1740
agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg	1800
ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg	1860
ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg	1920
cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag	1980
gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac	2040
tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca	2100
tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag	2160
tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta	2220

ES 2 764 134 T3

tcacgaggcc ctttcgtctc ggcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc	2280
agctcccga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc	2340
agggcgcgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc	2400
agattgtact gagagtgcac catatgggta ccgagctcgc ggccgcaagc cagctggagc	2460
tgttgacaat taatcatcgg ctctgtataat gtgtgggaat tcgagctcgg atcctctaga	2520
ggttctcgac aagctgaagg ctgagcgtga acgtggatc accattgaca ttgctctctg	2580
gaagttcgaa actccaaagt acaacgtcac tgtcatcgat gctccaggtc acagagattt	2640
cattaagaac atgattactg gtacctcca agctgactgc gctatcctca tcattggtgg	2700
tgggtgttgg gaattcgaag ctggtatctc caaggatggc caaaccagag aacacgctct	2760
tctctctttc accctcgggtg tcagacaact cattgtcgcc gtcaacaaga tggacaccac	2820
tcaatactct gaagcccgtt tcaactgaaat tatcaaggaa acccaaaact tcatcaagga	2880
gggtcgggta caaccctaag acaccgcctc tagactcgag ggaagcttcc acacattata	2940
cgagccgatg attaattgtc aacagctcga tatcatcagc tg	2982

<210> 21

5 <211> 722

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> RNAsa III BFo2

<400> 21

ES 2 764 134 T3

gttgatacag ccctgtttca tgtgcaatta acagacgcaa agaataactg gaacagcatg	60
aacccccattc ttataaataa gctgcagcgt aaactaggct acactttttac tcatccggaa	120
cttctgcaac aagccttgac gcatcgcagt gccagtagta aacataatga aagattagaa	180
tttcttgggg attcaatctt aagctatgtc atcgcgaaatg cgctttattg tcaattccct	240
cgtgttgatg aaggggatat gagccggatg cgtgcgacct tggttagggg gaataccctt	300
gctgagatgg cacgggagtt cgaactgggt gagtgccttac gcctaggccc tggtgagctt	360
aagagtgggtg gatttcgccg tgaatccatt ttagcggata ccgtagaagc actgattggc	420
ggaattttct tggatagcga tatccaacaa accgaaaaat taatccttaa ttggtatcag	480
tcgcggtctg aagcgatcag cccgggtgat aagcaaaaag atccgaaaac acgtttacaa	540
gagtatcttc aagggcgta cttaccgtta ccggcctatt tagtggttca ggtgagggga	600
gaggctcatg atcaagaatt tacgattcac tgccaagtga gtggtatgaa tgaagcggtg	660
gttggcattg gttctagccg tcgtaaagca gaacaggctg ctgcagagca agcactgact	720
aa	722

<210> 22
 <211> 3384
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNp1

10 <400> 22

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff tataggftaa tgtcatgata ataatggfff	60
cttagacgtc aggtggcact ttfcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff	120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat	180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttcog tgcgcctt attccctfff	240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	360
tccttgagag ttttcgccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc	420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac	480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg	540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcg ccataaccat gagtgataac actgcggcca	600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg	660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag	840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg	900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	1020
agatcgctga gatagggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact	1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	1200
cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct	1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttggttgccg gatcaagagc	1320
taccaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	1500
ggttggtgctc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt	1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620

agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagcg	1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatcttt	1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	1800
gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacaggttc ctggcctttt	1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	1920
ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt	1980
cagtgaagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgaactg gaaagcgggc agtgaagcga	2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcaactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc	2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	2220
accatgatta cagatctggg gaattcgttg atacagccct gtttcatgtg caattaacag	2280
acgcaaagaa taactggaac agcatgaacc ccattcttat aaataagctg cagcgtaaac	2340
taggctacac ttttactcat ccggaacttc tgcaacaagc cttgacgcat cgcagtgcc	2400
gtagtaaaca taatgaaaga ttagaatttc ttggggattc aatcttaagc tatgtcatcg	2460
cgaatgcgct ttattgtcaa ttccctcgtg ttgatgaagg ggatatgagc cggatgcgtg	2520
cgaccttggg tagggggaat acccttgctg agatggcacg ggagttcgaa ctgggtgagt	2580
gcttacgcct aggccctggt gagcttaaga gtggtggatt tcgccgtgaa tccattttag	2640
cggataccgt agaagcactg attggcggaa ttttcttggg tagcgatatc caacaaaccg	2700
aaaaattaat ccttaattgg tatcagtcgc ggctggaagc gatcagcccc ggtgataagc	2760
aaaaagatcc gaaaacacgt ttacaagagt atcttcaagg gcgtcactta ccgttaccgg	2820
cctattttagt gggtcagtg aggggagagg ctcatgatca agaatttacg attcactgcc	2880
aagtgaagtgg tatgaatgaa gcggtggttg gcattggttc tagccgtcgt aaagcagaac	2940
aggctgctgc agagcaagca ctgactaaaa gcttggctgc agatctggca ctggccgtcg	3000
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccga acttaatcgc cttgcagcac	3060
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc ccttcccaac	3120
agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt	3180
gcggtatttc acaccgcata tgggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt	3240
taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc	3300
cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt	3360
caccgtcatc accgaaacgc gcga	3384

<210> 23

<211> 5109

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNp2

10 <400> 23

ES 2 764 134 T3

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff tataggftaa tgtcatgata ataattggttt	60
cttagacgtc aggtggcact ttfcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff	120
tctaaatata ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat	180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcctt attccctfff	240
ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaaact ggatctcaac agcggtaaga	360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagtctgc	420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac	480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg	540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgc ccataaccat gagtataac actgcggcca	600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg	660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag	840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg	900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	1020
agatcgtga gatagggtgc tctactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact	1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	1200
cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct	1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc	1320
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg cctacatacc	1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt	1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620
agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg	1680

gcagggctcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740
atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atTTTTgtga	tgctcgtcag	1800
gggggCGGag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacgggttc	ctggcctttt	1860
gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1980
cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cagatctggg	gaattcgttg	atacagccct	gtttcatgtg	caattaacag	2280
acgcaaagaa	taactggaac	agcatgaacc	ccattcttat	aaataagctg	cagcgtaaac	2340
taggctacac	ttttactcat	ccggaacttc	tgcaacaagc	cttgacgcat	cgcagtgccca	2400
gtagtaaaca	taatgaaaga	ttagaatttc	ttggggattc	aatcttaagc	tatgtcatcg	2460
cgaatgcgct	ttattgtcaa	ttccctcgtg	ttgatgaagg	ggatatgagc	cggatgcgtg	2520
cgaccttggg	tagggggaat	acccttgctg	agatggcacg	ggagttcgaa	ctgggtgagt	2580
gcttacgcct	aggccctggg	gagcttaaga	gtggtggatt	tcgccgtgaa	tccatttttag	2640
cggataccgt	agaagcactg	attggcggaa	ttttcttgga	tagcgatagc	tttatgcttg	2700
taaaccgttt	tgtgaaaaaa	tttttaaaat	aaaaaagggg	acctctaggg	tccccaatTA	2760
attagtaata	taatctatta	aaggtcattc	aaaaggtcat	ccaccggatc	aattcccctg	2820
ctcgcgcagg	ctgggtgccca	agctctcggg	taacatcaag	gcccgatcct	tggagccctt	2880
gccctcccgc	acgatgatcg	tgccgtgatc	gaaatccaga	tccttgaccc	gcagttgcaa	2940
accctcactg	atccggctca	cggtaactga	tgccgtatTT	gcagtaccag	cgtacggccc	3000
acagaatgat	gtcacgctga	aaatgccggc	ctttgaatgg	gttcatgtgc	agctccatca	3060
gcaaaagggg	atgataagtt	tatcaccacc	gactatTTtg	aacagtgccg	ttgatcgtgc	3120
tatgatcgac	tgatgtcatc	agcgggtggag	tgcaatgtcg	tgcaatacga	atggcgaaaa	3180
gccgagctca	tcgggtcagct	tctcaacctt	ggggttaccc	ccggcgggtg	gctgctggtc	3240
cacagctcct	tccgtagcgt	ccggccccctc	gaagatgggc	cacttggact	gatcgaggcc	3300
ctgcgtgctg	cgctgggtcc	gggaggggacg	ctcgtcatgc	cctcgtggtc	aggtctggac	3360
gacgagccgt	tcgatcctgc	cacgtcgccc	gttacaccgg	accttggagt	tgtctctgac	3420
acattctggc	gcctgccaaa	tgtaaagcgc	agcgcccatc	catttgcctt	tgcggcagcg	3480
gggccacagg	cagagcagat	catctctgat	ccattgcccc	tgccacctca	ctcgcctgca	3540

agcccggtcg cccgtgtcca tgaactcgat gggcaggtac ttctcctcgg cgtgggacac	3600
gatgccaaca cgacgctgca tcttgccgag ttgatggcaa aggttcccta tggggtgccg	3660
agacactgca ccattcttca ggatggcaag ttggtacgcg tcgattatct cgagaatgac	3720
cactgctgtg agcgctttgc cttggcggac aggtggctca aggagaagag ccttcagaag	3780
gaaggtccag tcggtcatgc ctttgctcgg ttgatccgct cccgcgacat tgtggcgaca	3840
gccctgggtc aactggggccg agatccgttg atcttctcgc atccgccaga gggcgggatg	3900
cgaagaatgc gatgccgctc gccagtcgat tggctgagct catgagcggg gaacgagatg	3960
acgttggagg ggcaaggctc cgctgattgc tggggcaaca cgtgaaaggc gagatcacca	4020
aggtagtcgg caaataatgt ctaacaattc gttcaagccg acgccgcttc gcggcgcggc	4080
ttaactcaag cgttagatgc actaagcaca taattgctca cagccaaact atcaggtaa	4140
gtctgctttt attattttta agcgtgcata ataagcccta cacaaattgg gagatatatc	4200
atgaaaggct ggctttttct tgttatcgca atagttggcg aagtaatcgc aacatccgca	4260
ttaaaatcta gcgagggctt tactaagctg atccggtgga tgaccttttg aatgaccttt	4320
aatagattat attactaatt aattggggac cctagaggct ccctttttta ttttaaaaat	4380
tttttcacaa aacggtttac aagcataaag ctatccaaca aaccgaaaaa ttaatcctta	4440
attggtatca gtcgcggtg gaagcgatca gcccggtga taagcaaaaa gatccgaaaa	4500
cacgtttaca agagtatctt caagggcgtc acttaccgtt accggcctat ttagtggttc	4560
aggtgagggg agaggctcat gatcaagaat ttacgattca ctgccaagtg agtggtatga	4620
atgaagcggg ggttggcatt ggttctagcc gtcgtaaagc agaacaggct gctgcagagc	4680
aagcactgac taaaagcttg gctgcagatc tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg	4740
actgggaaaa ccctggcggtt acccaactta atcgcccttc agcacatccc cctttcgcca	4800
gctggcgtaa tagcgaagag gccgcacccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga	4860
atggcgaatg gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc	4920
gcatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac	4980
acccgccaac acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca	5040
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga	5100
aacgcgcga	5109

REIVINDICACIONES

1. Una célula bacteriana transfectada o transformada genéticamente en la que dicha bacteria es un simbiote intestinal de un insecto que pertenece al orden *Thysanoptera*, caracterizada porque dicha célula bacteriana se transforma o se transfecta con ácido nucleico para expresar dsARN contra al menos una parte del gen de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento del insecto.
2. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 1, en el que dicho dsARN es contra al menos una parte del gen de cadena de tubulina alfa 1 o al menos una parte del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.
3. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho dsARN comprende una cadena de ARN que comparte 50 % de complementariedad con al menos uno de dichos genes.
4. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 3, en la que dicho dsARN comprende una cadena de ARN que comparte al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de complementariedad con al menos uno de dichos genes.
5. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 3 o 4, en la que dicho dsARN activo contra dicho gen de tubulina o dicho gen del factor de alargamiento del insecto es complementario al menos a una parte de la estructura de secuencia mostrada en la figura 13 o 14.
6. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 3 o 4, en la que el dsARN comprende una cadena de ARN que comparte al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o 99 % de complementariedad con una parte de la estructura de secuencia que se muestra en la figura 13 o 14.
7. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho insecto pertenece a la familia *Thripidae*.
8. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 7, en la que dicho insecto pertenece al género *Frankliniella*.
9. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 8, en la que dicho insecto pertenece a la especie *Frankliniella occidentalis*.
10. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha bacteria es un simbiote intestinal del género *Pantoea*; o un simbiote intestinal de la especie *Erwinia*.
11. La célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada según la reivindicación 10, en la que dicha bacteria es la bacteria *F. occidentalis* 2 (BFo2) o la bacteria *F. occidentalis* 1 (BFo1).
12. Un insecto perteneciente al Orden *Thysanoptera* caracterizado porque dicho insecto comprende una célula bacteriana genéticamente transformada o transfectada en la que dicha bacteria es un simbiote intestinal de dicho insecto y se transforma para expresar dsARN contra al menos una parte del gen de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento del insecto.
13. El insecto según la reivindicación 12, en el que dicho dsARN es contra al menos una parte del gen de cadena de tubulina alfa 1 o al menos una parte del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.
14. El uso de la célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en un procedimiento para modular la expresión de un gen diana de un insecto que pertenece al orden *Thysanoptera* que comprende: contaminar una composición que va a ser ingerida por el insecto con dicha célula bacteriana; después de lo cual la ingesta de dicha célula bacteriana por dicho insecto produce que dicha célula bacteriana colonice el intestino de dicho insecto, en el que sintetiza dsARN contra al menos una parte del gen de tubulina o al menos una parte del gen del factor de alargamiento para modular dicha expresión del gen del insecto.
15. El uso según la reivindicación 14, en el que dicho dsARN es contra al menos una parte del gen de cadena de tubulina alfa 1 o al menos una parte del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.

16. Un procedimiento para modular la expresión de un gen diana de un insecto que pertenece al orden *Thysanoptera* que comprende:
contaminar una composición que va a ser ingerida por el insecto con una célula bacteriana según cualquiera de las
5 reivindicaciones 1-11;
después de lo cual la ingesta de dicha célula bacteriana por dicho insecto produce que dicha célula bacteriana colonice
el intestino de dicho insecto, en el que sintetiza dsARN contra al menos una parte del gen de tubulina o al menos una
parte del gen del factor de alargamiento para modular dicha expresión del gen del insecto.
- 10 17. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicho dsARN es contra al menos una parte del
gen de cadena de tubulina alfa 1 o al menos una parte del factor de alargamiento 1 alfa del insecto.
18. El procedimiento según la reivindicación 16 o 17, en el que dicha célula bacteriana se transforma o
modifica genéticamente de modo que el ADN recombinante se integra de manera estable en el genoma de la célula
15 huésped.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicho ácido nucleico o ADN recombinante se integra
de manera estable en el gen de la *ARNsa III*.
- 20 20. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que dicha modulación de la
expresión de un gen diana causa la muerte del insecto.
21. El procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha muerte ocurre en la etapa larval.
- 25 22. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que dicha modulación de la
expresión de un gen diana evita la transmisión de un organismo patógeno.
23. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho organismo patógeno es un tospovirus.
- 30 24. El uso según las reivindicaciones 14 a 15 o un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones
16 a 23, en el que dicha composición comprende una fuente de alimento para el insecto.
25. El uso según las reivindicaciones 14 a 15 o un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones
16 a 23, en el que dicha composición comprende una planta, heces o excremento.
- 35

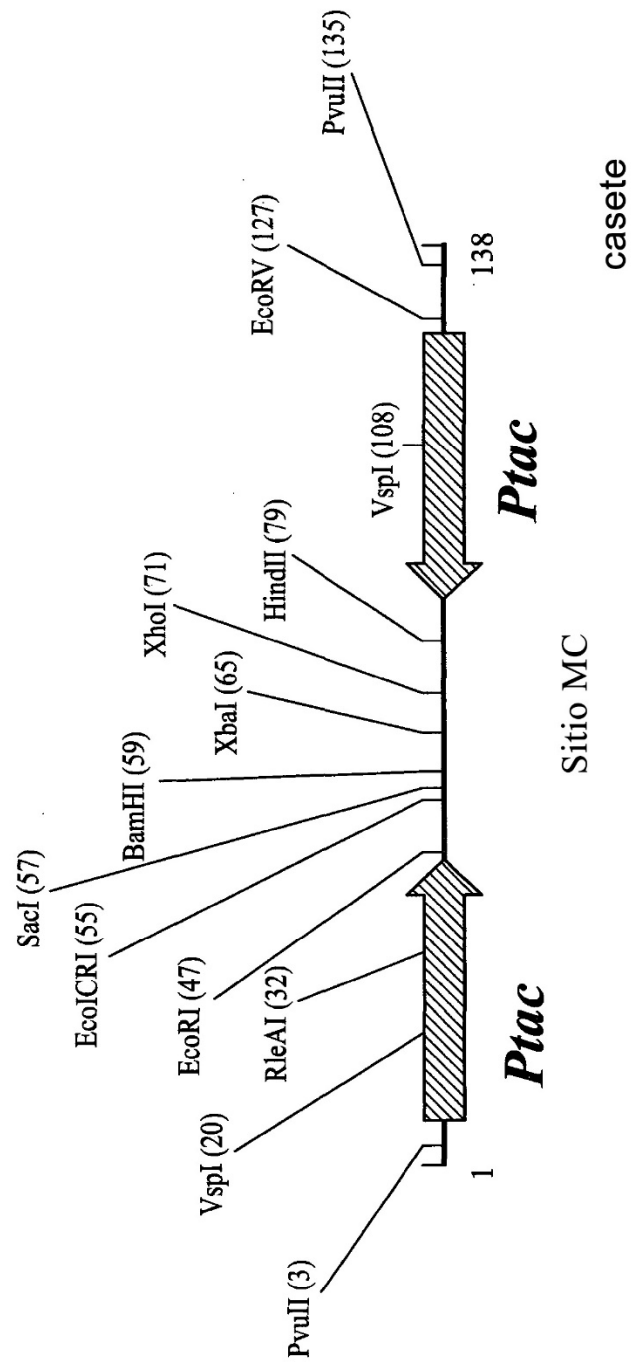


Figura 1: Tisanóptaros

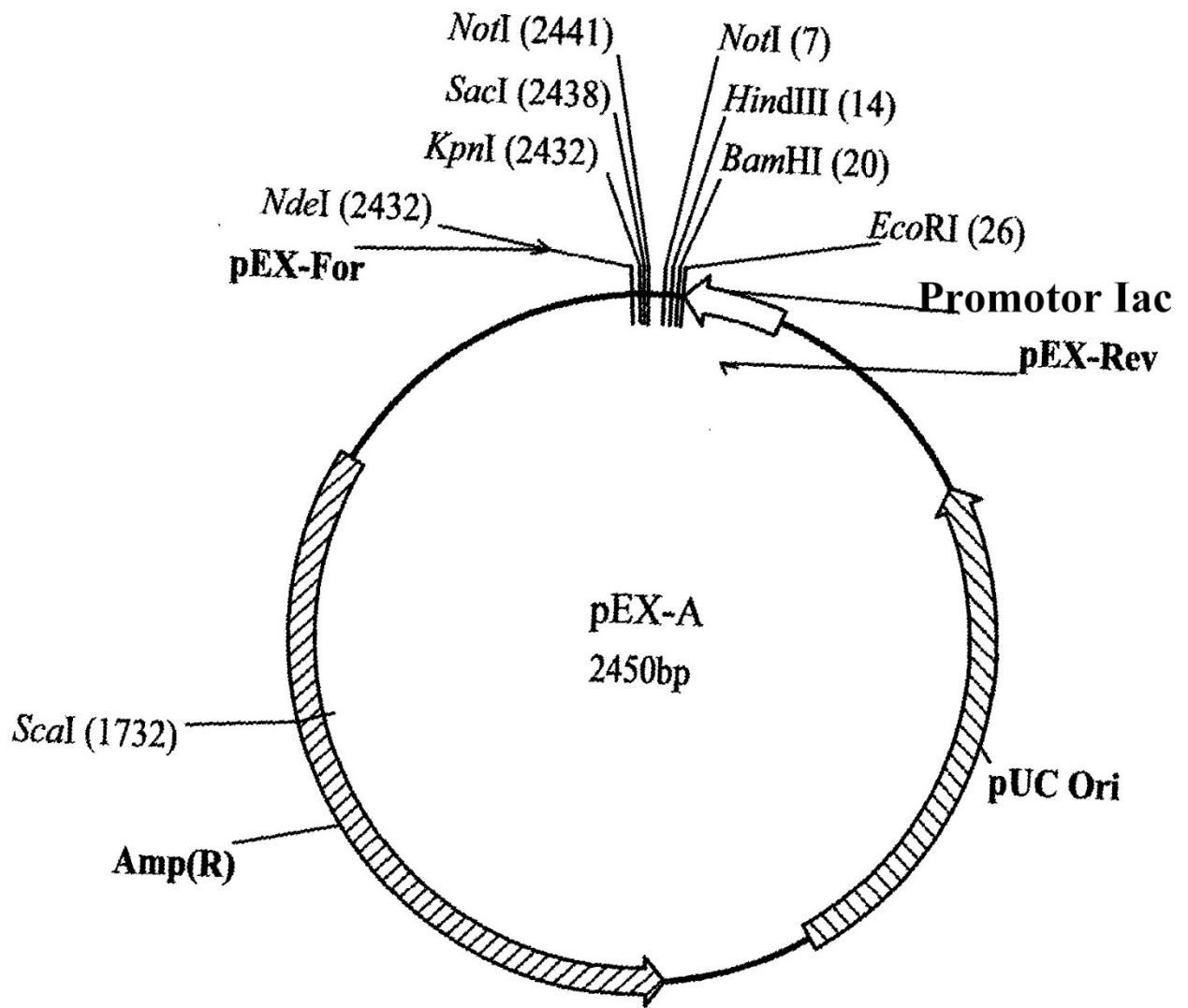


Figura 2: Mapa vectorial de Pex-A

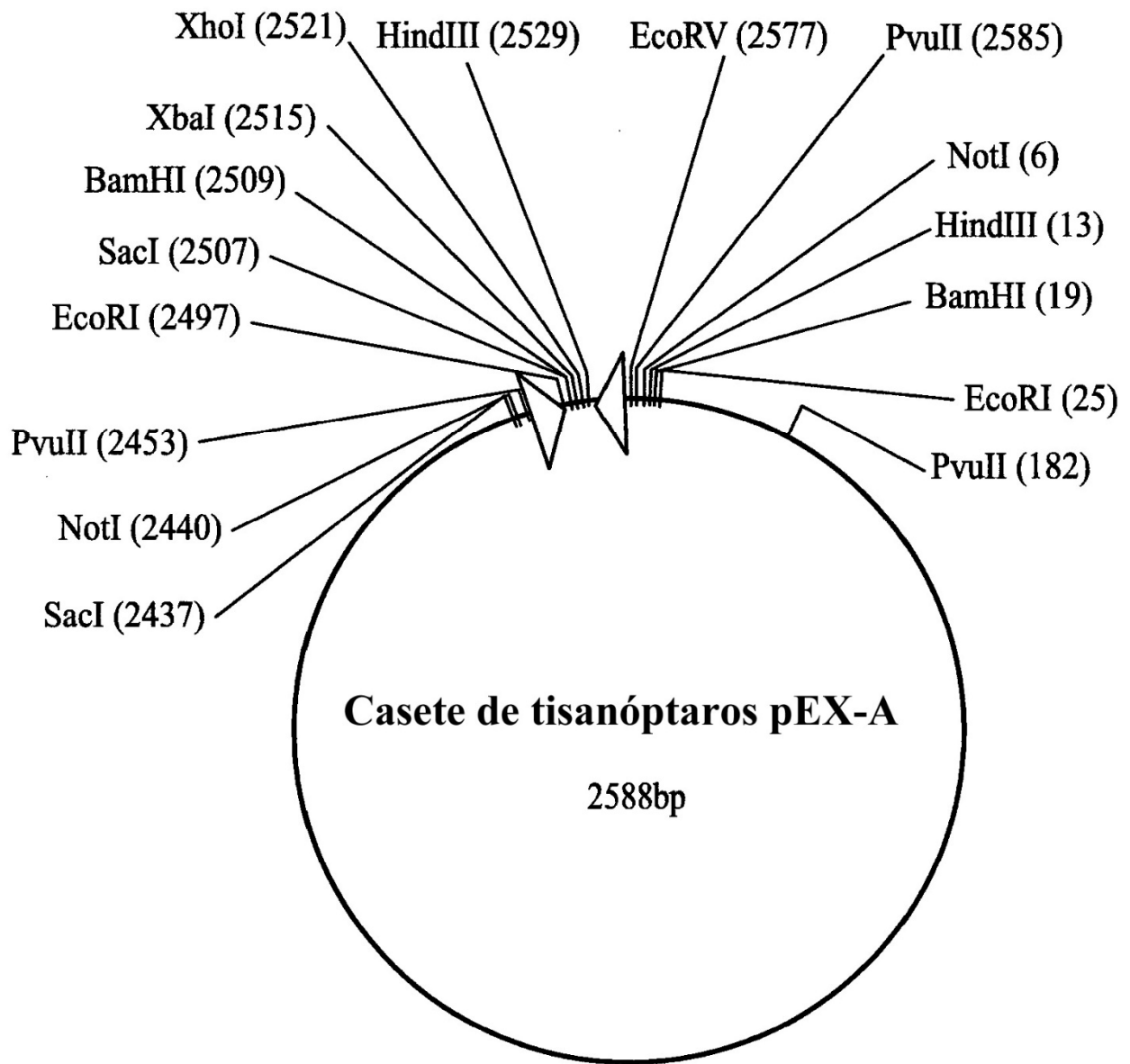


Figura 3: Mapa del casete de tisanóptaros pEX-A

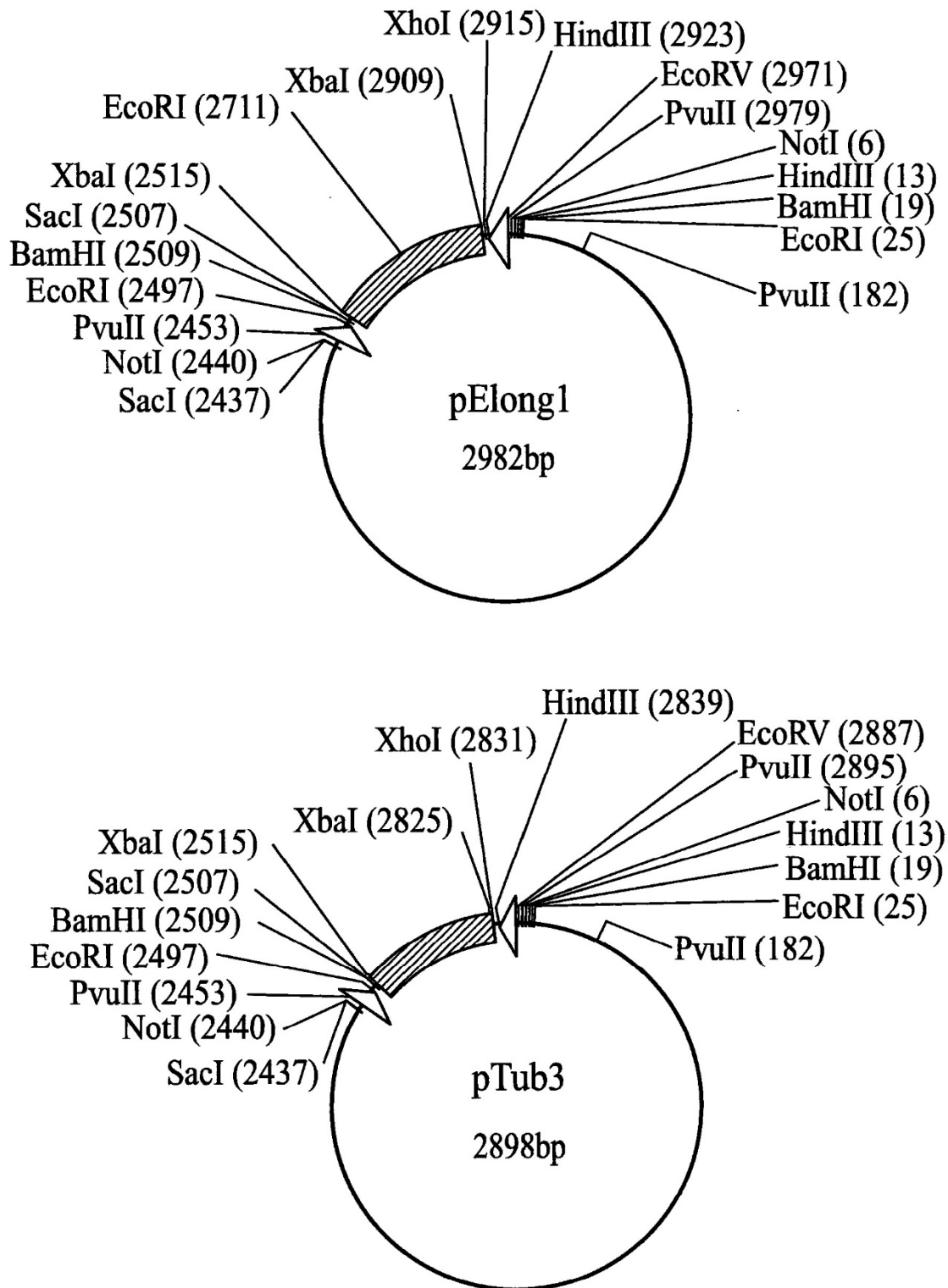


Figura 4: Mapas de plásmidos de pElong1 y pTub3

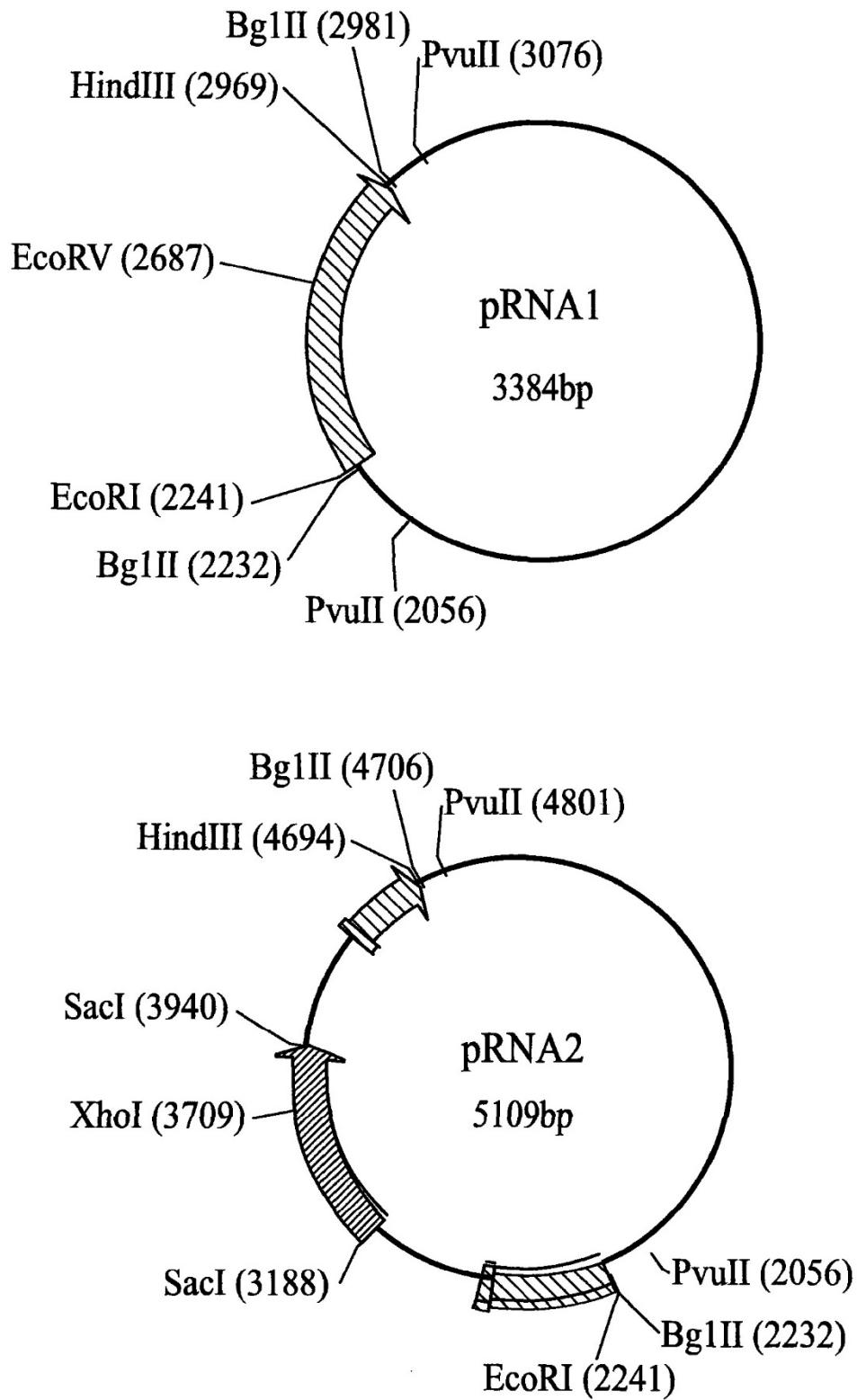


Figura 5: Mapas de plásmidos de pRN1 y pRN2

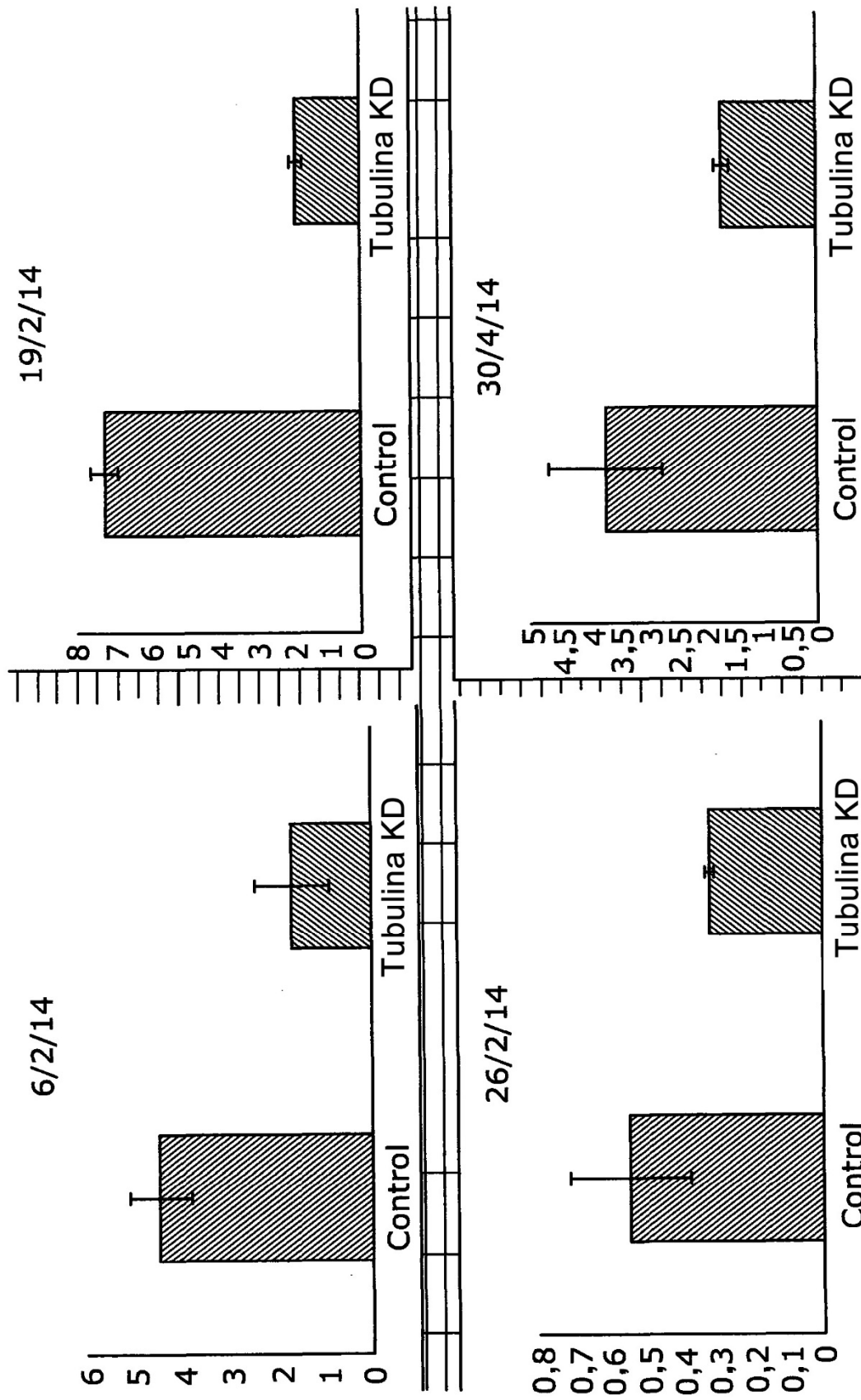


Figura 6: Expresión relativa de tubulina en *F. occidentalis* normalizada al control endógeno (18S ARN)

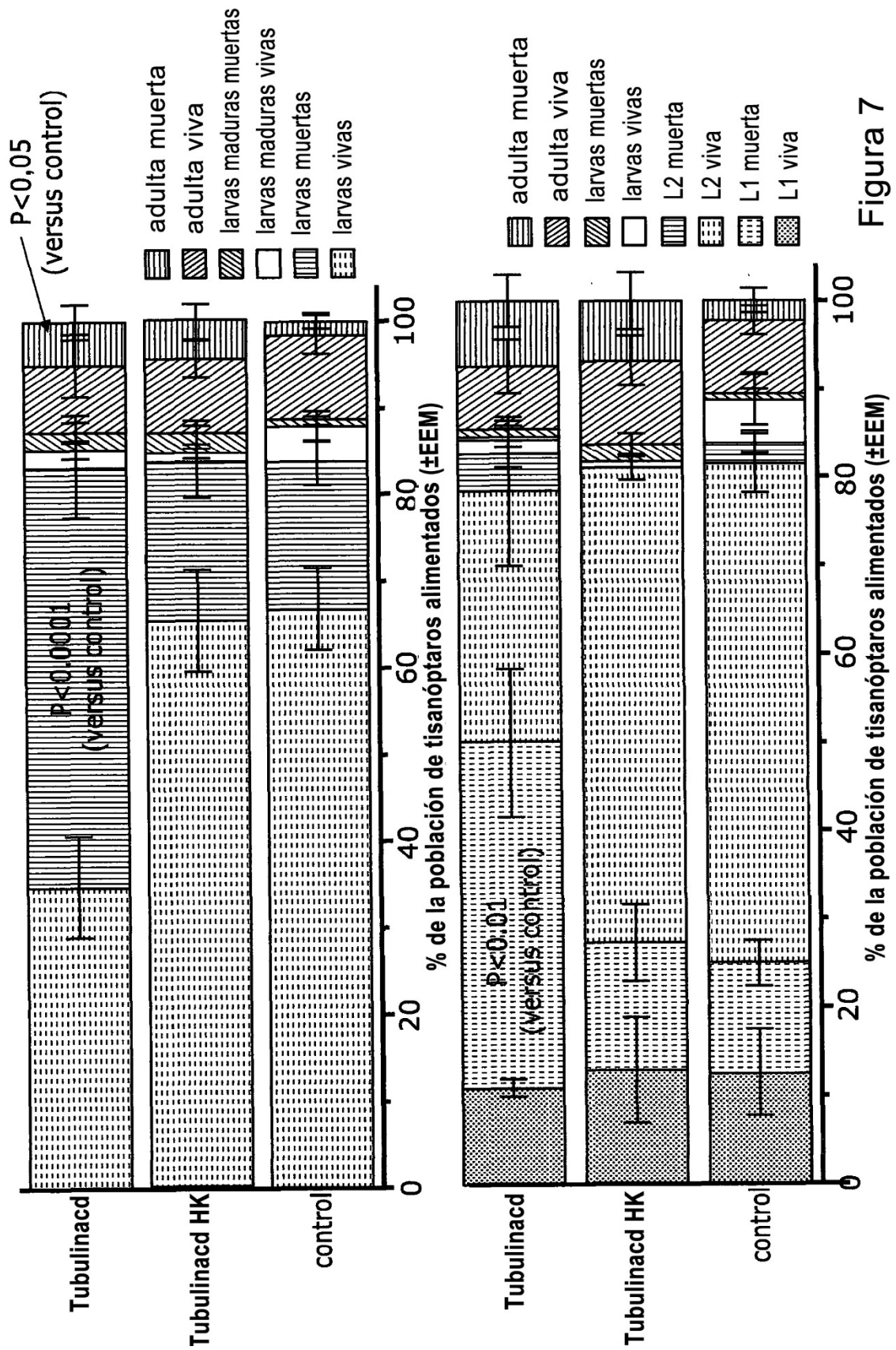


Figura 7

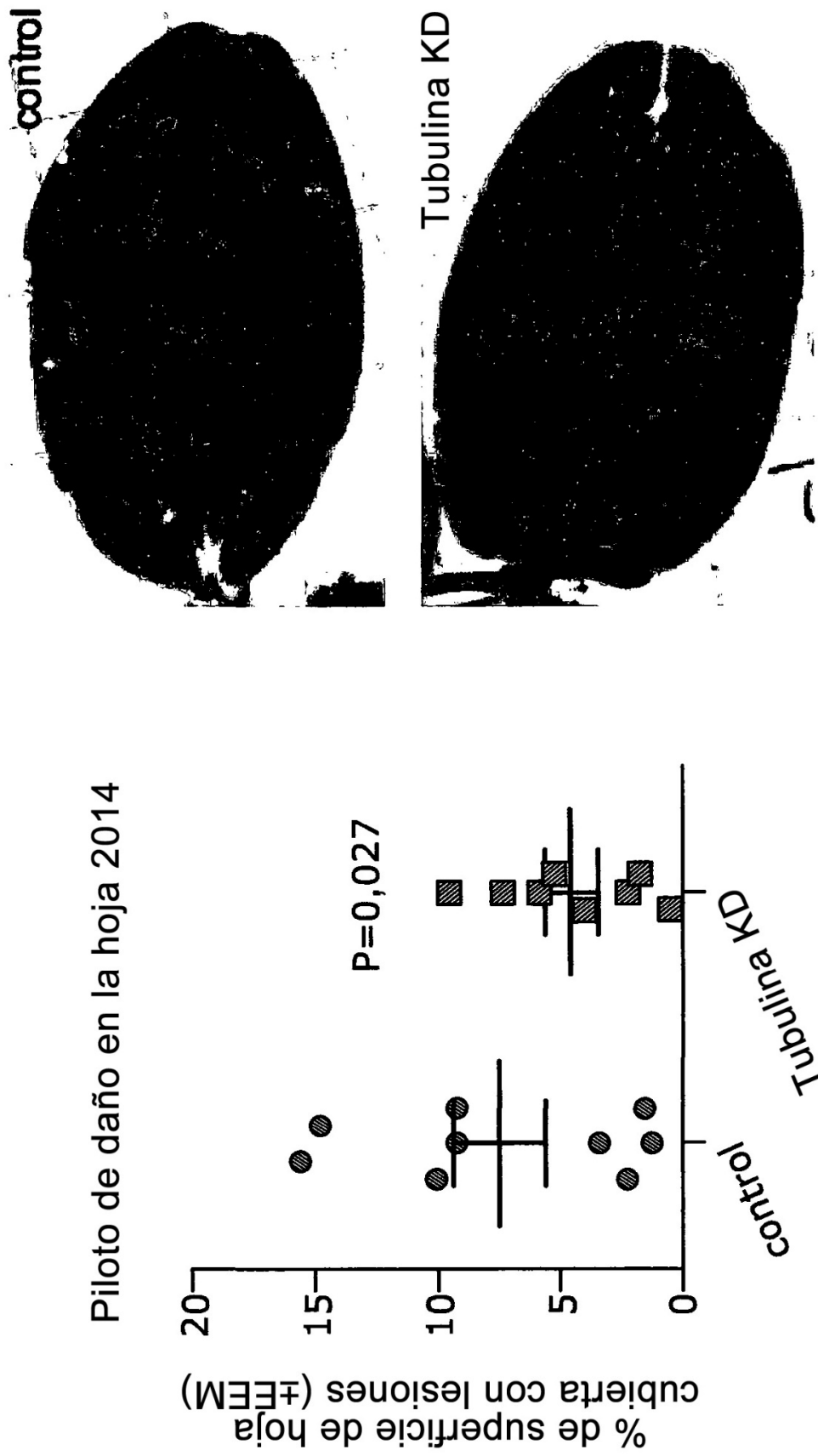


Figura 8: Daño de la hoja en plántulas de pepino provocado por *F. occidentalis* con y sin iARN administrado por simbionte

>pEX-A (2450 bp)

ACCTGCGGCCGCAAGCTTGGATCCGAATTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCC
TAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAG
TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG
CGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
CGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG
ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTA
AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACA
GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT
ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC
CAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT

Figura 9

CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA
 GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
 ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAA
 CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
 TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATG
 GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT
 CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
 CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
 ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGG
 ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG
 CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATA
 CTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG
 GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT
 TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAAC
 CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
 CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
 AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTG
 GCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGA
 GTGCACCATATGGGTACCGAGCTCGCGGCCGCAAGC

Figura 9 (Continuación)

> Secuencia Ptac

GAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGG

Figura 10

> Secuencia del casete de tisanóptaros (138 pb, construcción sintética, secuencia Ptac subrayada)

CAGCTGGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGGAATTCGA
 GCTCGGATCCTCTAGACTCGAGGGAAGCTT CCACACATTATACGAGCCGA
TGATTAATTGTCAACAGCTC GATATCATCAGCTG

Figura 11

>Casete de tisanóptaros pEX-A (2588bp)

ACCTGCGGCCGCAAGCTTGGATCCGAATTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
 CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCC
 TAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAG
 TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
 GAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG
 CGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
 ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
 GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
 AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
 GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
 TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
 TCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
 CGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCA
 CCGGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG
 ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
 GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
 ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
 AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
 TTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
 TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTA
 AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT
 TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACA
 GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
 ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT
 ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC
 CAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
 CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA
 GTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
 ATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAA
 CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
 TTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCACTGTTATCACTCATG
 GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT
 CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
 CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
 ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGG
 ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG
 CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATA
 CTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG
 GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT
 TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAC
 CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
 CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
 AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTG
 GCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGA
 GTGCACCATATGGGTACCGAGCTCGCGGCCGCAAGCCAGCTGGAGCTGTTGA
 CAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGGAATTCGAGCTCGGATCCTCTAGA
 CTCGAGGGAAGCTTCCACACATTATACGAGCCGATGATTAATTGTCAACAGCTC
 GATATCATCAGCTG

Figura 12

>Cadena de tubulina alfa 1

**TCTAGAGCAGATGCCATCAGACAAGACAATTGGAGGAGGTGATGATTCTTTTAA
CACATTCTTCAGCGAGACGGGCGCTGGCAAACACGTCCCCAGGGCTGTCTTTG
TTGACCTGGAACCCACTGTAGTTGATGAGGTCCGCACTGGTACCTACCGCCAG
CTCTTCCACCCTGAGCAGCTTATCACCGGCAAGGAGGATGCTGCTAACAACTAT
GCTCGTGGTCACTACACCATTGGCAAGGAAATTGTCGACCTTGTATTGGACCGC
ATCCGCAAGTTGGCTGACCAGTGCACAGGTCTTCAAGGCTTCTCTAGA**

Figura 13

>Factor de alargamiento 1 alfa

**TCTAGAGGTTCTCGACAAGCTGAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATCACCATTG
ACATTGCTCTCTGGAAGTTCGAAACTCCAAAGTACAACGTCACTGTCATCGATG
CTCCAGGTCACAGAGATTTTCATTAAGAACATGATTACTGGTACCTCCCAAGCTG
ACTGCGCTATCCTCATCATTGGTGGTGGTGTGGTGAATTCGAAGCTGGTATCT
CCAAGGATGGTCAAACCAGAGAACACGCTCTTCTCTCTTTCACCCTCGGTGTCA
GACAACTCATTGTCGCCGTCAACAAGATGGACACCACTCAATACTCTGAAGCCC
GTTTCACTGAAATTATCAAGGAAACCCAAAACCTTCATCAAGGAGGGTTCGGTTAC
AACCCTAAGACACCGCCTCTAGA**

Figura 14

>pTub3 (2898 bp)

ACCTGCGGCCGCAAGCTTGGATCCGAATTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
CAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCC
TAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG
TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG
CGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
CGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG
ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTA
AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACA
GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT
ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC
CAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA
GTAAGTAGTTGCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAA
CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTTATCACTCATG
GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT
CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
TCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG

Figura 15

CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATA
 CTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG
 GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT
 TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAC
 CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
 CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
 AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTG
 GCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGA
 GTGCACCATATGGGTACCGAGCTCGCGGCCGCAAGCCAGCTGGAGCTGTTGA
 CAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGGAATTCGAGCTCGGATCCTCTAGA
 GCAGATGCCATCAGACAAGACAATTGGAGGAGGTGATGATTCTTTTAACACATT
 CTTGAGCGAGACGGGCGCTGGCAAACACGTCCCCAGGGCTGTCTTTGTTGACC
 TGGAACCCACTGTAGTTGATGAGGTCCGCACTGGTACCTACCGCCAGCTCTTC
 CACCCTGAGCAGCTTATCACCGGCAAGGAGGATGCTGCTAACAACTATGCTCG
 TGGTCACTACACCATTGGCAAGGAAATTGTCGACCTTGTATTGGACCGCATCCG
 CAAGTTGGCTGACCAGTGCACAGGTCTTCAAGGCTTCTCTAGACTCGAGGGAA
 GCTTCCACACATTATACGAGCCGATGATTAATTGTCAACAGCTCGATATCATCA
 GCTG

Figura 15 (Continuación)

>pElong1 (2982)

ACCTGCGGCCGCAAGCTTGGATCCGAATTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
CAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCC
TAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG
TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG
CGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
CGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG
ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTA
AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACA
GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT
ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC
CAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA
GTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAA

Figura 16

CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
 TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATG
 GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT
 CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
 CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
 ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
 ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTCAACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG
 CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATA
 CTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG
 GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT
 TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAC
 CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
 CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
 AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTG
 GCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGA
 GTGCACCATATGGGTACCGAGCTCGCGGCCGCAAGCCAGCTGGAGCTGTTGA
 CAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGGAATTCGAGCTCGGATCCTCTAGA
 GGTTCGACAAGCTGAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATCACCATTGACATTG
 CTCTCTGGAAGTTCGAAACTCCAAAGTACAACGTCACTGTCATCGATGCTCCAG
 GTCACAGAGATTTTATTAAGAACATGATTACTGGTACCTCCCAAGCTGACTGCG
 CTATCCTCATCATTGGTGGTGGTGGTGAATTGGAAGCTGGTATCTCCAAGG
 ATGGTCAAACCAGAGAACACGCTCTTCTCTCTTTCACCCTCGGTGTCAGACAAC
 TCATTGTCGCCGTCAACAAGATGGACACCACTCAATACTCTGAAGCCCGTTTCA
 CTGAAATTATCAAGGAAACCCAAAACCTTCATCAAGGAGGGTTCGGTTACAACCCT
 AAGACACCGCCTCTAGACTCGAGGGAAGCTTCCACACATTATACGAGCCGATG
 ATTAATTGTCAACAGCTCGATATCATCAGCTG

Figura 16 (Continuación)

CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
 TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATG
 GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT
 CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
 CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
 ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGG
 ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG
 CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATA
 CTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG
 GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT
 TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAC
 CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
 CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
 AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGGTGTTG
 GCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGA
 GTGCACCATATGGGTACCGAGCTCGCGGCCGCAAGCCAGCTGGAGCTGTTGA
 CAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGGAATTTCGAGCTCGGATCCTCTAGA
 GGTTCCTCGACAAGCTGAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATCACCATTGACATTG
 CTCTCTGGAAGTTCGAAACTCCAAAGTACAACGTCACTGTCATCGATGCTCCAG
 GTCACAGAGATTTCAATTAAGAACATGATTACTGGTACCTCCCAAGCTGACTGCG
 CTATCCTCATCATTGGTGGTGGTGGTGAATTCGAAGCTGGTATCTCCAAGG
 ATGGTCAAACCAGAGAACACGCTCTTCTCTCTTTACCCTCGGTGTCAGACAAC
 TCATTGTCGCCGTCAACAAGATGGACACCACTCAATACTCTGAAGCCCGTTTCA
 CTGAAATTATCAAGGAAACCCAAAACCTTCATCAAGGAGGGTTCGGTTACAACCT
 AAGACACCGCCTCTAGACTCGAGGGAAGCTTCCACACATTATACGAGCCGATG
 ATTAATTGTCAACAGCTCGATATCATCAGCTG

Figura 16 (Continuación)

>BFo2 de ARNsa III (amplificada por RCP)

GTTGATACAGCCCTGTTTCATGTGCAATTAACAGACGCAAGAATAACTGGAAC
 AGCATGAACCCCATTTCTTATAAATAAGCTGCAGCGTAACTAGGCTACACTTTTA
 CTCATCCGGAACCTTCTGCAACAAGCCTTGACGCATCGCAGTGCCAGTAGTAAAC
 ATAATGAAAGATTAGAATTTCTTGGGGATTCAATCTTAAGCTATGTCATCGCGAA
 TGCGCTTTATTGTCAATTCCTCGTGTTGATGAAGGGGATATGAGCCGGATGCG
 TGCGACCTTGGTTAGGGGGAATACCCTTGCTGAGATGGCACGGGAGTTCGAAC
 TGGGTGAGTGCTTACGCCTAGGCCCTGGTGAGCTTAAGAGTGGTGGATTTTCGC
 CGTGAATCCATTTTAGCGGATACCGTAGAAGCACTGATTGGCGGAATTTCTTG
 GATAGCGATATCCAACAAACCGAAAAATTAATCCTTAATTGGTATCAGTCGCGG
 CTGGAAGCGATCAGCCCGGGTGATAAGCAAAAAGATCCGAAAACACGTTTACA
 AGAGTATCTTCAAGGGCGTCACTTACCGTTACCGGCCTATTTAGTGGTTCAGGT
 GAGGGGAGAGGCTCATGATCAAGAATTTACGATTCACTGCCAAGTGAGTGGTA
 TGAATGAAGCGGTGGTTGGCATTGGTTCTAGCCGTCGTAAAGCAGAACAGGCT
 GCTGCAGAGCAAGCACTGACTAA

Figura 17


```

>pRNA1
1  GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCA TGATA ATAAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGTGGCACT TTTCCGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTGCCCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCCTTCCT GTTTTGTCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGATTTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTGTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAACTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTTGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACCTC ATTTTAAAT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTCTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACCTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC

```

Figura 18

1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACCT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
 1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
 1501 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGTT
 1561 CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
 1621 AGCTATGAGA AAGGCCACG CTTCGCCAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
 1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGAACACGCC TGGTATCTTT
 1741 ATAGTCCTGT CGGGTTTCG CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
 1801 GGGGCGGAG CCTATGAAA AACGCCAGCA ACGCGCCTT TTACGGTTC CTGGCCTTTT
 1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCCTG CGTTATCCCC TGAATCTGTG GATAACCGTA
 1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
 1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
 2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGC AGTGAGCGCA
 2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
 2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
 2221 ACCATGATTA CAGATCTGGG GAATTCGTTG ATACAGCCCT GTTTCATGTG CAATTAAACAG
 2281 ACGCAAAGAA TAACTGGAAC AGCATGAACC CCATTCTTAT AAATAAGCTG CAGCGTAAAC
 2341 TAGGCTACAC TTTTACTCAT CCGGAAC TTC TCGAACAGC CTTGACGCAT CGCAGTGCCA
 2401 GTAGTAAACA TAATGAAAGA TTAGAATTTC TTGGGATTTC AATCTTAAGC TATGTCATCG
 2461 CGAATGCGCT TTATTGTCAA TTCCCTCGTG TTGATGAAGG GGATATGAGC CGGATGCGTG
 2521 CGACCTTGGT TAGGGGGAAT ACCCTTGCTG AGATGGCACG GGAGTTCGAA CTGGGTGAGT
 2581 GCTTACGCCCT AGGCCCTGGT GAGCTTAAGA GTGGTGGATT TCGCCGTGAA TCCATTTTAG
 2641 CGGATACCGT AGAAGCACTG ATTGGCGGAA TTTTCTTGA TAGCGATATC CAACAAACCG
 2701 AAAAATTAAAT CCTTAATTGG TATCAGTCGC GGCTGGAAGC GATCAGCCCG GGTGATAAGC

Figura 18 (Continuación)


```

2761 AAAAAGATCC GAA AACACG TTTACAAGAGT ATCTTCAAGG GCGTCACTTA CCGTTACCGG
2821 CCTATTTAGT GGTTCAGGTG AGGGGAGAGG CTCATGATCA AGAATTACG ATTCAC TGCC
2881 AAGTGAGTGG TATGAATGAA GCGGTGGTTG GCATTGGTTC TAGCCGTCGT AAAGCAGAAC
2941 AGGCTGCTGC AGAGCAAGCA CTGACTAAAA GCTTGGCTGC AGATCTGGCA CTGGCCGTCG
3001 TTTTACAACG TCGTGACTGG GAA AACCCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTGCAGCAC
3061 ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG CACCGATCGC CCTTCCCAAC
3121 AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCC TGATGCGGTA TTTTCTCCTT ACGCATCTGT
3181 GCGGTATTTC ACACCGCATA TGGTGCACTC TCAGTACAA TCTGCTCTGAT GCCGCATAGT
3241 TAAGCCAGCC CCGACACCCG CCAACACCCG CTGACGCGCC CTGACGGGCT TGTCTGCTCC
3301 CGGCATCCGC TTACAGACAA GCTGTGACCG TCTCCGGGAG CTGCATGTGT CAGAGGTTT
3361 CACCGTCATC ACCGAAACGC GCGA

```

Figura 18 (Continuación)

>pRNA2

1	GACGAAAGGG	CCTCGTGATA	CGCCTATTTT	TATAGTTAA	TGTCATGATA	ATAATGGTTT
61	CTTAGACGTC	AGGTGGCACT	TTTCGGGAA	ATGTGCGCG	AACCCCTATT	TGTTTATTTT
121	TCTAAATACA	TTCAAATATG	TATCCGCTCA	TGAGACAATA	ACCCTGATAA	ATGCTTCAAT
181	AATATTGAAA	AAGGAAGAGT	ATGAGTATTC	AACATTTCCG	TGTCGCCCTT	ATTCCTTTT
241	TTGCGGCATT	TTGCCCTTCCT	GTTTTTGCTC	ACCCAGAAAC	GCTGGTGAAA	GTAAAAGATG
301	CTGAAGATCA	GTTGGGTGCA	CGAGTGGGTT	ACATCGAACT	GGATCTCAAC	AGCGGTAAGA
361	TCCTTGAGAG	TTTTCGCCCC	GAAGAACGTT	TTCCAATGAT	GAGCACTTTT	AAAGTTCTGC
421	TATGTGGCGC	GGTATTATCC	CGTATTGACG	CCGGGCAAGA	GCAACTCGGT	CGCCGCATAC
481	ACTATTCTCA	GAATGACTTG	GTTGAGTACT	CACCAGTCAC	AGAAAAGCAT	CTTACGGATG
541	GCATGACAGT	AAGAGAAATTA	TGCAGTGCTG	CCATAACCAT	GAGTGATAAC	ACTGCGGCCA
601	ACTTACTTCT	GACAAACGATC	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	CGCTTTTTTG	CACAACATGG
661	GGGATCATGT	AACTCGCCTT	GATCGTTGGG	AACCGGAGCT	GAATGAAGCC	ATACCAAACG
721	ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	GTTGCGCAAA	CTATTAACTG
781	GCGAACTACT	TACTCTAGCT	TCCCGGCAAC	AATTAATAGA	CTGGATGGAG	CGGGATAAAG
841	TTGCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGCTGGCTG	GTTTATTGCT	GATAAATCTG
901	GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT
961	CCCGTATCGT	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	TATGGATGAA	CGAAATAGAC
1021	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCACTGATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT
1081	CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAAACCTC	ATTTTAAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA
1141	TCCTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTTCGTTT	CACTGAGCGT
1201	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT
1261	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC	CAGCGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC
1321	TACCAACTCT	TTTTCGGAAG	GTAACCTGGCT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC

Figura 19

1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGTT
1561 CGTGACACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCTATGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCAGGAGG AGCTTCCAGG GGAACGCGC TGTATCTTT
1741 ATAGTCCTGT CGGGTTTCG CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGGGCCCTT TTTACGGTTC CTGGCCCTTT
1861 GCTGGCCCTT TGCTCACATG TTCTTTCCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGACCGG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTA TGTGAGTTAG CTCACTCAT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CAGATCTGGG GAATTCGTTG ATACAGCCCTT GTTTCATGTG CAATTAACAG
2281 ACGCAAAGAA TAACTGGAAC AGCATGAACC CCATTCTTAT AAATAAGCTG CAGCGTAAAC
2341 TAGGCTACAC TTTTACTCAT CCGGAACCTC TGCAACAAGC CTTGACGCAT CGCAGTGCCA
2401 GTAGTAAACA TAATGAAAGA TTAGAAATTC TTGGGGATTG AATCTTAAGC TATGTCATCG
2461 CGAATGCGCT TTATTGTCAA TTCCCTCGTG TTGATGAAGG GGATATGAGC CGGATGCGTG
2521 CGACCTTGGT TAGGGGGAAT ACCCTTGCTG AGATGGCACG GGAGTTCGAA CTGGTGAGT
2581 GCTTACGCCCT AGGCCCTGGT GAGCTTAAGA GTGGTGGATT TCGCCGTGAA TCCATTTTAG
2641 CGGATACCGT AGAAGCACTG ATTGGCGGAA TTTTCTTGGA TAGCGATAGC TTTATGCTTG
2701 TAAACCGTTT TGTGAAAAAA TTTTAAAAAT AAAAAAGGGG ACCTCTAGGG TCCCCAATTA
2761 ATTAGTAATA TAATCTATTA AAGGTCATTC AAAAGGTCTC CCACCGGATC AATTCCCCCTG

Figura 19 (Continuación)

2821 CTCGCGCAGG CTGGGTGCCA AGCTCTCGGG TAACATCAAG GCCGATCCT TGGAGCCCTT
 2881 GCCCTCCCGC ACGATGATCG TGCCGTGATC GAAATCCAGA TCCTTGACCC GCAGTTGCAA
 2941 ACCCTCACTG ATCCGGCTCA CCGTAACCTGA TGCCGTATTT GCAGTACCAG CGTACGGCCC
 3001 ACAGAAATGAT GTCACGCTGA AAATGCCGGC CTTTGAATGG GTTCATGTGC AGCTCCATCA
 3061 GCAAAAGGGG ATGATAAGTT TATCACCAACC GACTATTTGC AACAGTGCCG TTGATCGTGC
 3121 TATGATCGAC TGATGTCATC AGCGGTGGAG TGCAATGTCG TGCAATACGA ATGGCGAAAA
 3181 GCCGAGCTCA TCGGTCAGCT TCTCAACCTT GGGTTACCC CCGCGGTGT GCTGCTGGTC
 3241 CACAGCTCCT TCCGTAGCGT CCGGCCCCCTC GAAGATGGC CACTTGACT GATCGAGGCC
 3301 CTGCGTGTG GACGAGCCGT TCGATCCTGC CACGTCGCC GTCGTCATGC CCTCGTGGT AGTCTGGAC
 3361 GACGAGCCGT TCGATCCTGC CACGTCGCC TGTAAGCGC AGCGCCCATC CATTGCTT TGCAGGACG
 3421 ACATTCTGGC GCCTGCCAAA CAGAGCAGAT CATCTCTGAT CCATTGCCCC TGCCACCTCA CTCGCCCTGCA
 3481 GGGCCACAGG CAGAGCAGAT TGAACCTCGAT GGCAGGTAC TCTCCTCGG CGTGGGACAC
 3541 AGCCCGGTG GATGCCAACA CGACGCTGCA TCTTGCCGAG TTGATGGCAA AGTTCCCTA TGGGTGCCG
 3601 AGACACTGCA CCATTCTTCA GATGGCAAG TTGGTACGCG TCGATTATCT CGAGAAATGAC
 3661 CACTGCTGTG AGCGCTTTGC CTTGCTCGG TCGATCCGCT AGGTGGCTCA AGGAGAGAG CCTTCAGAA
 3721 GAAGGTCCAG TCGGTCAATG CTTGCTCGG AGATCCGTTG ATCTTCCCTG ATCCGCCAGA GGGCGGATG
 3781 GCCCTGGGTC CGAAGAAATG CACTGCGCTC GCCAGTCGAT TGGCTGAGCT CATGAGCCGA GAACGAGATG
 3841 CGAAGAAATG CACTGCGCTC GCCAGTCGAT TGGCTGAGCT CATGAGCCGA GAACGAGATG
 3901 GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG
 3961 GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG
 4021 GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG
 4081 GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG
 4141 GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG GGGCGGATG

Figura 19 (Continuación)

4201 ATGAAAGGCT GGCTTTTCT TGTATCGCA ATAGTTGGCG AAGTAATCGC AACATCCGCA
 4261 TTAAATCTA GCGAGGCTT TACTAAGCTG ATCCGGTGGG TGACCTTTTG AATGACCTTT
 4321 AATAGATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCGTTTTTTA TTTTAAAAAT
 4381 TTTTTCACAA AACGGTTTAC AAGCATAAAG CTATCCAACA AACCGAAAAA TTAATCCCTA
 4441 ATTGGTATCA GTCGCGGCTG GAAGCGATCA GCCCGGTGA TAAGCAAAAA GATCCGAAAA
 4501 CACGTTTACA AGAGTATCTT CAAGGCGTC ACTTACCGTT ACCGGCTAT TTAGTGGTTC
 4561 AGGTGAGGGG AGAGGCTCAT GATCAAGAAAT TTACGATTCA CTGCCAAGTG AGTGGTATGA
 4621 ATGAAGCGGT GGTGGCATT GGTCTAGCC GTCGTAAAGC AGAACAGGCT GCTGCAGAGC
 4681 AAGCACTGAC TAAAGCTTG GCTGCAGATC TGGCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG
 4741 ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA
 4801 GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA
 4861 ATGGCGAATG GCGCCTGATG CCGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC
 4921 GCATATGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC
 4981 ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA
 5041 GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA
 5101 AACGCGCGA

Figura 19 (Continuación)