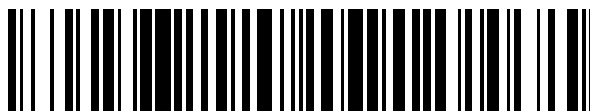


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 121**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009 E 09797438 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2310515**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de plantas transgénicas resistentes a los fitopatógenos basado en la interferencia por ARN (ARNi)**

30 Prioridad:

**17.07.2008 IT MI20081305**

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

**26.08.2014**

73 Titular/es:

**ARTERRA BIOSCIENCE S.R.L. (100.0%)  
Via Benedetto Brin, 69  
80142 Napoli, IT**

72 Inventor/es:

**ARCIELLO, STEFANIA;  
ANDRENACCI, DAVIDE;  
APONE, FABIO y  
COLUCCI, MARIA GABRIELLA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 488 121 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

Procedimiento para la obtención de plantas transgénicas resistentes a los fitopatógenos basado en la interferencia por ARN (ARNi).

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener plantas transgénicas resistentes al ataque de fitopatógenos basado en la interferencia por ARN (ARNi) para su protección del ataque de parásitos y fitófagos, que comprende la expresión de ARNbc en los tejidos vegetales adecuados para inhibir la funcionalidad de un receptor RAPG, cuyo funcionamiento es vital para los hongos, insectos herbívoros o nematodos fitopatógenos. En particular, la presente invención se refiere a plantas que expresan ARNbc en sus tejidos, que se pueden obtener con dicho tratamiento de protección preventiva de los ataques de hongos, insectos herbívoros o nematodos fitopatógenos.

La ARNi es un proceso natural conservado durante la evolución y presente en todos los organismos. Se trata de un mecanismo de silenciamiento génico por el que diversos fragmentos de ARN bicatenario son capaces de interferir y extinguir la expresión génica. Una vez que una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) se ha definido, el denominado sistema de ARNi es capaz de activar el mecanismo de ARNi (Brandt, 2002).

Mediante una enzima denominada dicer, la secuencia de ARNbc se corta en fragmentos que tienen una longitud más corta (19-21 pares de bases) (Hamilton y Baulcombe, 1999). El fragmento corto de ARNbc (denominado ARN corto de interferencia, o ARNsi) se asocia a un complejo enzimático denominado RISC (complejo de silenciamiento de la interferencia por ARN). El ARNbc se abre, probablemente por medio de una helicasa: sólo la cadena complementaria de ARN permanece asociada al RISC, mientras que la cadena transcrita se degrada. El complejo RISC es capaz de reconocer entre los numerosos ARNm presentes en el citosol, que es complementario al fragmento de ARN complementario asociado al mismo complejo. Si el emparejamiento entre ARNsi y ARNm es perfecto (o casi perfecto), un componente de RISC (denominado proteína argonauta) es capaz de efectuar un corte en el ARNm (Hammond *et al.*, 2001). Por tanto, los dos fragmentos de ARNm resultantes, uno sin cabeza en 5' y el otro sin cola de los polos A en 3', son degradados rápidamente por la ARNasa de la propia célula. Otra proteína común, aunque no universalmente presente en el sistema de ARNi, es la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) que sintetiza ARNbc a partir de un molde de ARN monocatenario para producir el mecanismo de ampliación de ARNi.

El descubrimiento de la ARNi como un procedimiento de silenciamiento génico potente y fácil ha despertado la atención de toda la comunidad científica. La ubicuidad del fenómeno le ha permitido ser estudiado en numerosas especies. Muchos experimentos se basan de hecho en la simple inmersión de organismos completos en soluciones que contienen ARNbc o mediante la alimentación con bacterias que expresan ARNdc. Esto ha permitido la rápida identificación de los genes involucrados en el ARNi en *C. elegans*, y el descubrimiento de sus homólogos en *Drosophila*, plantas y hongos, y se ha demostrado que fenómenos, que estaban clasificados por primera vez como PTGS represores (silenciamiento génico tras la transcripción), son todos parte de un único proceso cuyas raíces se fundan en un único mecanismo ancestral.

En el contexto de los vegetales, las aplicaciones de silenciamiento génico por medio de ARNi han permitido producir variedades de interés agrícola con un aumento de los niveles de resistencia a enfermedades, insectos, o con gran calidad nutritiva.

Algunos investigadores, por ejemplo, han contribuido a mejorar las plantas de arroz utilizando la técnica de ARNi. Han reducido los contenidos de glutenina que produce una variedad de arroz denominada *LGC-1* (bajo contenido de glutenina 1) adecuado para los pacientes con insuficiencias renales, incapaces de digerir la glutenina (Kusaba *et al.*, 2003).

Otras aplicaciones de ARNi se refieren a la eliminación de endotoxinas vegetales mediante el silenciamiento génico implicado en la biosíntesis de la toxina. La enzima teobromina sintasa de las plantas de café se inactivó con ARNbc lo que permite la producción de café descafeinado (Ogita *et al.*, 2003). Los experimentos de silenciamiento utilizando ARNbc se han llevado a cabo también en patógenos y fitófagos de plantas de interés agrícola para inhibir la expresión de algunos de sus genes vitales. Las microinyecciones de ARNbc en larvas y coleópteros adultos (*Tribolium castaneum*) en fase terminal han permitido silenciar los genes y estudiar su función (Tomoyasu y Denell, 2004). Algunos investigadores han llevado a cabo pruebas con larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte alimentadas con una dieta sintética enriquecida con ARNbc específico para identificar genes esenciales para la vitalidad del insecto. Estas pruebas condujeron a la identificación de 14 genes clave cuya inactivación debida a interferencias causa la muerte de las larvas. Las plantas de maíz transgénico que expresan uno de estos ARNbc han demostrado altos niveles de protección, comparables a los obtenidos con plantas transgénicas que expresan la toxina Bt (Baum *et al.*, 2007). A diferencia de estas últimas, sin embargo, las plantas transgénicas que expresan ARNbc tienen un impacto ambiental reducido. El efecto de inhibición de los genes de insectos, de hecho, en este caso depende exclusivamente del reconocimiento específico entre el ARNsi y la secuencia objetivo que debe inactivarse. Se eliminan, por lo tanto, los problemas relacionados con la introducción de moléculas "extrañas" en el medio y las interacciones con organismos que no son objetivo.

Para la lucha contra agentes patógenos y organismos fitófagos la selección del gen objetivo que debe inactivarse es de importancia fundamental.

Los receptores acoplados a la proteína G (RAPG) comprenden un gran vasto grupo de proteínas, estructural y funcionalmente similares entre sí, que ejercen funciones de vital importancia en todos los organismos eucariotas. Constan de una sola cadena de polipéptido que atraviesa la membrana siete veces con el extremo del terminal amino extracelular y el extremo del terminal carboxilo intracelular; después de la unión con ligandos extracelulares (péptidos, moléculas pequeñas, iones, luz y compuestos aromáticos) el receptor se activa desencadenando una respuesta en la célula que conduce a la producción de un mensaje secundario (AMPc, Ca<sup>2+</sup>, GMPc, IP<sub>3</sub>).

La mayoría de los organismos de interés agrícola tienen numerosos RAPG, la mayoría de los cuales son fundamentales para el ejercicio correcto de sus funciones vitales o por su patogenicidad. Las especies más estudiadas ampliamente, cuyo genoma se secuenció y se registró completamente y en el que existe una considerable información sobre la biología del desarrollo, son obviamente los organismos modelo: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces* y *Neurospora*. *D. melanogaster* es el artrópodo más ampliamente estudiado y se considera el organismo modelo para el estudio de los insectos perjudiciales. En el genoma de *Drosophila* aproximadamente se han identificado 270 RAPG, agrupados en 5 familias. Recientemente se ha completado también la secuencia del genoma del mosquito *Anopheles gambiae*. Un enfoque bioinformático detallado ha conducido a la identificación de 276 RAPG en el genoma de este díptero de gran interés sanitario. Una gran cantidad de información también está disponible en la especificidad de expresión de estos genes en las distintas fases de desarrollo y un análisis comparativo detallado se ha realizado con el genoma de *Drosophila melanogaster*.

*C. elegans* es el modelo metazoario ampliamente estudiado desde un punto de vista genético, neurobiológico, celular y molecular. Además para este organismo la secuencia del genoma es completa y una gran cantidad de información relativa a la bioinformática, la expresión, además de la transducción de señales, la neurobiología, el desarrollo, el comportamiento, la reproducción se proporciona en la bibliografía. Los proyectos financiados por instituciones públicas también se encuentran en una fase avanzada, que tienen por objeto la identificación de aproximadamente 315.000 EST (etiquetas de secuencia expresada) de 20 especies diferentes de parásitos nematodos. La disponibilidad de toda esta información permitirá clonar los ADNc de los RAPG muy rápidamente y de este modo utilizarlos como blancos de los ARNi y nematocidas potenciales.

Menos información, por otra parte, está disponible para los RAPG de hongos. Un total de dos vías de transducción en las que intervienen como mediadores los RAPG se han identificado tanto en ascomicetos como en basidiomicetos:

- a) respuesta a las feromonas (RAPG = STE);
- b) respuesta a factores nutritivos (sensores de glucosa).

Existe mucha más información disponible sobre las proteínas G heterotriméricas, efectores directos de los RAPG, tanto en ascomicetos como en basidiomicetos (Li et al., 2007). Al menos 3 subunidades G $\alpha$  se han identificado y no se ha obtenido ningún mutante de diversas especies de hongos (*Saccharomyces*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Ustilago*, *Fusarium*, *Colletotrichus*, *Cryphonectria*, etc.) la que sugiere la implicación de las proteínas G en una amplia gama de vías de señalización: la respuesta a feromonas, la sensibilidad a los nutrientes, la esterilidad, el crecimiento vital, la virulencia y patogenicidad, el desarrollo de las ascosporas, la morfogénesis, la luz. Por tanto, es evidente que la inactivación de estos RAPG interfiere con las señales de vital importancia de los hongos patógenos.

En conclusión, la interferencia por medio de ARNi en los RAPG de cualquier organismo sería por lo tanto extremadamente específica ya que el porcentaje de homología de genes entre los RAPG de insectos, nematodos, hongos y mamíferos nunca excede de 20-30% (véase la Tabla 1 a continuación). Del mismo modo, el porcentaje en relación con la homología entre los RAPG de las especies que pertenecen al mismo orden nunca es completa (de aproximadamente 90%) y esto asegura la discriminación entre especies de organismos perjudiciales y los benévolos con el medio ambiente (datos no publicados).

Tabla 1. Ejemplo de grados de homología entre especies de un insecto dado y otras especies de organismos:

- ser humano  $\cong$  20 - 30%
- insecto que pertenece al mismo orden  $\cong$  90%
- insecto que pertenece a un orden diferente  $\cong$  30 - 55%.

Hasta ahora, la mayoría de las sustancias utilizadas como pesticidas, nematocidas o fungicidas son moléculas con un amplio espectro, existe por lo tanto una enorme demanda de procedimientos más selectivos que interfieren

específicamente con la supervivencia y la fertilidad de los organismos nocivos, pero al mismo tiempo tienen un efecto mínimo o ninguno en los organismos que no son objetivo y sobre el medio ambiente. Los nematocidas actualmente presentes en el mercado, por ejemplo, son muy tóxicos, costosos y difíciles de utilizar. El bromuro de metileno, que es el producto más ampliamente utilizado para la lucha contra nemátodos, hongos y bacterias en árboles frutales y vegetales en California y Florida, es una neurotoxina que también reduce la capa de ozono en la atmósfera. Otros nematocidas utilizados son aldicarb (Temik) y 1',1,3-dicloropropeno (Telonell), ambos cancerígenos para los seres humanos.

Basándose en lo mencionado anteriormente, existe una demanda evidente de nuevos procedimientos y objetivos biológicos relativos que interfieren específicamente con la supervivencia y la fertilidad de los organismos fitopatógenos (es decir, parásitos y fitófagos) más selectivamente y, en consecuencia tienen un menor impacto ambiental.

El solicitante ha descubierto que los receptores RAPG pueden ser objetivos convenientes para la lucha contra parásitos y fitófagos de plantas, tales como hongos, insectos y nematodos. Muchos de estos RAPG, de hecho, tienen una secuencia génica que es muy específica para organismos nocivos, por consiguiente, las moléculas de ARNbc son capaces de inhibir su funcionalidad y no pueden dañar el organismo hospedador (planta) o un consumidor que no es objetivo de la misma planta (es decir, los seres humanos, otros animales). En particular, los solicitantes han preparado un procedimiento que utiliza la expresión del ARNbc para inhibir la funcionalidad de un receptor RAPG, cuyo funcionamiento es vital para los hongos, insectos herbívoros o nematodos fitopatógenos.

Las ventajas que se pueden asociar a la tecnología, objeto de la presente invención, se resumen a continuación:

- a) la selectividad, que puede hacer daño al insectos herbívoros, nematodos u hongos parásitos, pero no a otros organismos benévolos (por ejemplo abejas);
- b) seguridad de los alimentos, por la misma razón que el anterior, pero también por el hecho de que una molécula de ARN puede degradarse fácilmente y no persiste en el medio ambiente;
- c) la posibilidad de expresar ARNbc también en partes de la planta, que normalmente sería particularmente difícil de alcanzar incluso con tratamiento químico general (por ejemplo, pirámide);
- d) la ausencia potencial de riesgo alergénico, como nuevas proteínas de la planta hospedadora no se expresan;
- e) la posibilidad de seleccionar las plantas con una homología proteómica alta/total, con una selección natural adecuada de clones.

El solicitante ha descubierto un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas resistentes al ataque de uno o más fitopatógenos como *Spodoptera littoralis* y/o *Meloidogine incognita* por interferencia de ARN que comprende las siguientes fases:

- a) Aislamiento de la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica un receptor acoplado a proteína G (RAPG), o una porción del mismo, cuya función es vital para el fitopatógeno, en el que dicha secuencia de nucleótidos del ADNc codifica un receptor RAPG seleccionado de entre AlstCR de SEC. ID. nº 2, DHR de SEC. ID. nº 3 u Oct/TyrR de SEC. ID. nº 6 cuando dicho insecto es *Spodoptera littoralis* y en la que dicha secuencia de nucleótidos del ADNc codifica un receptor RAPG seleccionado de entre receptor serotoninico de SEC. ID. nº 9 o receptor neuropeptidico de SEC. ID. nº 11 cuando dicho fitopatógeno es *Meloidogine incognita*;
- b) construcción de un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica un RAPG o una porción del mismo determinada por la etapa a), flanqueado por dos sitios de recombinación específicos;
- c) reacción de recombinación del vector de expresión de la etapa b) con un vector binario que comprende un activador constitutivo o específico para el tejido, los mismos sitios de recombinación específicos y una secuencia intrónica para obtener un plásmido recombinante;
- d) transferencia de dicho plásmido recombinante en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* y transformación de la planta;
- e) cultivo de la planta y obtención de la expresión constitutiva o específica para el tejido de ARNbc en dicha planta.

El procedimiento descrito en la presente memoria utiliza la expresión ARN bicatenario para inhibir la funcionalidad de un receptor RAPG, cuyo funcionamiento es vital para los hongos, insectos herbívoros o nematodos fitopatógenos, y dicho ARNbc se expresa en los tejidos vegetales de modo que pueda ser absorbido a través del haustorio fúngico o ingerido por el insecto o nematodo.

Dichos fitopatógenos se seleccionan preferentemente de entre los insectos de los tipos lepidóptero o coleóptero a menudo herbívoros cuando están en estado de larvas, nematodos y hongos. Los insectos herbívoros en fase adulta o de larva puede ser *Spodoptera littoralis*, *Heliotis virescens*. Dicho nematodo puede seleccionarse de entre *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla*, *Globodera rostochiensis*. Los hongos fitopatógenos se pueden seleccionar de entre oídio, roya, Septoria, Venturia o Alternaria. Estos hongos pueden difundirse en el filoplano, o en las partes hipógeas de la planta, y se asientan en las partes superficiales, como también en los tejidos más internos.

En la práctica de la invención, uno o más ARNbc pueden expresarse constitutivamente en los tejidos de toda la planta, o en determinadas partes, tales como el filoplano, o en el sistema radicular, utilizando activadores específicos (activadores específicos de tejido). La expresión en las partes hipógeas de la planta puede estar orientada a luchar contra, por ejemplo, fitopatógenos terrestres, mientras que en el sistema radicular se utiliza para la lucha contra nematodos u otros insectos nocivos. Por consiguiente, según formas de realización preferidas de la invención, cuando la expresión del ARNbc es específica para el tejido, dicho tejido se selecciona de los grupos que consisten en filoplano, tronco, sistema radicular, yemas, flores, frutos.

El procedimiento descrito en la presente invención comprende la selección de uno o más receptores RAPG como objetivo de interferencia de ARN, dicho receptor debe ser vital para el fitopatógeno contra el cual la planta ha de hacerse resistente. En relación a los insectos, nematodos u hongos diversos tipos de receptor de RAPG se puede utilizar como diana. Dicho receptor diana de RAPG se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alostatina C o A, octopamina/tiramina, péptido PBAN, hormona diurética, hormona adipocinética, neuropéptidos, dopamina, serotonina y receptores semejantes a rodopsina. Según una forma de realización preferida, en la que, cuando dicho insecto herbívoro es *Spodoptera littoralis*, la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica un receptor RAPG o una porción del mismo se selecciona de entre el grupo que consiste en AlstCR (SEC. ID. nº 2), DHR (SEC. ID. nº 3), u Oct/TyrR (SEC. ID. nº 6). Con respecto a otras especies de lepidópteros, tales como por ejemplo, *Heliotis virescens*, los autores han descubierto que el receptor RAPG homólogo al de alostatina C de *Spodoptera* podría representar el objetivo de elección para este tipo de insecto herbívoro.

Con respecto a la utilización del procedimiento según la invención para la obtención de plantas transgénicas resistentes a nematodos parásitos, en particular de la especie *Meloidogyne incognita*, los autores de la presente invención han descubierto dos posibles receptores silenciadores de la diana RAPG por medio de ARNi. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica los receptores RAPG anteriores se selecciona de entre el grupo que consiste en receptores serotoninicos (homólogos de los receptores de serotonina de *C. elegans*, SEC. ID. nº 9), y del receptor de neuropéptidos (homólogo del receptor de neuropéptidos de *C. elegans* Q2TGX5\_MELIC, SEC. ID. nº 11).

Según una forma de realización preferida del procedimiento de la presente invención, uno o más ARNbc pueden expresarse en los tejidos de la planta transgénica obtenida. De esta manera, es posible obtener líneas que expresan dos o tres tipos diferentes de ARNbc y las mismas plantas por lo tanto pueden ser resistentes al ataque de ambos fitófagos (que se alimentan de hojas frecuentemente) y parásitos de las raíces. Aunque conservando la especificidad de la resistencia a las especies individuales de organismos nocivos, pueden producirse plantas, que son resistentes a varias especies, incluso muy diferentes entre sí, es decir, que pertenecen a grupos desde el punto de vista filogenético completamente distantes (Phyla). Por consiguiente, las fases a) a c) del procedimiento descrito en la presente memoria se pueden repetir en paralelo utilizando en cada fase, una secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica un receptor RAPG vital para diferentes fitopatógenos (es decir nematodos o insectos, diferentes especies de nematodos, insectos u hongos) para obtener uno o más plásmidos recombinantes y d) transformando conjuntamente la misma planta o d1) transformando diferentes plantas y cruzándolas. Gracias a los cruces entre plantas transformadas, pueden crearse también plantas que expresan ARNbc específicos tanto contra RAPG de insectos (es decir, *Spodoptera*, *Heliotis*), y contra RAPG de nematodos (*M. incognita*).

La presente invención también comprende la utilización de la tecnología de interferencia de ARN para la protección de plantas de interés agronómico (tales como, por ejemplo, cereales, plantas solanáceas, vides, hortalizas), plantas ornamentales (tales como rosas, etc.), plantas ambientales (tales como las coníferas, tilos, chopos, etc.) Según una forma de realización preferida de la invención se utiliza una planta solanácea, preferentemente tabaco, más específicamente *Nicotiana tabacum*.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una planta de tabaco transgénica resistente a uno o más fitopatógenos como *Spodoptera littoralis* y/o *Meloidogyne incognita* que pueden obtenerse según el procedimiento definido anteriormente. Las plantas modificadas genéticamente para inhibir los receptores RAPG de fitopatógenos, según los procedimientos previstos por la presente invención, se pueden utilizar para la producción de alimentos destinados a seres humanos o para la zootecnia, pero también para la producción de biomasa para fines industriales (papel, fibras, sustancias farmacológicas, biomasas para la producción de energía o de sustancias químicas básicas, etc.) Según una forma de realización preferida de la presente invención, dicha planta transgénica es una planta de tabaco resistente a uno de sus parásitos más dañinos, el insecto *Spodoptera littoralis*. En particular, la planta de tabaco transgénica (es decir, *Nicotiana tabacum*) expresa un ARNbc capaz de inhibir un receptor RAPG de *S. littoralis* (seleccionado de entre AlstCR (SEC. ID. nº 2), DHR (SEC. ID. nº 3) u Oct/TyrR (SEC. ID. nº 6), mediante la

ingestión de tejido vegetal que expresa dicho ARNbc por el mismo insecto en la fase de larva. En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a una planta transgénica resistente a *Spodoptera littoralis*, caracterizada por que es una planta de tabaco y expresa ARNbc en la que la cadena complementaria es complementaria al ARNm que codifica el receptor AlstCR (SEC. ID. n° 2) o DHR (SEC. ID. n° 3).  
 5 Según otra forma de realización preferida, la invención se refiere a una planta transgénica resistente a *Meloidogyne incognita* caracterizada por que es una planta de tabaco y expresa un ARNbc en el que la cadena complementaria es complementaria del ARNm que codifica la SEC. ID. n° 11.

Un objeto de la presente invención por lo tanto se refiere a un procedimiento para el tratamiento profiláctico de plantas para hacerlas resistentes al ataque de uno o más insectos, nematodos y hongos fitopatógenos que comprende las fases a) - e) del procedimiento definido anteriormente. A fin de garantizar su mejor desarrollo, las plantas obtenidas de este modo pueden, si es necesario, ser sometidas a una fase de tratamiento con fertilizantes, reguladores del crecimiento o bioestimulantes, o con productos fungicidas, herbicidas, insecticidas y nematocidas, sintéticos o naturales. Estas aplicaciones podría permitir a un menor riesgo de seleccionar parásitos resistentes con respecto a la actividad biocida obtenida con el objetivo tecnológico de esta patente, y que es posible tener una acción sinérgica entre la aplicación de un pesticida y la actividad biocida obtenida con el objeto tecnológico de la presente invención.

La presente invención se describirá a continuación a título ilustrativo pero no limitativo, según sus formas de realización preferidas haciendo referencia específica a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1 muestra las secuencias de los ADNc que codifican los receptores RAPG: AlstAR, AlstCR, DHR, AKHR, LGR1, OctR, Or83b, PBANR clonado a partir de *S. littoralis*;
- 25 - la figura 2 muestra las secuencias de los ADNc que codifican los receptores RAPG: semejantes a MiSerR1, semejantes a MiDopR1 y semejantes a MiNpR1 clonados en *Meloidogyne incognita*;
- la figura 3 muestra el análisis por RT-RCP de plantas transgénicas AlstCR (bandas 1 a 7); WT1 y WT2: plantas de tabaco no transformadas; M: marcador de peso molecular conocido; C+: plásmido pENTR+AlstCR;
- 30 - la figura 4 muestra los histogramas relativos a la tasa de mortalidad después de 4 semanas de larvas de *Spodoptera littoralis* alimentadas con plantas de tabaco transgénicas que expresan ARNbc específico para AlstCR;
- 35 - la figura 5 muestra la tendencia de la tasa de mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* alimentadas con plantas de tabaco transgénicas que expresan ARNbc específica para AlstCR y DHR;
- la figura 6 muestra los histogramas relativos al porcentaje de raíces de tabaco infectadas por *M. incognita* de plantas silvestres y plantas transgénicas que expresan semejantes a MiNpR1/ARNdc.

A título ilustrativo pero no limitativo de la presente invención, se describen dos ejemplos de transformaciones de una planta solanácea, a saber, el tabaco, para proteger dicha planta de dos de sus parásitos más dañinos, el insecto *Spodoptera littoralis* y el nematodo *Meloidogyne incognita*.

#### 45 **Ejemplo 1: Transformación de plantas de tabaco, con el fin de protegerlas del insecto *Spodoptera littoralis***

##### **Materiales y métodos**

##### Selección de objetivos de RAPG

Los receptores de *S. littoralis* seleccionados como objetivos de la presente forma de realización de la invención son:

1. AlstAR (receptor supuesto de alostatina A);
- 55 2. AlstCR (receptor supuesto de alostatina C):

estos dos RAPG son de fundamental importancia puesto que unen las alostatinas, neuropéptidos cuya función principal es la de inhibir la síntesis de la hormona juvenil en la parte de las "corpora allata". Además de estar involucradas en el proceso de activación de la metamorfosis (Weaver et al., 1994), las alostatinas también son importantes para la regulación de las contracciones de los músculos lisos intestinales y en el desarrollo y funcionalidad de los ovarios (Aguilar et al., 2003; Meyering-Vos et al., 2006);

3. DHR (receptor de la hormona diurética DH): importante para la regulación de la diuresis (Johnson et al., 2004);
- 65 4. PBAN-R (receptor del neuropéptido de activación de la biosíntesis de feromonas, PBAN): une un pequeño

péptido que activa la síntesis y liberación de feromonas sexuales (Rafaeli et al., 2007);

- 5 5. AKHR (receptor supuesto de la hormona adipocinética AKH): importante para el metabolismo de carbohidratos y lípidos y también para los rendimientos del vuelo (Staubli et al., 2002);
6. LGR1 (Receptor acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina): pertenece al grupo de receptores acoplados a la proteína G que contienen repeticiones ricas en leucina (LGR) y ejerce una función fundamental en la reproducción (Nishi et al., 2000);
- 10 7. Oct/TyrR, receptor supuesto de octopamina y tiramina: es capaz de interactuar con neurotransmisores tales como octopamina y tiramina y es por lo tanto importante en los procesos de neuromodulación en órganos sensoriales y secretores (Farooqui, 2007);
- 15 8. OR83b (receptor de la familia de receptores olfativos): a diferencia de otros miembros de la familia de receptores olfativos (OR), que sólo se expresan en pequeñas subpoblaciones de neuronas sensoriales olfativas, OR83b se expresa en casi todas las neuronas de la antena (Neuhaus et al., 2005). En lugar de tener un cometido directo en la función olfatoria, interactúa con los miembros de OR convencionales y es esencial para su localización en los cuerpos celulares a los cilios sensoriales donde tiene lugar la interacción con las moléculas de olor. Durante la función general ejerce en el sistema olfativo, OR83b es sin duda de  
20 fundamental importancia para la percepción de olores y, por tanto, para la nutrición de los insectos.

A fin de realizar experimentos con ARNi, todas las secuencias que codifican los RAPG se clonaron en *Spodoptera* con la excepción del gen que codifica PBAN-R ya presente en el banco de datos (AF401480).

25 Las secuencias que codifican los receptores AlstAR, DHR, LGR1, Or83b, Oct/TyrR, y parte de la secuencia que codifica el receptor de AlstCR y el receptor AKHR, se aislaron utilizando el ADNc transcrito posterior por la ARN total extraído de *S. littoralis*, utilizando cebadores degenerados procedentes de la comparación de regiones conservadas entre estos genes en varias especies de insectos. Para PBAN-R, por otro lado, se utilizaron cebadores específicos para el aislamiento de la secuencia de codificación a partir de larvas en fase V. Para los demás receptores,  
30 basándose en los datos de expresión disponibles en la bibliografía, las secuencias se aislaron utilizando diferentes tejidos y fases de crecimiento del insecto. En particular, el gen que codifica los receptores LGR se amplió en huevos, mientras que DHR en larvas en fase V; el gen que codifica los receptores AlstAR, AlstCR, AKHR, Or83b, Oct/TyrR se ampliaron por ARN extraído de la cabeza de individuos adultos. Los productos de RCP se secuenciaron y se utilizaron para el diseño de cebadores específicos para los experimentos en 5' y 3' RACE-RCP. Las secuencias  
35 aisladas se clonaron en el plásmido pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitogen) y se secuenciaron en su totalidad (figura 1).

#### Aislamiento y clonación de los receptores seleccionados

##### Clonación del receptor AlstAR

40 Con el fin de aislar el ADNc que codifica el receptor de alostatina A de *Spodoptera littoralis*, se diseñaron cebadores degenerados en regiones conservadas determinadas por la alineación entre las secuencias de aminoácidos de los receptores homólogos de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* y *Periplaneta americana*. Las secuencias de los cebadores se indican a continuación (los nucleótidos entre paréntesis indican las posiciones  
45 degeneradas; el cebador es decir, una mezcla de oligonucleótidos, que contiene cada uno un nucleótido diferente en esa posición específica):

1Fw: atg (ac) g (acgt) (at) (gc) (acgt) ac (agct) ac (agct) aa (tc) (tc) t (agct) (tc) t (agct) at (tc) a (ag) (tc) (SEC. ID. nº 12)

50 2Fw: gt (agct) cc (agct) tt (tc) ac (agct) gc (agct) ac (agct) ga (tc) ta (tc) gt (agct) atg (SEC. ID. nº 13)

1Rv: gt (agct) ac (agct) (ac) g (agct) atggt (agct) gt (agct) gt (agct) gt (agct) (SEC. ID. nº 14)

55 2Rv: tgg (at) s (agct) tg (tc) gt (agct) aa (tc) cc (atcg) gt (atgc) (ac) t (tc) ta (tc) gc (agct) (SEC. ID. nº 15).

Se extrajo todo el ARN de las cabezas de cada uno de los adultos de *Spodoptera littoralis* utilizando un kit comercializado por Promega. Las muestras de ARN se sometieron a un tratamiento con rDNasil (Ambion) para eliminar el ADN genómico contaminante. Se cargaron 2 µl de ARN en gel de agarosa al 1% en presencia de colorante de carga desnaturalizante y se cuantificaron usando un marcador específico para ARN (Fermentas) como referencia. Para el análisis cuantitativo se utilizó el programa informático Gene Tools (Perkin Elmer). Se transcribió 1 µg de ARN completo en ADNc utilizando la enzima transcriptasa inversa RevertAid M-MuLV (Fermentas) y 500 ng de oligodT (Promega).

65 Se obtuvo un fragmento de 507 pb de la ampliación del ADNc mediante 30 ciclos de RCP (10 s a 98°C, 30 s a 50°C, 30 s a 72°C) seguido de 10 minutos de ampliación a 72°C. La reacción se realizó en un volumen de 50 µl que

## ES 2 488 121 T3

contiene cada cebador a una concentración de 2,5  $\mu$ M, 0,2 mM de desoxinucleótidos (Fermentas) y 1 unidad de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) en el tampón correspondiente.

5 El fragmento obtenido se clonó en el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenció posteriormente (Ceinge Biotecnologie Avanzate scarl) utilizando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv, específicos para el vector.

Sobre la base de la secuencia, se diseñaron los siguientes grupos de oligonucleótidos para el 3' RACE (Grupo 1; transcrito) y 5' RACE (Grupo 2; complementario), respectivamente:

10 Grupo 1:

1s GCATCCCATAGCTTCCATGT (SEC. ID. nº 16)

15 2s GGTGATATTAACCACAGCTATTCCCGTGGGC (SEC. ID. nº 17)

3s GTATGCTGACGAGGTTGTGGAAGAGTGCTCC (SEC. ID. nº 18)

4s AAGGTGACGAGAATGGTTGTG (SEC. ID. nº 19)

20 5s GCGCAGATAGTGTGCGCATGTA (SEC. ID. nº 20)

Grupo 2:

25 1as AGACGACTCTTCCACAACCTCGTCAGCATAC (SEC. ID. nº 21)

2as GTTAATATCACCACCCATAT (SEC. ID. nº 22)

3as GCCCACGGGAATAGCTGTGGTTAATATCACC (SEC. ID. nº 23)

30 Los extremos en 5' y 3' del gen se obtuvieron mediante RCP-RACE utilizando el RACEKIT 5'/3' en el que el cebador de anclaje y cebador de anclaje oligo (dT) se sustituyeron con oligo SL1 y oligo (dT) SL1 cuya secuencias se indican a continuación:

35 SL1 GGTTTAATTACCCAACCTTTGAG (SEC. ID. nº 24)

dTSL1 GGTTTAATTACCCAACCTTTGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (ACG) (SEC. ID. nº 25).

40 1  $\mu$ l de ADNc, sintetizado utilizando 1,87  $\mu$ M del cebador dTSL1, se amplió con los cebadores 1s y SL1 para obtener el extremo 3' del gen. Las condiciones de ampliación fueron:

40 ciclos que comprenden 10 s a 98°C, 30 s a 46°C, 30 s a 72°C seguido de 10 minutos de extensión a 72°C. Las ampliaciones posteriores se efectuaron utilizando el cebador SL1 en una combinación con cada una de los cebadores de Grupo 1 utilizando las condiciones anteriores como condiciones de ampliación.

45 Se obtuvo un fragmento de 650 pb, clonado en el pCR2.1 y se secuenció como se describió anteriormente.

50 Con el fin de ampliar el extremo 5', se siguió el protocolo indicado por el proveedor del kit, utilizando el cebador 1as para la síntesis del ADNc y los cebadores 2as-3as y SL1 para las ampliaciones. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 500 pb, se clonó y se secuenció.

Con el fin de obtener el ADNc que codifica el gen completo, se amplió 1  $\mu$ l de ADNc utilizado para las reacciones con los cebadores degenerados, con los siguientes cebadores:

55 5'-ATGGCGTCGACTGAAGAC-3' (SEC. ID. nº 26)

3'-TCAGACGATGTCATGGCA-5' (SEC. ID. nº 27)

60 Las condiciones de ampliación utilizadas fueron las siguientes: 40 ciclos comprendiendo 10 s a 98°C, 30 s a 60°C y 1 minuto a 72°C seguido de 10 minutos de ampliación a 72°C. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1 080 bases, se clonó en el vector pCR2.1 y se secuenció.

### La clonación del receptor de OR83b

65 Con el fin de aislar el ADNc que codifica el receptor OR83b de *Spodoptera littoralis*, se diseñaron un cebador inverso específico y un cebador directo degenerado. La degeneración del cebador directo interesó sólo una posición desde la alineación entre las secuencias de nucleótidos respectivas provenientes de *Spodoptera exigua*, *Heliothis*



*virescens*, *Helicoverpa zea* y *Mamestra brassicae* puso de manifiesto un grado muy alto de conservación entre sí. Las secuencias de los cebadores se indican a continuación:

Fw ATGACCAA (AG) GTGAAGGCCAG (SEC. ID. nº 28)

Rv GTGTTGGTACAACCTCAAGTAA (SEC. ID. nº 29).

Se utilizó el ADNc preparado como se describe en el párrafo anterior, y de éste se amplió 1 µl con 250 nM de cada uno de los dos cebadores en 30 ciclos que comprenden 10 s a 98°C, 30 s a 50°C, y 1,5 minutos de ampliación. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1500 pb, que se clonó en el vector pCR2.1 y se secuenció como se describió anteriormente.

#### Clonación del receptor DHR

Con el fin de aislar el ADNc del receptor DHR de *Spodoptera littoralis*, se diseñaron cebadores degenerados basándose en la alineación entre las secuencias de proteínas correspondientes de *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster*, *Nilaparvata lugens* y *Acheta domesticus*. Las secuencias de los cebadores utilizados son las siguientes:

1Fw: TT (TC) (TC) T (ATCG) TA (TC) TT (TC) AA (AG) GA (ATCG) (TC) T (ATG) (AC) G (ATCG) TG (TC) (SEC. ID. nº 30)

2Rv: A (AG) (TC) TT (ATCG) GT (ATCG) AT (ATCG) A (AG) (ATCG) ACCACAT (ATCG) AT (SEC. ID. nº 31).

Se extrajo ARN de larvas en fase V por el procedimiento ya descrito. Para la cuantificación del ARN y la síntesis del ADNc, se utilizaron los protocolos descritos para la clonación de AlstAR.

Se obtuvo un fragmento de 550 pb, mediante 45 ciclos de ampliación, que comprende 10 s a 98°C, 30 s a 48°C, y 1 minuto a 72°C seguido de 10 minutos de extensión a 72°C, que se clonó posteriormente en el vector pCR2.1 y se secuenció.

Sobre la base de la secuencia, se diseñaron cebadores específicos y se utilizaron para las reacciones posteriores RACE 3' y 5' siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

Grupo 1:

1s AACCTCATGTCGACGTATATTCTGTCT (SEC. ID. nº 32)

2s ATGCTTGTAGAAGGTTTGTACCTGTAC (SEC. ID. nº 33)

3s TGGGTTATATGCAGGTGCTTCGTC AAC (SEC. ID. nº 34)

Grupo 2:

1as GGATGGGGTGCGCCGGGTGTTCCCTA (SEC. ID. nº 35)

2as CATA CATATGACCAGAATCGTACACGA (SEC. ID. nº 36)

3as GGCGAGGTAGATGAGGCTGGTGACGTC (SEC. ID. nº 37).

Para 3', se aisló un fragmento de aproximadamente 650 pb mediante 40 ciclos de ampliación, que comprenden 10 s a 98°C, 30 s a 46°C, 1 minuto a 72°C y seguido de 10 minutos de ampliación a 72°C. Para 5', se obtuvo un fragmento de aproximadamente 500 pb mediante 40 ciclos de ampliación según el procedimiento descrito anteriormente.

Para el aislamiento de todo el ADNc se utilizaron los siguientes cebadores:

5'-ATGGCGGAGAAGTGCCTGGCG-3' (SEC. ID. nº 38)

3'-TCATACCGTGAGTCGTATGCT-5' (SEC. ID. nº 39)

Un fragmento de 1190 pb se amplió con 1 µl de ADNc, sintetizado por ARN extraído de larvas en estadio V, con los cebadores Fw y Rv mediante 45 ciclos de ampliación, que comprenden 10 s a 98°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C y seguido de 10 minutos de ampliación.

#### Clonación del receptor LGR1

Con el fin de aislar el ADNc del receptor LGR1 de *Spodoptera littoralis*, se diseñaron cebadores degenerados basándose en la alineación entre las secuencias de proteínas correspondientes de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* y *Aedes aegypti*. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron las siguientes:

5 1Fw: GC (ATGC) TA (TC) (TC) T (AGCT) AC (AGCT) CA (TC) (GC) (AGCT) (AGCT) TT (TC) CA (TC) TG (TC) TG (TC) (SEC. ID. nº 40)

10 1Rv: TC (AGCT) A (TC) (AGCT) GG (AGCT) A (AG) (AG) CA (AGCT) AT (AGCT) (GC) (AT) (AGCT) GT (SEC. ID. nº 41).

Se extrajo ARN de los huevos de *Spodoptera littoralis*, siguiendo el procedimiento ya descrito. Para la cuantificación del ARN y la síntesis del ADNc, se utilizaron los protocolos descritos para la clonación de AlstAR.

15 Un fragmento de aproximadamente 1250 pb, se obtuvo mediante 45 ciclos de ampliación, que comprenden 10 s a 98°C, 30 s a 48°C, 1,5 minutos a 72°C y seguido de 10 minutos de ampliación a 72°C, que se clonó posteriormente en el vector pCR2.1 y se secuenció.

20 En un análisis de la secuencia, se diseñaron los siguientes cebadores, posteriormente utilizados por las reacciones RACE en 3' y 5' por los métodos descritos anteriormente:

Grupo 1:

25 1s TGATGAAAATGCCTTCGC (SEC. ID. nº 42)

2s CACGAACCAGTCAACAACAC (SEC. ID. nº 43)

3s GAAAGCGTACCTGACGCATCATTTCCTCA (SEC. ID. nº 44)

30 4s GTTATCAGTAATTACTTTAACTATAGT (SEC. ID. nº 45)

Grupo 2:

35 1as ACTGCCGGAGTCTGAGAAGTA (SEC. ID. nº 46)

2as GACTCCTCGCTCGTAGTTCG (SEC. ID. nº 47)

3as CATTTCGACTGCATTATAGC (SEC. ID. nº 48)

40 4as GCCTTCTAGGTCTATAGCTTG (SEC. ID. nº 49).

Se aisló un fragmento de aproximadamente 500 pb y un fragmento de 860 pb, se clonaron en el vector pCR2.1 y se secuenciaron en 3' y 5', respectivamente, mediante 35 ciclos de ampliación en el ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de los huevos de *Spodoptera littoralis*, según los procedimientos descritos en los párrafos anteriores.

45 Con el fin de aislar el ADNc correspondiente a toda la secuencia que codifica el receptor LGR1 de *Spodoptera littoralis*, se utilizaron los siguientes cebadores, que corresponden a los extremos 5' y 3', respectivamente:

50 5'-ATGTATTGGAGATTATGTATTTGGGCT-3' (SEC. ID. nº 50)

3'-TTAAAGCGGTACCTCACTACTGTCTTT-5' (SEC. ID. nº 51).

Se aisló un fragmento de 2.250 pb, clonado y secuenciado por procedimientos de ampliación estándar.

#### 55 Clonación del receptor Oct/TyrR

Para el aislamiento del ADNc que codifica el receptor Oct/TyrR de *Spodoptera littoralis*, se diseñaron cebadores degenerados basándose en la alineación entre las secuencias de nucleótidos de los genes correspondientes de *Bombyx mori*, *Heliothis virescens* y *Mamestra brassicae*.

60 Las secuencias de los cebadores utilizados son las siguientes:

1Fw CCAGAATGGGA (AG) GC (AT) AT (TC) TGAC (SEC. ID. nº 52)

65 2Rv AC (AG) CCCATTAT (TG) AT (AG) CC (TC) AG (AG) G (SEC. ID. nº 53).

Se utilizaron cebadores para ampliar un fragmento de 1.090 pb del ADNc sintetizado en ARN extraído de las cabezas de cada uno de los adultos, preparados según los procedimientos descritos anteriormente. Una vez que el fragmento se había clonado en el vector pCR2.1 y secuenciado, se diseñaron los siguientes cebadores, utilizados para las reacciones RACE en 3' y 5':

5

Grupo 1:

1s CCAGAAAATTGACACCAA (SEC. ID. nº 54)

10

2s GAGAGTAACTCGAAAGAAAC (SEC. ID. nº 55)

3s TGCTGTTTATCAATTCATTGAAGA (SEC. ID. nº 56)

Grupo 2:

15

1as AGTTCTTTTTTTAGTGGCCAAA (SEC. ID. nº 57)

2as GACAAGGCGTATCAGGTTC (SEC. ID. nº 58)

20

3as ACCCTAGAAGTGGCGGAGAGCTAATA (SEC. ID. nº 59).

25

Se aislaron un fragmento de aproximadamente 380 pb y un fragmento de 590 pb, se clonaron en el vector pCR2.1 y se secuenciaron en 3' y 5', respectivamente, mediante 40 ciclos de ampliación en el ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de las cabezas de cada uno de los adultos individuales de *Spodoptera littoralis*, según los procedimientos descritos en los párrafos anteriores.

Con el fin de aislar el ADNc correspondiente a la secuencia completa que codifica el receptor Oct/TyrR, se utilizaron los siguientes cebadores:

30

5'-ATGGGGCAAACAGCTACACAC-3' (SEC. ID. nº 60)

3' CTCTGTATGAAACCGTGA-5' (SEC. ID. nº 61).

35

Un fragmento de 1.434 pb, se aisló, se clonó y se secuenció mediante 40 ciclos de ampliación, que comprenden 10 s a 98°C, 30 s a 55°C y 1 minuto a 72°C.

#### Clonación del receptor PBANR

40

La secuencia del receptor PBANR ya estaba disponible en el banco de datos, por consiguiente, se diseñaron cebadores correspondientes a 5' y 3' de la región de codificación, cuyas secuencias se indica a continuación:

5'-ATGACATTGTCAGCGCCCCCGATC-3' (SEC. ID. nº 62)

3'-TCAATCATGAATGTAACA-5' (SEC. ID. nº 63).

45

Los cebadores se utilizaron para ampliar 1 µl de ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de larvas en estadio V, según los procedimientos descritos. La ampliación se llevó a cabo durante 40 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 55°C, 40 s a 72°C, seguido de 10 minutos de extensión a 72°C. Se obtuvo un fragmento de 1053 pb, que se clonó posteriormente en el vector pCR2.1 y se secuenció según los procedimientos descritos.

50

#### Clonación de parte de la secuencia que codifica el receptor AlstCR

55

Para el aislamiento del receptor AlstCR de *Spodoptera littoralis*, se diseñaron los siguientes cebadores degenerados basándose en la homología entre las secuencias de proteínas respectivas de *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster* y *Anopheles gambiae*:

1Fw: GA (AG) TG (TC) TT (TC) (TC) T (AGCT) AT (ATC) GG (ATGC) (SEC. ID. nº 64)

1Rv: (ATGC) GC (AG) CA (ATGC) GT (AG) CA (ATGC) GC (TC) TT (SEC. ID. nº 65).

60

Los cebadores 1Fw y 1Rv se utilizaron para ampliar ADNc transcrito a partir de ARN extraído de las cabezas de cada uno de los adultos, mediante 40 ciclos de ampliación a 45°C. Un fragmento de 726 pb se aisló, se clonó posteriormente en el vector pCR2.1 y se secuenció.

65

Clonación de parte de la secuencia que codifica el receptor AKHR

Para el aislamiento del receptor AKHR de *Spodoptera littoralis*, se diseñaron los siguientes cebadores degenerados basándose en la homología entre las secuencias de nucleótidos de los correspondientes receptores de *Bombyx mori* y *Periplaneta americana*:

- 5           1Fw: GACCTGATGTGC (AC) G (AC) (AG) TCATG (SEC. ID. nº 66)  
             1Rv: GTC (AG) ATCCA (AG) TACCACAG (AG) CA (SEC. ID. nº 67).

10           Los cebadores 1Fw y 1Rv se utilizaron para ampliar ADNc transcrito a partir de ARN extraído de las cabezas de cada uno de los adultos, mediante 40 ciclos de ampliación a 45°C. Se aisló un fragmento de 534 pb, se clonó posteriormente en el vector pCR2.1 y se secuenció.

Clonación de los receptores en los plásmidos PENTER y PH7GW1WG2

15           Los genes que codifican los receptores AlstAR, AlstCR, DHR, AKH, Or83b y Oct/TyrR se aislaron de los plásmidos pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> por digestión o por RCP usando un cebador directo y un cebador inverso homólogo a la secuencia del gen que debe aislarse, que lleva la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI (cebador directo) y XhoI (cebador inverso), compatible con el polienlazador del plásmido pENTR. El plásmido pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO amplió el receptor del receptor LGR1 con un cebador directo que lleva la secuencia de reconocimiento para la enzima BamHI y un cebador inverso que contiene el sitio XhoI. Para la clonación del receptor de PBAN se utilizó un cebador directo que contiene la secuencia EcoRI en combinación con un cebador inverso que lleva el corte de la secuencia por la enzima NotI. Las secuencias de los cebadores se indican a continuación:

- 25           AlstAR Fw 5'-GGAATTCATGGCGTCTGACTGAAGAC-3' (SEC. ID. nº 68)  
             AlstAR Rev 5'-CCTCGAGGTCAGACGATGTCATGGCA-3' (SEC. ID. nº 69)  
             AlstCR Fw 5'-GGAATTCCTGCGTTCCATTCCTGCTA-3' (SEC. ID. nº 70)  
             AlstCR Rev 5'-CCTCGAGGAAGAATTGGGTTTCATGGCAG-3' (SEC. ID. nº 71)  
             DHR Fw 5'-GGAATTCGATGGCGGAGAAGTGCCTGGC-3' (SEC. ID. nº 72)  
             DHR Rev 5'-CCTCGAGGGTCATACCGTGAGTCGTATGC-3' (SEC. ID. nº 73)  
             AKH Fw 5'-GGAATTCGACCTGATGTGCCGAGTCATG-3' (SEC. ID. nº 74)  
             AKH Rev 5'-CCTCGAGGGCTTGTCGATCCAATACCAC-3' (SEC. ID. nº 75)  
             LGR1 5'-CGGGATCCCGATGTATTGGAGATTATGTATTTGGGC-3' (SEC. ID. nº 76)  
             LGR1 Rev 5'-CCTCGAGGGTTAAAGCGGTACCTCACTAC-3' (SEC. ID. nº 77)  
             OR83b Fw 5'-GGAATTCGATGACCAAAGTGAAGGCCAGG-3' (SEC. ID. nº 78)  
             OR83b Rev 5'-CCTCGAGGGTTACTTGAGTTGTACCAACACC-3' (SEC. ID. nº 79)  
             Oct/TyrR Fw 5'-GGAATTCGGGGCAAACAGCTACACACG-3' (SEC. ID. nº 80)  
             Oct/TyrR Rev 5'-CCTCGAGGGTCACGGTTTCATACAGAGTAAC-3' (SEC. ID. nº 81)  
             PBAN-R Fw 5'-GGAATTCGATGACATTGTCAGCGCCCCCG-3' (SEC. ID. nº 82)  
             PBAN-R Rev 5'-TAAAGCGGCCGCTCAATCATGAATGTAACAAAAA-3' (SEC. ID. nº 83).

55           La reacción de ampliación se realizó en un volumen final de 50 µl utilizando 50 ng de ADN plasmídico, 200 µM de dNTP, 0,25 µM de cebador directo, 0,25 µM de cebador inverso, 5 x tampón de Phusion HF, 1 U de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ( Finnzymes). El programa de ampliación consiste en un ciclo de desnaturalización a 98°C durante 30 s, 35 ciclos a 90°C durante 10 s, 52°C durante 30 s, 72°C durante 1 min y un ciclo de ampliación final a 72°C durante 10 min. Se separaron aproximadamente 5 µl de producto ampliado en gel de agarosa al 1% para verificar su calidad y peso molecular. Después de la purificación de los reactivos utilizados para la ampliación (GenElute<sup>™</sup> PCR Clean-Up Kit, Sigma) las reacciones de RCP restantes se sometieron a digestión con 20 U de las enzimas de restricción apropiadas para producir extremos cohesivos para la posterior clonación en el vector pENTR, también digerido con las mismas endonucleasas de restricción. La reacción de ligadura entre los genes de los receptores (200 ng) y el vector pENTR (300 ng) se realizaron en un volumen de 20 µl a 16°C, usando 20 u de T4 ADN ligasa (Biolabs). 10 µl de reacción de ligasa se utilizaron para transformar células competentes de DH5a de

*E. coli* sembradas en placa en LB con el antibiótico kanamicina (50 mg/l) para seleccionar los clones de células que llevan los plásmidos pENTR. Las colonias obtenidas se inocularon con LB líquido y kanamicina a 37°C durante toda la noche.

- 5 El ADN plasmídico se extrajo (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega) y se digirió con 10 u de enzimas de restricción adecuadas.

Se utilizaron plásmidos pENTR con los receptores clonados para la reacción de recombinación con el vector binario pH7GW1WG2 (I). 150 ng de plásmido pENTR se incubaron con 300 ng de pH7/GW1WG2 (I) a 25°C en presencia de la enzima de Gateway® LR clonase II Enzyme Mix (*Invitrogen*) durante dos horas. La reacción se bloqueó a continuación con proteinasa K a 37°C durante 10 min. y se utilizó para transformar las células DH5α. Los plásmidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y además se verificaron mediante análisis de la secuencia. Las células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (C58) se transformaron con los plásmidos recombinantes por la técnica de congelación/descongelación. Aproximadamente 10 µg de plásmido se añadieron a 100 µl de células competentes y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Las células se pusieron en nieve carbónica/etanol durante 5 minutos y luego se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. Se añadió 1 ml de LB a las células y se incubaron a 28°C durante 3 horas antes de sembrarse en placas en LB que contenía 100 mg/l de Rifampicina y 100 mg/l de Espectinomina.

- 20 Las colonias resistentes se analizaron por RCP con cebadores específicos para cada receptor clonado.

#### Transformación de plantas de tabaco con ARNdc

Para la expresión del ARNbc en plantas de tabaco se utilizó la técnica Gateway: las secuencias que codifican los receptores se aislaron de los plásmidos pCR® 2,1-TOPO® en el que se clonaron y secuenciaron. Las reacciones de RCP se efectuaron utilizando oligonucleótidos complementarios a la secuencia génica y llevando a los sitios reconocidos por las enzimas de restricción para la clonación del plásmido pENTR (*Invitrogen*). Este plásmido es un Entry Vector que, además de la clonación de las secuencias de ADN, les permite que sean transferidos al vector de expresión (vector de destino) gracias a la presencia de dos sitios de recombinación específicos (attL1 y attL2) que flanquean el producto de RCP clonado. Los clones recombinantes se utilizaron para la reacción de recombinación con el vector binario pH7GWIWG (I) (*Biología del sistema vegetal*) para la expresión en plantas. Este plásmido se caracteriza por la presencia del activador 35S para la expresión constitutiva del gen clonado corriente abajo de los sitios attR1 y attR2, que sirven para la recombinación con el Entry Vector y la transferencia de la cadena 5'-3' del gen clonado corriente arriba de la secuencia intrónica y corriente abajo de otra secuencia intrónica idéntica. La presencia del activador constitutivo asegura la expresión del gen mientras que la secuencia intrónica permite la formación de ARNdc. La reacción de recombinación entre los sitios attL1 y attL2 de pENTR y los sitios attR1 y attR2 de pH7GWIWG (I) está mediada por la enzima Gateway® LR Clonase™ (*Invitrogen*). Los plásmidos recombinantes se caracterizaron por medios de digestión con endonucleasas de restricción y además verificados por secuenciación. Estos plásmidos se transfirieron a células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58) para la transformación de plantas de tabaco. Para cada montaje, se cultivaron conjuntamente 50 discos foliares y la misma cantidad de cultivaron conjuntamente con *Agrobacterium* transformada con el plásmido vacío pH7GWIWG (I) como referencia para los ensayos biológicos posteriores.

Tras la transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* con *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el plásmido pH7GW1WG2 que expresa los receptores clonados individuales, los explantes foliares se cultivaron conjuntamente durante 3 días con 100 µl de cultivo bacteriano cultivado a 28°C hasta alcanzar una  $DO_{600} = 0,8$  en presencia de 10 ml de medio líquido A10 (3,6 g/l de B5, 250 mg/l de  $NH_4NO_3$ , 500 mg/l de MES, 2% de glucosa, 1 µg/ml de bencilaminopurina, 0,1 g/ml de ácido naftalenacético, pH 5,7). El *Agrobacterium* se retiró por lavado las piezas de hoja con medio A10 reciente que contiene 500 mg/m de cefotaximal. Los discos foliares se transfirieron a continuación a un medio A11 sólido en presencia del antibiótico higromicina (30 mg/l). Los explantes se transfirieron cada semana a un medio reciente hasta que la formación de callos que se pusieron en A12 (todos con una concentración de cefotaxima igual a 200 g/ml). Los brotes se transfirieron a MS30 sólido (4,4 g/l de Murashige y Skoog, 30 g/l de sacarosa pH 5,7) e higromicina.

#### Caracterización de las plantas transgénicas

El ADN genómico se extrajo a partir de 0,5 g de hojas de plantas de tabaco cultivadas en medio selectivo (GenElute™ Plant Genomic DNA miniprep Kit, Sigma) y se utilizaron como molde para verificar la presencia de ADN exógeno mediante la RCP. Las plantas positivas a la RCP se caracterizaron además por la presencia de ARNbc mediante la extracción del ARN de las hojas de las plantas transgénicas (GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit, Sigma) para la transcripción inversa del ADNc. Con esta finalidad, se incubaron 2 µg de ARN totales con 250 ng de hexámeros aleatorios (*Invitrogen*) a 70°C durante 5 minutos y a continuación en hielo durante 5 minutos. Una solución que contiene 1 mM de dNTP, 1 x tampón de reacción, 20 u de inhibidor de ribonucleasa se añadió a la reacción y la mezcla se incubó a 25°C durante 5 minutos. 200 u de RevertAid™ M-MuLV Reverse se añadieron a las muestras y la reacción se incubó a 25°C durante 10 minutos y a continuación a 42°C durante 60 minutos y a continuación durante 10 minutos a 70°C. Se utiliza 1 µl de ADNc para las reacciones de RCP y para

cada receptor de los cebadores utilizados para la clonación en pENTR.

#### Pruebas con larvas de *S. littoralis*

5 Para los ensayos biológicos en plantas transgénicas con ARNdc/AlstC-R y ARNdc/DHR, se utilizaron larvas en estadio III de *Spodoptera littoralis*. Cada larva se colocó en un recipiente que tiene un diámetro de 6 cm en el que trozos de hojas de cada línea transgénica se introdujeron a diario. Como referencia, larvas de la misma edad se alimentaron con hojas de plantas transformadas con el plásmido vacío, y por lo tanto que no expresan ningún ARNdc.

10

#### Resultados

15 Las plantas regeneradas en un medio selectivo se caracterizaron por la presencia del gen heterólogo mediante RCP en el ADN genómico extraído de las hojas y la producción de ARNbc se verificó por medio de RT-RCP en el ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARN completo. La figura 3 muestra el análisis por RT-RCP del ARNbc en plantas transgénicas AlstC-R. En todas las 7 líneas analizadas, el nivel de expresión de ARNbc era bastante alto, mientras que en las plantas de referencia (WT1 y WT2) no se detectó ninguna expresión. Para asegurarse de que la reacción de ampliación funciona correctamente, se utilizó una referencia positiva (C+) de un plásmido que contiene el gen AlstCR como plantilla. Se obtuvieron resultados análogos para las plantas que expresan el ARNbc de otros receptores (AlstA-R, DHR, PBAN-R, OctR). Todas las plantas transgénicas positivas se micropropagaron por esquejes nodales para obtener poblaciones homogéneas de los transformantes individuales que deben probarse con las larvas.

25 Las pruebas con larvas se llevaron a cabo utilizando larvas en estadio I de *S. littoralis* alimentadas con trozos de hojas de plantas transgénicas cultivadas en condiciones estériles. Las larvas se criaron juntas hasta el estadio III y a continuación, cada una de ellas se aisló en placas de Petri de 10 cm donde se añadieron trozos de hojas a diario durante todo el ciclo vital del insecto hasta llegar a la fase de pupa.

30 En un primer experimento preliminar se utilizaron en la prueba 20 larvas para cada línea transgénica. El gráfico de la figura 4 muestra el resultado obtenido en el ensayo biológico en plantas que expresan ARNbc para AlstC-R. Las líneas transgénicas analizadas (C2, C3, C5a y C7) se indican en el eje de abscisas, mientras que el porcentaje de mortalidad en ordenadas. Es evidente que las larvas alimentadas en plantas transgénicas presentan un porcentaje de mortalidad mucho mayor con respecto a las larvas alimentadas en las plantas de referencia (WT). Mientras que las larvas alimentadas en la referencia presentaban una tasa de mortalidad de aproximadamente 3%, las alimentadas en las líneas transgénicas tenían una mortalidad en torno al 80% (líneas AlstC-R 5a y 7) y 100% (líneas AlstC-R 2 y 3), después de 4 semanas de alimentación.

40 En un segundo experimento, la tasa de mortalidad de las larvas alimentadas en dos líneas transgénicas (que expresan ARNbc de AlstCR y DHR, respectivamente) se puso a prueba y comparó con las larvas de referencia alimentadas con plantas wt. La tasa de mortalidad de la población de larvas se midió durante 10 días, a partir de larvas en estadio I. En el gráfico mostrado en la figura 5, la tasa de mortalidad de las larvas alimentadas en ambas líneas transgénicas llegar a 100% después de 8 días, mientras que en la referencia es todavía del 60%. Este experimento indicó claramente que la presencia de ARNdc, tanto AlstCR como DHR, produjo en las plantas una reducción significativa de la vitalidad de las larvas, lo que confirma la validez de la tecnología propuesta.

45

### **Ejemplo 2: Transformación de plantas de tabaco, para protegerlas del nematodo *Meloidogyne incognita***

#### **Materiales y métodos**

##### 50 Selección de los objetivos RAPG

Los receptores RAPG de *M. incognita* que se clonaron en este organismo y se seleccionaron como objetivos de la presente forma de realización de la invención son los siguientes:

- 55 1. Un homólogo de los receptores de serotonina de *C. elegans*, denominado semejante a MiSerR1 (figura 2; SEC. ID. nº 9);
2. Un homólogo del receptor de dopamina CeDop-1 de *C. elegans*, denominado semejante a MiDopR1 (figura 2; SEC. ID. nº 10);
- 60 3. Un homólogo del receptor de neuropéptidos semejante a CeNPR1 de *C. elegans*, denominado semejante a MiNPR1 (figura 2; SEC. ID. nº 11);
- 65 4. Un homólogo de un supuesto RAPG de *C. elegans* (T27D1.3) (perteneciente a la familia de los RAPG semejantes a rodopsina), denominado semejante a MiRho1;

5. Un homólogo de un supuesto RAPG de *C. elegans* (T07D4.1) (perteneciente a la familia de los RAPG semejantes a rodopsina), denominado semejantes a MiRho2;
6. Un homólogo de un supuesto RAPG de *C. elegans* (B0563.6) (perteneciente a la familia de los RAPG semejantes a rodopsina), denominado semejantes a MiRho3;
7. Un homólogo de un supuesto RAPG de *C. elegans* (F02E8.2) (perteneciente a la familia de los RAPG semejantes a rodopsina), denominado semejantes a MiRho4.

Además de estos receptores 6, se identificó otra secuencia correspondiente a un RAPG de interés en un banco de datos: semejante a MiNpR1 (Q2TGX5\_MELIC) que es un homólogo de un receptor de neuropéptido del modelo nematodo *C. elegans* (figura 2, SEC. ID. nº 11).

Las plantas de tabaco se transformaron con plásmidos que contienen secuencias génicas (que producen ARNbc en plantas) de los receptores semejantes a MiSerR1 (SEC. ID. nº 9), semejantes a MiDopR1 (SEC. ID. nº 10) y semejantes a MiNpR1 (SEC. ID. nº 11 ). Las secuencias de nucleótidos de los receptores que se analizaron se indican en la figura 2.

#### Clonación de los receptores de *M. incognita*

Para clonar los receptores semejantes a MiSerR1 y semejantes a MiDopR1 de *M. incognita*, el banco de datos de las secuencias expresadas del nematodo *M. incognita* (disponible en <http://www.nematode.net/BLAST/Cluster.BLAST/index.php>) se interrogó con varias secuencias peptídicas de los receptores homólogos de *C. elegans*.

Los clones identificados fueron:

- AW 735607 para semejantes a MiSerR1
- AW 571066 para semejantes a MiDopR1.

A partir de las secuencias de los clones identificados, se diseñaron oligonucleótidos específicos, y se utilizaron para ampliar porciones de las secuencias del receptor. Las secuencias de los receptores completos se obtuvieron a continuación, utilizando el método Race en 5' y 3' descrito anteriormente. Con respecto al receptor semejante a MiNpR1, la clonación se realizó utilizando cebadores específicos en 5' y 3' del gen cuya secuencia ya estaba presente en los bancos de datos Q2TGX5 MELIC). Los oligonucleótidos utilizados para la ampliación son los siguientes:

Para semejantes a MiSerR1 (SEC. ID. nº 9):

- MiserR F1: GATTTGGAAAATTTGGACGAT (SEC. ID. nº 84)
- MiserR F2: GGAGGGTCTTTTGTCCATGCA (SEC. ID. nº 85)
- MiserR F3: TCTCATCCAATAATTGCAATT (SEC. ID. nº 86)
- MiserR R1: ACGTAATGCTGAATATCGAAG (SEC. ID. nº 87)
- MiserR R2: CAAATTTAAAATTGAAGCAGT (SEC. ID. nº 88)
- MiserR R3: AGCCAAAGCAAGTGATATAAG (SEC. ID. nº 89)

Para semejante a MiDopR1 (SEC. ID. nº 10):

- MidopR F1: ACTCTTGGTGTATTATGGGC (SEC. ID. nº 90)
- MidopR F2: TGGCTAGGTTATGCCAATTCT (SEC. ID. nº 91)
- MidopR F3: CGAGACTTTCGACGTGCCTTT (SEC. ID. nº 92)
- MidopR R1: AAAGGCACGTCGAAAGTCTCG (SEC. ID. nº 93)
- MidopR R2: AGAATTGGCATAACCTAGCCA (SEC. ID. nº 94)
- MidopR R3: GCCCATAATAACACCAAGAGT (SEC. ID. nº 95).

Los siguientes oligonucleótidos se utilizaron para la ampliación de toda la región de codificación:

MiserR directo: ATGTTAGAAAATGATTTGGAAAA (SEC. ID. nº 96)

5 MiserR inverso: TTATTTTGATGATTCCATCA (SEC. ID. nº 97)

MiDopR directo: ATGTTGCCCTGGTGGCTACCTCT (SEC. ID. nº 98)

10 MiDopR inverso: TTA AAAACATAAAAATCTCA (SEC. ID. nº 99)

MiNprR directo: ATGGAAGCATCTACAATGGAATT (SEC. ID. nº 100)

MiNprR inverso: TCATATCCTCTCATCTGTAT (SEC. ID. nº 101).

15 Los receptores ampliados de este modo se clonaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenciaron.

De igual manera a lo que se describe en el ejemplo 1 para los genes que codifican los receptores RAPG de *Spodoptera littoralis*, los ADNc de *M. incognita* se transfirieron al plásmido pENTER y posteriormente al vector binario para plantas PH7GW1WG2.

20 Las líneas transgénicas que expresan ARNbc correspondientes a semejantes a MiNPR1 de *M. incognita* se utilizaron para ensayos de infección radicular.

#### Experimentos infección radicular

25 Unas plantas de tabaco de dos semanas se trasladaron a macetas de 16 cm que contenían tierra estéril mezclada con aproximadamente 5 a 6 agallas de *M. incognita*, previamente extirpadas de las raíces de otras plantas infectadas. Después de 6 semanas, se quitó la tierra y se analizó la presencia de agallas en las raíces de las plantas. Se midió la cantidad de biomasa total infectada de las plantas transgénicas y los valores se compararon con los de las plantas no infectadas de referencia WT.

#### Resultados

35 Como se describió anteriormente, las plantas de tabaco pertenecientes a 3 líneas transgénicas diferentes que expresan ARNbc de semejantes a NPR1 se infectaron con gusanos *M. incognita*. Después de 3 semanas, se estimó el porcentaje de raíces infectadas de las plantas transgénicas y se comparó con el de las plantas de referencia no transformadas (WT). Como se muestra en la figura 6, las raíces de las plantas transgénicas presentaban una reducción en el nivel de infección en comparación con las plantas WT. Este resultado indica que las plantas transgénicas, que expresan el ARNbc del gen semejante a NPR1 de *M. incognita*, son más resistentes a la infección por nematodos, lo que confirma que la tecnología propuesta en la presente memoria encuentra aplicaciones también en la protección de las plantas contra los ataques de nematodos.

#### **Bibliografía**

- 45 - Aguilar R, Maestro JL, Vilaplana L, Pascual N, Piulachs MD, Bellés X (2003). Regul Pept. Oct 15; 115(3): 171-7.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GH, Feldman P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, vaughn TY y Roberts J (2007). Nature Biotech, 25 (11): 1322-1326.
- 50 - Brantl, S. (2002) Biochimica et Biophysica Acta. 1575: 15-25.
- Farooqui T (2007). Neurochem Res. 32: 1511-1529.
- 55 - Hamilton, A.J. y Baulcombe, D.C. (1999). Science 286: 950-952.
- Hammond, S.M. Boettcher, S., Caudy, A., Kobayashi, R. y Hannon, G. (2001). Science 293: 1146-1150.
- Johnson EC, Bohn LM y Taghert PH (2004). Journal of Exper Biol, 207: 743-748.
- 60 - Kusaba, M., Miyahara, K., Lida, S., Fukuoka, H., Takario, T., Sassa, H., Nishimura, M., Nishio, T. (2003) Plant Cell 15: 1455-1467.
- Li L, Wright SJ, Krystofova S, Park G, Borkovich KA (2007). Annu Rev Microbiol., 61: 423-452.
- 65 - Meyering-Vos M, Merz S, Sertkol M, Hoffmann KH (2006). Insect Biochem Mol Biol. Jun;36(6): 492-504.



- Neuhaus EM, Gisselmann G, Zhang W, Dooley R, Stortkuhl K Hatt H (2005). Nature Neurosc, 8 (1): 15-17.
- 5 - Nishi S, Hsu SY, Zell K y Hsueh JW (2000). Endocrinology, 141 (11): 4081-4090.
- Ogita, S., H., Uefuji, Y., Yamaguchi, N. Koizumi y Sano, H. (2003). Nature 423: 823.
- Rafaeli A, Bober R, Becker L, Choi MY, Fuerst EJ y Jurenka R (2007). Insect Molec Biol, 16 (3): 287-293.
- 10 - Staubli F, Jorgensen TJD, Cazzamali G, Williamson M, Lenz C, Sondergaard L, Roepstorff P y Grimmeliikhuijzen JP (2002). PNAS, 99 (6): 3446-3451.
- Tomoyasu, Y. y Denell, R. E. (2004). Dev. Genes Evol. 214: 575-578.
- 15 - Weaver RJ, Freeman ZA, Pickering MG, Edwards JP. (1994). Comp. Biochem. Physiol. C 107: 119-27.

**Listado de secuencias**

- 20 <110> Arterra Bioscience SRL
- <120> Procedimiento para la obtención de plantas transgénicas resistentes al ataque de fitopatógenos basado en la interferencia por ARN (ARNi).
- 25 <130> PCT97529
- <150> MI2008A1305
- <151> 2008-07-17
- 30 <160> 101
- <170> PatentIn versión 3.2
- 35 <210> 1
- <211> 1086
- <212> ADN
- <213> Spodoptera littoralis
- 40 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(1086)
- <223> receptor de alostatina A que codifica el ADNc

ES 2 488 121 T3

<400> 1  
atggcgtcga ctgaagacga attaggagc atatgcctta acttaaccag tgaggagget 60  
atgcttgag gatgtaacta cagcagcgaa tatgaaaatg gagaactgtt ggagaaggtc 120  
gtctcgaggg ttgtgcccat cttctttggc ttcataggca tcgttgatt agttggcaat 180  
gctttggtcg tcttagtggc cgctgccaac cctggcatgc ggtccactac caacctgctc 240  
atcataaact tggctgtcgc tgaactgctc tttgtgatct tctgcgttcc attcactgct 300  
accgactatg tcatgccacg atggcccttc ggagactggt ggtgcaaggt tgtccagtac 360  
ttcattgtag tcaactgctca tgcgtccgtc tacactctag tactcatgct tctagacagg 420  
ttcatggctg tagtgcatcc catagcttcc atgtctatca gaacagagaa gaacgcatta 480  
cttgcataag cttgcatatg ggtggtgata ttaaccacag ctattcccgt gggcatctgc 540  
cacggggagc ggggaatactc ctacttccat agaaccatt cctcctgctg gttccttgag 600  
gagcaaggat atagcaagct agggttccag atgtctttct ttttgccttc ctatgtgatt 660  
cccttagctt tgattagtgt attgtatatg tgtatgctga cgaggttgtg gaagagtgtc 720  
ccaggagggg ggggtgtctgc ggagagtcgg agggggagga agaagggtgac gagaatggtt 780  
gtggctgtag tgggtgtgtt cgcagtgctc tgggtgccaa tacagataat cctgttggtg 840  
aaggcgtctg acaagtacca catcacatac ttcacagtca ctgcccagat agtgtcgcac 900  
gtactagcct acatgaacag ctgctgcaac ccagtgtgtt acgccttctc ctctgagaac 960  
ttcagggtcg ccttcaggaa ggtaatgtac tgcctgcccc cctacaatga cggcatgtca 1020  
ggccggcccc agcccaccaa gacgactcgt acaggcaatg ggaactcctg ccatgacatc 1080  
gtctga 1086

5 <210> 2  
<211> 726  
<212> ADN  
<213> Spodoptera littoralis

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(726)  
<223> receptor de alostatina C que codifica el ADNc

<400> 2  
tgctttctta tcggcatccc attcctgac acaacgatgt ctcttcgtgc gtggccgttt 60  
ggacgcctca tgtgtaaggc ctacatgata tctaccggaa tcaaccagtt caccagctct 120  
atattcttgt gtataatgag tgcggatcga tacatagccg tgtgtcatcc gatagccgag 180  
ccgcgactgc ggaagccatt cgtctctaga gtgggtgctc ctgcagcatg gacagcgtca 240  
gctttggtga tgacgcctat atttatgtac acgacactca taccaacacc ccatggctctg 300  
tcgtgcaata tagtgtggcc cgagcaagag ttcaataaag gccagacgct cttcactctg 360  
tactcgttcg ctctcggttt cgccgacca ctaccctta tcttcgtgtt ttactgtctc 420  
gtgattcgca aactgaagac tgtcggccct aagaacaaat ctaaagagaa aaagcgatca 480  
cacagaaaag taaccaaatt agtgtgact gtcattgctg tgtacgtgct gtgctggctg 540  
ccgtactggg cgttccaggt agctctcatt tactctccac cgaacgagtg cgccagccag 600  
atcactatca ccgtttttct ggtagccgag tgcttcagtt acagtaactc tgccatgaac 660  
ccaattcttt acgcctttct ttctgacaac ttcaagaaaa gtttcctaaa ggcctgcacc 720  
tgtgcc 726

15 <210> 3  
<211> 1191  
<212> ADN  
<213> Spodoptera littoralis

20 <220>  
<221> misc\_feature

ES 2 488 121 T3

<222> (1)..(1191)  
 <223> receptor DHR que codifica el ADNc

<400> 3  
 atggcggaga agtgcctggc gcagaacgaa gggctggcgg aggaggagtt ctgccccgcg 60  
 tactacgacg ggctgctgtg ctgggacgcg acgccctgga acacgctggc ggtgcagcgc 120  
 tgcttcagcg agttccacgg cgtccagtac gatgacacac agaacgcac gcggatgtgc 180  
 ttggacggcg tgtggcacia ctactcaaac tacgcgaact gcacagaacg catgaccaac 240  
 gtgtcggcga ctgacgtcac cagcctcatc tacctcgcgg gctactcgct cagcctcggc 300  
 gtgctttcac tcgccgtcct cgtcttcctt tatttcaagg acctgcatg tctaaggaac 360  
 acgatacata ccaacctcat gtcgacgtat attctgtctg cctgcagctg gatcttaaac 420  
 ttagctttac aaaattggtc cgatgaggcc caacaagatc aaacctcgtg tacgattctg 480  
 5 gtcatatgta tgcaactact ttacctact aatttcttcg ggatgcttgt agaaggtttg 540  
 tacctgtaca tgctcgtggg ggagacgttc accgctgaaa atattaaact gaaggtgtac 600  
 actaccatag gatgggggtg gccggcgggtg ttcctaacia tatgggttat atgcaggtgc 660  
 ttcgtcaaca tcgtgccttc caacctgct gatgggcttg ccctggcagg tgaggctaag 720  
 atgtgtattt ggatgtcggg gcaccagggtg gattggatcc ataaagctcc agcactcgtc 780  
 gggctcggcc tcaacctcct cttcctcatt aggattatgt gggattaat cacaaaactg 840  
 cggctcgcga acacggttggg gacggagcag tatcggaaag caacgaaggc acttctagtc 900  
 ctgatcccac tgctgggcat caccaacctg ctggtgctgt gtgggcccga tgacgactcc 960  
 tggttcgcac acgccttcga ctacacgcga gcactcatgc tttcaacaca gggtttcttg 1020  
 gtggctttgt tctactgctt catgaataca gaagtacggc acgcaatcag ataccacgtc 1080  
 gagaggtgga agactgggag gaccatcggg ggaggaagga ggagaggagc ttcctactcc 1140  
 aaggactggt ctctcgggtc acgaacagaa agcatacgac tcacggtatg a 1191

<210> 4  
 <211> 534  
 <212> ADN  
 <213> Spodoptera littoralis

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(534)  
 <223> receptor AKHR que codifica el ADNc

<400> 4  
 gacctgatgt gccgagtcac gatgttcacc aggaccttcg gactgtacct ctccagcttc 60  
 gtgcttatct gtatagctgt tgatagatac tacgccattt taaagccttt gaacgtgaca 120  
 tgggaggcgc gcgtgcgcag agcgtgatt atcgcgtggg tgtgcgccgg cctcggcagc 180  
 ctgccgcaga gcttcatatt ccacgtagag gagcatcctg atgttaaggg gtactaccag 240  
 tgcgtgtcgt acgggtcgtt gccgacggag tgccacgagt ttgcgtactt cttggtaaac 300  
 atgatcctca tgtacgtcat cctctgctg tccacgctgt actgctcctc ggcagctttg 360  
 ttggaatca ttcggagatc taacacttct aatgataaga tgcgacggag cggcgtgggt 420  
 atactcgggc gggcgcgggc tcggacactc aagatgacag tcactatagt tctagctttt 480  
 20 tttacatggt ggtcacccta ctactgttat tgtctgtggt attggatcga caag 534

<210> 5  
 <211> 2250

ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
 <213> spodoptera littoralis

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2250)  
 <223> receptor LGR1 que codifica el ADNc

10 <400> 5  
 atgtattgga gattatgtat ttgggctggt gcctttatct tactggggag cagagaagca 60  
 gcattgccact cgatgagtga gagtgtgtct gtgggtgctgc accagaccaa catcacacgg 120  
 ctcacggcaa aggtcatcca tgctgcgggc taccatttgc atcgagttga gcatttatca 180  
 ataatggatg caccaaaatt ggatcacata gtagtggacg atctgactaa gatgcctaata 240  
 ctcaaattctc tgtttataac gcaagctccg cgactacaca ggggtgctgcc cctccctccg 300  
 ctgcccgagc tacgcacatt catcatcaca acctccggct tgggtggaagt ccccaacctg 360  
 agccacgtgc acgacaagaa gaataacaac tcaactgcct atctgcaagc tatagacctc 420  
 gaaggcaacc acataaagcg cctatcgccg cacgcattgc gcgtgcgcgc tgatcaagtg 480  
 tccttgaact acaacttgcct agaagaagtg cctgcttttg cgttcaagaa tgcgcagatt 540  
 tcaaaattga gtttcagagg aaacacgaaa ctaaacata ttgatgaaaa tgccttcgca 600  
 tcgaatttgc tcctccgaca attagattta agtaacaccg ctattacctc cctgcctaca 660  
 gcaggactac agaacttggg aacctttaga atagaaaaga caccttcatt gaaatacatc 720  
 ccatcgattt acgaatttca gactctccag aaagcgtacc tgacgcatca tttccactgc 780  
 tgcgcgttcc acttccccga gcgacacaac ccaacgagac acaagctcta tgaacgcaa 840  
 attgctataa tgcagtcgaa atgtgctgagc gctagtcagc agaagaaacc agtagccaga 900  
 agaaagaaga ggtcactggc accactcaag atcgttatgc ctcagcgtaa aaacgatact 960  
 acagactcat tagaggaaga cctgtcaaca gcgactacga gcgaggagta cgacgctaac 1020  
 ttgatggacg agtacttctc agactccggc agttgggagg acgaggacga ccaggagagag 1080  
 ttccacgaac cagtcaacaa cacgctcggg gccggcttcg cgatcatatc cgctgagtg 1140  
 gggaaacttca gtattagccc acgaaaagtg gaatgctttc ccgcacctga tgcactgaat 1200  
 ccgtgcaag atgtgatggg ctggctgctg ctccgagcga gtgtgtggtt cgctatcacg 1260  
 gcggcggtgg tgggcaacgt tgccgtctc ctcgtcttac ttacaaacca cacggagatt 1320  
 acagtcccgc ggttccttat gtgccacctc gccttctctg acctctgcac cggcctctac 1380  
 ctgtttatgt tggccgctct agacctcaga tcttatggag aattcttcaa ctacgcctac 1440  
 gattggcagt acggggctcg ctgcaagatc gctggctttc tatcagattt ttctggacag 1500  
 ttatcagtaa ttactttaac tatagtcaca ttggagcgtt ggttcgcat aacttatgca 1560  
 atatacttag aaaggaggat ctctctatca gccgcagcta agataatgat gggcggttgg 1620  
 ttgtactcct tcctgatggc tggcttgccg ctggctcggc tgtcagacta ttcgtctacg 1680  
 tcaatatggt taccggttga gagcaaggat gtgggagatg ctgtgtacca gggatcaata 1740  
 tttatagtga gtgcggtggc gtgggtcacg attgtggtgt gctacgtgca gatatacagg 1800  
 tcgctagggg gtggagagag ttacggaggg aggggggagg ccgcagccgc tgagagacga 1860  
 attgcgaata aaatggcact cctcatcggg accgacctgt tgtgctgggc gcctgtggcg 1920  
 ttcttcggca tcacagctct agcaggagtg ccgctagtcg atgtcagtc cgggaaagtg 1980  
 ttgctagtat tcttttacc tctgaacgct tgtgcgaatc cattcttata cgccatatta 2040  
 acgaaacaat accgaagaga tttgataacg ttgatagcac ggacgggtca ctgcacctgg 2100

ES 2 488 121 T3

	<b>ttagtggaga agtacaagtt ggcggcgacc cgccecccca ccgcgcacac taacccttct</b>	<b>2160</b>
	<b>ggcgccggcgc agttgatgcc gctagtagac tccgtcacgt atcaaaggag ccagtcacag</b>	<b>2220</b>
	<b>tgtaaagaca gtagtgaggt accgctttaa</b>	<b>2250</b>
5	<210> 6 <211> 1437 <212> ADN <213> spodoptera littoralis	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1437) <223> receptor OCtR que codifica el ADNc	
	<400> 6	
	<b>atggggcaaa cagctacaca cgtaaacgca aattacacat taattaatta tactgatgaa</b>	<b>60</b>
	<b>ataattgagg atgacagaga cgcttgtgcc gtcgcagatg accctaaata tccgagtagt</b>	<b>120</b>
	<b>ttcggataa cacttgcggt accagaatgg gaagcaatth gtacagccat agtcctaacg</b>	<b>180</b>
	<b>cttataataa tctcaacgat agttggaac atthtggatga tcttgagtgt gtttacatac</b>	<b>240</b>
	<b>aaaccctta ggattgtcca gaacttcttc atagtatcac ttgctgtggc ggatttgaca</b>	<b>300</b>
	<b>gtagcaatat tagtattgcc actaaatgtg gcatactcca ttctaggaca atgggtattt</b>	<b>360</b>
	<b>gggatttacg tatgcaaaat gtggtaaca tgcgacataa tgtgttgac ttcgtccatt</b>	<b>420</b>
	<b>ttaaatttat gtgcaatcgc attagacagg tattgggcca taaccgatcc tataaattat</b>	<b>480</b>
	<b>gcacaaaaga gaactttaga aagagtgatg ttaatgattg gagtagttg ggtactttca</b>	<b>540</b>
	<b>ttagttatta gctctccgcc acttctaggg tggaaatgact ggcccagcgt ctttgaacct</b>	<b>600</b>
	<b>gatacgcctt gtcgtttaac ttcccaacct ggcttcgta tcttctcttc atctgggtcc</b>	<b>660</b>
	<b>ttctacatac cgctagttat aatgactgta gtttattttg aaatatattt ggccactaaa</b>	<b>720</b>
	<b>aaaagactta gagatcgcgc taaagccaca aagatcagca ctatttctag cggtcagaat</b>	<b>780</b>
	<b>agatacaata ataaagacga taacaatgat catgatcaag attctgttag ctcagaagcc</b>	<b>840</b>
	<b>aatcacaatg agcaccaagg cgtgacacgg ttggcatcag acaatgagaa aaagaaaaga</b>	<b>900</b>
	<b>accagaaaat tgacacaaa gaaaaaacca aagcgcgat attggagtaa ggacgataaa</b>	<b>960</b>
	<b>tcgcaaaaca aactgataat accgattctc tctaacgata attcggtaac tgatatgggt</b>	<b>1020</b>
	<b>gataatttag aaaatagaaa cacatcatca gagagtaact cgaaagaaac tcacgaggat</b>	<b>1080</b>
	<b>gatttgattg aagttactga gcctgcgcca gtgaagagtc acaagcggcc gaagcctaac</b>	<b>1140</b>
	<b>cagcaaagtg ctgtttatca attcattgaa gaaaagcaaa ggatttctt gacacgtgag</b>	<b>1200</b>
	<b>cgtcgagccg ccagaaccct tgggattata atggcgat ttgtcgtgtg ttggttggcc</b>	<b>1260</b>
	<b>ttctttgtca tataccttgt tattcccttc tgtgcgagtt gctgtttgtc caacaagttt</b>	<b>1320</b>
	<b>atcaatttca taacttggct tggctactgc aattctgcac tcaaccctct aatatacacc</b>	<b>1380</b>
15	<b>atctttaaca tggactttag gagagcattc aaaaagttac tctgtatgaa accgtga</b>	<b>1437</b>
20	<210> 7 <211> 1419 <212> ADN <213> Spodoptera littoralis	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1419) <223> receptor or83b que codifica el ADNc	

ES 2 488 121 T3

```

<400> 7
atgaccaaag tgaaggccca gggcctcgtc tccgacctga tgcccaacat caagttgatg      60
caggcagctg gacacttcct cttcaattac catgcagaaa atggtggcat gagcggcctc     120
cttcggaaga tctacgccag taccacgcg atttcatca ccatacattt tgcctgtatg     180
ggatcaaca tggcccagta ctccgatgag gtcaacgagc tgactgctaa cactatcacc     240
gtcctcttct tcactcacac catcatcaag ttggggttct tcgctttgaa ctccaagagt     300
ttttacagga ctttagcagt atggaaccag tcgaacagcc accctctggt cacggagtca     360
gatgcccgct accatcaaat tgcgctcacc aagatgagga gactcctgta cttcatctgc     420
ggcatgactg tcctgtcagt tgtagctgg gtcacactca cattcttcgg tgaatcagtc     480
cgcctgatta ctagtaagga aacgaatgag acggtgacag aagtagcccc tcgattgcct     540
ctgaaggcct ggtacccttt caatgctatg agcggcacca cgtatattat cgctttcgct     600
ttccaggctc actggctcct cttctcaatg gctatagcaa atctgatgga tgttatgttc     660
tgctcctggc tgatcttcgc ttgtgaacag ctgcagcacc tgaaggccat catgaaacct     720
ctcatggaac tcagtgttc actggacagc tatcggccta aactgctga gctgtccgt      780
gcttcttcca ctgagaaatc agaaaagatt cctgatacag tcgacatgga catccgcggc     840
atatattcca cacagcaaga tttcgggatg acggtgcgag gagctggagg tagactgcag     900
gcctttggac agcagaacaa caaccctaat ggcttgactc cgaagcagga gatgctggcg     960
aggtctgcta ttaagtattg ggtggagagg cacaacacg tcgtcagatt ggtagcatcg    1020
ataggagaca cgtatggtac tgccctgctg ttccacatgt tgggtgtcaac tataacactc    1080
actctattgg cttaccaggc tactaagatc aatggaatta atgtctacgc gttcagtact    1140
attggctacc tcagctatac cctgggacag gtgttcatt tctgtatctt cgggaacagg    1200
cttattgaag agagttcctc agtgatggaa gccgcctact cctgtcagtg gtacgacggc    1260
tccgaggaag caaagacctt cgtccagatc gtgtgccagc aatgccagaa agccatgagc    1320
atctccgggg ccaagttcct cacggtgtca cttgatcttt ttgcttcggt acttgggtgca    1380
gtagttactt acttcatggt gttggtacaa ctcaagtaa                               1419

```

5 <210> 8  
 <211> 1053  
 <212> ADN  
 <213> Spodoptera littoralis

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1053)  
 <223> receptor PBANR que codifica el ADNc

ES 2 488 121 T3

<400> 8  
atgacattgt cagcgcctcc gatcgacgag tttgaggacc cgttcgtcgt gatgaacacg 60  
acgaatgtgt cgagtcaccc ggccgcctat gacgagccat acacgctcga tctggtggtg 120  
ccactcaccg tcacctacgt ggtgatattc gtagccggca tcctggggaa caccagcacc 180  
tgtgtggtca ttgagaggaa tcgctctatg cacaccgcta caaactttta cctcttcagt 240  
ttagcaattt cggatctcat attgtagta tgtggtctac cgtttgagggt gcacagatta 300  
tggaaacccg acacgtaccc gttgggagag gctcactgca tcgccattgg gtttagcgtcg 360  
gagacttcag ctaacgcgac agtggtgaca ataacagcgt ttacgggtga gcggtacatt 420  
gcatatgta gacctttcat gtcgcacacc atgtcgaagc tgtcacgagc tgtgcggttt 480  
ataatagcta tttgggtggt tgcggtgtgt actgcggtac cacaagcgat gcagttcggg 540  
atagtgtcgt atgtggataa tggtcagaat gtgagcgcgt gcacagtga ggggtgtggg 600  
gttcatcaag tgttcggtat atctagtttc gtgttcttcg tgggtcctat gtcgatgata 660  
tcagtgttgt acgcggtgat tggattaaag ttgaggatct ctcgagtggt gcatccagtg 720  
aagaagctct cgtgagcag caacgaaaga gcgagtggac agatgcagta caggaatgga 780  
gcatcacaga ggagagtcac tagaatgctc gttgagggtg cgctgtcatt cttcatttgc 840  
tgggcgccct tccacgtgca aagggtgctg gccatctacg ggaaaagttt agaacaccct 900  
tctgatactt tctacttggg ctacatcgtg ctgacgtttt tgtcgggagt gctatatttc 960  
ctgtcaaccg ccatcaacc gttcctgtac aacatcatgt cgaataagtt tagaaacgcc 1020  
ttcaagggtga gtttttgta cattcatgat tga 1053

5

<210> 9  
<211> 1656  
<212> ADN  
<213> Meloidogyne incognita

10

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1656)  
<223> receptor de tipo serotonina que codifica el ADNc

15

<400> 9  
atgtagaaa atgatttggg aaatttggac gattcttcat taattctgca tcatttggga 60  
gggtcttttg tccatgcaca aattgtagaa attgaagaaa atgattatat aaacagcaac 120  
acaagtgtaa gcaatacaaa tttaaattta ttttcatcat catcatcaac gtcttcctcg 180  
tcattatattt cttcgtcttc acaagatct cctcttcttg aaccaattt tgttgatgaa 240  
atgtggccag ctacaagttc aaattcttta ttttattctc atccaataat tgcaatttta 300  
atctcaattt taatattttt attaatTTTA attactataa ttggaaattt ggggtgttgg 360  
gctgcaattt tgtagttag aaaattaaaa gcgcaaccag ctaatttggg gcttatatca 420

```

cttgctttgg ctgatttttg tgtaggcctt tttgtaatgc ctttagctgc agtttacgtt 480
ttggaagatc gttggatatt tggatgatatt ctctgccggt tttgggttac tgccgattta 540
actttgtgta cagcttcaat tttaaatttg tgtgcaatct ctggtgatcg acatttggca 600
gtgactagag ctcttcgata ttcagcatta cgtactcgaa gacgtatttg tttgtatatt 660
tgtattgttt ggttgggtgc tttattagtt tctgctgcgc ctttagcttt gttaccgttt 720
ccaaagattg agcaatattg tcaggctca caaaatcgtg tttatcaaat ttatgcaaca 780
attattgcgt tttgggtcc atcattaata atggttattg tttatgttaa attatggagt 840
gcagcgaaaa gaatgcacg acaagatcaa ttggttttgc gttggcaagg agtacattta 900
ccttctgatg gagatttaga ggacggactt cctccaacaa caacaacatc aaatgctact 960
aaatctttat ttagaatga ttcaatagcc cgtgcaaatg ctctgtttct ttttgcattg 1020
cgtatgtcag cacaaaaatt tggttattat gatcatcaaa ataataaac taatggagga 1080
gaaattataa atgatgatga aaatttaaga attgaagtta gaacaagtgc tagtagtagt 1140
ggtggtggag gaggaggatc ttctactttg gggactttac gtgttccaat agtgtaatt 1200
attatgagtg ccttcataat ttggtgggtg ccatttttta tattagcttt ggcaaaatca 1260
cagcattggg taaattatgt tcctagatgg cttgattcac ttacattatg gcttggatat 1320
tctaatagca tgttaaacc aataatttat tgcaaatata atcgagaatt tcgtgttcca 1380
tttgagaaa tgctttgtt tcggtttaga acaattcaag acgttatgag aaatgaaagt 1440
tattatgcaa aattcggttc tccaagaatt tctgaacaa aaattggggg aagtcaacaa 1500
cggctctctg gaaataatta ttactactaa agaaaaagaa acaacacaga aaggagagca 1560
ccacaaaatg ggtttttaga ttcttcgaaa acgaagaaaa attatgggat taaaaggaat 1620
agtagtctt ctatcttgat ggaatcatca aaataa 1656

```

5 <210> 10  
 <211> 1601  
 <212> ADN  
 <213> Meloidogyne incognita

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1601)  
 <223> receptor de tipo dopamina que codifica el ADNc

```

<400> 10
atggtgacct ggtggctacc tcttttaatt tttgtcccca tcttttctgt attaatttcc 60
cttgcccttt ctggcaacct tctcgtaatc gcagcaatat ttacgacag aaaattgcgt 120
agacaaccag aaaatttatt tttagtttcc ttagctttgt cagacttgtt tgttgctgga 180
atggttatgg ttttagcggc agcaaacgat ttaattgggt tttggccttt tggggctgct 240
ttttgtcaat tttggatttg tttggatatt gctttagta ctgcttctat tttaaattta 300
tgtgcaatag ctctcgatcg ttttattcac attagcaggc caatgcgta tgtagattt 360
gttggaagaa gggttatttg ttgttctggt tgtgctatct ggataatttc tacagctggt 420

```

15



ES 2 488 121 T3

```

ggaacggccc aaatagcttt tggggctact aatggattgg agatatattc tgttatatTT 480
aatggagact atTTTggaga gattaatgag actgataaat ttagattcat cgaacaacaa 540
catacactag ttcaatgccA attacaatta tctcctTTTT atgccgTTTT ttcttcctta 600
cttagcttct tcttaccagc tactttgatg cTTTTcttt actacaggct ttatttatat 660
gctcggcatc atgctcgttc tatacaatca caacttaaac aggctacttc actTTTgatt 720
tacaattagc ctcagataga gtacgtcaag tagttgtacg tccttctagt ggattTTTat 780
ccccctcttc aatagccctt cactacgatt ctcgaagatt tagtggaAAA tctcctTTg 840
atggagaatc acttcaaaaa gccgagtTTa gccaaataaa cgTTgctgtg aataaatcac 900
cagaaaaatca ttctatcgac gctacaatcc aacaaggaac gcctgtactt agggctacat 960
tgagacaatt aagaaggaca gaaagcaata atagtagcag cTTtagcttt gtttcgagaa 1020
atggattggg tgTTaatagc agaagggtg gttgtggTg tggaatggt ggggagagaa 1080
gaaagagtTg tccccactt cTTtctcaa caacaaaaag aggtTTtaa tctTgtggT 1140
ggtctaataa taataatggc aatggagggc atcgttcttc tgacaaaaaa gcacgtgTTa 1200
ctctTggtgT tattatgggt actTTtctaa tatgtTggt acccttcttt attgtcaatg 1260
ttctacgcc tttctggcct gaaatTTtc ctccactact tttcagaca gtttcctggc 1320
taggttatgc caattcttca gtaaatccag taatttatgg aatatttaat cgagactttc 1380
gacgtgcctt tagccgtata atgaacaaat taattcattg tatagacgag gaaagaaggg 1440
gagaaaatag tcgaggaggg acatttagaa ctagaacaga aagtgaatct tTTaataaat 1500
TTaataaaag tTTaataat gcaagtgaac tacaacaaca acaaaaatta atTTTaaac 1560
aaaaaaagac aaataaaaaa ttgagatttt tatgtTTTta a 1601

```

5 <210> 11  
 <211> 1484  
 <212> ADN  
 <213> Meloidogyne incognita

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1484)  
 <223> receptor neuropeptídico que codifica el ADNc

```

<400> 11
atggaagcAt ctacaatgga attacttcca cctcccacca tattatTTaa tgtatcatca 60
gcgccttctg ttattTgtga ggatatgaat gcttatTTat ggaacactcg tcgggattTg 120
actacatgTc cTTTcgTTat ggctctatTT gcttctTtaa ttcatcaatc atTTTactgg 180
gtattatcgg aaactctTgt gtgattatgg ctattgccag aattaaatca cttcaaactg 240
tgccataat gTTtatTTtc tcgTTgagtt gttcagatat actTgTTTgc tttatTTctg 300
ctactataac tccaatcgct gccttcaaaa aggattggat tTTTggccaa ttcttatgct 360
ctTTTgcacc tTTTgtTgcy ggaggggagtt tgtgtTTctc tacattcact ttggcggcta 420

```

ES 2 488 121 T3

tttccgtgga ccgttttctt ctaatacttt ttcccacgag aaaggctttc tcgcatacac 480  
 aagctttatt tataattctt gtcacgtttc tgttggttag cgggtttagt ttaccaatgt 540  
 tgttcatgca aaagttaaaa ccagtaactc attattgtgg ccgattttgt ttcgaggatt 600  
 ggggcgagat gattggaata agacgaatct atggaacttt attgctgacc gtccaattca 660  
 ttattccgtt agcattgatc actttctgtt acacagcaat ttcattccga cttggaaaaa 720  
 gcgtgaatct acgtactagg aagaaatgtg aatggcaaat gccgattagt gctcagcgaa 780  
 acgcgccac aaagcgaaga caacgaacta accgaatggt tattgcaatg gtaattgcct 840  
 tctcagttag ctggatatgg tctgttctat ataatatggt acgagactat gacggctttc 900  
 caaagttgt acatgatcaa gaattctttt ttggaatatt aacacactgt attgcaatga 960  
 gctccacggt gtggaatccg atcttatatg ccttattaaa tctacaacta agggcagcct 1020  
 ttctacaact tgtgccacaa tgtattaagc attctctgac ttgcacttgt agtcctaata 1080  
 aaggaagatt aagcggtcga tcagttgctc gatgtgccta ccttgaagag agccggcttc 1140  
 ttggttcttc agttcttcgc ggaacaaccg gacaagtaca gagaagagaa acgaattatg 1200  
 aaaataaaaa ctgttttaat tgtttgattg gctcctctag atccgttgaa tcttcttcaa 1260  
 acgaaacaca gaagcaaacg ttttctgtta aatgtgaagg aaataaagga gatgctaaaa 1320  
 ttttgtcaca taatcacat cggcatcaat tagaaagaat aacagcggac ggtggatttg 1380  
 acgagcaaac atggacagag caactgagga aggactctga agatgatgcc ttagatgatt 1440  
 gtaatgatga tttgagagaa agagatacag atgagaggat atga 1484

5  
 <210> 12  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10  
 <220>  
 <223> Cebador directo degenerado 1 de AlstAR

<400> 12  
 atgacgacgt atgcacgtac agctacagct aatctctagc ttctagctat tcaagtc 57

15  
 <210> 13  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20  
 <220>  
 <223> Cebador directo degenerado 2 de AlstAR

<400> 13  
 gtagctccag ctttcacag ctgcagctac agctgatcta tcgtagctat g 51

25  
 <210> 14  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30  
 <220>  
 <223> cebador inverso degenerado 1 de AlstAR

35  
 <400> 14  
 gtagctacag ctacgagcta tggtagctgt agctgtagct gtagctgtag ct 52

<210> 15  
 <211> 51

ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador inverso degenerado 2 de AlstAR  
  
 <400> 15  
 tggatsagct tgcgtagct aatcccatcg gtagcactt ctatcgagc t 51  
  
 10 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación 3'RACE 1s  
  
 <400> 16  
 20 gcatcccata gcttccatgt 20  
  
 <210> 17  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación 3'RACE 2s  
  
 <400> 17  
 30 ggtgatatta accacagcta ttcccgtagg c 31  
  
 <210> 18  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación 3'RACE 3s  
  
 <400> 18  
 40 gtagctgac gaggtgtgg aagagtgctc c 31  
  
 <210> 19  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación 3'RACE 4s  
  
 <400> 19  
 50 aaggtgacga gaatggtgt g 21  
  
 <210> 20  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación 3'RACE 5s  
  
 <400> 20  
 60 gcgcagatag tgcgcatgt a 21  
  
 <210> 21  
 <211> 31  
 65

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido de amplificación 5'RACE 1as  
  
 <400> 21  
 agacgactct tccacaacct cgtcagcata c 31  
  
 10 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación 5'RACE 2as  
  
 <400> 22  
 20 gttaatatca ccacccatat 20  
  
 <210> 23  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación 5'RACE 3as  
  
 <400> 23  
 30 gccacggga atagctgtgg ttaatcac c 31  
  
 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligo SL1  
  
 40 <400> 24  
 ggttaatta cccaacttg ag 22  
  
 <210> 25  
 <211> 41  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligo(dT) SL1  
  
 50 <400> 25  
 ggttaatta cccaacttg agttttttt tttttttac g 41  
  
 <210> 26  
 <211> 18  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador de amplificación génica de AlstAR  
  
 <400> 26  
 atggcgtcga ctgaagac- 18  
  
 65 <210> 27  
 <211> 18

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 5 <220>  
 <223> cebador de amplificación de AlstAR  
  
 <400> 27  
 tcagacgatg tcatggca 18  
  
 10 <210> 28  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador directo de or83b  
  
 <400> 28  
 atgaccaaag gtgaaggccc ag 22  
 20  
 <210> 29  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador inverso de Or83b  
  
 <400> 29  
 gtgttggtac aactcaagta a 21  
 30  
 <210> 30  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> DHR  
  
 <400> 30  
 tttctctatc gtatcttca aaggaatcgt ctatgacgat cgtgtc 46  
 40  
 <210> 31  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> cebador inverso de DHR  
 50  
 <400> 31  
 aagtcttatc ggtatcgata tcgaagatcg acccacatat cgat 44  
  
 <210> 32  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación de DHR de 3'RACE 1s  
 60  
 <400> 32  
 aacctcatgt cgacgtatat tctgtct 27  
  
 <210> 33  
 <211> 27  
 65

# ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de DHR de 3'RACE 2s

<400> 33  
atgctttag aaggttgta cctgtac 27

10 <210> 34  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de DHR de 3'RACE 3s

<400> 34  
tgggttatat gcaggtgctt cgtcaac 27

20 <210> 35  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de DHR de 5'RACE 1as

30 <400> 35  
ggatggggtg cgccggcggg gttccta 27

<210> 36  
<211> 27  
<212> ADN  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de DHR de 5'RACE 2as

40 <400> 36  
catacatatg accagaatcg tacacga 27

<210> 37  
<211> 27  
<212> ADN  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de DHR de 5'RACE 3as

50 <400> 37  
ggcgaggtag atgaggctgg tgacgtc 27

<210> 38  
55 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> cebador de amplificación directo de DHR

<400> 38  
atggcggaga agtgctctggc g 21

65 <210> 39  
<211> 21

ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador de amplificación inverso de DHR  
  
 <400> 39  
 tcataccgtg agtcgtatgc t 21  
  
 10 <210> 40  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador directo degenerado de LGR1  
  
 <400> 40  
 20 gcatgctatc tctagctaca gctcatcgca gctagctttt ccatctgtct gtc 53  
  
 <210> 41  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador inverso degenerado de LGR1  
  
 <400> 41  
 30 tcagctatca gctggagcta agagcaagct atagctgcat agctgt 46  
  
 <210> 42  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 3'RACE 1s  
  
 <400> 42  
 40 tgatgaaaat gccttcgc 18  
  
 <210> 43  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 3'RACE 2s  
  
 <400> 43  
 50 cacgaaccag tcaacaacac 20  
  
 <210> 44  
 <211> 27  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 3'RACE 3s  
  
 <400> 44  
 60 gaaagcgtac ctgacgcatc attcca 27  
  
 <210> 45  
 <211> 27  
 65

# ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 3'RACE 4s

<400> 45  
gttatcagta attactttaa ctatagt 27

10 <210> 46  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 5'RACE 1as

<400> 46  
actgccggag tctgagaagt a 21

20 <210> 47  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 5'RACE 2as

30 <400> 47  
gtactcctcg ctcgtagtgc 20

<210> 48  
<211> 20  
<212> ADN  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 5'RACE 3as

40 <400> 48  
catttcgact gcattatagc 20

<210> 49  
<211> 21  
<212> ADN  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de LGR1 de 5'RACE 4as

50 <400> 49  
gccttctagg tctatagctt g 21

<210> 50  
<211> 27  
<212> ADN  
55 <213> Artificial

<220>  
60 <223> cebador directo de amplificación de LGR1

<400> 50  
atgtattgga gattatgtat ttgggct 27

65 <210> 51  
<211> 27



# ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> cebador inverso de amplificación de LGR1

<400> 51  
 ttaaagcggg acctcactac tgtcttt 27

10 <210> 52  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador directo degenerado de Oct/TyrR

<400> 52  
 ccagaatggg aaggcatatt ctgcac 26

20 <210> 53  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> cebador inverso degenerado de Oct/TyrR

<400> 53  
 acagcccatt attgatagcc tcagagg 27

30 <210> 54  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación de Oct/TyrR de 3'RACE 1s

<400> 54  
 ccagaaaatt gacaccaa 18

40 <210> 55  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación de Oct/TyrR de 3'RACE 2s

50 <400> 55  
 gagagtaact cgaagaaac 20

55 <210> 56  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> oligonucleótido de amplificación de Oct/TyrR de 3'RACE 3s

<400> 56  
 tgctgtttat caattcattg aaga 24

65 <210> 57  
 <211> 22

# ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de Oct/TyrR de 5'RACE 1as

<400> 57  
agttctttt ttagtgcca aa 22

10 <210> 58  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de Oct/TyrR de 5'RACE 2as

<400> 58  
gacaaggcgt atcaggttc 19

20 <210> 59  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido de amplificación de Oct/TyrR de 5'RACE 3as

30 <400> 59  
accctagaag tggcggagag ctaata 26

<210> 60  
<211> 21  
<212> ADN  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador directo de amplificación de oct/TyrR

40 <400> 60  
atggggcaaa cagctacaca c 21

<210> 61  
<211> 18  
<212> ADN  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador inverso de amplificación de Oct/TyrR

50 <400> 61  
ctctgtatga aaccgtga 18

<210> 62  
<211> 24  
<212> ADN  
55 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador directo de amplificación de PBANR

60 <400> 62  
atgacattgt cagcgcccc gatc 24

65 <210> 63  
<211> 18

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador inverso de amplificación de PBANR  
  
 <400> 63  
 tcaatcatga atgtaaca 18  
  
 10 <210> 64  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador directo degenerado de AlstCR  
  
 <400> 64  
 20 gaagtgtctt tctctagcta tatcggatgc 30  
  
 <210> 65  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador inverso degenerado de AlstCR  
  
 <400> 65  
 30 atgcgagca atcgtagca atcgctctt 30  
  
 <210> 66  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo degenerado de AKHR  
  
 <400> 66  
 40 gacctgatgt gcacgacagt catg 24  
  
 <210> 67  
 <211> 24  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso degenerado de AKHR  
  
 50 <400> 67  
 gtcagatcca agtaccacag agca 24  
  
 <210> 68  
 55 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador directo para clonar AlstAR  
  
 <400> 68  
 ggaattccat ggcgtcgact gaagac 26  
  
 65 <210> 69  
 <211> 26

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador inverso para clonar AlstAR  
  
 <400> 69  
 cctcgaggtc agacgatgtc atggca 26  
  
 10 <210> 70  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador directo para clonar AlstCR  
  
 <400> 70  
 20 ggaattccct gcgtccatt cactgcta 28  
  
 <210> 71  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador inverso para clonar AlstCR  
  
 <400> 71  
 30 cctcgaggaa gaattgggtt catggcag 28  
  
 <210> 72  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo para clonar DHR  
  
 <400> 72  
 40 ggaattccga tggcggagaa gtcctggc 29  
  
 <210> 73  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso para clonar DHR  
  
 <400> 73  
 50 cctcgagggt cataccgtga gtcgatgc 29  
  
 <210> 74  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 55 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo para clonar AKH  
  
 <400> 74  
 60 ggaattccgg acctgatgtg ccgagtcag 30  
  
 <210> 75  
 <211> 28  
 65

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador inverso para clonar AKH  
  
 <400> 75  
 cctcgagggc ttgtcgatcc aataccac 28  
  
 10 <210> 76  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador directo para clonar LGR1  
  
 <400> 76  
 20 cgggatcccg gatgtattgg agattatgta tttgggc 37  
  
 <210> 77  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Cebador inverso para clonar LGR1  
  
 <400> 77  
 30 cctcgagggt taaagcggta cctcactac 29  
  
 <210> 78  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo para clonar or83b  
  
 <400> 78  
 40 ggaattccga tgaccaaagt gaaggcccag g 31  
  
 <210> 79  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para clonar or83b  
  
 <400> 79  
 50 cctcgagggt tacttgagtt gtaccaacac c 31  
  
 <210> 80  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 55 <213> Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Cebador directo para clonar Oct/TyrR  
  
 <400> 80  
 ggaattccgg ggcaaacagc tacacag 28  
  
 65 <210> 81  
 <211> 31

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Cebador inverso para clonar Oct/TyrR  
  
 <400> 81  
 cctcgagggt cacggttca tacagagtaa c 31  
  
 10 <210> 82  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador directo para clonar PBAN-R  
  
 <400> 82  
 ggaattccga tgacattgtc agcgccccg 30  
 20  
 <210> 83  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para clonar PBAN-R  
  
 <400> 83  
 30 taaagcggcc gctcaatcat gaatgtaaca aaaa 34  
  
 <210> 84  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MiserR 1  
 40  
 <400> 84  
 gatttgaaa atttgacga t 21  
  
 <210> 85  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MiserR 2  
 50  
 <400> 85  
 ggagggtctt ttgtccatgc a 21  
  
 <210> 86  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MiserR 3  
 60  
 <400> 86  
 tctcatcaa taattgcaat t 21  
  
 <210> 87  
 65 <211> 21

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador inverso de MiserR 1  
  
 <400> 87  
 acgtaatgct gaatcga g 21  
  
 10 <210> 88  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador inverso de MiserR 2  
  
 <400> 88  
 20 caaatataa attgaagcag t 21  
  
 <210> 89  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de MiserR 3  
  
 <400> 89  
 30 agccaaagca agtgatataa g 21  
  
 <210> 90  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MidopR 1  
  
 <400> 90  
 40 actcttggtg ttattatggg c 21  
  
 <210> 91  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MidopR 2  
  
 <400> 91  
 50 tggctaggtt atgccaattc t 21  
  
 <210> 92  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MidopR 3  
  
 <400> 92  
 60 cgagacttgc gacgtgcctt t 21  
  
 <210> 93  
 <211> 21  
 65

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Cebador inverso de MidopR 1  
  
 <400> 93  
 aaaggcacgt cgaaagtctc g 21  
  
 10 <210> 94  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador inverso de MidopR 2  
  
 <400> 94  
 agaattggca taacctagcc a 21  
 20  
 <210> 95  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de MidopR 3  
  
 <400> 95  
 gcccataata acaccaagag t 21  
 30  
 <210> 96  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MiserR 1  
  
 <400> 96  
 atgtagaaa atgattgga aaa 23  
 40  
 <210> 97  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de MiserR 1  
 50  
 <400> 97  
 ttattttgat gattccatca 20  
  
 <210> 98  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador directo de MiDopR  
 60  
 <400> 98  
 atgttgcctt ggtggctacc tct 23  
  
 <210> 99  
 <211> 20  
 65



ES 2 488 121 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Cebador inverso de MiDopR

<400> 99  
ttaaaaacat aaaaatctca 20

10 <210> 100  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> cebador directo de MiNprR

<400> 100  
atggaagcat ctacaatgga att 23

20 <210> 101  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> cebador inverso de MiNprR

30 <400> 101  
tcatatcctc tcatctgtat 20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de plantas transgénicas resistentes al ataque de fitopatógenos como *Spodoptera littoralis* y/o *Meloidogyne incognita* por interferencia del ARN que comprende las etapas siguientes:
- 10 a) aislar la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica un receptor acoplado a la proteína G (RAPG), o una porción del mismo, cuya función es vital para el fitopatógeno, en el que dicha secuencia de nucleótidos del ADNc codifica un receptor RAPG seleccionado de entre AlstCR de SEC ID nº 2, DHR de SEC ID nº 3 u Oct/TyrR de SEC ID nº 6 cuando dicho insecto es *Spodoptera littoralis* y en el que dicha secuencia de nucleótidos de ADNc codifica un receptor RAPG seleccionado de entre el receptor de tipo serotonina de SEC ID nº 9 o el receptor de neuropéptidos de SEC ID nº 11 cuando dicho fitopatógeno es *Meloidogyne incognita*;
- 15 b) construir un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica un receptor RAPG o una porción del mismo según se determina en la etapa a), flanqueado por dos sitios de recombinación específicos;
- 20 c) reaccionar por recombinación el vector de expresión de la etapa b) con un vector binario que comprende un activador constitutivo o específico para el tejido, los mismos sitios de recombinación específicos y una secuencia intrónica para obtener un plásmido recombinante;
- 25 d) transferir dicho plásmido recombinante en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* y transformar la planta;
- e) cultivar la planta y obtener la expresión constitutiva o específica para el tejido de ARNbc en dicha planta.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cuando la expresión de ARNbc es específica para el tejido, dicho tejido se selecciona de entre el grupo que consiste en filoplano, sistema radicular, tronco, yemas, flores, frutos.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las etapas a) - c) pueden repetirse en paralelo utilizando en cada etapa una secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica un receptor RAPG que es vital para *Spodoptera littoralis* y/o *Meloidogyne incognita* para obtener uno o más plásmidos recombinantes y d) cotransformar la misma planta.
- 35 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha planta pertenece a la familia de las solanáceas, preferentemente el tabaco.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el tratamiento preventivo de plantas para hacerlas resistentes al ataque de *Spodoptera littoralis* y/o *Meloidogyne incognita*, que comprende además una etapa para el tratamiento de las plantas así obtenidas con fertilizantes, agentes bioestimulantes, fungicidas, nematocidas sintéticos o naturales, herbicidas o insecticidas.
- 40 6. Planta transgénica resistente a *Spodoptera littoralis* caracterizada por que es una planta de tabaco y comprende un ARNbc en el que la cadena no codificante es complementaria del ARNm que codifica la SEC ID nº 2 y/o la SEC ID nº 3.
- 45 7. Planta transgénica resistente a *Meloidogyne incognita* caracterizada por que es una planta de tabaco y comprende un ARNbc en el que la cadena no codificante es complementaria del ARNm que codifica la SEC ID nº 9 y/o la SEC ID nº 11.

**AlstAR**

ATGGCGTCTGACTGAAGACGAATTTAGGAGCATATGCCTTAACTTAAACCAGTGAGGAGGCTATGCTTGGGA  
GGATGTAACACTACAGCAGCGAATATGAAAATGGAGAAGCTGTTGGAGAAGGTCGTCTCGAGGGTTGTGCC  
CATCTTCTTTGGCTTCATAGGCATCGTTGGATTAGTTGGCAATGCTTTGGTCGTCTTAGTGGTCGCTGCC  
AACCCCTGGCATGCGGTCCACTACCAACCTGCTCATATAAACTTGGCTGTCGCTGACTTGTCTTTGTG  
ATCTTCTGCGTTCATTCACTGCTACCGACTATGTCATGCCACGATGGCCCTTCGGAGACTGGTGGTGC  
AAGGTTGTCCAGTACTTCATTGTAGTCACTGCTCATGCGTCCGTCTACACTCTAGTACTCATGTCTCTAG  
ACAGGTTTCATGGCTGTAGTGCATCCCATAGCTTCCATGTCTATCAGAACAGAGAAGAACGCATTACTTG  
CTATAGCTTGCATATGGGTGGTGATATTAACCACAGCTATTCCCGTGGGCATCTGCCACGGGAGCGG  
GAATACTCCTACTTCCATAGAAACCATTCTCCTGCGTGTCCCTTGAGGAGCAAGGATATAGCAAGCTA  
GGGTTCCAGATGTCTTTCTTTTGTCTTCTATGTGATTCCCTTAGCTTTGATTAGTGTATTGTATATGTG  
TATGCTGACGAGGTTGTGGAAGAGTGTCCAGGAGGGAGGGTGTCTGCGGAGAGTCCGAGGGGGAG  
GAAGAAGGTGACGAGAATGGTTGTGGTGTAGTGGTGGTGTTCGCAGTGTGCTGGTGCCCAATACAGA  
TAATCCTGTTGGTAAAGGCGCTGGACAAGTACCACATCACATACTTACAGTCACTGCGCAGATAGTGT  
CGCATGTACTAGCCTACATGAACAGCTGCGTCAACCCAGTGTCTGTACGCTTCCCTCTGAGAACTTCA  
GGGTGCGCTTCAGGAAGGTAATGTACTGCCCGCCCCCTACAATGACGGCATGTGAGGCCGGCCCCA  
GCCACCAAGACGACTCGTACAGGCAATGGGAACCTGCCATGACATCGTCTGA (SEC. ID. n° 1)

**AlstCR**

TGCTTCTTATCGGCATCCCATTCCCTGATCACAACGATGTCTCTTCGTGCGTGGCCGTTTGGACGCTTCA  
TGTGTAAGGCCTACATGATATCTACCGGAATCAACCAGTTCACCAGCTCTATATCTTGTGTATAATGAG  
TGGGATCGTACATAGCCGTGTGTATCCGATGCCCGCGACTGCGGAGCCATTCCGTCTCTA  
GAGTGGTGTGAGCTGCAGCATGGACAGCGTCACTTTGGTGTGACGCTATATTTATGTACACGACAC  
TCATACCAACACCCCATGGTCTGTGCTGCAATATAGTGTGGCCCGAGCAAGAGTTCAATAAAGGCCAGA  
CGTCCCTCACTCTGTACTCGTTCGCTCTCGGTTTCGCCGCACTCACCTTATCTTCGTGTTTTACTG  
TCTCGTGATTGCAAACTGAAGACTGTCCGGCCCTAAGAACAATCTAAAGAGAAAAGCGATCACACAG  
AAAAGTAAACAAATAGTGTGACTGTCAATGCTGTGTACGTGCTGTGCTGGCTGCCGTACTGGGCGTT  
CCAGGTAGCTCTATTTACTCTCCACCGAAGTGCAGGAGCCAGATCACTATCACCGTTTTCTGTT  
AGCCGCGTGTTCAGTTACAGTAACTCTGCCATGAACCCAATTCCTTACGCTTTCTTCTGACAACTTC  
AAGAAAAGTTTCTAAAGGCCTGCACCTGTGCC (SEC. ID. n° 2)

**DHR**

ATGGCGGAGAAGTGCCTGGCGCAGAACGAAGGGCTGGCGGAGGAGGAGTTCTGCCCGCGTACTACG  
ACGGGCTGCTGTGCTGGGACGCGACGCCCTGGAACACGCTGGCGGTGCAGCGCTGCTTCAGCGAGTT  
CCACGGCGTCCAGTACGATGACACACAGAACGCATCGCGGATGTGCTTGGACGGCGTGTGGCACAAC  
ACTCAAACACTACGCGAAGTGCACAGAACGCATGACCAACGTGTCCCGACTGACGTCCACCAGCCTCATC  
TACCTCGCCGGCTACTCGCTCAGCCTCGCCGTGCTTCACTCGCCGTCTTCGCTTCTCTTATTTCAAG  
GACCTGCGATGTCTAAGGAACAGATACATACCAACCTCATGTGACGATATTTCTGTCTGCCTGCAGC  
TGGATCTTAACTTAGCTTTACAAAATTTGGTCCGATGAGGCCCAACAAGATCAAACCTCGTGTACGATTC  
TGGCATATGTATGCACACTCTTTACCTCACTAATTTCTCGGGATGCTTGTAGAAAGTTTGTACCTGTAC  
ATGCTCGTGGTGGAGACGTTCCACCGCTGAAAATATTAACCTGAAGGTGTACACTACCATAGGATGGGGT  
GCGCCGGCGGTGTTCTTAACAATATGGGTTATATGCAGGTGCTTCGTCAACATCGTGCCTTCCAACCCT  
GCTGATGGGCTTGCCTGGCAGGTGAGGCTAAGATGTGATTTGGATGTGCGAGCACCAGGTGGATTG  
GATCCATAAAGCTCCAGCACTCGCTGGGCTCGCCCTCAACCTCTTCTTCTCATTAGGATTATGTGGGT  
ATTAATCACAAAACCTGCGGTCTGCAAACACGTTGGAGACGGAGCAGTATCGGAAAGCAACGAAGGCAC  
TTCTAGTCTGATCCCACTGCTGGGCATCACCAACCTGCTGGTGTGTGTTGGCCCAATGACGACTCCT  
GGTTCGCACACGCTTCCACTACACGCGAGCACTCATGCTTCAACACAGGGTTTCTTGGTGGCTTTGT  
TCTACTGCTTCATGAATACAGAAGTACGGCACGCAATCAGATACCAGTCCGAGAGGTGGAAGACTGGG  
AGGACCATCGGTGGAGGAAGGAGGAGGAGGCTTCTACTCCAAGGACTGGTCTCCTCGGTACAGAA  
CAGAAAACATACGACTCACGGTATGA (SEC. ID. n° 3)

**AKHR**

GACCTGATGTGCCGAGTCATGATGTTTACCAGGACCTTCGGACTGTACCTCTCCAGCTTCGTGCTTATC  
TGATAGCTGTTGATAGATACTACGCCATTTTAAAGCCTTTGAACGTGACATGGGAGGCGCGGTGCCG  
AGAGCGCTGATTATCGCGTGGGTGTGCGCCGGCCTCGCCAGCCTGCCGACAGCTTCATATCCACGT  
AGAGGAGCATCCTGATGTTAAGGGGTACTACCAAGTGCCTGTGCTACGGGTGCTTGGCCAGCGAGTGCC  
ACGAGTTTGCCTACTTCTTGGTAAACATGATCCTCATGTACGTATCCCTCTGCTGTCCACGCTGTACTG  
CTCCTCGGCAGCTTTGTTGGAAATCATTGGAGATCTAACACTTCTAATGATAAGATGCGACGGACGGG

CGTGGGTATACTCGGGCGGGCGGGGCTCGGACACTCAAGATGACAGTCACTATAGTTCTAGTCTTTTT  
TACATGTTGGTCACCCTACTACTGTTATTGTCTGTGGTATTGGATCGACAAG (SEC. ID. n° 4)

LGR1

ATGTATTGGAGATTATGTATTTGGGCTGTTGCCTTTATTTTACTGGGGAGCAGAGAAGCAGCATGCCACT  
CGATGAGTGAGAGTGTGTCTGTGGTGTGCACACAGCAACATCACACGGCTCACGGCAAAGGTCATC  
CATGCTGCGGGCTACCATTTGCATCGAGTTGAGCATTATCAATAATGGATGCACAAAATTGGATCACA  
TAGTAGTGGACGATCTGACTAAGATGCCTAATCTCAAATCTCTGTTTATAACGCAAGCTCCGCGACTACA  
CAGGGTGTGCCCCCTCCCTCCGCTGCCGAGCTACGCACATTCATCATCAACCTCCGGCTTGGTGG  
AAGTCCCCAACCTGAGCCACGTGCACGACAAGAAGAATAACAACCTCACTCGCCTATCTGCAAGCTATAG  
ACCTAGAAGGCAACCACATAAAGCGCCTATCGCCGCACGCATTGCGCGTGGCGCGTATCAAGTGTCC  
TTGAACACAACTTGCTAGAAGAAGTGCCTGCTTTTGCCTTCAAGAATGCGCAGATTTCAAATTGAGTT  
TCAGAGGAAACACGAACTAAAACATATTGATGAAAATGCCTTCGCATCGAATTTGCTCCTCCGACAATT  
AGATTTAAGTAACACCGCTATTACCTCCCTGCCTACAGCAGGACTACAGAACTTGGAAAACCTTAGAATA  
GAAAAGACACCTTCATTGAAATACATCCCATCGATTTACGAATTTTCAAGTCTCCAGAAAGCGTACCTGA  
CGCATATTTCCACTGCTGCGCGTCCACTTCCCGAGCGACACAACCCAACGAGACACAAGCTCTATG  
AAACGCAAATTGCTATAATGCAGTCGAAATGTGCGAGCGCTAGTCAGCAGAAGAAACCAGTAGCCAGAA  
GAAAGAAGAGGTCACTGGCACCCTCAAGATCGTTATGCCTCAGCGTAAAACGATACTACAGACTCAT  
TAGAGGAAGACCTGTCAACAGCGACTACGAGCGAGGAGTACGACGCTAACTTGATGGACGAGTACTTC  
TCAGACTCCGGCAGTTGGGAGGACGAGGACGACCAGGGAGAGTTCCACGAACCAGTCAACAACACGC  
TCGGGGCCGGCTTCGCGATCATATCCGCTGAGTGGCGGAACCTCAGTATTAGCCCACGAAAAGTGGAA  
TGCTTTCCCGCACCTGATGCACTGAATCCGTGCGAAGATGTGATGGGCTGGTGGTCCGAGCGAG  
TGTGTGGTTGCTCATCACGGCGGGCGGTGGTGGGCAACGTTGCCGTCCCTGCTCGTCTTACTTACAAACC  
ACACGGAGATTACAGTCCCGCGGTTCCCTTATGTGCCACCTCGCCTTCTCTGACCTCTGCACCGGCCTCT  
ACCTGTTTTATGTTGGCCGTCGTAGACCTCAGATCTTATGAGAAATTTCAACTACGCTACGATTGGCA  
GTACGGGGTCCGGTCAAGATCGCTGGCTTCTATCAGTATTTTCTGGACAGTTTACAGTAATTACTTTA  
ACTATAGTCACATTGGAGCGCTGGTTCCGCATAACTTATGCAATATACTTAGAAAGGAGGATCTCTCTAT  
CAGCCGCAGCTAAGATAATGATGGGCGGTTGGTTGACTCCTTCCCTGATGGCTGGCTTCCGCGTGGTC  
GGCGTGTGAGACTATTCGTCTACGTCAATATGTTTACCGGTTGAGAGCAAGGATGTGGGAGATGCTGTG  
TACCAGGGATCAATATTTATAGTGAGTGCCTTGGCGTGGGTACGATTGTGGTGTGCTACGTGCAGATA  
TACAGGTGCTAGGGGGTGGAGAGAGTTACGGAGGGAGGGGGGCGGCCGAGCCGCTGAGAGACGA  
ATTGCGAATAAAAACCTCCTCATCGGAACCGACCTGTTGTGCTGGGCGCCTGTGGCGTCTTCCG  
CATCACAGCTCTAGCAGGAGTCCCGCTAGTCGATGTCAGTACGCGGAAAGTGTGCTAGTATTCTTTTA  
CCCTCTGAACGCTTGTGCGAATCCATTCTTATACGCCATATTAACGAAACAATACCGAAGAGATTTGATA  
ACGTTGATAGCACGGACGGTCACTGCACCTGGTTAGTGGAGAAGTACAAGTTGGCGGCGACCCCGC  
CCCCACCGCGCACACTAACCCCTTCTGCGCCGGCGCAGTTGATGCCGCTAGTAGACTCCGTCACGTAT  
CAAAGGAGCCAGTCACAGTGTAAGACAGTAGTGAGGTACCGCTTAA (SEC. ID. n° 5)

OctR

ATGGGGCAAACAGCTACACACGTAACCGCAAATTACACATTAATTAATTATACTGATGAAATAATTGAGG  
ATGACAGAGACGCTTGTGCCGTGCGAGATGACCCTAAATATCCGAGTAGTTTCGGTATAAACACTTGCGG  
TACCAGAATGGGAAGCAATTTGTACAGCCATAGTCCTAACGCTTATAATAATCTCAACGATAGTTGGAAA  
CATTTTGGTGATCTTGAGTGTGTTACATACAAACCCCTTAGGATTGTCCAGAACTTCTTCATAGTATCAC  
TTGCTGTGGCGGATTTGACAGTAGCAATATTAGTATTGCCACTAAATGTGGCATACTCCATTCTAGGACA  
ATGGGTATTTGGGATTTACGTATGCAAAATGTGGTTAACATGCGACATAATGTGTTGCACTTCGTCCATT  
TTAAATTTATGTGCAATCGCATTAGACAGGTATTGGGCGATAAACCATCCTATAAATTATGCACAAAAGA  
GAACCTTAGAAAGAGTGATGTTAATGATTGGAGTAGTTGGGTACTTTTATTAGTTATTAGCTCTCCGCC  
ACTTCTAGGGTGAATGACTGGCCCGACGTCTTTGAACCTGATACGCCTTGTGCTTTAACTTCCCAACC  
TGGCTTCGTTATCTTCTCTCATCTGGGTCTTCTACATACCGCTAGTTATAATGACTGTAGTTTATTTG  
AAATATATTTGGCCACTAAAAAAGACTTAGAGATCGCGCTAAAGCCACAAAGATCAGCACTATTTCTAG  
CGGTGAGAATAGATACAATAATAAAGACGATAACAATGATCATGATCAAGATTCTGTTAGCTCAGAAGCC  
AATCACAATGAGCACCAGGCGTGACACGGTTGGCATCAGACAATGAGAAAAAGAAAAGAACCAGAAAA  
TTGACACCAAAGAAAAACCAAGCGACGATATTGGAGTAAGGACGATAAATCGCAAAACAACTGATA  
ATACCGATTCTCTAACGATAATTCGGTAAGTATGATGGTATAATTTAGAAAATAGAAAACACATCATC  
AGAGAGTAACCTGAAAAGAACTACGAGGATGATTTGATTGAAGTTACTGAGCCTGCGCCAGTGAAGAG  
TCACAAGCGGCCGAAGCCTAACAGCAAAGTGTGTTTATCAATTCATTGAAGAAAAGCAAAGGATTTT  
CTTGACACGTGAGCGTGCAGCCGCGAACCCTTGGGATTATAATGGGCGTATTTGTCGTGTGTTGGTT  
GCCCTTCTTTGTCATATACCTTGTATTCCCTTCTGTGCGAGTTGCTGTTTGTCCAACAAGTTTATCAATT  
TCATAACTTGGCTTGGCTACTGCAATTCTGCACTCAACCCTCTAATATACACCATCTTAAACATGGACTTT  
AGGAGAGCATTCAAAAAGTACTCTGTATGAAACCGTGA (SEC. ID. n° 6)

OR83b

ATGACCAAAGTGAAGGCCAGGGCCTCGTCTCCGACCTGATGCCCAACATCAAGTTGATGCAGGCAGC  
 TGGACACTTCTCTTCAATTACCATGCAGAAAATGGTGGCATGAGCGGCCTCCTTCGGAAGATCTACGC  
 CAGTACCCACGCGATTCTCATCACCATACATTTTTGCCTGTATGGGTATCAACATGGCCCAGTACTCCGAT  
 GAGGTCAACGAGCTGACTGCTAACACTATCACCGTCTCTTCTTCACTCACACCATCATCAAGTTGGGG  
 TTCTTCGCTTTGAACTCCAAGAGTTTTTACAGGACTTTAGCAGTATGGAACCAGTCAACAGCCACCCTC  
 TGTTACGGAGTCAGATGCCCGCTACCATCAAATTGCGCTCACCAAGATGAGGAGACTCCTGTACTTCA  
 TCTGCGGCATGACTGTCCTGTCAGTTGTTAGCTGGGTACACTCACATTTCTCGGTGAATCAGTCCGCC  
 TGATACTAGTAAGGAAACGAATGAGACGTTGACAGAAGTAGCCCTCGATTGCCTCTGAAGCCTGGT  
 ACCCTTTC AATGCTATGAGCGGCACCACGTATATTATCGCTTTTCGCTTTCCAGGTCTACTGGCTCCTCTT  
 CCAATGGCTATAGCAAATCTGATGGATGTTATGTTCTGCTCCTGGCTGATCTTCGCTTGTGAACAGCTG  
 CAGCACCTGAAGGCCATCATGAAACCTCTCATGGAACCTCAGTGCTTCACTGGACACGTATCGGCCTAAT  
 ACTGCTGAGCTGTTCCGTGCTTCTTCCACTGAGAAATCAGAAAAGATTCTGATACAGTCGACATGGAC  
 ATCCGCGGCATATATCCACACAGCAAGATTTCCGGGATGACGTTGCGAGGAGCTGGAGGTAGACTGCA  
 GGCTTTGGACAGCAGAACAACAACCCTAATGGCTTGACTCCGAAGCAGGAGATGCTGGCGAGGTCTG  
 CTATTAAGTATTGGGTGGAGAGGCACAAACACGTCGTCGATTGGTAGCATCGATAGGAGACACGTATG  
 TACTGCCCTGCTGTTCCACATGTTGGTGTCAACTATAACACTCACTCTATTGGCTTACCAGGCTACTAA  
 GATCAATGGAATTAATGTCTACGCGTTCAGTACTATTGGCTACCTCAGCTATACCCTGGGACAGGTGTTT  
 CATTTCTGTATCTTCGGGAACAGGCTTATTGAAGAGAGTTCCTCAGTGATGGAAGCCGCCTACTCCTGT  
 CAGTGGTACGACGGCTCCGAGGAAGCAAAGACCTTCGTCCAGATCGTGTGCCAGCAATGCCAGAAAGC  
 CATGAGCATCTCCGGGGCCAAGTTCTTACGGGTGTCACTTGATCTTTTTGCTTCGGTACTTGGTGCAGT  
 AGTTACTTACTTCATGGTGTGGTACAACCTCAAGTAA (SEC. ID. n° 7)

PBAN-R

ATGACATTGTGACGCGCCCCGATCGACGAGTTTTGAGGACCCGTTTCGTCGTGATGAACACGACGAATGT  
 GTCGAGTCACCCGCGCCCTATGACGAGCCATACACGCTCGATCTGGTGGTGCCACTCACCGTCACCT  
 ACGTGGTGATATTCGTAGCCGGCATCCTGGGGAACACCAGCACCTGTGTGGTCATTGCGAGGAATCGC  
 TCTATGCACACCGCTACAACTTTACCTCTTCAGTTTAGCAATTTCCGGATCTCATATTGATGTGG  
 TCTACCGTTTGAGGTGCACAGATTATGGAACCCGGACACGTACCCGTTGGGCGAGGCTCACTGCATCG  
 CCATTGGGTTAGCGTCGGAGACTTCAGCTAACGCGACAGTGTGACAATAACAGCGTTTACGGTGGAG  
 CCGTACATTGCGATATGTAGACCTTTTCATGTGCGACACCATGTGCAAGCTGTCACGAGCTGTGCGGTTT  
 ATAATAGCTATTGGGTGTTTGCCTGTTGTACTGCGGTACCACAAGCGATGCAGTTCGGTATAGTGTCC  
 TATGTGGATAATGGTCAGAATGTGAGCGCGTGCACAGTGAAGGGTGTGGGTGTTTCATCAAGTGTTCGTT  
 ATATCTAGTTTCGTGTTCTTCGTGGTGCCTATGTCGATGATATCAGTGTTGTACGCGTTGATTGGTATTA  
 AGTTGCGGATCTCTCGAGTGTTGCATCCAGTGAAGAAGCTCTCGGTGGACAGCAACGAAAGAGCGAGT  
 GGACAGATGCAGTACAGGAATGGAGCATCACAGAGGAGAGTCAATTAGAATGCTCGTTGCGGTGGCGCT  
 GTCATTCTTCAATTTGCTGGGCGCCCTTCCACGTGCAAAGGTTGCTGGCCATCTACGGGAAAAGTTTAGA  
 ACACCTTCTGATACTTTCTACTTGGTCTACATCGTGCTGACGTTTTTGTCCGGAGTGCTATATTTCTG  
 TCAACCGCCATCAACCCGTTCTCTGTACAACATCATGTGCAATAAGTTTAGAAACGCCCTCAAGGTGAGTT  
 TTTGTTACATTCATGATTGA (SEC. ID. n° 8)

Fig. 1

**Semejante a MiSerR1:**

ATGTTAGAAAATGATTTGGAAAATTTGGACGATTCTTCATTAATTCTGCA  
 TCATTTGGGAGGGTCTTTTGTCCATGCACAAAATTGTAGAAAATTGAAGAAA  
 ATGATTATATAAACAGCAACACAAGTGAAGCAATACAAAATTTAAATTTA  
 TTTTCATCATCATCAACGTCCTTCTCGTCATTATTTTCTTCGTCTTC  
 ACAAAGATCTCCTCTTCTTGAACCAAATTTTGTGATGAAATTTGGCCAG  
 CTACAAGTTCAAATTTCTTTATTTTATTCTCATCCAATAATTGCAATTTTA  
 ATCTCAATTTAATATTTTTATTAAATTTAATTACTATAATTGGAAATTT  
 GGGTGTGTTGTGCTGCAATTTTGTAGTTAGAAAATTTAAAAGCGCAACCAG  
 CTAATTTGTTGCTTATATCACTTGTCTTTGGCTGATTTTTGTGTAGGCCTT  
 TTTGTAATGCCTTTAGCTGCAGTTTACGTTTTGGAAAGATCGTTGGATATT  
 TGGTGATATTCTCTGCCGTTTTTGGGTTACTGCCGATTTAACTTTGTGTA  
 CAGCTTCAATTTTAAATTTGTGTGCAATTTCTGTTGATCGACATTTGGCA  
 GTGACTAGAGCTCTTCGATATTCAGCATTACGTACTIONGAAAGACGTATTTG  
 TTTGATATTTGTATTGTTTGGTGGGTCCTTATTAGTTTCTGCTGCCG  
 CTTTAGCTTTGTTACCGTTTTCCAAAGATTGAGCAATATTGTCAGGTCACA  
 CAAAATCGTGTTTATCAAATTTATGCAACAATTATTGCGTTTTGGGGTCC  
 ATCATTAAATGGTTATTGTTTATGTTAAATTATGGAGTGCAGCGAAAA  
 GAATGCATCGACAAGATCAATTGGTTTTGCGTTGGCAAGGAGTACATTTA  
 CCTTCTGATGGAGATTTAGAGGACGGACTTCTCCAACAACAACAACAT  
 CAAATGCTACTAAATCTTTATTTAGAAAATGATTCAATAGCCCGTGCAAATG  
 CTCGTTTTCTTTTTGCATTGCGTATGTCAGCACAAAAATTTGGTTATTAT  
 GATCATCAAATAATAAACTAATGGAGGAGAAATTATAAATGATGATGA  
 AAATTTAAGAATTGAAGTTAGAACAAGTCTAGTAGTAGTGGTGGTGGGA  
 GGAGGAGGATCTTCTACTTTGGGGACTTTACGTGTTCCAATAGTGTAA  
 TTATTATGAGTGCCCTTCATAATTTGTTGGGTGCCATTTTTTTATATTAGCTTT  
 GGCAAATCACAGCATTGGGTAAATTATGTTTCTAGATGGCTTGATTCAC  
 TTACATTATGGCTTGGATATTCTAATAGCATGTTAAACCCAATAATTTAT  
 TGCAAATATAATCGAGAATTTCTGTGTTCCATTTGGAGAAATGCTTTGTTG  
 TCGGTTTAGAACAAATCAAGACGTTATGAGAAATGAAAGTTATTATGCAA  
 AATTCGGTTCTCCAAGAATTTCTGAAACAAAAATTTGGGGGAAGTCAACAA  
 CGGTCCTCTGGAATAAATTATTACACTAAAAGAAAAAGAAACAACACAGA  
 AAGGAGAGCACCACAAAATGGGTTTTTAGATTCTTCGAAAACGAAGAAAA  
 ATTATGGGATTAAAAGGAATAGTAGTCTTCTATCTTGATGGAATCATCA  
 AAATAA (SEC. ID. nº 9)

**Semejante a MiDopR1:**

ATGTTGCCCTGGTGGCTACCTCTTTAATTTTTGTCCCATCTTTTCTGT  
 ATTAATTTCCCTTGCTTTTCTGGCAACCTTCTCGTAATCGCAGCAATAT  
 TTTACGACAGAAAATTGCGTAGACAACCAGAAAATTTATTTTTAGTTTCC  
 TTAGCTTTGTGCACTTGTGTTGTTGCTGGAATGGTTATGGTTTTAGCGGC  
 AGCAAACGATTTAATTGGTTTTTGGCCTTTTGGGGCTGCTTTTTGTCAAT  
 TTTGGATTTGTTGGATATTGCTTGTAGTACTGCTTCTATTTTAAATTTA  
 TGTGCAATAGCTCTCGATCGTTTTATTACATTAGCAGGCCAATGCGTTA  
 TGTTAGATTTGTTGGAAGAAGGGTTATTTGTTGTTCTGTTTGTGCTATTT  
 GGATAATTTCTACAGCTGTTGGAACGGCCCAAATAGCTTTTGGGGCTAC  
 TAATGGATTGGAGATATATTCTGTTATATTTAATGGAGACTATTTTGGAGA  
 GATTAATGAGACTGATAAATTTAGATTCATCGAACAAACAACATACACTAG  
 TTCAATGCCAATTACAATTATCTCCTTTTTATGCCGTTTTTTCTTCTTA  
 CTTAGCTTCTTCTACCAGCTACTTTGATGCTTTTTCTTTACTACAGGCT  
 TTATTTATATGCTCGGCATCATGCTCGTTCTATACAATCACAACCTTAAAC  
 AGGCTACTTCACTTTTGAATTTACAATTAGCCTCAGATAGAGTACGTCAA  
 GTAGTTGTACGTCCTTCTAGTGGATTTTTATCCCCCTTTCAATAGCCCT  
 TCACTACGATTTCTGAAGATTTAGTGGAAAATCCTCCTTTGATGGAGAAT  
 CACTTCAAAAAGCCGAGTTTAGCCAAATAAACGTTGCTGTGAATAAATCA  
 CCAGAAAATCATTCTATCGACGCTACAATCCAACAAGGAACGCCTGTACT  
 TAGGGCTACATTGAGACAATTAAGAAGGACAGAAAGCAATAATAGTAGCA  
 GCTTTAGCTTTGTTTTCGAGAAAATGGATTGGGTGTTAATAGCAGAAGGGTTGG  
 TTGTGGTGGTGGTAATGGTGGGGGAGAGAAGAAAGAGTTGTTCCCACTTC

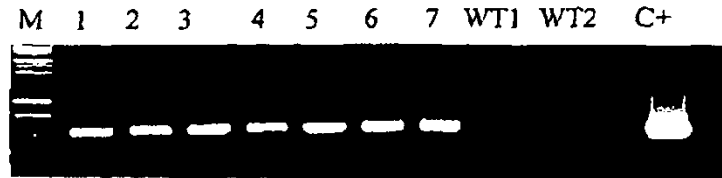
CTTCTCCAACAACAAAAAGAGGTTTTAAATCTTGTGGGTGGTCTAATAATAA  
 TAATGGCAATGGAGGGCATCGTTCTTCTGACAAAAAGCACGTGTTACTCT  
 TGGTGTATTATGGGTACTIONTTCTAATATGTTGGTTACCCTTCTTTATTGTCA  
 ATGTTCTACGCCCTTTCTGGCCTGAAATTTTTCTCCACTACTTTTTCAGAC  
 AGTTTCCTGGCTAGGTTATGCCAATCTTCAGTAAATCCAGTAATTTATGGA  
 ATATTTAATCGAGACTTTTCGACGTGCCTTTAGCCGTATAATGAACAAATTA  
 TTCATTGTATAGACGAGGAAAGAAGGGGAGAAAATAGTCGAGGAGGGACA  
 TTTAGAACTAGAACAGAAAGTGAATCTTTAATAAATTTAATAAAAGTTTAA  
 TAATGCAAGTGAACACAACAACAAAAATTAATTTTTAAACAAAAAAGA  
 CAAATAAAAAATTGAGATTTTTATGTTTTAA (SEC. ID. n° 10)

Semejante a MiNPR1:

ATGGAAGCATCTACAATGGAATTACTTCCACCTCCCACCATATTATTTAATG  
 TATCATCAGCGCCTTCTGTTATTTGTGAGGATATGAATGCTTATTTATGGAA  
 CACTCGTCGGGATTTGACTACATGTCCTTTCGTTATGGCTCTATTTGCTTCC  
 TTATATTCATCAATCATTACTGGGTATTATCGGAAACTCTTGTGTGATTAT  
 GGCTATTGCCAGAATTAATCACTTCAAACGTGCCTAATATGTTTATTTTCT  
 CGTTGAGTTGTTGAGATATACTTGTGTTGCTTATTTCTGCTACTATAACTCCA  
 ATCGCTGCCTTCAAAAAGGATTGGATTTTTGGCCAATCTTATGCTCTTTTG  
 CACCTTTTGTGCGGGAGGGAGTTTGTGTTTCTCTACATTCACTTTGGCGGC  
 TATTTCCGTGGACCGTTTTCTTAATACTTTTTCCCACGAGAAAGGCTTTCT  
 CGCATACACAAGCTTTATTTATAATTCTTGTACGTTTTCTGTTGGCTAGCGGG  
 TTTAGTTTACCAATGTTGTTTCATGCAAAAGTTAAAACCAGTAACTCATTATTGT  
 GGCCGATTTTGTTCGAGGATTGGGGCGAGATGATTGGAATAAGACGAATCT  
 ATGGAACCTTATTGCTGACCGTCCAATTCATTATTCCGTTAGCATTGATCACTT  
 TCTGTTACACAGCAATTTCAATCCGACTTGGAAAAAGCGTGAATCTACGTA  
 AGGAAGAAATGTGAATGGCAAATGCCGATTAGTGCTCAGCGAAACGCGGCC  
 ACAAAGCGAAGACAACGAACCTAACCGAATGTTTATTGCAATGGTAATTGCCT  
 TCTCAGTGAGCTGGATATGGTCGGTTCTATATAATATGTTACGAGACTATGAC  
 GGTCTTCAAAGTTTGTACATGATCAAGAATTCTTTTTTGGAAATTTAACACAC  
 TGTATTGCAATGAGCTCCACGGTGTGGAATCCGATCTTATATGCCTTATTTAA  
 TCTACAACCTAAGGGCAGCCTTTCTACAACCTTGTGCCACAATGTATTAAGCATT  
 CTCTGACTTGCCTTGTAGTCCTAATAAAGGAAGATTAAGCGGTGATCAGTT  
 GCTCGATGTGCCTACCTTGAAGAGAGCCGGCTTCTTGGTTCTCAGTTCTTC  
 GCGGAACAACCGGACAAGTACAGAGAAGAGAAACGAATTATGAAAATAAAAA  
 CTGTTTTAATTGTTTATTGCTCCTCTAGATCCGTTGAATCTTCTTCAAACGA  
 AACACAGAAGCAAACGTTTTCTGTTAAATGTGAAGGAAATAAAGGAGATGCTA  
 AAATTTTGTACATAATCACCATCGGCATCAATTAGAAAGAATAACAGCGGAC  
 GGTGGATTTGACGAGCAAACATGGACAGAGCAACTGAGGAAGGACTCTGAAG  
 ATGATGCCTTAGATGATTGTAATGATGATTTGAGAGAAAGAGATACAGATGAG  
 AGGATATGA (SEC. ID. n° 11)

Fig. 2

# Fig.3



# Fig.4

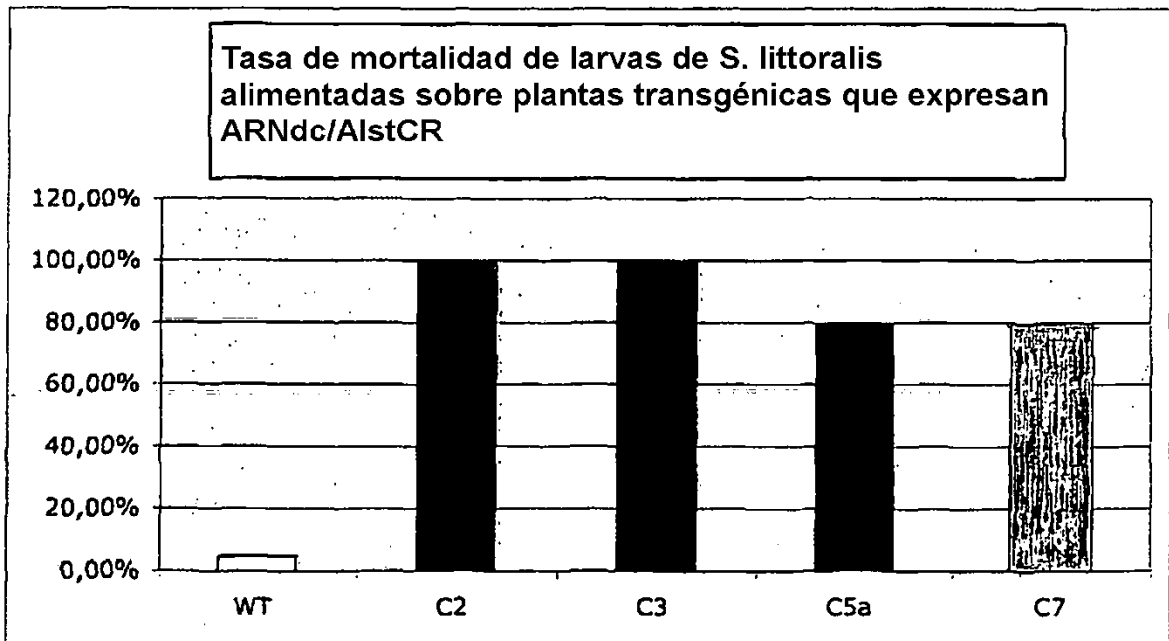




Fig.5

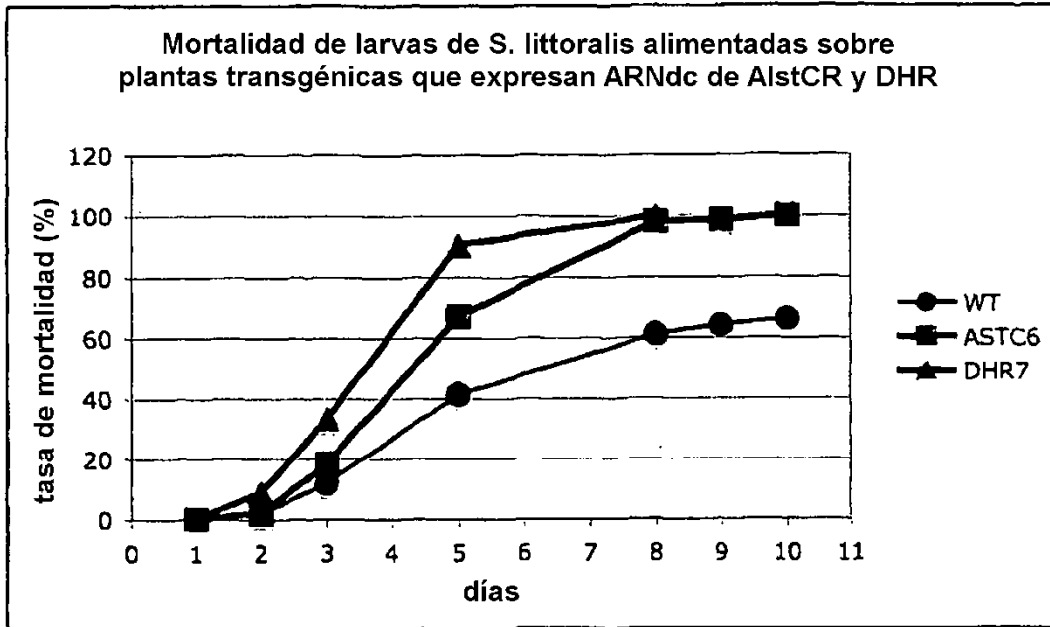


Fig.6

