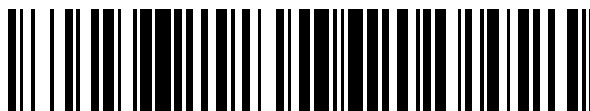


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 602**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/32 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2007 E 07795240 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2032700**

54 Título: **Evento de maíz MIR162**

30 Prioridad:

03.06.2006 US 810499 P

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

07.07.2014

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
SCHWARZWALDALLEE 215
4058 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**LONG, NYKOLL;
PULLIAM, DERRICK;
BOTTOMS, JEFF;
MEGHJI, MOEZ;
HART, HOPE y
QUE, QIUDENG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 473 602 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

Evento de Maíz MIR162

5 **Antecedentes**

10 La presente invención se refiere generalmente al campo de la biología molecular de plantas, a la transformación de las plantas, y a la propagación de las plantas. De manera más específica, la invención se refiere a plantas de maíz transgénicas resistentes a los insectos que comprenden un genotipo transgénico novedoso y a métodos para detectar la presencia de ácidos nucleicos que son únicos para las plantas de maíz transgénicas en una muestra y composiciones de estas.

15 Las plagas de las plantas constituyen un factor importante en la pérdida de los cultivos agrícolas importantes del mundo. Aproximadamente 8 mil millones de dólares estadounidenses se pierden por año solo en los Estados Unidos debido a infestaciones de plagas no mamíferas, que incluyen insectos. Además de estas pérdidas en los cultivos de los campos, las plagas de insectos también significan una carga para los cultivadores de vegetales y frutas, los productores de flores decorativas y para los jardineros hogareños.

20 Las plagas de insectos se controlan principalmente mediante aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos, que actúan a través de la inhibición del crecimiento de los insectos, la prevención de la alimentación o reproducción de los insectos, o causan su muerte. El buen control de los insectos se puede lograr de ese modo pero estos productos químicos pueden afectar a veces a otros insectos beneficiosos. Otro problema que resulta del amplio uso de plaguicidas químicos es la aparición de variedades de insectos resistentes. Este hecho se alivió parcialmente mediante diversas prácticas de control de la resistencia, pero existe una creciente necesidad de agentes de control de plagas alternativos. Los agentes de control de plagas biológicos, como por ejemplo las cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que expresan toxinas plaguicidas como δ -endotoxinas, también se han aplicado a las plantas de maíz con resultados satisfactorios, ofreciendo una alternativa o un complemento para los plaguicidas químicos. Los genes que codifican algunas de estas δ -endotoxinas se aislaron y se demostró que su expresión en huéspedes heterólogos proveía otra herramienta para el control de plagas de insectos importantes desde el punto de vista económico. En particular, la expresión de las δ -endotoxinas de Bt ha provisto una protección eficiente contra plagas de insectos seleccionadas, y las plantas transgénicas que expresan dichas toxinas se han comercializado, permitiendo a los granjeros reducir las aplicaciones de agentes químicos para el control de insectos.

35 También, se identificó otra familia de proteínas insecticidas producidas por la especie *Bacillus* durante la etapa de crecimiento vegetativo (proteínas insecticidas vegetativas (Vip, por sus siglas en inglés)). Las Patentes de Invención estadounidenses números 5.877.012, 6.107.279, y 6.137.033, describen una nueva clase de proteínas insecticidas denominadas Vip3. Otras descripciones, incluidas las de los documentos WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546, y WO 99/57282, ahora han identificado también homólogos de la clase Vip3 de proteínas. Las secuencias que codifican la Vip3 codifican proteínas de aproximadamente 88 kDa que poseen actividad insecticida contra un amplio espectro de plagas de lepidópteros, con inclusión, pero sin limitación, del gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano de las yemas del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), gusano perforador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), gusano saltarín perforador del tallo de maíz (LCB, *Elasmopalpus lignosellus*), e isoca del maíz (CEW, *Helicoverpa zea*), y cuando se expresan en plantas transgénicas, por ejemplo maíz (*Zea mays*), confieren protección a la planta contra el daño producido por la alimentación de los insectos.

45 Los métodos presentes de transformación de plantas generalmente conducen a la integración aleatoria de trasgenes como *vip3* en un genoma de planta huésped. Esta inserción aleatoria de ADN introducido en el genoma de la planta puede ser letal si resulta que el ADN extraño se inserta en un gen nativo esencialmente importante y, de esa manera, hace mutar a dicho gen. Además, incluso si un evento de inserción aleatoria no perjudica el funcionamiento de un gen de célula huésped, la expresión de un gen extraño insertado puede ser influenciada por los "efectos de posición" causados por el ADN genómico circundante. En algunos casos, el gen se inserta en sitios en los que los efectos de la posición son lo suficientemente fuertes para evitar la síntesis de una cantidad efectiva de producto del gen introducido. Por ejemplo, se ha observado en las plantas que pueden existir amplias variaciones en los niveles de expresión de un gen heterólogo introducido en el cromosoma de una planta entre eventos individualmente seleccionados. Pueden existir también diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo diferencias en la expresión relativa de un transgen en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores transcripcionales presentes en el constructo del gen introducido. En otros casos, la sobreproducción del producto génico posee efectos perjudiciales sobre la célula. Debido a estos problemas potenciales, es común producir cientos de diferentes eventos y cribar aquellos eventos para escoger un único evento que posee patrones de expresión de trasgenes y niveles deseados para fines comerciales. Sin embargo, una vez identificado el sitio comercialmente viable dentro del genoma de una planta, sería ventajoso dirigir los genes de interés a ese sitio no perjudicial.

65 Se han descrito varios métodos para la inserción dirigida de una secuencia de nucleótidos de interés en un sitio cromosómico específico dentro de una célula vegetal. Los sistemas de recombinación de sitio específico se han identificado en varios organismos procariontes y eucariotes inferiores. Dichos sistemas comprenden generalmente una o

más proteínas que reconocen dos copias de una secuencia de nucleótidos específica, escinden y ligan aquellas secuencias de nucleótidos y proveen así un intercambio de información genética de sitio específico preciso. Varias recombinasas de sitio específico son conocidas en la técnica. Ellas incluyen, pero sin limitación, por ejemplo el sistema del bacteriófago P1 Cre/lox (Austin *et al.* (1981) Cell 25: 729-736), el sistema de recombinasa R/RS del plásmido pSR1 de la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki *et al.* (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), el sistema Gin/gix del fago Mu (Maeser y Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176), el sistema de recombinasa FLP/FRT del plásmido 2 .mu.m de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Broach *et al.* (1982) Cell 29: 227-234), y la recombinasa Int del bacteriófago Lambda (Landy (1989) Annu. Rev. Biochem. 58: 912-949; Landy (1993) Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 699-707; Lorbach *et al.* (2000) J. Mol. Biol. 296: 1175-1181; y WO 01/16345). Una estrategia dirigida de sitio específico particularmente útil, descrita en la Publicación de la Solicitud de Patente de Invención estadounidense No. 2006/0130179, utiliza la recombinación mediada por la integrasa lambda. El método comprende introducir en una célula vegetal una secuencia de nucleótidos objetivo que comprende un primer Sitio de Reconocimiento de Integrasa; introducir en la célula vegetal una secuencia de nucleótidos donante que comprende un segundo Sitio de Reconocimiento de Integrasa; e introducir en la célula vegetal una integrasa o un complejo de integrasa. Otra estrategia dirigida de sitio específico útil se encuentra descrita en la Publicación de la Solicitud de Patente de Invención No. 2006/0253918, que utiliza la recombinación homóloga para integrar uno o más genes (apilamiento de genes) en ubicaciones específicas en el genoma.

Un evento que posee niveles deseados o patrones de expresión de transgenes es útil para introgresionar el transgen en otros antecedentes genéticos mediante un cruce exogámico ("outcrossing") sexual con el uso de métodos de cultivo selectivo convencionales. La progenie de dichos cruces mantiene las características de la expresión del transgen del transformante original. Esta estrategia se utiliza para asegurar la expresión confiable del gen en una cantidad de variedades que está bien adaptada a las condiciones de cultivo locales. Asimismo, sería conveniente poder detectar la presencia de un evento particular a fin de determinar si la progenie de una cruce sexual contiene un transgen de interés. Además, un método para detectar un evento particular sería útil para cumplir con las normas que requieren la aprobación percomercial y el etiquetado de, por ejemplo, los alimentos derivados de los vegetales de cultivos recombinantes. Es posible detectar la presencia de un transgen mediante cualquier método de detección de ácido nucleico bien conocido, que incluye, pero sin limitación, la amplificación térmica (reacción de cadena de polimerasa (PCR)) con el uso de cebadores de polinucleótidos o hibridación de ADN con sondas de ácido nucleico. Generalmente, por razones de simpleza y uniformidad de los reactivos y las metodologías para utilizar en la detección de un constructo de ADN particular que se utilizó para transformar diversas variedades de plantas, estos métodos de detección generalmente se centran en elementos genéticos utilizados con frecuencia, por ejemplo, promotores, terminadores, y genes marcadores, puesto que para muchos constructos de ADN, la región de la secuencia codificadora es intercambiable. Como resultado, dichos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre constructos que difieren solamente con referencia a la secuencia codificadora. Además, dichos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, particularmente aquellos producidos con el uso del mismo constructo de ADN a menos que se conozca la secuencia del ADN cromosómico adyacente al ADN heterólogo insertado ("ADN flanqueante").

Por las razones expuestas precedentemente, existe la necesidad de eventos de maíz transgénico resistente a los insectos que comprendan secuencias de ácido nucleico novedosas que sean únicas para el evento de maíz transgénico, útiles para identificar el evento de maíz transgénico y para detectar los ácidos nucleicos del evento de maíz transgénico en una muestra biológica, así como también conjuntos que comprendan a los reactivos necesarios para usar en la detección de estos ácidos nucleicos en una muestra biológica. Existe otra necesidad de proveer sitios objetivos específicos dentro del genoma del maíz a fin de permitir establecer el objetivo y controlar la inserción de secuencias de nucleótidos para que se integren en el genoma de maíz.

SÍNTESIS

La presente invención se refiere a un evento de maíz transformado (*Zea mays*), denominado MIR162 que comprende un genotipo transgénico nuevo que comprende una secuencia codificadora de *vip3Aa20*, que es única para el evento MIR162. La secuencia codificadora de *vip3Aa20* codifica una proteína insecticida de Vip3Aa20 que confiere resistencia contra los insectos a las plantas de maíz de MIR162. El evento de MIR162 también comprende una secuencia codificadora de *pmi* que codifica una proteína de PMI que confiere a las células de maíz la capacidad para utilizar manosa como fuente de carbono. Además de la secuencia codificadora de *vip3A20*, la presente invención también provee otros ácidos nucleicos que son únicos para MIR162. La invención también provee plantas de maíz transgénicas que comprenden ácidos nucleicos únicos para MIR162, semillas de las plantas de maíz transgénicas, y describe métodos para producir una planta de maíz transgénica que comprende los ácidos nucleicos únicos de la invención mediante el cruce de un endogámico de maíz que comprende los ácidos nucleicos únicos para MIR162 u otra línea de maíz de un genotipo diferente. Un ejemplo de semilla, y por ende de plantas de maíz cultivadas a partir de dichas semillas, que comprende ácidos nucleicos únicos para MIR162 se depositó en la American Type Culture Collection (Colección de Cultivos del Tipo Estadounidense) con número de acceso PTA-8166. Las plantas de maíz transgénicas de la invención pueden tener esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas de las plantas de maíz no transgénicas isogénicas además de aquellas conferidas a las plantas de maíz por el nuevo genotipo de la invención. Las muestras biológicas y los extractos, tejidos y semillas de las plantas de maíz MIR162 también se proveen mediante la presente invención. Esta invención también proporciona composiciones y métodos para detectar la presencia de ácidos nucleicos únicos para MIR162 en muestras biológicas basadas en la secuencia de ADN de los casetes de

5 expresión recombinantes insertados en el genoma del maíz que resultó en el evento MIR162 y de las secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción. El evento MIR162 se puede caracterizar también mediante el análisis de los niveles de expresión de las proteínas Vip3Aa20 y PMI como también mediante el sometimiento a prueba del MIR162 para determinar la eficacia contra las plagas de insectos lepidópteros. La presente invención también provee métodos para producir plantas de maíz transgénicas a un espectro más amplio de plagas de insectos mediante el apilamiento de un rasgo característico resistente a los insectos de Vip3Aa20 con los rasgos de resistencia a los insectos diferentes a Vip3Aa20.

10 Los aspectos mencionados anteriormente y otros aspectos de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN EL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 es la secuencia codificadora de Vip3Aa20 en MIR162.
 SEC ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de Vip3Aa20.
 15 SEC ID NO: 3 es la secuencia del plásmido pNOV1300.
 SEC ID Nos.: 4-12 son cebadores y sondas útiles en un ensayo TAQMAN.
 SEC ID NO: 13 es la secuencia de una sonda de vip3Aa20.
 SEC ID NO: 14 es la secuencia de una sonda de pmi.
 SEC ID Nos: 15-37 son cebadores útiles en la presente invención.
 20 SEC ID No: 38 es la secuencia de un amplicón de vip3Aa20.
 SEC ID Nos: 39-40 son cebadores útiles en la presente invención.
 SEC ID No: 41 es la secuencia del amplicón de CJ134/179 5'.
 SEC ID Nos: 42-43 son cebadores útiles en la presente invención.
 SEC ID NO: 44 es un amplicón de vip3Aa20 3'.
 25 SEC ID NO: 45 es la unión del inserto- genoma 5'.
 SEC ID NO: 46 es una secuencia de genoma del maíz que flanquea al inserto en 5'.

SEC ID NO: 47 es la unión del inserto –genoma 3'.
 SEC ID NO: 48 es el genoma de maíz que flanquea al inserto en 3'.
 30 SEC ID NO: 49 es el inserto MIR162 y las secuencias flanqueadoras.
 SEC ID Nos. 50-54 son cebadores útiles en la presente invención.
 SEC ID NO: 55 es un amplicón de 5' PCR
 SEC ID Nos. 56-58 son los cebadores útiles en la presente invención.
 SEC ID NO: 59 es un amplicón de PCR 3'.
 35 SEC ID Nos. 60-105 son cebadores útiles en la presente invención.
 SEC ID NO: 106 es la secuencia de la región del cromosoma de maíz 5 que comprende el sitio objetivo cromosómico descripto.
 SEC ID NO: 107 es la secuencia genómica de maíz que se reemplazó por la inserción del ADN heterólogo en MIR162.

40 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Las siguientes definiciones y métodos se proveen a los efectos de definir de manera más acabada la presente invención y guiar a aquellos con conocimiento común en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique de otro modo, los términos utilizados aquí deben entenderse de acuerdo con el uso convencional de las personas versadas en la materia relevante. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular también se pueden hallar en Rieger *et al.*, Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5^a edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1994. En la presente, se utiliza la nomenclatura para las bases de ADN y aminoácidos de acuerdo con lo establecido en el art. 1.822, Título 37 del Código de Normas Federales.

50 De acuerdo con su uso en la presente, el término "amplificado" significa la construcción de múltiples copias de una molécula de ácido nucleico o múltiples copias complementarias a la molécula de ácido nucleico con el uso de por lo menos una de las moléculas de ácido nucleico como plantilla. Los sistemas de amplificación incluyen, pero sin limitación, el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el sistema de reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación basada en las secuencias de ácido nucleico (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario), sistemas de Q-Beta Replicasa, sistemas de amplificación basados en transcripciones (TAS), y amplificación por reemplazo de hebra (SDA). Véase, por ejemplo, *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, D. H. Persing et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). El producto de la amplificación se denomina un amplicón.

60 Una "secuencia codificadora " es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en el ARN, como por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, ARNnp, ARN sentido o ARN antisentido. Preferentemente, el ARN se traduce luego en un organismo para producir una proteína.

65 Como se utiliza en la presente, el término "maíz" significa maíz *Zea* e incluye a todas las variedades de plantas que se pueden reproducir con maíz, con inclusión de las especies de maíz silvestres.

“Conjunto de detección” como se usa en la presente se refiere a un conjunto de partes útiles para detectar la presencia o ausencia de ADN único para las plantas de MIR162 en una muestra, en donde el conjunto comprende sondas y/o cebadores de ácido nucleico de la presente invención, que se hibridan específicamente bajo condiciones de alta rigurosidad a una secuencia de ADN objetivo, y otros materiales necesarios para permitir métodos de amplificación o hibridación de ácido nucleico.

Como se usa en la presente, el término “evento” transgénico se refiere a una planta recombinante producida por la transformación y regeneración de una célula o tejido vegetal con ADN heterólogo, por ejemplo, un casete de expresión que incluye un gen de interés. El término “evento” se refiere al transformante original y/o progenie del transformante que incluye al ADN heterólogo. El término “evento” se refiere también a la progenie producida por un cruce exogámico sexual entre el transformante y otra línea de maíz. Incluso luego de una retrocruza repetida a un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del progenitor transformado se encuentra presente en la progenie de la cruce en la misma ubicación cromosómica. El término “evento” se refiere también al ADN del transformante original que comprende al ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado del que se esperaba que se transfiriera a una progenie que recibe el ADN insertado que incluye al transgen de interés como el resultado de una cruce sexual de una línea progenitora que incluye al ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultantes de la autopolinización (“selfing”)) y una línea progenitora que no contiene al ADN insertado. Normalmente, la transformación del tejido vegetal produce múltiples eventos, cada uno de los cuales representa la inserción de un constructo de ADN en una ubicación diferente en el genoma de una célula vegetal. En base a la expresión del transgen u otras características deseables, se selecciona un evento en particular. De esta manera, “evento MIR162”, “MIR162” o “evento MIR162” se pueden usar intercambiamente.

Una planta de maíz MIR162 resistente a los insectos puede reproducirse mediante la cruce sexual de una primera planta de maíz progenitora que comprende una planta de maíz que creció a partir de una planta de maíz transgénica MIR162, como por ejemplo una planta de maíz MIR162 cultivada a partir de la semilla depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-6188, y su progenie derivada de la transformación con casetes de expresión de las realizaciones de la presente invención que confieren resistencia a los insectos y una segunda planta de maíz progenitora que carece de resistencia a los insectos, para producir así una pluralidad de plantas de primera progenie; y luego seleccionar una planta de la primera progenie resistente a los insectos; y autopolinizar la planta de la primera progenie, con lo cual se produce una pluralidad de plantas de segunda progenie; y luego seleccionar de las plantas de segunda progenie, una planta resistente a los insectos. Estos pasos pueden incluir además la retrocruza de la planta de la primera progenie resistente a los insectos o la planta de la segunda progenie resistente a los insectos con la segunda planta de maíz progenitora o una tercera planta de maíz progenitora, para producir así una planta de maíz resistente a los insectos.

“Casete de expresión” como se usa en la presente significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula huésped adecuada, que comprende un promotor unido operablemente a la secuencia de nucleótidos de interés, que está operablemente unida a las señales de terminación. También, comprende generalmente secuencias requeridas para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos. El casete de expresión puede comprender también secuencias no necesarias en la expresión directa de una secuencia de nucleótidos de interés pero que están presentes debido a los sitios de restricción convenientes para la eliminación del casete de un vector de expresión. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, es decir que por lo menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión puede ser uno que se produzca naturalmente pero que se ha obtenido en forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Generalmente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no se produce naturalmente en la célula huésped y debe haberse introducido en la célula huésped o un ancestro de la célula huésped mediante un proceso de transformación conocido en la técnica. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solamente cuando la célula huésped se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, como por ejemplo una planta, el promotor también puede ser específico para un tejido particular, u órgano o etapa de desarrollo. Un casete de expresión, o su fragmento, también se puede mencionar como “secuencia insertada” o “secuencia de inserción” cuando se transforma en una planta.

Un “gen” es una región definida que se ubica dentro de un genoma que, además de la secuencia codificadora mencionada anteriormente, puede comprender otras secuencias de ácido nucleico, principalmente reguladoras, responsables del control de la expresión, es decir la transcripción y traducción de la porción codificadora. Un gen puede también comprender otras secuencias no traducidas 5’ y 3’ y secuencias de terminación. Otros elementos que pueden hallarse, por ejemplo, son los intrones.

“Gen de interés” se refiere a cualquier gen, cuando se transfiere a una planta, confiere a la planta una característica deseada como por ejemplo una resistencia antibiótica, resistencia a virus, resistencia a los insectos, resistencia a las enfermedades o resistencia a otras plagas, tolerancia herbicida, valor nutricional mejorado, desempeño mejorado en un proceso industrial o capacidad reproductiva alterada.

“Genotipo” como se usa en la presente es el material genético heredado de las plantas de maíz progenitoras que no se encuentra expresado necesariamente en su totalidad en las plantas de maíz descendientes. El genotipo MIR162 se refiere al material genético heterólogo transformado en el genoma de una planta como también al material genético que flanquea la secuencia insertada.

5

Una secuencia de ácido nucleico “heteróloga” es una secuencia de ácido nucleico no asociada naturalmente con una célula huésped en la que se introduce, incluso copias múltiples no producidas naturalmente de una secuencia de ácido nucleico producida naturalmente.

10

Una secuencia de ácido nucleico “homóloga” es una secuencia de ácido nucleico asociada naturalmente con una célula huésped en la que se introduce.

15

“Operablemente unida” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico sobre un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de uno afecte la función del otro. Por ejemplo, un promotor está operablemente unido con una secuencia codificadora o ARN funcional cuando es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificadora o ARN funcional (es decir, la secuencia codificadora o ARN funcional está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras en orientación sentido o antisentido se pueden unir operablemente a las secuencias reguladoras.

20

“Cebadores”, como se utiliza en la presente, son ácidos nucleicos aislados que son templados a una hebra de ADN objetivo complementaria mediante hibridación del ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN objetivo, y luego extendidos a lo largo de la hebra de ADN objetivo mediante una polimerasa, como por ejemplo ADN polimerasa. Se pueden usar pares o conjuntos de cebadores para la amplificación de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

25

Una “sonda” es un ácido nucleico aislado al que se unió una etiqueta detectable convencional o molécula informante, como por ejemplo un isótopo radioactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o una enzima. Dicha sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico objetivo, en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN genómico del evento de maíz MIR162. El ADN de MIR162 puede provenir de una planta de maíz o de una muestra que incluye ADN de MIR162. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solamente ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN objetivo y se pueden usar para detectar la presencia de esa secuencia de ADN objetivo.

30

35

Los cebadores y sondas tienen generalmente entre 10 y 15 nucleótidos o más de longitud. Los cebadores y sondas pueden tener al menos 20 nucleótidos o más de longitud, o por lo menos 25 nucleótidos o más, o por lo menos 30 nucleótidos o más de longitud. Dichos cebadores y sondas se hibridan específicamente a una secuencia objetivo bajo condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Los cebadores y las sondas de acuerdo con la presente invención pueden tener una complementariedad de secuencia completa con la secuencia objetivo, aunque las sondas que difieren de la secuencia objetivo y que retienen la capacidad de hibridarse con las secuencias objetivo se pueden diseñar mediante métodos convencionales.

40

45

De acuerdo con su uso en la presente, gen o “apilamiento” de rasgos es la combinación de rasgos deseados en una línea transgénica. Los cultivadores de plantas apilan rasgos transgénicos mediante cruza entre progenitores que poseen un rasgo deseado y luego mediante la identificación de la descendencia que posea ambos rasgos deseados. Otra forma de apilar genes es mediante la transferencia de dos o más genes en el núcleo de la célula de una planta al mismo tiempo durante la transformación. Otra forma de apilar genes es mediante la retransformación de una planta transgénica con otro gen de interés. Por ejemplo, el apilamiento de genes se puede usar para combinar dos rasgos diferentes de resistencia a los insectos, un rasgo de resistencia a los insectos o un rasgo de resistencia a las enfermedades, o un rasgo de resistencia a herbicidas. El uso de un marcador seleccionable además de un gen de interés también se consideraría un apilamiento de genes.

50

55

“Condiciones rigurosas ” o “condiciones de hibridación rigurosas ” incluyen referencias a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará a su secuencia objetivo, con un grado detectablemente mayor que a otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia objetivo y diferirán según la estructura del polinucleótido. Mediante el control de la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado, las secuencias objetivo se pueden identificar para que sean 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Como alternativa, las condiciones de rigurosidad se pueden ajustar para permitir cierto desacoplamiento en las secuencias de manera que se detecten grados menores de similitud (sondeo heterólogo). Las secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. Una guía extensiva a la hibridación de ácidos nucleicos se halla en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier: Nueva York; y *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel *et al.*, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience: Nueva York (1995), y también Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (5ª Ed. Cols Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

60

65

La especificidad es generalmente la función de los lavados poshibridación, en donde los factores críticos son la resistencia iónica y la temperatura de la solución del lavado final. Generalmente, las condiciones de lavado e hibridación de alta rigurosidad se seleccionan a aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una resistencia iónica y pH definidos. T_m es la temperatura (bajo la resistencia iónica y pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia objetivo se hibrida a una sonda perfectamente acoplada. Generalmente, bajo condiciones de alta rigurosidad, una sonda se hibridará a su subsecuencia objetivo, pero no a otras secuencias.

Un ejemplo de condiciones de hibridación de alta rigurosidad para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que poseen más de 100 residuos complementarios sobre un filtro en un Southern o northern blot es 50% de formamida con 1 mg de heparina a 42°C, donde la hibridación se lleva a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado de alta rigurosidad es de NaCl 0,15M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado de alta rigurosidad es un lavado de 0,2x de SSC a 65°C durante 15 minutos (Véase, Sambrook, *infra*, para una descripción del tampón de SSC).

Las condiciones de hibridación ejemplares para la presente invención incluyen la hibridación en 7% de SDS, NaPO₄ 0,25 M pH 7,2 a 67°C durante la noche, seguido por dos lavados en 5% de SDS, NaPO₄ 0,20 M pH 7,2 a 65°C durante 30 minutos cada lavado, y dos lavados en 1% de SDS, NaPO₄ 0,20 M pH 7,2 a 65°C durante 30 minutos cada lavado. Un lavado de rigurosidad media ejemplar para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1x SSC a 45°C durante 15 minutos. Un lavado de rigurosidad baja ejemplar para un dúplex de, por ejemplo más de 100 nucleótidos, es 4-6x de SSC a 40°C durante 15 minutos.

Para las sondas de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos, las condiciones de alta rigurosidad generalmente comprenden concentraciones de sal inferiores a aproximadamente 1.0 M de iones de Na, generalmente una concentración de alrededor de 0,01 a 1,0 M de iones de Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es generalmente de por lo menos aproximadamente 30°C. Las condiciones altamente rigurosas se pueden lograr también con la adición de agentes desestabilizantes, como por ejemplo formamida. En general, una relación de señal y ruido de 2x (o más) a la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones altamente rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Ello se produce, por ejemplo, cuando una copia de ácido nucleico se crea con el uso de una degeneración de codón máxima permitida por el código genético.

Los siguientes son conjuntos ejemplares de condiciones de hibridación/lavado que se pueden utilizar para hibridar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias de nucleótidos de referencia de la presente invención: una secuencia de nucleótidos de referencia preferentemente se hibrida a la secuencia de nucleótidos de referencia en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 2X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, más deseablemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 1X de SSC, 0,1% de SDS a 50°C, más deseablemente aún en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 0,5X de SSC, 0,1% de SDS a 50°C, preferentemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 0,1X de SSC, 0,1% de SDS a 50°C, de mayor preferencia en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 0,1X de SSC, 0,1% de SDS a 65°C. Las secuencias de la presente invención se pueden detectar con el uso de todas las condiciones mencionadas precedentemente. A los efectos de definir la invención, se utilizan condiciones altamente rigurosas.

"Transformación" es un proceso para introducir ácido nucleico heterólogo en una célula huésped u organismo. En particular, "transformación" significa la integración estable de una molécula de ADN en el genoma de un organismo de interés.

"Transformado/transgénico/recombinante" se refieren a un organismo huésped, como por ejemplo una bacteria o una planta, en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico puede estar integrada establemente en el genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Dicha molécula extracromosómica puede autorreplicarse. Se entiende que las células, tejidos o plantas transformadas comprenden no solamente el producto final de un proceso de transformación, sino también su progenie transgénica. Un huésped "no transformado", "no transgénico", o "no recombinante" se refiere a un organismo de tipo silvestre, por ejemplo una bacteria o una planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga. Como se usa en la presente, "transgénico" se refiere a una planta, célula vegetal, o multitud de células vegetales estructuradas o no estructuradas que han integrado, mediante técnicas de manipulación genética e inserción de genes bien conocidas, una secuencia de ácido nucleico que representa un gen de interés en el genoma de la planta, y generalmente en un cromosoma de un núcleo celular, mitocondria, u otro organelo que contiene cromosomas, en un sitio diferente, o en una cantidad de copias superior, a los presentes normalmente en la planta o célula vegetal nativos. Las plantas transgénicas resultan de la manipulación e inserción de dichas secuencias de ácido nucleico, en contraposición a las mutaciones que se producen naturalmente, a fin de producir una planta que no se produce naturalmente o una planta con un genotipo que no se produce en forma natural. Las técnicas de transformación de plantas y células vegetales son muy conocidas en la técnica y pueden comprender, por ejemplo, la electroporación, microinyección, transformación mediada por *Agrobacterium*, y transformación balística.

Como se usa en la presente, el término "único" para MIR162 significa característico distintivamente de MIR162. Por lo tanto, los ácidos nucleicos únicos para el evento MIR162 no se hallan en otras plantas de maíz que no son de MIR162.

5 La clase "Vip3" de proteínas comprende, por ejemplo, Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ac, Vip3Ad, Vip3Ae, VipAf, Vip3Ag, Vip3Ba, y Vip3Bb, y sus homólogos. "Homólogo" significa que la proteína o polipéptido indicado porta una relación definida con otros miembros de la clase Vip3 de proteínas. "Vip3Aa20" es un homólogo de Vip3 único para el evento MIR162. Se generó mediante mutaciones espontáneas introducidas en el gen *vip3Aa19* optimizado del maíz, comprendido en pNOV1300 (SEC ID NO: 3) durante el proceso de transformación de la planta.

10 La presente invención se refiere a una línea genéticamente mejorada de maíz que produce una proteína de control de insectos, Vip3Aa20, y una enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) que permite a la planta utilizar manosa como fuente de carbono. La invención se dirige particularmente a un evento de maíz transgénico denominado MIR162 que comprende un genotipo nuevo, así como también a composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos únicos para MIR162 en una muestra biológica. La invención se refiere también a plantas de maíz que comprenden al genotipo de MIR162 y a la semilla transgénica de las plantas de maíz. Las plantas de maíz que comprenden al genotipo de MIR162 de la invención son útiles para controlar las plagas de insectos lepidópteros, que incluyen, pero sin limitación, al gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano de las yemas del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), gusano perforador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), gusano saltarín perforador de los tallos de maíz (LCB, *Elasmopalpus lignosellus*), isoca del maíz (CEW, *Helicoverpa zea*), oruga de frijol occidental (WBCW, *Striacosta albicosta*).

20 En una realización, la presente invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es única para el evento MIR162.

25 En otra realización, la presente invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que es única para el evento MIR162 y se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.

30 Se describe también una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos una secuencia de unión del evento MIR162, en donde una secuencia de unión atraviesa la unión entre un casete de expresión heterólogo insertado en el genoma del maíz y el ADN del genoma del maíz que flanquea el sitio de inserción y que es diagnóstico para el evento. Preferentemente, la secuencia de unión se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, y sus complementos.

35 Se describe también una molécula de ácido nucleico aislada que une una molécula de ADN heteróloga al genoma de la planta de maíz en el evento MIR162 que comprende una secuencia de aproximadamente 11 a aproximadamente 20 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que comprende las SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, y sus complementos.

40 En un aspecto de esta realización, la molécula de ácido nucleico aislada se encuentra comprendida en una semilla de maíz depositada en la American Type Culture Collection con el número de acceso PTA-8166, o en plantas cultivadas a partir de la semilla.

45 También se describe un amplicón que comprende una secuencia de nucleótidos única para el evento MIR162. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.

50 También se describen secuencias flanqueantes para detectar el evento MIR162. Dichos cebadores de secuencias flanqueantes comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 10-15 nucleótidos contiguos de la secuencia flanqueante 5' o 3'. En un aspecto de esta realización, los nucleótidos contiguos se seleccionan de los nucleótidos 1-1088 (inclusive) de la SEC ID NO: 49 (denominada arbitrariamente en la presente como secuencia flanqueante 5'), o sus complementos. Preferentemente, los cebadores de la secuencia flanqueante 5' se seleccionan del grupo que comprende las SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 53, SEC ID números: 68-80, y sus complementos. Los nucleótidos contiguos también se pueden seleccionar de los nucleótidos 9391-10579 (inclusive) de la SEC ID NO: 49 (denominada arbitrariamente como secuencia flanqueante 3'), o sus complementos. En incluso otro aspecto, los cebadores de la secuencia flanqueante 3' se seleccionan del grupo que comprende las SEC ID NO: 58, SEC ID Números: 97-105, y sus complementos.

60 También se describe un par de cebadores de polinucleótidos que comprenden un primer cebador de polinucleótido y un segundo cebador de polinucleótido que funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN de evento MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento MIR162. Preferentemente, el primer cebador y/o el segundo cebador se eligen de la SEC ID NO: 1 o su complemento o el primer cebador y/o el segundo cebador se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NOs: 15-35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 42, y sus complementos. El

amplicón que es producido por el par de cebadores comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 44, o sus complementos.

5 En otra realización, la presente invención comprende un par de cebadores de polinucleótidos que comprende un primer cebador de polinucleótido y un segundo cebador de polinucleótido que funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN de evento MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento MIR162, en donde el primer cebador comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende los nucleótidos 1-1088 de la SEC ID NO: 49, nucleótidos 9391-10579 de la SEC ID NO: 49, y sus complementos y donde el segundo cebador de polinucleótido comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 1089-9390 de la SEC ID NO: 49, o sus complementos. En otro aspecto de esta realización, el primer cebador se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 58, SEC ID NOs: 68-72, SEC ID NO: 79, SEC ID NO: 80, SEC ID números 97-105, y sus complementos. En incluso otro aspecto de esta realización, el segundo cebador de polinucleótido se selecciona del grupo que comprende las SEC ID números: 15-35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 40, SEC ID: 50-52, SEC ID: 54, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 73, SEC ID NO: 82, SEC ID NO: 96, y sus complementos.

20 El primer cebador de polinucleótido, que está establecido en la SEC ID NO: 36, y el segundo cebador de polinucleótido que está establecido en la SEC ID NO: 37, funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN del evento MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento MIR162 como se describe en el Ejemplo 4. El amplicón comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID NO: 38.

25 También, el primer cebador de polinucleótido, que está establecido en la SEC ID NO: 39, y el segundo cebador de polinucleótido, que está establecido en la SEC ID NO: 40, funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN del evento MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento de maíz MIR162 como se describe en el Ejemplo 4. El amplicón comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID NO: 41.

30 Además, el primer cebador de polinucleótido, que está establecido en la SEC ID NO: 53, y el segundo cebador de polinucleótido, que está establecido en la SEC ID NO: 54, funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN del evento de maíz MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento de maíz MIR162 como se describe en el Ejemplo 5. En la presente, el amplicón comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID NO: 55.

35 Finalmente, el primer cebador de polinucleótido, que está establecido en la SEC ID NO: 58, y el segundo cebador de polinucleótido, que está establecido en la SEC ID NO: 56, funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN del evento de maíz MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento de maíz MIR162 como se encuentra descrito en el Ejemplo 5. El amplicón comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID NO: 59.

40 Por supuesto, se encuentra dentro de la habilidad en la técnica la obtención de secuencias adicionales más afuera en la secuencia de genoma que flanquea cualquiera de los extremos de las secuencias de ADN heterólogas insertadas para utilizar como secuencia de cebadores que se puede utilizar en dichos pares de cebadores para amplificar las secuencias que son diagnósticos del evento MIR162. Para los fines de la presente descripción, la frase "más afuera en la secuencia del genoma que flanquea cualquiera de los extremos de las secuencias de ADN heterólogas insertadas" se refiere específicamente al movimiento secuencial alejándose de los extremos de las secuencias de ADN heterólogas insertadas, en cuyos puntos las secuencias de ADN insertadas están adyacentes a la secuencia de ADN genómica nativa, y hacia afuera hacia el interior del ADN genómico del cromosoma particular en el que se insertaron las secuencias de ADN heterólogas. Preferentemente, una secuencia de cebadores correspondiente o complementaria a una parte de la secuencia de inserción debería cebar la extensión transcripcional de una hebra naciente de ADN o ARN hacia la unión de secuencias flanqueantes más cercana. En consecuencia, una secuencia de cebadores correspondiente o complementaria a una parte de la secuencia flanqueante genómica debería cebar la extensión transcripcional de una hebra naciente de ADN o ARN hacia la unión de las secuencias flanqueantes más cercana. Una secuencia de cebadores puede ser, o ser complementaria de, una secuencia de ADN heteróloga insertada en el cromosoma de la planta, o una secuencia flanqueante genómica. Un experto en la técnica reconocería fácilmente el beneficio de si una secuencia de cebadores necesitaría ser, o ser complementaria de, la secuencia como se establece dentro de la secuencia de ADN heteróloga insertada o como se establece en la SEC ID NO: 38 según la naturaleza del producto deseado que se obtendrá con el uso del conjunto anidado de cebadores que se han de utilizar para la amplificación de una secuencia flanqueante particular que contiene la unión entre la secuencia de ADN genómico y la secuencia de ADN heteróloga.

60 En otra realización, la presente invención comprende una proteína insecticida aislada que comprende la SEC ID NO: 2 y una molécula de ácido nucleico que codifica la SEC ID NO: 2. En un aspecto de esta realización, la molécula de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 1. La presente invención también comprende un gen quimérico que comprende un promotor heterólogo operablemente unido a la molécula de ácido nucleico, y a vectores recombinantes y células huésped que comprenden al gen quimérico.

65

- 5 En incluso otra realización, la presente invención comprende un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico que es única para el evento MIR162 en una muestra que comprende ácidos nucleicos de maíz, en donde el método comprende: (a) contactar la muestra con un par de cebadores de polinucleótidos que, al utilizarse con una reacción de amplificación de ácido nucleico con un ADN genómico del evento MIR162, produce un amplicón que es diagnóstico del evento MIR162; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, para producir así al amplicón; y (c) detectar el amplicón. En un aspecto de esta invención, el amplicón comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.
- 10 En otra realización, la presente invención comprende un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico que es única para el evento MIR162 en una muestra que comprende ácidos nucleicos de maíz, en donde el método comprende: (a) contactar la muestra con una sonda que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con ADN genómico del evento MIR162 y no se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con ADN de una planta de maíz de control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación altamente rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN. La detección se puede realizar mediante cualquier medio bien conocido en la técnica, que incluye la técnica fluorescente, quemiluminiscente, radiológica, inmunológica, y similares. En el caso en el que la hibridación se pretende utilizar como medio para la amplificación de una secuencia en particular para producir un amplicón que es diagnóstico para el evento MIR162, la producción y detección por cualquier medio bien conocido en la técnica del amplicón tiene como objetivo la hibridación pretendida a la secuencia objetivo en donde se utiliza una sonda o un cebador, o secuencias en las que se utilizan dos o más sondas o cebadores. El término "muestra biológica" comprende una muestra que contiene o de la que se sospecha que contiene un ácido nucleico que comprende entre cinco y diez nucleótidos en cualquiera de los lados del punto en el que uno o el otro de los dos extremos terminales de la secuencia de ADN heteróloga insertada se contacta con la secuencia de ADN genómica dentro del cromosoma en el que se insertó la secuencia de ADN heteróloga, conocidas aquí también como las secuencias de unión. Además, la secuencia de unión comprende tan solo dos nucleótidos: aquellos que constituyen el primer nucleótido dentro del ADN genómico flanqueante adyacente y unido covalentemente al primer nucleótido dentro de la secuencia de ADN heteróloga insertada. En un aspecto de esta realización, la sonda comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.
- 20 En incluso otra realización, la presente invención comprende un kit para la detección de ácidos nucleicos que son únicos para el evento MIR162 en una muestra biológica. El conjunto incluye por lo menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de polinucleótidos contiguos para funcionar como un cebador o una sonda en un método de detección de ácido nucleico, y que ante la amplificación de o hibridación a una secuencia objetivo de ácido nucleico en una muestra seguida de la detección del amplicón o la hibridación a la secuencia objetivo, sirve de diagnóstico para la presencia de secuencias de ácidos nucleicos únicas para el evento MIR162 en la muestra. El conjunto además incluye otros materiales necesarios para posibilitar los métodos de amplificación o hibridación de ácidos nucleicos. En un aspecto de esta realización, una molécula de ácido nucleico contenida en el conjunto comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 49. En otro aspecto de esta realización, la molécula de ácido nucleico es un cebador seleccionado del grupo que comprende las SEC ID NOs: 15-37, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 43, SEC ID NOs: 50-54, SEC ID NOs: 56-58, SEC ID NOs: 60-105, y sus complementos. En incluso otro aspecto de esta realización, el amplicón comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, o sus complementos. Se puede utilizar una diversidad de métodos de detección que incluyen, pero sin limitación, TAQMAN (Perkin Elmer), amplificación térmica, reacción en cadena de la ligasa, hibridación southern, métodos ELISA, y métodos de detección colorimétrico y fluorescente. En particular, la presente invención provee conjuntos para detectar la presencia de la secuencia objetivo, es decir, por lo menos la secuencia de *vip3Aa20* o una secuencia de unión, en una muestra que contiene ácido nucleico genómico de MIR162. El conjunto comprende por lo menos un polinucleótido capaz de unirse al sitio objetivo o sustancialmente adyacente al sitio objetivo y por lo menos un medio para detectar la unión del polinucleótido al sitio objetivo. El medio de detección puede ser fluorescente, quemiluminiscente, colorimétrico, o isotópico y se puede acoplar por lo menos con métodos inmunológicos para detectar la unión. Un conjunto también se prevé que puede detectar la presencia del sitio objetivo en una muestra, es decir, por lo menos la secuencia de *vip3Aa20* o una secuencia de unión de MIR162, aprovechando dos o más secuencias de polinucleótidos que juntas son capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos adyacentes o dentro de aproximadamente 100 pares de base, o dentro de aproximadamente 200 pares de base, o dentro de aproximadamente 500 pares de base o dentro de aproximadamente 1000 pares de base de la secuencia objetivo y que se pueden extender una hacia la otra para formar un amplicón que contiene por lo menos el sitio objetivo.
- 30 También se describe un método para detectar la proteína Vip3Aa20 en una muestra biológica, en donde el método comprende: (a) extraer la proteína del tejido del evento MIR162; (b) evaluar la proteína extraída con el uso de un método inmunológico que comprende el anticuerpo específico para la proteína Vip3Aa20 producida por el evento MIR162; y (c) detectar la unión de dicho anticuerpo a la proteína Vip3Aa20.
- 40 En incluso otra realización, la presente invención comprende una muestra biológica derivada de una planta de maíz, tejido o semilla del evento MIR162, en donde la muestra comprende una secuencia de nucleótidos que es, o es complementaria de, una secuencia que es única para el evento MIR162, y en donde la secuencia es detectable en la

muestra con el uso de un método de amplificación de ácido nucleico o hibridación de ácido nucleico. En un aspecto de esta realización, la secuencia de nucleótidos es, o es complementaria de las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, o SEC ID NO: 59. En otro aspecto de esta realización, la muestra se selecciona del grupo que comprende harina de maíz, polenta de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz y cereales fabricados total o parcialmente para que contengan subproductos del maíz.

También se describe un extracto de una muestra biológica derivada de una planta de maíz, tejido o semilla de MIR162 que comprende una secuencia de nucleótidos que es o es complementaria de una secuencia que es única para MIR162. La secuencia es detectable en el extracto con el uso de un método de amplificación de ácido nucleico o hibridación de ácido nucleico. Preferentemente, la secuencia es o es complementaria de las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, o SEC ID NO: 59. La muestra se puede seleccionar del grupo que comprende harina de maíz, polenta de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales producidos total o parcialmente para que contengan subproductos del maíz.

Otra realización de la presente invención comprende una planta de maíz, o partes de ella y la semilla de una planta de maíz que comprende el genotipo del evento transgénico MIR162, en donde el genotipo comprende una secuencia de nucleótidos establecida en las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, o sus complementos. Un ejemplo de semilla de maíz que comprende las moléculas de ácido nucleico de la invención se depositó el 23 de enero de 2007 y recibió el número de Acceso PTA-8166 de la ATCC. En un aspecto de esta realización, la planta de maíz es de las líneas de maíz endogámicas CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, CG4NU15, CG00685, CG00526, CG00716, NP904, NP911, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151, NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316, BCTT609, AF031, NPH8431, 894, BUTT201, R327H, 2044BT, y 2070BT. Un experto en la técnica reconocerá, sin embargo, que el genotipo MIR162 se puede introgresar en cualquier variedad de planta que se pueda reproducir con maíz, incluso con especies de maíz salvajes y, por ende, la lista de líneas endogámicas de esta realización no es limitativa.

También se describe una planta de maíz que comprende por lo menos una primera y una segunda secuencia de ADN unidas juntas para formar una secuencia de nucleótidos contigua, en donde la primera secuencia de ADN se encuentra dentro de una secuencia de unión y comprende por lo menos aproximadamente 11 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que comprende a los nucleótidos 1079-1098 de la SEC ID NO: 49, nucleótidos 9381-9400, y sus complementos, en donde la segunda secuencia de ADN se encuentra dentro de la secuencia de ADN heteróloga de inserción establecida en la SEC ID NO: 49, y sus complementos; y en donde las secuencias de ADN primera y segunda son útiles como cebadores o sondas de nucleótidos para detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico del evento MIR162 del maíz en una muestra biológica. En un aspecto de la realización, los cebadores de nucleótidos se utilizan en un método de amplificación de ADN para amplificar una secuencia de ADN objetivo a partir del ADN de plantilla extraído de la planta de maíz y la planta de maíz se puede identificar a partir de otras plantas de maíz mediante la producción de un amplicón correspondiente a una secuencia de ADN que comprende las SEC ID NO: 45 o SEC ID NO: 47.

Las plantas de maíz de la invención se pueden caracterizar además porque la digestión simultánea del ADN genómico de la planta con las endonucleasas de restricción *KpnI*, *EcoRV* o *NcoI* resulta en una banda de hibridación de *vip3A20* de aproximadamente 8 kb, 13 kb o 4,6, respectivamente, con el uso de una sonda de *vip3Aa20* bajo condiciones de alta rigurosidad. En la presente, se ejemplifica una sonda de *vip3Aa20* que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID NO: 13.

Las plantas de maíz de la invención se pueden caracterizar además porque la digestión del ADN genómico de la planta con la endonucleasa de restricción *Acc65I* o *BamHI* resulta en una única banda de hibridación *pmi* con el uso de una sonda *pmi* bajo condiciones de alta rigurosidad. En la presente, se ejemplifica una sonda *pmi* que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID NO: 14.

En una realización, la presente invención provee una planta de maíz, en donde el genotipo de MIR162 confiere a la planta de maíz resistencia a los insectos o la capacidad de utilizar manosa como fuente de carbono, o tanto la resistencia a los insectos como la capacidad de utilizar manosa como fuente de carbono. En un aspecto de esta realización, el genotipo transgénico que confiere resistencia a los insectos a la planta de maíz de la invención comprende un gen *vip3Aa20* y el genotipo transgénico que confiere la capacidad de utilizar manosa como fuente de carbono a la planta de maíz comprende un gen *pmi*.

También se describe un método para producir una planta de maíz resistente a las plagas de lepidópteros que comprende: (a) cruzar sexualmente una primera planta de maíz progenitora con una segunda planta de maíz progenitora, en donde dicha primera o segunda planta de maíz progenitora comprende ADN del evento MIR162, con lo cual produce una pluralidad de la primera generación de plantas de progenie; (b) seleccionar una primera generación de planta de progenie que sea resistente a una o más plagas de lepidópteros; (c) autopolinizar la primera generación de planta de progenie; y (d) seleccionar de las plantas de progenie de segunda generación una planta que sea resistente a una o más plagas de lepidópteros; en donde las plantas de progenie de la segunda generación comprenden una

secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, y SEC ID NO: 59.

5 También se describe un método para producir semillas de maíz híbrido que comprende: (a) sembrar semillas de una primera línea de maíz endogámico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, y SEC ID NO: 59, y semillas de una segunda línea endogámica que posee un genotipo diferente; (b) cultivar las plantas de maíz que resultan de dicha siembra hasta el florecimiento; (c) emasculas las flores de las plantas de una de las líneas endogámicas de maíz; (d) cruzar sexualmente las dos líneas endogámicas diferentes entre sí; y (e) cosechar la semilla híbrida producida de ese modo. La primera línea de maíz endogámica puede proveer progenitores hembras. La primera línea de maíz endogámica provee progenitores machos.

15 Un experto en la técnica reconocerá que el genotipo transgénico de MIR162 se puede introgresar mediante la reproducción en otras líneas de maíz que comprenden diferentes genotipos transgénicos. Por ejemplo, una endogamia en maíz de MIR162 se puede cruzar con una endogamia en maíz que comprende el genotipo transgénico del evento Bt11 resistente a los lepidópteros (Patentes de Invención estadounidenses Nos. 6.114.608 y 6.342.660). La semilla y las plantas de progenie resultantes poseen las características de resistencia a los insectos apiladas y el espectro combinado de actividad de Cry1Ab y Vip3Aa20. Otro apilamiento de rasgo comprendido por la presente invención incluye la combinación del rasgo de MIR162 de resistencia a los insectos y el rasgo de resistencia a los insectos MIR604 (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense No. 2005/0216970, publicada el 29 de septiembre de 2005). Los rasgos de apilamiento en la semilla resultante y en la progenie confieren a las plantas un espectro de actividad aumentado; es decir, las plantas son activas contra las plagas de insectos lepidópteros y coleópteros.

25 También se describe un método para proteger una planta de maíz transgénica del daño producido por la alimentación de una o más plagas de insectos en donde el método comprende apilar en la misma planta de maíz transgénica un rasgo de Vip3Aa20 de resistencia a los insectos con otro rasgos de resistencia a los insectos que sea diferente a Vip3Aa20, por lo cual los rasgos apilados protegen a la planta de maíz contra el daño producido por la alimentación de una o más plagas de insectos en un grado mayor al que se esperaría debido a los rasgos de resistencia a los insectos solos. En un aspecto de esta realización, el rasgo de Vip3Aa20 de resistencia a los insectos en el evento MIR162 se apila con el rasgo de resistencia a los insectos Cry3A055 comprendido en el evento MIR604 en la misma planta de maíz transgénica mediante el cruce sexual del evento MIR162 con el evento MIR604 o mediante la transformación de los rasgos juntos en la misma planta.

35 Los ejemplos de otros eventos transgénicos que se pueden cruzar con una endogamia de MIR162 incluyen al evento GA21 tolerante al glifosato, el evento MON802 resistente a los insectos lepidópteros/tolerante al glifosato, el evento DBT418 resistente a los lepidópteros, el evento estéril macho MS3, el evento B16 tolerante a fosfotricina, el evento MON 80100 resistente a los insectos lepidópteros, los eventos T14 y T25 tolerantes a la fosfotricina, el evento 176 resistente a los insectos lepidópteros, y el evento MON863 resistente a los coleópteros, todos ellos son conocidos en la técnica. Se reconocerá además que otras combinaciones o apilamientos se pueden realizar con el genotipo transgénico de la invención y, por ende, estos ejemplos no deberían verse como limitativos.

45 Un experto en la técnica reconocerá también que la semilla de maíz transgénica que comprende al genotipo MIR162 se puede tratar con diversos productos químicos de tratamiento de semillas, que incluyen insecticidas, para aumentar o sinergizar la actividad insecticida de la proteína Vip3Aa20.

50 La presente divulgación describe en la presente un sitio específico en el cromosoma 5 en el genoma de maíz que es excelente para la inserción de ácidos nucleicos heterólogos. También, se describe un marcador molecular de 5' (opie2; nucleótidos 1680-3338 de la SEC ID NO: 106) y un marcador molecular de 3' (gag; nucleótidos 43,275-45,086 de la SEC ID NO: 106) útiles para identificar la ubicación de un sitio de dirección de objetivo en el cromosoma 5. Una opción para lograr dicha integración establecida como objetivo consiste en sustituir un inserto diferente en lugar del casete de expresión de *vip3Aa20* ejemplificado en la presente. En este respecto general, la recombinación homóloga establecido como objetivo, por ejemplo sin limitación, se puede utilizar. "Recombinación homóloga" se refiere a una reacción entre cualquier par de secuencias de nucleótidos que poseen sitios correspondientes que contienen una secuencia de nucleótidos similar (es decir, secuencias homólogas) a través de la cual las dos moléculas pueden interactuar (recombinar) para formar una nueva secuencia de ADN recombinante. Los sitios de secuencia de nucleótidos similar se mencionan cada uno en la presente como "secuencia de homología". Generalmente, la frecuencia de la recombinación homóloga aumenta a medida que aumenta la longitud de la secuencia de homología. De esta manera, mientras la recombinación homóloga se puede producir entre dos secuencias de nucleótidos que son menos que idénticas, la frecuencia de recombinación (o eficiencia) disminuye a medida que aumenta la divergencia entre las dos secuencias. La recombinación se puede lograr con el uso de una secuencia de homología sobre cada una de las moléculas donante y objetivo, con lo cual se genera un producto de recombinación de "cruce único". Como alternativa, dos secuencias de homología se pueden colocar sobre cada una de las secuencias de nucleótidos objetivo y donante. La recombinación entre dos secuencias de homología sobre el donante con dos secuencias de homología sobre el objetivo genera un producto de recombinación de "cruce doble". Si las secuencias de homología sobre la molécula donante flanquean una secuencia que se ha de manipular (por ejemplo, una secuencia de interés), la recombinación de doble cruce con la molécula objetivo resultará en un producto de recombinación en donde la secuencia de interés reemplaza una

secuencia de ADN que estaba originalmente entre las secuencias de homología sobre la molécula objetivo. El intercambio de la secuencia de ADN entre la objetivo y la donante a través de un evento de recombinación de doble cruza se denomina "reemplazo de secuencias". Este tipo de tecnología es el tema de, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de Invención estadounidense No. 2006/0253918. Con el sitio objetivo descrito que se identifica ahora y con las secuencias que rodean al sitio objetivo identificado, el experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otros métodos para la integración establecida como objetivo de ácidos nucleicos heterólogos. Estos métodos, por ejemplo, sin limitación, se describen en la Publicación de Patente de Invención estadounidense No. 2007/0039074 y en la Publicación de la Solicitud de Patente de Invención estadounidense No. 2006/0130179.

También se describe en la presente un sitio objetivo cromosómico de maíz ubicado en el cromosoma 5 entre un marcador molecular *opie2* establecido como nucleótidos 1680-3338 de la SEC ID NO: 106 y un marcador molecular *gag* establecido como nucleótidos 43,275-45,086 de la SEC ID NO: 106, en donde el sitio objetivo comprende un ácido nucleico heterólogo. El sitio objetivo cromosómico del maíz se encuentra sobre el cromosoma 5 entre los nucleótidos 25.454 y 25.513 de la SEC ID NO: 106. En incluso otra realización, el sitio objetivo cromosómico es 5' flanqueado por los nucleótidos 5.454 a 25.454 de la SEC ID NO: 106 y 3' flanqueado por los nucleótidos 25.513 a 45.513 de la SEC ID NO: 106.

El genotipo transgénico de la presente invención se puede introgresar en cualquier endogamia o híbrido de maíz con el uso de técnicas de propagación reconocidas. El objetivo de la propagación de plantas consiste en combinar en una sola variedad o híbrido diversos rasgos deseables. Para los cultivos de campo, estos rasgos pueden incluir resistencia a los insectos y enfermedades, tolerancia a los herbicidas, tolerancia al calor y a la sequía, reducción del tiempo para alcanzar la madurez, mayor rendimiento, y una mejor calidad agrónoma. Con la cosecha mecánica de muchos cultivos, la uniformidad de las características de las plantas, tales como la germinación y el establecimiento de plántulas, velocidad de crecimiento, madurez y altura de la planta y de la espiga, son importantes.

Los cultivos de campo se propagan a través de técnicas que toman ventaja del método de polinización de la planta. Una planta se autopoliniza si el polen de una flor se transfiere a la misma flor o a otra flor de la misma planta. Una planta se poliniza por cruza si el polen proviene de otra flor de una planta diferente.

Las plantas que se han autopolinizado y seleccionado por tipo para muchas generaciones se vuelven homocigóticas en casi toda la posición del gen y producen una población uniforme de progenie de endogamia verdadera. Una cruza entre dos líneas homocigóticas diferentes produce una población uniforme de plantas híbridas que pueden ser heterocigóticas para muchas posiciones del gen. Una cruza de dos plantas, cada una de ellas heterocigóticas, en una cantidad de posiciones del gen producirá una población de plantas híbridas que difieren genéticamente y no serán uniformes.

El maíz (*Zea mays* L.) se puede propagar mediante técnicas de autopolinización o polinización cruzada. El maíz tiene flores macho y flores hembra en la misma planta, ubicadas en la espiga y espiguilla, respectivamente. La polinización natural se produce en el maíz cuando el viento sopla el polen de las espigas a las sedas que sobresalen de las puntas de las espigas.

Un método confiable para controlar la fertilidad masculina de las plantas ofrece la oportunidad de una propagación mejorada de las plantas. Ello es especialmente cierto para el desarrollo de híbridos de maíz, que reside en alguna clase de sistema de esterilidad masculina. Existen varias opciones para controlar la fertilidad masculina disponibles para los cultivadores, tales como la emasculación manual o mecánica (o desespigamiento), esterilidad masculina citoplásmica, esterilidad masculina genética, gametocidas y similares.

La semilla de maíz híbrida se produce generalmente mediante un sistema de esterilidad masculina que incorpora el desespigamiento manual o mecánico. Las hileras alternadas de dos endogamias de maíz se plantan en un campo, y las espigas que portan el polen se retiran de uno de los endogámicos (hembra). Con la condición de que exista un aislamiento suficiente de otras fuentes de polen de maíz exógenas, las espigas del endogámico desespigado se fertilizarán solamente del otro endogámico (macho), y la semilla resultante es, por lo tanto, híbrida y formará plantas híbridas.

El proceso de desespigamiento trabajoso, y ocasionalmente desconfiable, se puede evitar mediante el uso de muchos de los métodos de otorgamiento de esterilidad genética masculina de la técnica, cada uno de los cuales presenta sus propios beneficios y desventajas. Estos métodos utilizan una diversidad de estrategias, como por ejemplo la administración a la planta de un gen que codifica una sustancia citotóxica asociada con un promotor de tejido específico o un sistema de antisentido en el que se identifica un gen esencial para la fertilidad y se inserta un antisentido a ese gen en la planta (Véase: Fabinjanski, et al. EPO 89/3010153.8 publicación no. 329.308 y solicitud PCT PCT/CA90/00037 publicada como WO 90/08828).

El uso de endogámicos estériles machos es solo un factor en la producción de híbridos de maíz. Las técnicas de propagación de plantas conocidas en la técnica y utilizadas en un programa de propagación de plantas de maíz incluyen, pero sin limitación, la selección recurrente, retrocruza, propagación de pedigrí, selección aumentada del polimorfismo de longitud de restricción, selección y transformación aumentada por un marcador genético. El desarrollo de híbridos de maíz en un programa de propagación de plantas de maíz requiere, en general, el desarrollo de líneas de

endogámicos homocigóticos, la cruce de estas líneas, y la evaluación de las cruces. Los métodos de propagación de pedigrí y propagación por selección recurrente se utilizan para desarrollar líneas de endogámicos de poblaciones de propagación. Los programas de propagación de plantas de maíz combinan los antecedentes genéticos de dos o más líneas endogámicas u otras diversas fuentes de germplasma en conjuntos de propagación a partir de los cuales se desarrollan nuevas líneas endogámicas por autopolinización y selección de los fenotipos deseados. Los nuevos endogámicos se cruzan con otras líneas endogámicas y los híbridos de estas cruces se evalúan para determinar cuáles son las que tienen potencial comercial. La propagación de plantas y el desarrollo de híbridos, como se practican en un programa de propagación y mejoramiento de plantas de maíz, son procesos costosos y que llevan mucho tiempo.

La propagación de pedigrís comienza con la cruce de dos genotipos, cada uno de los cuales puede tener una o más características deseables que le falta al otro o que complementa al otro. Si los dos progenitores originales no proveen todas las características deseadas, se pueden incluir otras fuentes en la población de propagación. En el método de pedigrí, las plantas superiores son autopolinizadas y seleccionadas en generaciones sucesivas. En las siguientes generaciones, la condición heterocigótica da lugar a las líneas homogéneas como resultado de la autopolinización y selección. Generalmente, en el método de propagación de pedigrí, se practican cinco o más generaciones de autopolinización y selección: $F_1 \rightarrow F_2$; $F_2 \rightarrow F_3$; $F_3 \rightarrow F_4$; $F_4 \rightarrow F_5$; etc.

La propagación por selección recurrente, por ejemplo retrocruce, se puede utilizar para mejorar una línea endogámica y un híbrido que se realiza con el uso de aquellos endogámicos. El retrocruce se puede usar para transferir un rasgo deseable específico a partir de un endogámico o fuente a un endogámico que carece de ese rasgo. Ello se puede lograr, por ejemplo, mediante el cruce en primer lugar de un endogámico superior (progenitor recurrente) a un endogámico donante (progenitor no recurrente), que porta el o los genes adecuados para el rasgo en cuestión. La progenie de este cruce se aparea luego otra vez con el progenitor recurrente superior seguido por la selección en la progenie resultante para transferir el rasgo deseado desde el progenitor no recurrente. Luego de cinco o más generaciones de retrocruce con la selección de ese rasgo deseado, la progenie será homocigótica para la posición que controla la característica que se transfiere, pero será como el progenitor superior para esencialmente todos los demás genes. La última generación de retrocruce se autopoliniza luego para proporcionar una progenie de propagación pura para el o los genes que se transfieren. Un híbrido desarrollado a partir de endogámicos que contienen el o los genes transferidos es esencialmente el mismo que un híbrido desarrollado a partir de los mismos endogámicos sin los genes transferidos.

Las líneas de endogámicos de elite, es decir las líneas de propagación puras, las líneas endogámicas homocigóticas, también se pueden usar como materiales de partida para poblaciones de propagación o fuente de las que se pueden desarrollar otras líneas endogámicas. Estas líneas endogámicas derivadas de las líneas endogámicas de elite se pueden desarrollar con los métodos de propagación de pedigrí y de selección recurrente descritos anteriormente. Como ejemplo, cuando se utiliza un retrocruce para crear estas líneas derivadas en un programa de propagación de plantas de maíz, se pueden usar endogámicos de elite como una línea progenitora o como material de partida o población fuente y pueden servir como donante o como progenitor recurrente.

Un único híbrido de maíz de cruce resulta de la cruce de dos líneas endogámicas, cada una de las cuales posee un genotipo que complementa al genotipo de la otra. La progenie híbrida de la primera generación se denomina F_1 . En el desarrollo de híbridos comerciales en un programa de propagación de plantas de maíz, se buscan solamente las plantas híbridas F_1 . Los híbridos F_1 preferidos son más vigorosos que sus progenitores endogámicos. Este vigor híbrido o heterosis, se puede manifestar en muchos rasgos poligénicos, que incluyen un aumento del crecimiento vegetativo y un mayor rendimiento.

El desarrollo de un híbrido de maíz en un programa de propagación de plantas de maíz comprende tres pasos: (1) la selección de plantas de diversos conjuntos de germplasma para las cruces de propagación iniciales; (2) la autopolinización de las plantas seleccionadas a partir de las cruces de propagación para varias generaciones a fin de producir una serie de líneas endogámicas, que aunque son diferentes una de la otra, se propagan realmente y son altamente uniformes; y (3) el cruce de las líneas endogámicas seleccionadas con diferentes líneas endogámicas para producir la progenie híbrida (F_1). Durante el proceso de propagación en el maíz, el vigor de las líneas disminuye. El vigor se restaura cuando dos líneas endogámicas diferentes se cruzan para producir la progenie híbrida (F_1). Una consecuencia importante de la homocigosidad y homogeneidad de las líneas endogámicas es que el híbrido entre un par definido de endogámicos siempre será igual. Una vez indentificados los endogámicos que proporcionan un híbrido superior, la semilla del híbrido se puede reproducir indefinidamente con la condición de que se mantenga la homogeneidad de los progenitores endogámicos.

Un híbrido de cruce único se produce cuando se cruzan dos líneas endogámicas para producir la progenie F_1 . Un híbrido de cruce doble se produce a partir de cuatro líneas endogámicas cruzadas en pares (A X B y C X D) y luego los dos híbridos F_1 se cruzan nuevamente (A X B) X (C X D). Un cruce de híbridos de tres formas se produce a partir de tres líneas endogámicas en donde dos de las líneas endogámicas se cruzan (A X B) y luego el híbrido F_1 resultante se cruza con el tercer endogámico (A X B) X C. Una gran cantidad del vigor del híbrido presentado por los híbridos F_1 se pierde en la siguiente generación (F_2). En consecuencia, la semilla de los híbridos no se utiliza para el stock de plantación.

La producción de semillas híbridas requiere la eliminación o inactivación del polen producido por la progenitora. La eliminación o inactivación incompleta del polen provee el potencial para la autopolinización. Esta semilla inadvertidamente autopolinizada puede ser cosechada involuntariamente y envasada con las semillas híbridas.

5 Una vez plantada la semilla, es posible identificar y seleccionar estas plantas autopolinizadas. Las plantas autopolinizadas serán genéticamente equivalentes a la línea endogámica hembra usada para producir el híbrido.

10 Generalmente, estas plantas autopolinizadas se pueden identificar y seleccionar debido a su vigor disminuido. Las autopolinizadoras hembras se identifican por su apariencia de menor vigor para las características vegetativas y/o reproductivas, con inclusión de la altura más corta de la planta, el tamaño menor de la espiga, la forma de la espiga y del grano, el color de la mazorca, u otras características.

15 La identificación de estas líneas autopolinizadas también se puede lograr a través de análisis de marcadores moleculares. Véase, "The Identification of Female Selfs in Hybrid Maize: A Comparison Using Electrophoresis and Morphology", Smith, J. S. C. y Wych, R. D., Seed Science and Technology 14, págs. 1-8 (1995). A través de estas tecnologías, la homocigosidad de la línea autopolinizada se puede verificar mediante el análisis de la composición alélica en diversos lugares a lo largo del genoma. Estos métodos permiten la identificación rápida de la invención descrita en la presente. Véase también, "Identification of Atypical Plants in Hybrid Maize Seed by Postcontrol and Electrophoresis" Sarca, V. et al., Probleme de Genetica Teoritica si Aplicata Vol. 20 (1) p. 29-42.

20 Como será fácilmente evidente para un experto en la técnica, lo expuesto precedentemente constituye solamente algunas de las diversas maneras por las que se puede obtener el endogámico de la presente invención por aquellos que desean introgresar el genotipo transgénico de la invención en otras líneas de maíz. Otros medios disponibles y los ejemplos indicados anteriormente son solo ilustrativos.

25 Los siguientes ejemplos tienen por fin simplemente ilustrar una o más realizaciones preferidas de la invención y no han de interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1. Transformación y Selección del Evento MIR162

El evento MIR604 se produjo por la transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea de maíz patentada (*Zea mays*). Los embriones inmaduros se transformaron esencialmente de acuerdo con lo descrito en Negrotto *et al.* (Plant Cell Reports 19: 798-803, 2000), con el uso de un fragmento de ADN del plásmido pNOV1300 (SEQ ID NO: 3). El pNOV1300 contiene una secuencia de nucleótidos que comprende casetes de expresión en tándem. El primer casete de expresión comprende una región de promotor ZmUbilnt de un gen de poliubiquitina de *Zea mays*, que contiene el primer intrón (GenBank® Número de acceso S94464) unido operablemente a una secuencia codificadora de *vip3Aa19* unida además operablemente a un intrón PEPC #9 del gen fosfoenolpiruvato carboxilasa (GenBank® Número de acceso X15239) de *Zea mays* (Matsuoka y Minami, 1989. European J. Of Biochem. 181:593-598) y una secuencia terminadora 35S del ARN 35S del genoma del virus mosaico del coliflor (Similar a GenBank®, Número de acceso AF140604). Su función consiste en proveer una secuencia de poliadenilación (Franck *et al.*, 1980. Cell 21:285-294). El gen de *vip3Aa19* en pNOV1300 comprende una secuencia codificadora de *vip3Aa* sintética optimizada de maíz (Estruch, *et al.*, 1999.) que se sintetizó para alojar al uso del codón preferido para el maíz (Murray *et al.*, 1989). La secuencia codificadora de *vip3Aa19* sintética utilizada en las transformaciones de la planta codifica a la secuencia de aminoácido idéntica como la secuencia codificadora de *vip3Aa1* nativa hallada en la cepa de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* AB88 (Patente de invención estadounidense 5.877.012), con la excepción de la diferencia de un solo aminoácido en la posición 284; la secuencia codificadora de *vip3Aa1* nativa codifica lisina, mientras que la secuencia codificadora de *vip3Aa19* sintética codifica glutamina en esta posición. La secuencia codificadora de *vip3Aa19* codifica una proteína de control de insectos, Vip3Aa19 que provee resistencia a los insectos lepidópteros. El segundo casete de expresión comprende un promotor de ZmUbilnt unido operablemente a una secuencia codificadora de *pmi* (también conocida como *E.coli manA*) que codifica fosfomanosa isomerasa (GenBank® Número de acceso M15380), que cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato (Negrotto *et al.*, 2000). La secuencia codificadora de *pmi* está también unida operablemente a una secuencia de poliadenilación y terminación de transcripción de extremo 3' de nopalina sintasa.

55 Los embriones inmaduros se extirparon de espigas de 8-12 días de edad y se enjuagaron con un medio fresco para prepararlos para la transformación. Los embriones se mezclaron con la suspensión de células de *Agrobacterium* que albergaban al vector de transformación pNOV1300, se sometieron a vórtex durante 30 segundos, y se dejaron incubar durante otros 5 minutos más. Se aspiró el exceso de solución que contenía *Agrobacterium* y los embriones se transfirieron luego a placas que contenían un medio de cultivo no selectivo. Los embriones se cocultivaron con el resto de *Agrobacterium* a 22°C durante 2-3 días en la oscuridad. Los embriones se transfirieron a un medio de cultivo complementado con ticarcilina (100 mg/ml) y nitrato de plata (1,6 mg/l) y se incubaron en la oscuridad durante 10 días. Los embriones que produjeron un callo embriogénico se transfirieron al medio de cultivo celular que contenía manosa.

Las plántulas regeneradas se sometieron a prueba mediante un análisis de PCR TAQMAN® (véase el Ejemplo 2) para determinar la presencia de ambos genes *pmi* y *vip3Aa19*, así como también la ausencia del gen de espectinomicina (*spec*) resistente a los antibióticos. Se descubrió luego (Véase el Ejemplo 4 más adelante) que durante el proceso de transformación, se introdujeron dos mutaciones en la secuencia codificadora de *vip3Aa19*, una de las cuales resultó en un cambio de aminoácidos en la proteína Vip3Aa19. Por lo tanto, esta nueva secuencia codificadora de *vip3Aa*, que es única para el evento MIR162, se denominó *vip3Aa20*. La secuencia codificadora *vip3Aa20* codifica la isoleucina en la posición 129 en lugar del residuo de metionina codificado por el gen *vip3Aa19*.

Las plantas positivas para ambos transgenes, y las negativas para el gen *spec*, se transfirieron al invernadero para su propagación. Los eventos positivos se identificaron y se cribaron con el uso de bioensayos para insectos contra el gusano cogollero. Los eventos insecticidas se caracterizaron para el número de copia mediante el análisis TAQMAN. El MIR162 se eligió para otro análisis por tener una sola copia de transgenes, una buena expresión de proteínas de acuerdo con lo identificado por ELISA, y una buena actividad insecticida contra el gusano cogollero.

El pedigrí de propagación del evento MIR162 fue de la siguiente manera: T₀ planta de MIR162 (x NPH8431)→→ NPH8431 (MIR162) F₁ (x NP2161)→NP2161(MIR162) F₁ (x NP2161)→NP2161 (MIR162) BC1F₁ (x B9620)→F₁ (x B9620)→BC1F₁ (x B9620)→BC2F₁ (x B9620)→BC3F₁ (x B9620)→BC4F₁ (x B9620). El material vegetal de la generación BC4 se utilizó para el análisis Southern, la determinación del número de copias y el secuenciamiento del ADN de inserción. Los controles negativos para los experimentos consistieron en 10 vegetales segregantes negativos de la generación BC4.

Ejemplo 2. Detección de MIR162 por PCR TAQMAN

El análisis TAQMAN se realizó esencialmente del modo descrito en Ingham *et al.* (Biotechniques, 31:132-140, 2001) En resumen, el ADN genómico se aisló de las hojas de plantas de maíz transgénicas y no transgénicas con el uso de un conjunto de extracción de ADN genómico Puregene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN) esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que todos los pasos se realizaron en placas de 96 pocillos de 1,2 ml. El pellet de ADN seco se resuspendió en tampón de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM).

Las reacciones de PCR TAQMAN se realizaron en placas de 96 pocillos. Para el control de genes de maíz endógenos, se diseñaron cebadores y sondas específicos para la secuencia codificadora de alcohol deshidrogenasa de *Zea mays* (*adh1*) (Genbank Número de acceso AF044295). El experto en la técnica reconocerá que se pueden usar otros genes de maíz como controles endógenos. Las reacciones se multiplexaron para amplificar simultáneamente la *vip3Aa* y *adh1* o *pmi* y *adh1*. Para cada muestra, una mezcla maestra combinando 20 µL de ADN genómico extraído se generó con 35 µL 2x de mezcla maestra de PCR TAQMAN Universal (Applied Biosystems) complementado con cebadores hasta una concentración final de 900 nM cada uno, sondas hasta una concentración final de 100 nM cada una, y agua hasta un volumen final de 70 µL. Esta mezcla se distribuyó en tres réplicas de 20 µL cada una en placas de amplificación de 96 pocillos y se sellaron con una película de sellado térmico ópticamente transparente (Marsh Bio Products). La PCR se llevó a cabo en el instrumento ABI Prism 7700 con los siguientes parámetros de amplificación: 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

Los resultados del análisis TAQMAN demostraron que el evento MIR162 presentó una copia del gen *vip3Aa20* y una copia del gen *pmi*.

Los cebadores y las sondas que se usaron en las reacciones de PCR TAQMAN se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados en el ensayo TAQMAN.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Secuencia No:
Vip3Aa-hacia adelante	5'CACCTTCAGCAACCCGAACTA3'	SEQ ID NO: 4
Vip3Aa –inversa	5'GCTTAGCCTCCACGATCATCTT3'	SEQ ID NO: 5
Vip3Aa –sonda	5'GTCCTCGTGCCTGCCCTTCACCT3' (etiqueta 5' = FAM, etiqueta 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 6
PMI-hacia adelante	5'CCGGGTGAATCAGCGTTTT3'	SEQ ID NO: 7
PMI-inversa	5'GCCGTGGCCTTTGACAGT3'	SEQ ID NO: 8
PMI-sonda	5'TGCCGCCAACGAATCACCGG3' (etiqueta 5' = FAM, etiqueta 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 9
ZmADH-267 hacia adelante	5'GAACGTGTGTTGGGTTTGCAT3'	SEQ ID NO: 10
ZmADH-337 inversa	5'TCCAGCAATCCTTGACCTT3'	SEQ ID NO: 11
ZmADH-316 sonda	5'TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA3' (etiqueta 5' = TET, etiqueta 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 12

Ejemplo 3. Detección de MIR162 por Southern Blot

5 El ADN genómico que se utiliza para el análisis southern se aisló del tejido de hoja extraído de 10 plantas que representaba la generación BC4 del MIR162 con el uso esencialmente del método de Thomas *et al.* (Theor. Appl. Genet. 86:173-180, 1993). Todas las plantas usadas para el aislamiento de ADN se analizaron individualmente con PCR TAQMAN (como se describe en el Ejemplo 2) para confirmar la presencia de una sola copia del gen *vip3Aa20* y del gen *pmi*. Para los controles segregantes negativos, se aisló ADN de un tejido de hoja extraído de segregantes negativos de la generación BC4. Estas plantas segregantes negativas se analizaron individualmente con el uso de PCR TAQMAN para confirmar la ausencia de los genes *vip3Aa20* y *pmi*, pero fueron, tal como se esperaba, positivas para el gen *adh1* de maíz endógeno.

15 El análisis Southern se realizó con el uso de técnicas de biología molecular convencionales. (Véase Chomczynski, P. 1992. Analytical Biochemistry 201:34-139). El ADN genómico DNA (7,5 µg) se digirió con las enzimas de restricción que digieren dentro del inserto del evento MIR162, pero no dentro de la secuencia codificadora que corresponde a la sonda específica utilizada en el experimento. Esta estrategia permitió la determinación de la cantidad de copias de cada gen, que corresponde a la sonda específica utilizada para cada análisis Southern, que se incorporó en el evento MIR162.

20 Se realizó otra serie de digestiones de restricción en las que el inserto se digirió con enzimas de restricción que liberarían un fragmento de tamaño conocido del inserto. Esta estrategia proveyó una prueba adicional para la presencia de una sola copia de cada secuencia codificadora presente en MIR162 y permitió la detección de copias parciales del inserto que pueden estar unidas estrechamente al inserto de MIR162. Luego de una electroforesis de gel de agarosa y la transferencia alcalina a una membrana de GT Zeta-Probe® (Bio-Rad, Cat. No. 162-0195), se realizaron hibridaciones con sondas de elementos generados por PCR de longitud completa. Las sondas se etiquetaron con cebación aleatoria via ³²P con el sistema MegaPrime™ (Amersham Biosciences, Cat. No. RPN1607). La hibridación se realizó a 65°C, seguida de múltiples lavados en 2X SSC, 0,1% de SDS y luego 0,1X de SSC y 0,1% de SDS. Las membranas se sometieron luego a autorradiografía.

30 Se incluyeron en cada análisis Southern tres muestras de control: (1) ADN del segregante negativo (no transformado) usado para identificar cualesquiera secuencias de *Zea mays* endógenas que pudieran hibridarse por cruzamiento con la sonda de elemento específico; (2) se introdujo ADN de un segregante negativo en el que se introduce una cantidad de pNOV1300 digerido que es igual a un número de copias basado en el tamaño del plásmido para demostrar la sensibilidad del experimento para detectar una sola copia del gen dentro del genoma de *Zea mays*; y (3) el plásmido pNOV1300 digerido igual a un número de copias basado en el tamaño del plásmido, para actuar como un control positivo para la hibridación, así como también para demostrar la sensibilidad del experimento.

40 Los resultados de los análisis Southern demostraron que el inserto de MIR162 contiene una sola copia del gen *vip3Aa20* y del gen *pmi* y no contiene ninguna secuencia de estructura principal de pNOV1300. Una sonda de *vip3Aa19* (SEC ID NO: 13) se utilizó para el análisis Southern de *vip3Aa20*. Las secuencias de nucleótidos de *vip3Aa19* y *vip3Aa20* difieren por dos nucleótidos y son un 99,9% idénticas. Por lo tanto, la sonda de *vip3Aa19* se hibridó a la secuencia de *vip3Aa20* presente en MIR162 bajo condiciones rigurosas. Con el uso de la sonda de *vip3Aa19*, un digerido *KpnI* y un digerido *EcoRV* resultaron en bandas de una sola hibridación de aproximadamente 8 kb y 13 kb de tamaño, respectivamente. Además, un doble digerido de *NcoI* resultó en una sola banda de hibridación coherente con el tamaño esperado de 4,6 kb. Con el uso de la sonda de *pmi* (SEC ID NO: 14), un digerido *Acc65I* y un digerido *BamHI* resultaron en bandas de hibridación única de aproximadamente 4 kb y 6 kb de tamaño, respectivamente. Además, un doble digerido *XmaI* + *HindIII* resultó en una banda de hibridación única coherente con el tamaño esperado de 8,1 kb. La banda de 8,1 kb, *XmaI* + *HindIII*, de pNOV1300 (control positivo) también hibridó con las sondas de *vip3Aa19* y *pmi* de acuerdo con lo esperado. Alguna hibridación cruzada se detectó en las franjas del plásmido solamente con la sonda de la escalera del ADN. Las escaleras de ADN generalmente comercialmente disponibles pueden contener algunas secuencias de vectores que pueden tener una hibridación cruzada con las secuencias de control del plásmido de acuerdo con lo observado en estos experimentos, pero ello no impacta en los hallazgos de este estudio. Finalmente, una sonda de estructura principal de pNOV1300 no se hibridó, lo cual demuestra la ausencia de incorporación de cualquier secuencia de estructura principal del vector de pNOV1300 en MIR162 durante el proceso de transformación.

Ejemplo 4. Secuenciamiento del inserto de ADN heterólogo

60 Se determinó que la secuencia de nucleótidos de las secuencias codificadoras de *vip3Aa* y *pmi* en la molécula de ADN heteróloga insertada en MIR162 demuestra una integridad total del inserto, contigüidad de los elementos funcionales y la detección de cualquier cambio en el par de bases individual. Las secuencias codificadoras se amplificaron a partir del ADN derivado de la generación BC4. La amplificación por PCR se realizó con el sistema de PCR de Expansión de Alta Fidelidad (Expand High Fidelity PCR system, Roche, Cat. No. 1732650) o polimerasa de ADN de alta fidelidad de comienzo caliente *PfuUltra*™ (Hotstart High-Fidelity DNA polymerase) (Stratagene, Cat. No. 600390). Cada producto de la PCR se clonó individualmente en cualquiera de los vectores pCR®-XL-TOPO (Invitrogen, Cat. No. K4700-20) o pCR®-BluntII-TOPO (Invitrogen, Cat. No. K2800-20) y se identificaron tres clones separados para cada producto de PCR y se

- 5 secuenciaron. El secuenciamiento se realizó con el analizador ABI3730XL con ABI BigDye® 1,1 o con la química de Big Dye 3.1 dGTP (para las plantillas ricas en GC). El análisis de las secuencias se realizó con el paquete Phred, Phrap, y Consed de la Universidad de Washington y se realizó hasta una velocidad de error inferior a 1 en 10.000 bases (Ewing & Green, 1998. Genome Research 8:186-194). La secuencia de consenso final para cada gen se determinó combinando los datos de la secuencia de los tres clones individuales para generar una secuencia de consenso para cada gen. La alineación de secuencias se realizó con el programa ClustalW con los siguientes parámetros: matriz de clasificación blosum55, falla de apertura de espacio 15, falla de extensión de espacio 6,66 (Thompson *et al*, 1994. Nucleic Acids Research 22:4673-4680).
- 10 La secuencia codificadora completa de *vip3Aa20* se amplificó mediante PCR con los cebadores MOV3Aa-01-5': 5'ATGAACAAGAACAACACCAA3' (SEC ID NO: 15) y MOV3Aa-01-3': 5'CTACTTGATGCTCACGTCGTAG3' (SEC ID NO: 16) y la enzima *PfuUltra Hotstart* generando un producto 2370bp. El amplicón de la PCR se secuenció con los cebadores mostrados en la Tabla 2.

15 Tabla 2.

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Secuencia No.
b03503b	ACGAGCAGAACCAGGTGC	SEC ID NO: 17
b03503c	GGTGAAGAAGGACGGCAG	SEC ID NO: 18
b03503d	ACCTGTCGCAAGCTGCTGGG	SEC ID NO: 19
b03503e	TGGACAAGCTGCTGTGTC	SEC ID NO: 20
b03503f	TGCAGGCCGACGAGAACAG	SEC ID NO: 21
b03503g	TGATCCAGTACACCGTGAA	SEC ID NO: 22
b03503h	ACCCTGACCCTGTACCAG	SEC ID NO: 23
b03504b	GTGTTGCCGCTGATGTTG	SEC ID NO: 24
b03504c	CGTACTCGGTCTTCGGCT	SEC ID NO: 25
b03504d	CTGCAGGCCAAAGCCGTT	SEC ID NO: 26
b03504e	TCGCCGTAGATCACCTCG	SEC ID NO: 27
b03504f	GCTTGCGACAGGTGGTCA	SEC ID NO: 28
b03504g	TTGCTGCTGGTCTCGGTGG	SEC ID NO: 29
b03504h	CGTTGGCGATCTTAAGGAT	SEC ID NO: 30
b00203c	GCAAGCCATCGATTAC	SEC ID NO: 31
b00203d	GCAACACCCTGACCCTG	SEC ID NO: 32
b00203e	TCTACGACGTGAGCATCAAG	SEC ID NO: 33
b00203f	GTAGAAGTGCACGATCGGG	SEC ID NO: 34
b00203g	CGGTGCTGGTCCAGTTG	SEC ID NO: 35

- 20 Otras dos reacciones de PCR se superpusieron con la secuencia codificadora completa de *vip3Aa20*. El extremo 5' de *vip3Aa20* se cubrió con una amplificación de PCR con los cebadores 162INSERT-F2: 5'ACACCAATGATGCAAATAGGC3' (SEC ID NO: 36) y VIP_R4 5'GAAGGTGTTTCAGGTAGAAGTCTCGAAG3' (SEC ID NO: 37) y con la enzima de expansión de alta fidelidad. La segunda reacción cubrió el extremo 3' de *vip3Aa20*; el producto se amplificó con los cebadores VIP-F3: 5'GGTGCTGTTTCAGAGAAGAGGT3' (SEC ID NO: 42) y PMI_REV1: 5'CGATTTATCACTCTCAATCACAT3' (SEC ID NO: 43) y la enzima de expansión de alta fidelidad. Los amplicones generados por estas reacciones comprendieron una secuencia de nucleótidos de 2946 bp (SEC ID NO: 38) y una secuencia de nucleótidos de 2577 bp (SEC ID NO: 44), respectivamente.

30 Los datos de la secuencia de consenso revelaron dos cambios de nucleótidos en la secuencia codificadora de *vip3Aa* en MIR162 (denominada *vip3Aa20*) en comparación con la secuencia codificadora de *vip3Aa* en pNOV1300 (denominada *vip3Aa19*), que se utilizó para transformar el MIR162. El primer cambio de nucleótidos, una mutación de G a T, se produjo en la posición 387 de la secuencia codificadora *vip3Aa19* (SEC ID NO: 3). Esta mutación resultó en que la metionina en la posición 129 de la *Vip3Aa19* cambió a isoleucina en la *Vip3Aa20* (M129I). El segundo cambio de nucleótidos se produjo en la posición 1683 de la secuencia codificadora, una mutación de G a C, pero no resultó en un cambio de aminoácidos. Por lo tanto, la secuencia codificadora *vip3Aa20* y la proteína *Vip3Aa20* son únicas para el evento MIR162 y se pueden usar para identificar cualquier planta que comprenda al genotipo transgénico MIR162. El MIR162 de la secuencia codificadora de *pmi* fue idéntico a aquel del plásmido de transformación pNOV1300. Una alineación de las proteínas insecticidas de *Vip3Aa20* y *Vip3Aa19* se muestra en la Tabla 3.

40 Tabla 3. Comparación de las secuencias de aminoácidos *Vip3Aa20* y *Vip3Aa19*

Nombre	Alineación de Secuencias
<i>Vip3Aa20</i>	(1) MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNIGYGFATGIKDIMNMIFKTDGGDLTLDE
<i>Vip3Aa19</i>	(1) MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNIGYGFATGIKDIMNMIFKTDGGDLTLDE

	Vip3Aa20	(51) ILKNQQLLNDISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTELSKEILKIANEQNQVL
	Vip3Aa19	(51) ILKNQQLLNDISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTELSKEILKIANEQNQVL
5	Vip3Aa20	(101) NDVNNKLD AINTMLRVYLPKITSMLS DV I KQNYALSLQIEYLSKQLQEIS
	Vip3Aa19	(101) NDVNNKLD AINTMLRVYLPKITSMLS DV M KQNYALSLQIEYLSKQLQEIS
	Vip3Aa20	(151) DKLDIINVNLIN STLTEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETSSKVKKDG
10	Vip3Aa19	(151) DKLDIINVNLIN STLTEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETSSKVKKDG
	Vip3Aa20	(201) SPADILDELTELELAKSVTKNDVDGFEFYLNTFHDVMVGNLNFGRSALK
	Vip3Aa19	(201) SPADILDELTELELAKSVTKNDVDGFEFYLNTFHDVMVGNLNFGRSALK
15	Vip3Aa20	(251) TASELITKENVKTS GSEVGNVYNFLIVLTALQAQAFLLTTTCRKLGLAD
	Vip3Aa19	(251) TASELITKENVKTS GSEVGNVYNFLIVLTALQAQAFLLTTTCRKLGLAD
	Vip3Aa20	(301) IDYTSIMNEHLNKEKEEF RVNLP TLSNTF SNPNYAKVKGSD EDAKMIVE
	Vip3Aa19	(301) IDYTSIMNEHLNKEKEEF RVNLP TLSNTF SNPNYAKVKGSD EDAKMIVE
20	Vip3Aa20	(351) AKPGHALIGFEISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLL
	Vip3Aa19	(351) AKPGHALIGFEISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLL
	Vip3Aa20	(401) CPDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKMKMKT LRYEVTANFYDSSTGEI
25	Vip3Aa19	(401) CPDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKMKMKT LRYEVTANFYDSSTGEI
	Vip3Aa20	(451) DLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVY MPLGVIS EFLTPINGFGLQADENS
	Vip3Aa19	(451) DLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVY MPLGVIS EFLTPINGFGLQADENS
30	Vip3Aa20	(501) RLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLE
	Vip3Aa19	(501) RLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLE
	Vip3Aa20	(551) PWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKP KTEYVIQYT
	Vip3Aa19	(551) PWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKP KTEYVIQYT
35	Vip3Aa20	(601) VKGKPSIHLK DENTGYIHYEDTNNNLEDYQTINKRFTTG TDLKGVYLILK
	Vip3Aa19	(601) VKGKPSIHLK DENTGYIHYEDTNNNLEDYQTINKRFTTG TDLKGVYLILK
	Vip3Aa20	(651) SQNGDEAWGDNFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTG STNISGNLTLY
40	Vip3Aa19	(651) SQNGDEAWGDNFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTG STNISGNLTLY
	Vip3Aa20	(701) QGGRGILKQNLQLDSFSTYRVYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAK
	Vip3Aa19	(701) QGGRGILKQNLQLDSFSTYRVYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAK
45	Vip3Aa20	(751) DVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNNLYGGPIVHFYDVSIK
	Vip3Aa19	(751) DVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNNLYGGPIVHFYDVSIK

El casillero sombreado indica el cambio de aminoácidos.

Ejemplo 5. Análisis de la secuencia de ADN flanqueante

50

Una cantidad de métodos son conocidos por los expertos en la técnica para amplificar las secuencias de ADN desconocidas adyacentes a una región núcleo de la secuencia conocida. Esos métodos incluyen, pero sin limitación, PCR inversa (iPCR) [Ochman et. al., *Genetics* 120:621-623 (1988); Triglia et. al., *Nucleic Acids Res.* 16:8186 (1988)], PCR angosta ("panhandle PCR") [Jones and Winistorfer, *Nucleic Acids Res.* 20:595-600 (1992); Jones y Winistorfer, *Biotechniques* 23:132-138 (1997)], PCR anclada por ligamiento de casetes [Mueller and Wold, *Science* 246:780-786 (1989)], PCR de Vectorette [Riley et. al., *Nucleic Acids Res.* 18:2887-2890 (1990)], PCR de Alu nueva [Puskas et. al., *Nucleic Acids Res.* 22:3251-3252 (1994)] y PCR interlazada asimétrica térmica (TAIL-PCR) [Liu and Whittier, *Genomics* 25:673-681 (1995)].

60

Un método utilizado para amplificar la secuencia de ADN del genoma de maíz que flanquea al ADN heterólogo insertado en el evento MIR162 fue la PCR de vectorette esencialmente como se describe por Riley et al., *Nucleic Acids Res.* 18:2887-2890 (1990).

65

La secuencia flanqueante de 5' y la secuencia de unión se confirmaron con el uso de procedimientos de PCR convencionales. Los siguientes pares de cebadores, o sus complementos, se utilizaron para confirmar la secuencia:

162INSERT-F2: 5'ACACCAATGATGCAAATAGGC3' (SEC ID NO: 36)/ VIP_R4: 5'GAAGGTGTTTCAGGTAGAACTCGAAG3' (SEC ID NO: 37) y CJB179: 5'ATGCAAATAGGCTGGGAATAGTC3' (SEC ID NO: 39)/ CJB134 5'GTACCAGCTTGCTGAGTGGCT3' (SEC ID NO: 40). El amplicón resultante tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO: 41 y comprende la secuencia de unión 5' de SEC ID NO: 45. Se reconocerá que las otras secuencias de cebador se pueden usar para confirmar las secuencias de unión y flanqueantes. Con este método, se descubrió que el inserto de MIR162 era 5' flanqueado por los nucleótidos 1040-1088 de la secuencia genómica de maíz que se muestra en la SEC ID NO: 46.

Una región más grande de la secuencia flanqueadora 5' del evento MIR162 se generó con el conjunto de premezcla Seegene DNA Walking SpeedUp™ Premix siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una primera reacción de PCR se realizó independientemente en cuatro tubos individuales con el cebador FE1002: 5'CGTGACTCCCTTAATTCTCCGCT3' (SEC ID NO: 50) con uno de los cebadores 1, 2, 3 o 4 DW-ACP provistos por el fabricante. Los siguientes reactivos se mezclaron en un tubo de PCR sobre hielo: 100 µg de ADN genómico de MIR162, 4 µl 2,5 µM de DW-ACP (cada uno con DW-ACP 1, 2, 3, o 4), 4 µl 2,5 µM de FE1002, 19 µl de agua destilada, y 25 µl 2X de mezcla maestra SeeAmp™ ACPTM Master Mix II. Los tubos se colocaron en un ciclador térmico precalentado (94°C). La PCR se completó con el siguiente programa: un ciclo a 94°C durante cinco minutos, 42°C durante un minuto, y 72°C durante dos minutos, 30 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 55°C durante 40 segundos, y 72°C durante 90 segundos, y un ciclo a 72°C durante siete minutos. Los productos de la PCR se purificaron con el uso de Exonucleasa I y fosfatasa alcalina de langostino.

Una segunda reacción de PCR se realizó independientemente en cuatro tubos individuales con el cebador FE1003: 5'GATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTT3' (SEC ID NO: 51) con el cebador DW-ACPN provisto por el fabricante del conjunto. Los reactivos siguientes se mezclaron en un tubo de PCR sobre hielo: 3 µl de producto de PCR purificado, 1 µl 10 µM de DW-ACPN, 1 µl 10 µM de FE1003, 5 µl de agua destilada, y 10 µl 2X de mezcla maestra SeeAmp™ ACPTM Master Mix II. Los tubos se colocaron en un ciclador térmico precalentado (94°C). La PCR se completó con el siguiente programa: un ciclo a 94°C durante cinco minutos, 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C durante 40 segundos, y 72°C durante 90 segundos, y un ciclo a 72°C durante siete minutos.

Una tercera reacción de PCR se realizó independientemente en cuatro tubos individuales con el cebador FE1004: 5'GATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTT3' (SEC ID NO: 52) con el cebador Universal provisto por el fabricante. Se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo de PCR sobre hielo: 2 µl de producto de PCR purificado, 1 µl de cebador Universal 10 µM, 1 µl de FE1004 10 µM, 6 µl de agua destilada, y 10 µl de 2X mezcla maestra SeeAmp™ ACPTM Master Mix II. Los tubos se colocaron en un ciclador térmico precalentado (94°C). La PCR se completó con el siguiente programa: un ciclo a 94°C durante cinco minutos, 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C durante 40 segundos, y 72°C durante 90 segundos, y un ciclo a 72°C durante siete minutos.

Diez µl de los productos de la PCR se analizaron sobre un 1% de gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. La banda adecuada se extrajo del gel de agarosa y se purificó con un conjunto de extracción de gel Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se clonó en un vector de clonación TOPO-XL de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este clon se transformó en *E. coli*, y el ADN del plásmido se extrajo de las células al otro día cultivado con un conjunto Qiagen Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este plásmido se utilizó para el secuenciamiento del análisis final.

Se diseñó un nuevo cebador dentro de la secuencia nueva conocida previamente para utilizarse con un cebador en el inserto de ADN heterólogo para amplificar el 1 kb completo de la secuencia flanqueante fuera del ADN genómico. El cebador de la secuencia flanqueante 162DWConf3: 5'CCTGTGTTGTTGGAACAGACTTCTGTC3' (SEC ID NO: 53) y el cebador del ADN del inserto FE0900: 5'GGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTC3' (SEC ID NO: 54) se utilizaron para amplificar una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia flanqueante 5' para la confirmación. La secuencia del amplicón resultante se encuentra establecida en la SEC ID NO: 55. Este amplicón 5' comprende la secuencia de unión de 5' establecida en la SEC ID NO: 45. Diez µl del producto de la PCR (amplicón) se analizaron sobre un 1% de gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. La banda adecuada se extrajo del gel de agarosa y se purificó con un conjunto de extracción de gel Qiagen Qiaquick Gel Extraction de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se clonó en un vector de clonación TOPO-XL de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este clon se transformó en ADN del plásmido de *E. coli*. El ADN del plásmido se extrajo de las células al otro día en un medio con un conjunto Qiagen Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron completamente tres plásmidos con los cebadores que se muestran en la Tabla 4. Las secuencias de los plásmidos se alinearon para generar la secuencia flanqueante 5' confirmada. Con el uso de este método, se determinó aproximadamente 1 kb de la secuencia flanqueante 5' (SEC ID NO: 46).

Tabla 4. Secuencias de Cebadores

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Secuencia No.
b00201h	TTCACGGGAGACTTTATCTG	SEC ID NO: 60
b00605a	CCGATTCATTAATGCAG	SEC ID NO: 61
b00701b	ACGTAAAACGGCTTGTC	SEC ID NO: 62

ES 2 473 602 T3

b00702b	GTTTAAACTGAAGCGG	SEC ID NO: 63
b00704h	AATAATATCACTCTGTACATCC	SEC ID NO: 64
b01106f	GTTGTAAAACGACGG	SEC ID NO: 65
b01709f	TAGGCACCCCAGGCTTTA	SEC ID NO: 66
b03504a	AATTGAATTTAGCGGCCG	SEC ID NO: 67
b05102f	GGTCCCTACAACATAAATAG	SEC ID NO: 68
b05102g	TTCGTCCCTACTATCAACGC	SEC ID NO: 69
b05102h	CTTTAGGCATCAGCGGGT	SEC ID NO: 70
b05103a	AGCATCTGCGTAAGCACA	SEC ID NO: 71
b05103b	CTGATGACACCAATGATGC	SEC ID NO: 72
b05103c	GATCAGATTGTCGTTTCCC	SEC ID NO: 73
b05103d	GCATCATTGGTGTCATCAG	SEC ID NO: 74
b05103e	TGTGCTTACGCAGATGCT	SEC ID NO: 75
b05103f	ACCCGCTGATGCCTAAAG	SEC ID NO: 76
b05103g	GCGTTGATAGTAGGGACGAA	SEC ID NO: 77
b05103h	CTATTTATGTTGTAGGGACC	SEC ID NO: 78
b05210a	CTAGACTGAAAAGCGGAG	SEC ID NO: 79
b05210b	CCACTTTCATCCCTAGTTG	SEC ID NO: 80

La secuencia flanqueante 3' del evento MIR162 se generó con el uso del conjunto Clonotech GenomeWalker™ Universal (Clonotech Laboratories, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5

En primer lugar, se construyeron conjuntos de fragmentos de ADN genómico ligados a adaptadores, no clonados, conocidos como "colecciones" de GenomeWalker. Cada colección se construyó mediante la digestión del ADN genómico de MIR162 con una enzima de restricción (*Dral*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*, y *XmnI*) de la siguiente manera: Por ejemplo, 25 µl de ADN genómico de MIR162 (0,1 µg/µl), 8 µl de la enzima de restricción (10 unidades/µl), 10 µl del tampón de la enzima de restricción (10X), y 57 µl de H₂O destilada se mezclaron en un tubo y se incubaron a 37°C durante la noche.

10

El ADN se purificó luego con varias rondas de extracción de fenol/cloroformo. Finalmente, el ADN se precipitó y se lavó con etanol, se secó y se disolvió en 20 µl de tampón de TE.

15

Para ligar los extremos del Adaptador de GenomeWalker al ADN genómico de MIR162, se mezclaron 4 µl del ADN genómico purificado digerido, con 1,9 µl del Adaptador de GenomeWalker (25 µM), 1,6 µl 10X de Tampón de Unión, y 0,5 µl T4 de Ligasa de ADN (6 unidades/ µl). Estas reacciones se incubaron durante la noche a 16°C. Las reacciones se detuvieron con la incubación a 70°C durante cinco minutos. Luego de detenida la reacción, se agregaron 72 µl de TE a cada tubo, y los contenidos se mezclaron completamente.

20

Una primera reacción de PCR se realizó con el cebador AP1, provisto por el fabricante, con diferentes cebadores diseñados dentro de la secuencia heteróloga de ADN del inserto conocida (Ronda 1 "cebadores específicos del gen" o "GSP1"). Los siguientes reactivos se mezclaron en un tubo de PCR sobre hielo: 1 µl de la colección de ADN de MIR 162 adecuada, 1 µl de AP1 10 µM, 1 µl de GSP1 10 µM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 5 µl de 10X Tampón de PCR Advantage 2, 1 µl de Polimerasa de BD Advantage 2, y 40 µl de agua destilada. La PCR se completó con el siguiente programa: siete ciclos a 94°C durante 25 segundos y 72°C durante cuatro minutos, 32 ciclos a 94°C durante 25 segundos y 67°C durante cuatro minutos, y un ciclo a 67°C durante cuatro minutos. Cada reacción de PCR primaria se diluyó 50 veces mediante el agregado de 1 µl del producto de PCR primario con 49 µl de agua destilada. Las reacciones que funcionaron fueron (1) las colecciones de *Dral* y *XmnI* con el cebador de GSP1 162GW3F1: 5'TCTCTTGCTAAGCTGGGAGCTCGATCCG3' (SEC ID NO: 56) y el cebador AP1.

25

30

Una segunda reacción de PCR se realizó independientemente con el cebador AP2, provisto por el fabricante con diferentes cebadores diseñados dentro de la secuencia de ADN del inserto heteróloga (Ronda 2 "cebadores específicos del gen" o "GSP2"). Los siguientes reactivos se mezclaron en un tubo de PCR sobre hielo: 1 µl del producto de PCR primario diluido adecuado, 1 µl de AP2 10 µM, 1 µl de GSP2 10 µM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 5 µl de 10X Tampón de PCR Advantage 2, 1 µl de Polimerasa de BD Advantage 2, y 40 µl de agua destilada. La PCR se completó con el siguiente programa: cinco ciclos a 94°C durante 25 segundos y 72°C durante cuatro minutos, 20 ciclos a 94°C durante 25 segundos y 67°C durante cuatro minutos, y un ciclo a 67°C durante cuatro minutos. Las reacciones que funcionaron fueron: (1) las colecciones de *Dral* y *XmnI* con el cebador de GSP2 162GW3F2: 5'AAGATTGAATCCTGTTGCCGTCTTGCG3' (SEC ID NO: 57) y el cebador AP2.

35

40

Diez µl de los productos de la PCR se analizaron sobre 1% de gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. La banda adecuada se extrajo del gel de agarosa y se purificó con un conjunto de extracción de gel Qiagen Qiaquick de

acuerdo con las instrucciones del cliente. El ADN extraído se clonó en un vector de clonación TOPO-XL de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este clon se transformó en *E. coli*, y el ADN del plásmido se extrajo de las células luego de un cultivo durante la noche con un conjunto Qiagen Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este plásmido se secuenció con el uso del secuenciamiento del análisis final.

5 Un nuevo cebador se diseño dentro de la nueva secuencia, previamente desconocida, para utilizarse con un cebador en el ADN del inserto a fin de amplificar aproximadamente 1 kb de la secuencia flanqueante 3' hacia afuera del ADN genómico. El cebador del ADN del inserto 162GW3F1: 5'TCTCTTGCTAAGCTGGGAGCTCGATCCG3' (SEC ID NO: 56) y un cebador de la secuencia flanqueante 3' 1623'GWR1: 5CTGGTGAACCGATTTTTACGGAGG3' (SEC ID NO: 58) se utilizaron para amplificar una molécula de ácido nucleico que comprendía la secuencia flanqueante 3' para la confirmación. La secuencia del amplicón resultante se encuentra establecida en la SEC ID NO: 59. Este amplicón de 3' comprende la secuencia de unión 3' establecida en la SEC ID NO: 47. Diez µl del amplicón de la PCR se analizaron sobre 1% de gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. La banda adecuada se extrajo del gel de agarosa y se purificó con un conjunto de extracción de gel Qiagen Qiaquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se clonó en un vector de clonación TOPO-XL de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este clon se transformó en *E. coli*. El ADN del plásmido se extrajo de las células luego de un cultivo durante la noche en un medio con un conjunto Qiagen Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron completamente tres plásmidos con los cebadores que se muestran en la Tabla 5. Las secuencias del plásmido se alinearon para generar la secuencia flanqueante 3' completa confirmada (SEC ID NO: 48).

Tabla 5. Secuencias del Cebador

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Secuencia No.
b00106a	GATTGAATCCTGTTGCC	SEC ID NO: 81
b00106b	TTCATAAATAACGTCATGC	SEC ID NO: 82
b00108a	TCTGTGGATAACCGTATTAC	SEC ID NO: 83
b00201h	TTCACGGGAGACTTTATCTG	SEC ID NO: 60
b00605a	CCGATTCATTAATGCAG	SEC ID NO: 61
b00704h	AATAATATCACTCTGTACATCC	SEC ID NO: 64
b00712e	AGTAACATAGATGACACCGC	SEC ID NO: 84
b01106a	CCAGTGTGCTGGAATTCCG	SEC ID NO: 85
b01106f	GTTGTAAAACGACGG	SEC ID NO: 65
b01107h	CCAGTGTGATGGATATCTGC	SEC ID NO: 86
b01108e	CCAGTGTGCTGGAATTCCG	SEC ID NO: 87
b01111f	CCAGTGTGATGGATATCTGC	SEC ID NO: 88
b01709f	TAGGCACCCAGGCTTTA	SEC ID NO: 66
b02701a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 89
b02701e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 90
b02702a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 91
b02702e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 92
b02703a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 93
b02703e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 94
b02704a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 95
b02811a	GGTCTTGCGATGATTATC	SEC ID NO: 96
b05104c	GAGAGGAATGGCAGCAGA	SEC ID NO: 97
b05104d	CATGACGGGTTTGAGATT	SEC ID NO: 98
b05104e	AATCTCAAACCCGTCATG	SEC ID NO: 99
b05104f	TCTGCTGCCATTCCTCTC	SEC ID NO: 100
b05104g	GATCAACCCGGAGAGGAAT	SEC ID NO: 101
b05104h	CCATGACGGGTTTGAGAT	SEC ID NO: 102
b05105c	CAACCGACCTGACAAGTGAC	SEC ID NO: 103
b05105e	ATCTCAAACCCGTCATGG	SEC ID NO: 104
b05105f	ATTCCTCTCCGGGTTGATC	SEC ID NO: 105

Ejemplo 6. Detección de la Proteína Vip3Aa20 en MIR162 por ELISA

25 Los extractos se prepararon a partir de hojas, raíces, piel, granos, seda, polen, y plantas enteras de MIR 162. Los extractos se analizaron cuantitativamente para determinar la Vip3Aa20 mediante ELISA con el uso de los anticuerpos

5 policlonales anti-Vip3A de cabra purificado por inmunoafinidad y anti-Vip3A de conejo purificado con la Proteína A con los procedimientos ELISA reconocidos en la técnica. La Vip3Aa20 se detectó en todos los tejidos analizados en todas las etapas de crecimiento. El nivel medio de proteína Vip3Aa20 detectado en toda la planta en la antesis y madurez de la semilla fue de 10 µg/g en peso fresco y 16 µg/g en peso fresco, respectivamente. El nivel medio de proteína Vip3Aa20 en las hojas en la antesis fue de 22 µg/g en peso fresco.

Ejemplo 7. Eficacia del MIR162 en el Campo

10 El evento MIR162 se sometió a prueba en el campo para determinar la eficacia contra el gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano del fruto del maíz (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), y la oruga perforadora del maíz europea (ECB, *Ostrinia nubilalis*). El desempeño del evento MIR162 se comparó con aquel de Warrior® (Syngenta, Inc.), un insecticida convencional estándar aplicado a una velocidad de 11,2 g a.i./acre, el evento Bt11 del maíz transgénico, que comprende un gen *cry1Ab*, y un híbrido de Bt11 X MIR162, producido mediante el cruce de una línea endogámica de Bt11 con una línea endogámica de MIR162.

20 Se plantaron veintiocho pruebas en 13 estados que representaban las regiones principales de cultivo de maíz de los Estados Unidos continental. Las pruebas se plantaron en un diseño de bloque completo aleatorio con cuatro lotes replicados por bloque. Los lotes consistían en filas de 17,5 pies por tratamiento por réplica. La densidad de la plantación se fijó en aproximadamente 30.000 plantas/hectárea. Las franjas para inmunodiagnóstico se utilizaron para confirmar la presencia o ausencia de las proteínas Vip3Aa20 y Cry1Ab en los diferentes grupos de tratamiento.

25 Las infestaciones de plagas naturales se utilizaron en pruebas en las que las poblaciones fueron lo suficientemente elevadas; en donde no se realizaron infestaciones artificiales. La infestación artificial con dos larvas de 2^a- a 3^a- instar en V1-V2 se utilizó en las pruebas de BCW. Los lotes se clasificaron a los 3, 7, y 14 días luego de la infestación. El daño producido por BCW se registró como plantas dañadas parcialmente y plantas cortadas completamente. Los lotes de FAW se clasificaron a los 7 y 14 días luego de la infestación o luego de observarse la tercera larva instar en las plantas de control. La siguiente escala se utilizó para evaluar el daño producido en las hojas por FAW y CEW:

30 0.01 – Daño no visible a la hoja
 1 – Daño en forma de orificios pequeños tipo alfiler en unas pocas hojas
 2 – Pequeña cantidad de daño en forma de orificios más grandes del tipo bala en unas pocas hojas
 3 – Daño en forma de orificios tipo bala sobre varias hojas
 35 4 – Daño en forma de orificios tipo bala y lesiones en unas pocas hojas
 5 – Lesiones en varias hojas
 6 – Grandes lesiones sobre varias hojas
 7 – Grandes lesiones y porciones comidas en unas pocas hojas
 8 – Grandes lesiones y porciones comidas en varias hojas
 9 – Grandes lesiones y porciones comidas en la mayoría de las hojas
 40 El daño a las plantas se evaluó para ambas ECB de generaciones primera y segunda. La siguiente escala se utilizó para clasificar el daño de la primera generación, generalmente cuando las larvas se encontraban en la tercera y cuarta instar:
 1 – Ningún daño visible a la hoja
 2 – Pequeña cantidad de lesiones en forma de orificios tipo bala sobre unas pocas hojas
 45 3 – Lesiones en forma de orificios tipo bala comunes en varias hojas
 4 – Varias hojas con orificios tipo bala y lesiones alargadas
 5 – Varias hojas con lesiones alargadas
 6 – Varias hojas con lesiones alargadas de aproximadamente 2,5 cm
 7 – Lesiones largas comunes en aproximadamente la mitad de las hojas.
 50 8 – Lesiones largas comunes en aproximadamente dos tercios de las hojas
 9 – La mayoría de las hojas con lesiones largas

55 El daño producido por ECB de la segunda generación se evaluó a las tres a cuatro semanas luego de la infestación artificial o al final del período pico de puesta de huevos. Se tomaron las siguientes mediciones: cantidad de larvas vivas/tallo, cantidad de larvas vivas /varillas, cantidad de larvas vivas /espiga, cantidad de túneles /tallo, longitud acumulativa de túneles (cm)/tallo, longitud acumulativa de túneles (cm)/varillas, cantidad de túneles /espiga, daño a los granos, longitud de túneles acumulativos (cm)/espiga, y % de plantas infestadas.

60 Las pruebas de CEW se plantaron generalmente tarde a fin de aumentar los niveles de infestación natural. El daño producido por la alimentación a las espigas se evaluó cuando las larvas de CEW en las plantas de control habían alcanzado la etapa de crecimiento L5-L6. Las clasificaciones de las espigas incluyeron el registro de la cantidad de larvas observadas por espiga y la longitud de alimentación visible en el grano medida a partir de la punta de la espiga hasta el grano promedio más bajo destruido.

65

Los resultados de la prueba de campo con BCW se muestran en la Tabla 6. Menos del 3% de las plantas de MIR162 y las plantas de Bt11 X MIR162 fue cortado por las larvas de BCW. Fueron cortadas cantidades significativas de Bt11 y plantas de control. Las plantas que comprendían el genotipo del MIR162 presentaron un daño menor producido por la alimentación de BCW que las plantas tratadas con el insecticida convencional.

5

Tabla 6. Clasificaciones del daño en los tallos a partir de cinco pruebas con BCW a 21 días luego de la infestación. El daño se midió como porcentaje del corte de las plantas totales.

Tratamiento	% de plantas cortadas
MIR162	2
Bt11	42
Bt11 X MIR162	3
Insecticida Warrior	12
Control Negativo	40

10

Los resultados de la prueba de campo de FAW se muestran en la Tabla 7. El daño producido por la alimentación de FAW se midió sobre una escala de 0,01 a 9. El daño por alimentación medio en los híbridos de MIR162 fue muy bajo (< 1) y significativamente menor que el daño promedio observado en el Bt11 y en los tratamientos con insecticidas convencionales. La presión de los insectos en estas pruebas fue pesada con aproximadamente 50 a 100 neonatos de larvas /planta. El Bt11 proveyó alguna protección contra el daño, mientras que el tratamiento con el insecticida convencional no proporcionó ninguna protección presentando la misma cantidad de daño que las plantas de control.

15

Tabla 7. Clasificaciones del daño producido por la alimentación en las hojas a partir de cinco pruebas para FAW. Las clasificaciones de los daños medios a los 14 días luego de la infestación se presentan para cada tratamiento.

20

Tratamiento	Clasificación del Daño Medio en las Hojas (0,01-9)
MIR162	0,0
Bt11	2,52
Bt11 X MIR162	0,84
Insecticida Warrior	3,60
Control Negativo	3,78

Los resultados de estas pruebas para evaluar el daño de ECB de la primera generación se presentan en la Tabla 8. El daño producido por la alimentación de ECB se clasificó sobre una escala de 1-9. En estas pruebas, el MIR162 proporcionó una protección mínima contra el daño por la alimentación de ECB. El Bt11 protegió completamente las plantas contra el daño producido por la alimentación de ECB. Las plantas de Bt11 X MIR162 tuvieron el mismo nivel de protección que las plantas de Bt11. El tratamiento con el insecticida convencional proveyó una mejor protección que el rasgo del MIR162 pero con una protección significativamente menor que la provista por Bt11.

25

Tabla 8. Prueba de campo del daño producido por la alimentación en las hojas. Clasificaciones del daño medio a los 14 días luego de la infestación.

30

Tratamiento	Clasificación del Daño medio en las hojas (1-9)
MIR162	2,95
Bt11	1,00
Bt11 X MIR162	1,00
Insecticida Warrior	2,05
Control Negativo	3,88

Los resultados del daño por ECB de segunda generación se presentan en la Tabla 9. El daño por la alimentación se midió como la longitud de túneles acumulativa en cada tallo de maíz (si se halló más de un túnel, se sumaron las longitudes de los túneles). Los tratamientos con Bt11 y Bt11 x MIR162 proporcionaron una fuerte protección contra la perforación de los tallos, mientras que el tratamiento con MIR162 solo o con el insecticida no proveyó ninguna protección contra la producción de túneles.

35

Tabla 9. Clasificaciones del daño producido en los tallos a partir de siete pruebas para las larvas de ECB de segunda generación medido en longitud de túnel (cm) por tallo. Las mediciones se tomaron tres a cuatro semanas luego de la infestación artificial.

40

Tratamiento	Longitud media del túnel (cm)
MIR162	5,46
Bt11	0,37
Bt11 X MIR162	0,48

Insecticida Warrior	5,06
Control Negativo	5,04

Los resultados de las pruebas para evaluar el daño producido por CEW se presentan en la Tabla 10. El daño causado por la alimentación se clasificó como longitud del daño producido en el grano por espiga, medido desde la punta de la espiga hasta el grano destruido promedio más bajo. Se observó un daño considerable en los lotes de Bt11, insecticida y de chequeo. El Bt11 proporcionó algún nivel de protección en comparación con el de chequeo no tratado y fue equivalente a la protección provista por el tratamiento con el insecticida convencional. El MIR162 y Bt11 X MIR162 proporcionaron una protección casi completa de las espigas contra el daño producido por la alimentación de las larvas de CEW.

Tabla 10. Clasificaciones del daño producido en las espigas a partir de seis pruebas para CEW medido como la longitud promedio del daño producido por la alimentación. Las mediciones se tomaron cuando las larvas de CEW eran L5-L6 en las plantas de chequeo.

Tratamiento	Daño medio en las espigas (cm)
MIR162	0,17
Bt11	2,24
Bt11 X MIR162	0,02
Insecticida Warrior	2,20
Control Negativo	3,42

Ejemplo 8. Eficacia de MIR162 contra el gusano cortador de habichuelas occidental.

Los eventos transgénicos comerciales actuales que producen la proteína Cry1Ab no proporcionaron niveles aceptables de protección contra el gusano cortador de habichuelas occidental (WBCW, *Striacosta albicosta*). Por lo tanto, el MIR162 solo y apilado con otros genotipos transgénicos se sometió a prueba para determinar la eficacia contra WBCW.

Los huevos de WBCW se recogieron de polillas hembras silvestres. Las larvas se alimentaron con una dieta de gusanos cortadores meridicos hasta utilizarse en los experimentos. Las plantas de maíz se cultivaron en el campo. Se evaluaron los siguientes tratamientos: MIR162, Bt11, MIR604, MIR162 X Bt11, MIR162 X MIR604, MIR604 X Bt11, Force® (Syngenta, Inc.), un insecticida convencional aplicado en la plantación a una isolina negativa, y dos isolinas de control negativo. El MIR604 es un evento de maíz transgénico novedoso que comprende un gen *cry3A055* que codifica una proteína que es activa contra las larvas del gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica spp.*) y se encuentra descrito en la publicación de la solicitud de patente de invención estadounidense No. 2005/0216970, publicada el 29 de septiembre de 2005.

Para los experimentos, se cortaron sedas verdes de dos pulgadas y vainas de las espigas de plantas de maíz cultivadas en el campo en cada tratamiento y replicación. Los extremos marrones terminales de las sedas se retiraron y se desecharon las vainas. Aproximadamente 1,5 pulgadas de seda se colocaron en recipientes de plástico de 14 ml individuales. Se colocó luego una larva en cada recipiente y se sellaron los recipientes. Se sometieron a prueba varias etapas diferentes de larvas, que oscilaban entre los estadios de desarrollo tercero a sexto. Los recipientes que contenían sedas y larvas se mantuvieron a luz natural de día y a temperatura ambiente durante los experimentos. Se registró la supervivencia de las larvas luego de 8 días. Los tratamientos se replicaron cuatro veces por experimento.

Los resultados de los experimentos de WBCW se presentan en la Tabla 11. La supervivencia de WBCW en las sedas de las isolinas negativas y el tratamiento con insecticida convencional fue de aproximadamente el 100%. La supervivencia de las larvas de WBCW en las sedas con Bt11 y MIR604, evaluadas solas o en combinación en la misma planta, no fue diferente a la supervivencia sobre las isolinas negativas. La supervivencia de las larvas de WBCW se redujo cuando las larvas se alimentaron con las sedas del MIR162. La combinación del MIR162 X Bt11 en la misma planta no disminuyó la supervivencia más que el MIR162 solo. Sin embargo, de manera sorprendente, cuando el genotipo transgénico del MIR162 se apiló con el genotipo transgénico del MIR604 en la misma planta, la mortalidad de las larvas aumento significativamente en comparación con el MIR162 o MIR604 solos.

Tabla 11. Porcentaje (±SE) de la supervivencia de las larvas de WBCW sobre sedas de maíz.

Tratamiento	Número de experimento						
	1	2	3	4	5	6	7
Bt11	75(25)	75(25)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)
MIR162	25(25)	0(0)	0(0)	50(29)	50(29)	50(29)	0(0)
MIR604					100(0)	100(0)	100(0)
MIR162xBt11	25(25)	25(25)	0(0)	0(0)	25(25)	25(25)	25(25)
MIR162xMIR604					0(0)	25(25)	50(29)

MIR604xBt11							75(25)
Fuerza					100(0)	100(0)	100(0)
Control Neg. #1	100(0)	75(25)	100(0)	100(0)	75(25)	100(0)	100(0)
Control Neg. #2	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)

Ejemplo ilustrativo 9. Uso del sitio de inserción del evento MIR162 para la integración fijada como objetivo en el maíz.

5 Las secuencias flanqueantes de MIR162 descritas en la SEC ID NO: 46 y SEC ID NO: 48 se utilizaron para la búsqueda de las bases de datos genómicas del maíz. Se hallaron combinaciones idénticas para ambas secuencias flanqueantes en un clon de BAC, CH201-307P5, del cromosoma 5 (NCBI Número de acceso AC185313) en el Contig 13 (SEC ID NO: 106). Más específicamente, el inserto de MIR162 está en el cromosoma 5 entre el marcador molecular 5', denominado en la presente como el marcador *Opie2* (nucleótidos 1680-3338 de la SEC ID NO: 106), y un marcador molecular 3', denominado en la presente como marcador *gag* (nucleótidos 43.275-45.086 de la SEC ID NO: 106). Con esta información, se determinó que el ADN heterólogo inserto en el MIR162 desplazó a 58 nucleótidos de ADN genómico de maíz, nucleótidos 25.455 a 25.512 de la SEC ID NO: 106 (también mostrada como SEC ID NO: 107), que está entre la secuencia flanqueante 5' (nucleótidos 1-25.454 de la SEC ID NO: 106) y la secuencia flanqueante 3' (nucleótidos 25.513-51.328 de la SEC ID NO: 106).

15 El desempeño agronómico uniforme del transgen del evento MIR162 respecto de varias generaciones bajo condiciones de campo sugiere que estas regiones identificadas alrededor del sitio de inserción de MIR162 proveen buenas ubicaciones genómicas para la integración dirigida de otros genes transgénicos de interés. Dicha integración dirigida supera los problemas con los llamados “efectos de posición” y el riesgo de crear una mutación en el genoma ante la integración del transgen en el huésped. Otras ventajas de dicha integración dirigida incluyen, pero sin limitación, la reducción de la gran cantidad de eventos de transformación que se deben cribar y probar antes de obtener una planta transgénica que exhiba el nivel deseado de expresión transgénica sin exhibir también anomalías resultantes de la inserción inadvertida del transgen en un lugar importante en el genoma del huésped. Además, dicha integración dirigida permite el apilamiento de transgenes con lo cual la propagación de las líneas de vegetales de elite con ambos genes se torna más eficiente.

30 Con el uso de la enseñanza provista precedentemente, el experto puede utilizar los métodos conocidos en la técnica para dirigir los ácidos nucleicos heterólogos de interés al mismo sitio de inserción en el cromosoma 5 que aquel en el MIR162 o en un sitio en estrecha proximidad al sitio de inserción de MIR162. Un método de esta naturaleza se describe en la Publicación de Patente de Invención estadounidense 20060253918. En síntesis, hasta 20 Kb de la secuencia genómica flanqueante 5' al sitio de inserción (nucleótidos 5.454 a 25.454 de SEC ID NO: 106) y hasta 20 Kb de la secuencia genómica flanqueante de 3' al sitio de inserción (nucleótidos 25.513 a 45.513 de SEC ID NO: 106) se utilizan para flanquear el gen o los genes de interés que se han de insertar en una ubicación genómica sobre el Cromosoma 5 mediante recombinación homóloga. Estas secuencias se pueden flanquear además por repeticiones de borde de T-ADN, como por ejemplo las secuencias de repetición de borde izquierdo (LB) y borde derecho (RB) y otras secuencias estimulantes para aumentar la eficiencia de la administración del T-ADN. El gen o los genes de interés se pueden colocar exactamente en el sitio de inserción de MIR162 o se pueden colocar en cualquier lugar dentro de las regiones de 20 Kb alrededor de los sitios de inserción de MIR162 para conferir un nivel coherente de expresión transgénica sin efectos perjudiciales sobre la planta. Los vectores de ADN que contienen al gen o los genes de interés y las secuencias flanqueantes se pueden administrar en células vegetales mediante uno de los varios métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la transformación mediada por *Agrobacterium*. La inserción del vector de ADN en el sitio objetivo del MIR162 se puede aumentar aún más mediante uno de los varios métodos, que incluyen, pero sin limitación, la coexpresión o regulación ascendente de genes que aumentan la recombinación o la regulación descendente de genes de supresión de la recombinación endógena. Además, se sabe en la técnica que el clivaje de las secuencias específicas en el genoma se puede usar para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga, por lo cual la inserción en el sitio de inserción del MIR162 y sus regiones flanqueantes puede ser aumentada por la expresión de endonucleasas de secuencias específicas diseñadas o naturales para escindir estas secuencias. De esta manera, con el uso de la enseñanza provista en la presente, se puede inertar cualquier ácido nucleico heterólogo sobre el cromosoma 5 del maíz en un sitio objetivo ubicado entre los nucleótidos 25.454 y 45.513 de la SEC ID NO: 106 o un sitio objetivo en la vecindad de este sitio.

Ejemplo ilustrativo 10. Uso del sitio de inserción del evento MIR162 y secuencias flanqueantes para la estabilización de la expresión del gen

55 Las secuencias genómicas que flanquean al sitio de inserción del MIR162 se pueden usar también para estabilizar la expresión de otros genes de interés cuando se insertan como un transgen en otras ubicaciones genómicas en el maíz y otros cultivos. Específicamente, hasta 20 Kb de la secuencia genómica que flanquea a 5' hasta el sitio de inserción (nucleótidos 5.454 a 25.454 de SEC ID NO: 106) y hasta 20 Kb de la secuencia genómica que flanquea a 3' hasta el sitio de inserción (nucleótidos 25.513 a 45.513 de SEC ID NO: 106) se utilizan para flanquear el gen o los genes de interés que se han de insertar en el genoma de las plantas. Estas secuencias se pueden flanquear también por repeticiones de bordes de T-ADN, como por ejemplo secuencias de repetición del borde izquierdo (LB) y del borde

derecho (RB) y otras secuencias estimulantes para aumentar la eficiencia en la administración de T-ADN. El gen o los genes de interés se pueden colocar exactamente en el sitio de inserción del MIR162 o bien se pueden colocar en cualquier lugar dentro de las regiones 20 Kb alrededor de los sitios de inserción de MIR162 para conferir un nivel uniforme de expresión transgénica. Los vectores de ADN que contienen al gen o a los genes de interés y la secuencia flanqueante del sitio de inserción del MIR162 se pueden administrar en las células vegetales mediante uno de los varios métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la transformación de protoplastos, bombardeo balístico, y la transformación mediada por *Agrobacterium*. El ADN administrado se puede integrar aleatoriamente en un genoma de una planta o puede hallarse como parte de las unidades genéticas segregantes independientemente, como por ejemplo, un cromosoma artificial o minicromosoma. Los vectores de ADN que contienen al gen o a los genes de interés y las secuencias flanqueantes del sitio de inserción de MIR162 se pueden administrar en células vegetales. De esta manera, al rodear un gen o genes de interés con la secuencia genómica que flanquea al sitio de inserción de MIR162, la expresión de esos genes se estabiliza en una planta huésped transgénica, como por ejemplo una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea, como el maíz.

15 DEPÓSITO

Los solicitantes han hecho el depósito de la semilla de maíz del evento MIR162 descrito precedentemente el día 23 de enero de 2007, de acuerdo con el Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 1801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 con el número de acceso de la ATCC PTA-8166. El depósito permanecerá en el centro de depósitos por un período de 30 años o 5 años luego de la última solicitud, o durante la duración de la patente de invención, cualquiera sea el mayor, y se reemplazará según lo necesario durante ese período. Los solicitantes no imponen restricciones a la disponibilidad del material depositado por parte de la ATCC. Sin embargo, los solicitantes no tienen facultad para renunciar a cualquier restricción impuesta por ley sobre la transferencia de material biológico o su transporte en el comercio. Los solicitantes no renuncian a ninguna violación de sus derechos otorgados de conformidad con esta Patente de Invención o por la Ley de Protección de Variedades de Plantas (Art. 2321 y siguientes, Título 7, Código de los Estados Unidos).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Syngenta Participations AG
Long, NyKoll
Pulliam, Derrick
Hart, Hope
Bottoms, Jeff
- 10 Meghji, Moez
Que, Qiudeng
- <120> Evento de maiz MIR162
- <130> 71133WOPCT
- <160> 107
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 2370
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Secuencia codificadora de vip3Aa20

ES 2 473 602 T3

<400> 1
atgaacaaga acaacaccaa gctgagcacc cgcgccctgc cgagcttcat cgactacttc 60
aacggcatct acggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
gacaccggcg gcgacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgac 180
atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgatcgc ccagggcaac 240
ctgaacaccg agctgagcaa ggagatcctt aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctg 300
aacgacgtga acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcgcgtgta cctgccgaag 360
atcaccagca tgctgagcga cgtgattaag cagaactacg ccctgagcct gcagatcgag 420
tacctgagca agcagctgca ggagatcagc gacaagctgg acatcatcaa cgtgaacgtc 480
ctgatcaaca gcacctgac cgagatcacc ccggcctacc agcgcacaa gtacgtgaac 540
gagaagtctg aagagctgac cttcgccacc gagaccagca gcaaggtgaa gaaggacggc 600
agccccggccg acatcctgga cgagctgacc gagctgaccg agctggcgaa gagcgtgacc 660
aagaacgacg tggacggcct cgagttctac ctgaacacct tccacgacgt gatggtgggc 720
aacaacctgt tcggccgcag cggcctgaag accgccagcg agctgatcac caaggagaac 780
gtgaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtgtacaact tcctgatcgt gctgaccgcc 840
ctgcaggccc aggccttctc gaccctgacc acctgtcgca agctgctggg cctggccgac 900
atcgactaca ccagcatcat gaacgagcac ttgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg 960
aacatcctgc cgaccctgag caacacctc agcaaccgga actacgcaa ggtgaagggc 1020
agcgcagagg acgccaagat gatcgtggag gctaagccgg gccacgcgtt gatcggcttc 1080
gagatcagca acgacagcat caccgtgctg aaggtgtacg aggccaagct gaagcagaac 1140
taccaggctg acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgctg 1200
tgtccggacc agagcgagca aatctactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtac 1260

ES 2 473 602 T3

gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagaccc tgcgctacga ggtgaccgcc 1320
aacttctacg acagcagcac cggcgagatc gacctgaaca agaagaaggt ggagagcagc 1380
gaggccgagt accgcaccct gagcgcgaac gacgacggcg tctacatgcc actgggctg 1440
atcagcgaga ccttcctgac cccgatcaac ggctttggcc tgcaggccga cgagaacagc 1500
cgcctgatca ccctgacctg taagagctac ctgctgtagc tgctgctagc caccgacctg 1560
agcaacaagg agaccaagct gatcgtgcca ccgagcggct tcatcagcaa catcgtggag 1620
aacggcagca tcgaggagga caacctggag ccgtggaagg ccaacaacaa gaacgcctac 1680
gtcgaccaca ccggcggcgt gaacggcacc aaggccctgt acgtgcacaa ggacggcggc 1740
atcagccagt tcatcggcga caagctgaag ccgaagaccg agtacgtgat ccagtacacc 1800
gtgaagggca agccatcgat tcacctgaag gacgagaaca ccggctacat ccaactacgag 1860
gacaccaaca acaacctgga ggactaccag accatcaaca agcgcttcac caccggcacc 1920
gacctgaagg gcgtgtacct gatcctgaag agccagaacg gcgacgaggc ctggggcgac 1980
aacttcatca tcctggagat cagcccagac gagaagctgc tgagcccgga gctgatcaac 2040
accaacaact ggaccagcac cggcagcacc aacatcagcg gcaacaccct gaccctgtac 2100
cagggcggcc gcggcatcct gaagcagaac ctgcagctgg acagcttcag cacctaccgc 2160
gtgtacttca gcgtgagcgg cgacgccaac gtgctcatcc gcaactcccg cgaggtgctg 2220
ttcgagaaga ggtacatgag cggcgccaag gacgtgagcg agatgttcac caccaagttc 2280
gagaaggaca acttctacat cgagctgagc cagggcaaca acctgtacgg cggcccgatc 2340
gtgcatttct acgacgtgag catcaagtag 2370

<210> 2
<211> 789
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Toxina Vip3Aa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(789)
<223> Proteína Vip3Aa20 producida por MIR162

<400> 2
Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15
Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20 25 30
Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35 40 45

ES 2 473 602 T3

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
 50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125

Ile Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255

Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr
 275 280 285

Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300

Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320

ES 2 473 602 T3

Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340 345 350
 Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr
 355 360 365
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400
 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405 410 415
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420 425 430 435
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435 440 445
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485 490 495
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515 520 525
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile
 530 535 540
 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575
 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590

ES 2 473 602 T3

Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620

Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640

Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670

Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly
 675 680 685

Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
 690 695 700

Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720

Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735

Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
 740 745 750

Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
 755 760 765

Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr
 770 775 780

Asp Val Ser Ile Lys
 785

<210> 3
 <211> 14405
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pNOV1300

<400> 3
 atgaacaaga acaacaccaa gctgagcacc cgcgccctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aacggcatct acggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcgacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgac 180
 atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgatcgc ccagggcaac 240

10

ES 2 473 602 T3

ctgaacaccg agctgagcaa ggagatcctt aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctg 300
 aacgacgtga acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcgcgtgta cctgccgaag 360
 atcaccagca tgctgagcga cgtgatgaag cagaactacg ccctgagcct gcagatcgag 420
 tacctgagca agcagctgca ggagatcagc gacaagctgg acatcatcaa cgtgaacgtc 480
 ctgatcaaca gcaccctgac cgagatcacc ccggcctacc agcgcaccaa gtacgtgaac 540
 gagaagttcg aagagctgac cttcgccacc gagaccagca gcaaggtgaa gaaggacggc 600
 agcccggccc acatcctgga cgagctgacc gagctgaccg agctggcgaa gagcgtgacc 660
 aagaacgacg tggacggcct cgagttctac ctgaacacct tccacgacgt gatggtgggc 720
 aacaacctgt tcggccgcag cgccctgaag accgccagcg agctgatcac caaggagaac 780
 gtgaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtgtacaact tcctgatcgt gctgaccgcc 840
 ctgcaggccc aggccttctt gaccctgacc acctgtcgca agctgctggg cctggccgac 900
 atcgactaca ccagcatcat gaacgagcac ttgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg 960
 aacatcctgc cgaccctgag caacacctt agcaaccga actacgcca ggtgaagggc 1020
 agcgacgagg acgccaagat gatcgtggag gctaagccgg gccacgcgtt gatcggcttc 1080
 gagatcagca acgacagcat caccgtgctg aaggtgtacg aggccaagct gaagcagaac 1140
 taccaggtgg acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgctg 1200
 tgtccggacc agagcgagca aatctactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtac 1260
 gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagacc tcgctacga ggtgaccgcc 1320
 aacttctacg acagcagcac cggcgagatc gacctgaaca agaagaaggt ggagagcagc 1380
 gaggccgagt accgcaccct gagcgcgaac gacgacggcg tctacatgcc actgggcgtg 1440
 atcagcgaga ccttcctgac cccgatcaac ggctttggcc tgcaggccga cgagaacagc 1500
 cgctgatca ccctgacctg taagagctac ctgcccagc tgctgctagc caccgacctg 1560
 agcaacaagg agaccaagct gatcgtgcc aagcagcggc tcatcagcaa catcgtggag 1620
 aacggcagca tcgaggagga caacctggag ccgtggaagg ccaacaacaa gaacgcctac 1680
 gtggaccaca ccggcggcgt gaacggcacc aaggccctgt acgtgcacaa ggacggcggc 1740
 atcagccagt tcatcggcga caagctgaag ccgaagaccg agtacgtgat ccagtacacc 1800
 gtgaagggca agccatcgat tcacctgaag gacgagaaca ccggctacat ccaactacgag 1860
 gacaccaaca acaacctgga ggactaccag accatcaaca agcgtttcac caccggcacc 1920
 gacctgaagg gcgtgtacct gatcctgaag agccagaacg gcgacgaggc ctggggcgac 1980
 aacttcatca tcctggagat cagcccagc gagaagctgc tgagcccgga gctgatcaac 2040
 accaacaact ggaccagcac cggcagcacc aacatcagcg gcaacaccct gaccctgtac 2100
 cagggcggcc gcggcatcct gaagcagaac ctgcagctgg acagcttcag cacctaccgc 2160
 gtgtacttca gcgtgagcgg cgacgccaac gtgcccaccc gcaactcccg cgaggtgctg 2220
 ttcgagaaga ggtacatgag cggcgccaag gacgtgagcg agatgttcac caccaagttc 2280

ES 2 473 602 T3

gagaaggaca acttctacat cgagctgagc cagggcaaca acctgtacgg cggccccgatc 2340
gtgcacttct acgacgtgag catcaagtag gagctctaga tctgttctgc acaaagtgga 2400
gtagtcagtc atcgatcagg aaccagacac cagactttta ttcatacagt gaagtgaagt 2460
gaagtgcagt gcagtgagtt gctggttttt gtacaactta gtatgtattt gtatttgtaa 2520
aatacttcta tcaataaaat ttctaattcc taaaaccaa atccaggggt accagcttgc 2580
atgcctgcag tgcagcgtga cccggctcgtg cccctctcta gagataatga gcattgcatg 2640
tctaagttat aaaaaattac cacatatttt ttttgtcaca cttgtttgaa gtgcagttta 2700
tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta tagtactaca 2760
ataatatcag tgtttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc taaaggacaa 2820
ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatctttt tagtgtgcat gtgttctcct 2880
ttttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag tacatccatt 2940
tagggtttag ggtaaatggt ttttatagac taattttttt agtacatcta ttttattcta 3000
ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctatttttag tttttttatt taataattta 3060
gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaataccctt taagaaatta 3120
aaaaaactaa ggaaacattt ttcttgtttc gagtagataa tgccagcctg ttaaacgccg 3180
tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgctcggg ccaagcgaag 3240
cagacggcac ggcactctctg tcgctgcctc tggaccctc tcgagagttc cgctccaccg 3300
ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgctggc ggagcggcag acgtgagccg 3360
gcacggcagg cggcctcctc ctctctcac ggcaccggca gctacggggg attcctttcc 3420
caccgctcct tcgctttccc ttctcgcgc gccgtaataa atagacacc cctccacacc 3480
ctctttcccc aacctcgtgt tgttcggagc gcacacacac acaaccagat ctccccaaa 3540
tccaccgctc ggcacctccg cttcaaggta cgccgctcgt cctcccccc cccccctctc 3600
taccttctct agatcggcgt tccggtccat ggtagggcc cggtagttct acttctgttc 3660
atgtttgtgt tagatccgtg tttgtgtag atccgtgctg ctagcgttcg tacacggatg 3720
cgacctgtac gtcagacacg ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc 3780
ctgggatggc tctagccgtt ccgcagacgg gatcgatttc atgattttt ttgtttcgtt 3840
gcataggggt tggtttgccc ttttcctta tttcaatata tgccgtgcac ttgtttgtcg 3900
ggatcctttt tcatgctttt ttttgtcttg gttgtgatga tgtggctctg ttgggcggtc 3960
gttctagatc ggagtagaat tctgtttcaa actacctggt ggatttatta attttgatc 4020
tgtatgtgtg tgccatacat attcatagtt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg 4080
atctaggata ggtatacatg ttgatgcggg ttttactgat gcatatacag agatgctttt 4140
tgttcgcttg gttgtgatga tgtggtgtgg ttggcggtc gttcattcgt tctagatcgg 4200
agtagaatac tgtttcaaac tacctggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg 4260
tcatacatct tcatagttac gagttaaga tggatggaaa tatcgatcta ggataggtat 4320

ES 2 473 602 T3

acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat 4380
 atgctctaac cttgagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattatthttg 4440
 atcttgatat acttgatga tggcatatgc agcagctata tgtggatttt tttagccctg 4500
 ccttcatacg ctattttatt gcttggtact gtttcttttg tcgatgctca ccctgttggt 4560
 tgggtgttact tctgcagga tccccgatca tgcaaaaact cattaactca gtgcaaaaact 4620
 atgcctgggg cagcaaaacg gcgttgactg aactttatgg tatggaaaat ccgccagcc 4680
 agccgatggc cgagctgtgg atgggcgcac atccgaaaag cagttcacga gtgcagaatg 4740
 ccgccggaga tatcgtttca ctgcgtgatg tgattgagag tgataaatcg actctgctcg 4800
 gagaggccgt tgccaaacgc tttggcgaac tgctttcct gttcaaagta ttatgctgag 4860
 cacagccact ctccattcag gttcatcaa acaaacacaa ttctgaaatc ggttttgcca 4920
 aagaaaatgc cgcaggtatc ccgatggatg ccgccgagcg taactataaa gatcctaacc 4980
 acaagccgga gctgggtttt gcgctgacgc ctttcttgc gatgaacgcg tttcgtgaat 5040
 tttccgagat tgtctcccta ctccagccgg tcgcaggtgc acatccggcg attgctcact 5100
 tttacaaca gcctgatgcc gaacgttta gcgaactggt cgcagcctg ttgaatatgc 5160
 aggtggaaga aaaatcccgc gcgctggcga ttttaaatc ggcctcgat agccagcagg 5220
 gtgaaccgtg gcaaacgatt cgtttaattt ctgaatttta cccggaagac agcggctctgt 5280
 tctccccgct attgctgaat gtgggtgaaat tgaaccctgg cgaagcgatg ttcctgttcg 5340
 ctgaaacacc gcacgcttac ctgcaaggcg tggcgtgga agtgatggca aactccgata 5400
 acgtgctgcg tgcgggtctg acgcctaaat acattgatat tccggaactg gttgccaatg 5460
 tgaattcga agccaaaccg gctaaccagt tgttgacca gccggtgaaa caaggtgcag 5520
 aactggactt cccgattcca gtggatgatt ttgccttctc gctgcatgac cttagtata 5580
 aagaaaccac cattagccag cagagtgcg ccattttgtt ctgctcgaa ggcgatgcaa 5640
 cgttggtgaa aggttctcag cagttacagc ttaaaccggg tgaatcagcg tttattgccg 5700
 ccaacgaatc accggtgact gtcaaaggcc acggccgttt agcgcgtgtt tacaacaagc 5760
 tgtaagagct tactgaaaaa attaacatct cttgctaagc tgggagctcg atccgctgac 5820
 ctgcagatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggtc 5880
 ttgcgatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacatgt 5940
 aatgcatgac gttatthttg agatgggttt ttatgattag agtcccgcaa ttatacattt 6000
 aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg cgcgcggtgt 6060
 catctatggt actagatccc cgggtctaga caattcagta cattaaaaac gtccgcaatg 6120
 tgttattaag ttgtctaagc gtcaatttgt ttacaccaca atatatcctg ccaccagcca 6180
 gccaacagct ccccgaccgg cagctcggca caaaatcacc actcgataca ggcagcccat 6240
 cagtccggga cggcgtcagc gggagagccg ttgtaaggcg gcagactttg ctcatgttac 6300
 cgatgctatt cggaagaacg gcaactaagc tgccgggttt gaaacacgga tgatctcgcg 6360

ES 2 473 602 T3

gagggtagca tgttgattgt aacgatgaca gagcgttgct gcctgtgatc aaatatcatc 6420
tccctcgcag agatccgaat tatcagcctt cttattcatt tctcgcttaa ccgtgacagg 6480
ctgtcgatct tgagaactat gccgacataa taggaaatcg ctggataaag ccgtgagga 6540
agctgagtgg cgctatttct ttagaagtga acgttgacga tcgtcgaccg taccctgatg 6600
aattaattcg gacgtacgtt ctgaacacag ctggatactt acttggggcga ttgtcataca 6660
tgacatcaac aatgtacccg tttgtgtaac cgtctcttgg aggttcgtat gacactagtg 6720
gttcccctca gcttgcgact agatgttgag gcctaacatt ttattagaga gcaggctagt 6780
tgcttagata catgatcttc aggccgttat ctgtcagggc aagcgaaaat tggccattta 6840
tgacgaccaa tgccccgcag aagctcccat ctttgccgcc atagacgccg cgccccctt 6900
ttggggtgta gaacatcctt ttgccagatg tggaaaagaa gttcgttgtc ccattgttgg 6960
caatgacgta gtagccggcg aaagtgcgag acccatttgc gctatatata agcctacgat 7020
ttccgttgcg actatttgcg taattggatg aactattatc gtagttgctc tcagagttgt 7080
cgtaatttga tggactattg tcgtaattgc ttatggagtt gtcgtagttg cttggagaaa 7140
tgtcgtagtt ggatggggag tagtcatagg gaagacgagc ttcactccact aaaacaattg 7200
gcaggtcagc aagtgcctgc cccgatgcc a tcgcaagtac gaggcttaga accaccttca 7260
acagatcgcg catagtcttc cccagctctc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc 7320
ggcgtcggct tgaacgaatt gttagacatt atttgccgac taccttgggtg atctcgcctt 7380
tcacgtagtg aacaaattct tccaactgat ctgcgcgca ggccaagcga tcttcttctc 7440
caagataagc ctgcctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggccggc aggcgctcca 7500
ttgccagtc ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgcc ggttactgcg ctgtacaaa 7560
tgcgggacaa cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc 7620
atagcgtaa ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga 7680
gttctccgcg cgctggacct accaaggcaa cgctatgtt ccttgccttt gtcagcaaga 7740
tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct 7800
gccattctcc aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg atgtcgtcgt 7860
gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgt ctctccaggg gaagccgaag 7920
tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttgttc atcaagcctt acggtcaccg 7980
taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg gagccgtaca 8040
aatgtacggc cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaaact acctctgata 8100
gttgagtcca tacttcggcg atcaccgctt ccctcatgat gtttaactcc tgaattaagc 8160
cgcgccgca agcgggtgctg gcttgaatga attgttaggc gtcactctgt gctcccgaga 8220
accagtacca gtacatcgct gtttcgctc agacttgagg tctagtttta tacgtgaaca 8280
ggtcaatgcc gccgagagta aagccacatt ttgctgataa attgcaggca ggtacattgt 8340
tcgtttgtgt ctctaactcg atgccaaagga gctgtctgct tagtgcccac tttttcga 8400

ES 2 473 602 T3

attcgatgag actgtgCGcg actcctttgc ctCGgtgCGt gtgCGacaca acaatgtgtt 8460
 cgatagaggc tagatcgttc catgttgagt tgagttcaat cttcccGaca agctcttggT 8520
 cgatgaatgc gccatagcaa gcagagtcTt catcagagtc atcatccgag atgtaatcct 8580
 tccggtaggg gctcacactt ctggtagata gttcaaagcc ttggtcggat aggtgcacat 8640
 cgaacacttc acgaacaatg aaatggTtct cagcatccaa tgtttccgCC acctgctcag 8700
 ggatcaccga aatcttcata tgacgcctaa cgcctggcAC agcggatcgc aaacctggcg 8760
 cggcttttgg cacaaaaggc gtgacaggTt tgCGaatccg ttgctgCCac ttgttaaccC 8820
 ttttgccaga tttggtaact ataatttatg ttagaggCGa agtcttgggt aaaaactggc 8880
 ctaaaattgc tggggatttc aggaaagtaa acatcacctt ccggctcgat gtctattgta 8940
 gatatatgta gtgtatctac ttgatcgggg gatctgctgc ctCGcgcgtt tcgggtgatga 9000
 cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggTc acagcttgtc tgtaagcggA 9060
 tgccggggagc agacaagccc gtcaggggcGc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcGc 9120
 agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgCGgcatca 9180
 gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 9240
 agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tctctgctca ctgactcgct gcgctcggTc 9300
 gttcggctgc ggcgagcggT atcagctcac tcaaaggcgg taatacggTt atccacagaa 9360
 tcaggggata acgcagggaaa gaacatgtga gcaaaaaggc agcaaaaaggc caggaaccgt 9420
 aaaaaggccg cgTtgctggc gtttttccat aggtctccgCC cccctgacga gcatcacaaa 9480
 aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgTtt 9540
 cccctgGaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccC tgccgcttac cggatacctg 9600
 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 9660
 agttcggTgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgTtcagccc 9720
 gaccgctgcg ctttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta 9780
 tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggTatgt aggcggTgct 9840
 acagagTtct tgaagtggTg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc 9900
 tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagTtg gtagctcttg atccggcaaa 9960
 caaaccaccg ctggtagcgg tggTTTTttt gtttgcaagc agcagattac gcgCagaaaa 10020
 aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggT ctgacgctca gtggaacgaa 10080
 aactcacgTt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 10140
 ttaaattaa aatgaagTtt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 10200
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc 10260
 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 10320
 cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 10380
 aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggTcctg caactttatc cgctccatc 10440

ES 2 473 602 T3

cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcc 10500
 aacgttggtt ccattgctgc aggggggggg gggggggggg tccattgttc attccacgga 10560
 caaaaacaga gaaaggaaac gacagaggcc aaaaagctcg ctttcagcac ctgtcgtttc 10620
 ctttcttttc agagggtatt ttaaataaaa acattaagtt atgacgaaga agaacggaaa 10680
 cgccttaaac cggaaaattt tcataaatag cgaaaacccg cgaggtcgcc gccccgtaac 10740
 ctgtcggatc accgaaaagg acccgtaaag tgataatgat tatcatctac atatcacaac 10800
 gtgcgtggag gccatcaaac cacgtcaaat aatcaattat gacgcaggta tcgtattaat 10860
 tgatctgcat caacttaacg taaaaacaac ttcagacaat acaaatcagc gacactgaat 10920
 acggggcaac ctcatgtccc ccccccccc ccccctgcag gcatcgtggt gtcacgctcg 10980
 tcgtttggtg tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 11040
 cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag 11100
 ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 11160
 ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 11220
 tgtatgccc gaccgagttg ctcttgccc gcgtcaacac gggataatac cgcgccacat 11280
 agcagaactt taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 11340
 atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcaccaa ctgatcttca 11400
 gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 11460
 aaaaaggaa taaggcgac acggaatgt tgaatactca tactcttctt tttcaatat 11520
 tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 11580
 aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgactctaa 11640
 gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 11700
 cttcaagaat tggtcgacga tcttgctgcg ttcggatatt ttcgtggagt tcccgcaca 11760
 gacccggatt gaaggcgaga tccagcaact cgcgccagat catcctgtga cggaaacttg 11820
 gcgcgtgatg actggccagg acgtcggccg aaagagcgac aagcagatca cgcttttcga 11880
 cagcgtcgga tttgcatcg aggattttc ggcgtgccc tacgtccgcg accgcgttga 11940
 gggatcaagc cacagcagcc cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct 12000
 ttttggaatg ctgctccgtc gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttga cagaagtcac 12060
 tatcgcacgg aatgccaagc actcccagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa 12120
 tggacgaacg gataaacctt ttcacgccct tttaaatc cgattattct aataaacgct 12180
 ctttctctt aggtttacc gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaactgaag 12240
 gcgggaaacg acaatctgat catgagcggg gaattaaggg agtcacgta tgacccccgc 12300
 cgatgacgcg ggacaagccg ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gttgaaggag 12360
 ccactcagca agctggtaca agcttgcatg cctgcagtgc agcgtgacct ggtcgtgcc 12420
 ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa aaattaccac atatttttt 12480

ES 2 473 602 T3

tgtcacactt gttgaagtg cagtttatct atctttatac atatatttaa actttactct 12540
 acgaataata taatctatag tactacaata atatcagtggt tttagagaat catataaatg 12600
 aacagttaga catggcttaa aggacaattg agtattttga caacaggact ctacagtttt 12660
 atcttttttag tgtgcatgtg ttctcctttt tttttgcaaa tagcttcacc tatataatac 12720
 ttcattccatt ttattagtac atccatttag ggttttaggt taatggtttt tatagactaa 12780
 ttttttttagt acatctattt tattctattt tagcctctaa attaagaaaa ctaaaactct 12840
 attttagttt ttttatttaa taatttagat ataaaataga ataaaataaa gtgactaaaa 12900
 attaaacaaa taccctttaa gaaattaaaa aaactaagga aacatttttc ttgtttcgag 12960
 tagataatgc cagcctgtta aacgccgtcg acgagcttaa cggacaccaa ccagcgaacc 13020
 agcagcgtcg cgtcgggcca agcgaagcag acggcacggc atctctgtcg ctgcctctgg 13080
 acccctctcg agagttccgc tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt 13140
 gcgtggcgga gcggcagacg tgagccggca cggcagcggg cctcctcctc ctctcacggc 13200
 accggcagct acgggggatt cctttcccac cgctcctctg ctttcccttc ctgcccggc 13260
 gtaataaata gacacccctt ccacaccctc tttcccaac ctctgtttgt tcggagcgca 13320
 cacacacaca accagatctc ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtacgc 13380
 cgctcgtcct ccccccccc cctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt 13440
 tagggcccgg tagttctact tctgttcatg tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc 13500
 cgtgctgcta gcgttcgtac acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa 13560
 cttgccagtg tttctctttg ggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat 13620
 cgatttcatg attttttttg tttcgttgca tagggtttg tttgcccttt tctttattt 13680
 caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt catcttttca tgcttttttt tgtcttggtt 13740
 gtgatgatgt ggtctggttg ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact 13800
 acctggtgga tttattaatt ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg 13860
 aattgaagat gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt 13920
 tactgatgca tatacagaga tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg 13980
 ggcggtcgtt cattcgttct agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt 14040
 tattaatfff ggaactgtat gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag ttttaagatg 14100
 atggaaatat cgatctagga taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac 14160
 atgatggcat atgcagcatc tattcatatg ctctaactt gagtacctat ctattataat 14220
 aaacaagtat gttttataat tttttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc 14280
 agctatatgt ggatfttttt agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tggactgtt 14340
 tcttttgctg atgctcacc tgttgttttg tgttacttct gcaggtcgac tctagaggat 14400
 ccacc 14405

<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cebador TAQMAN de vip3Aa químicamente sintetizado

<400> 4
 caccttcagc aaccgaact a 21

ES 2 473 602 T3

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador rev TAQMAN de vip3Aa químicamente sintetizado

<400> 5
gcttagcctc cagatcatc tt 22

10 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda TAQMAN de vip3Aa químicamente sintetizada

15 <400> 6
gtcctcgtcg ctgccctca cct 23

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador TAQMAN de pmi químicamente sintetizado para

<400> 7
ccgggtgaat cagcgttt 18

25 <210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> cebador rev TAQMAN pmi químicamente sintetizado

<400> 8
gccgtggcct ttgacagt 18

<210> 9
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda TAQMAN de pmi químicamente sintetizada

<400> 9
40 tgccgccaac gaatcaccgg 20

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

ES 2 473 602 T3

<220>
 <223> Cebador TAQMAN ZmADH-267 químicamente sintetizado para

<400> 10
 gaacgtgtgt tgggtttgca t 21

5 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador rev TAQMAN ZmADH-267 químicamente sintetizado

<400> 11
 tccagcaatc cttgcacctt 20

15 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda TAQMAN ZmADH-267 químicamente sintetizada

20 <400> 12
 tgcagcctaa ccatgcccag ggta 24

<210> 13
 <211> 2370
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sonda de vip3Aa20 químicamente sintetizada

<400> 13
 atgaacaaga acaacaccaa gctgagcacc cgcgccctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aacggcatct acggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcgacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgac 180
 atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgatcgc ccagggcaac 240
 ctgaacaccg agctgagcaa ggagatcctt aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctg 300
 aacgacgtga acaacaagct ggacgccatc aacacatgc tgcgctgta cctgccgaag 360
 atcaccagca tgctgagcga cgtgatgaag cagaactacg ccctgagcct gcagatcgag 420
 tacctgagca agcagctgca ggagatcagc gacaagctgg acatcatcaa cgtgaacgtc 480
 ctgatcaaca gcaccctgac cgagatcacc ccggcctacc agcgcacaa gtacgtgaac 540
 gagaagtctg aagagctgac cttcgccacc gagaccagca gcaaggtgaa gaaggacggc 600

ES 2 473 602 T3

agccccggccg acatcctgga cgagctgacc gagctgaccg agctggcgaa gagcgtgacc 660
 aagaacgacg tggacggcct cgagttctac ctgaacacct tccacgacgt gatggtgggc 720
 aacaacctgt tcggcccgag cgccctgaag accgccagcg agctgatcac caaggagaac 780
 gtgaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtgtacaact tcctgatcgt gctgaccgcc 840
 ctgcaggccc aggccttcct gaccctgacc acctgtcgca agctgctggg cctggccgac 900
 atcgactaca ccagcatcat gaacgagcac ttgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg 960
 aacatcctgc cgaccctgag caacaccttc agcaaccgga actacgcca ggtgaagggc 1020
 agcgcgagg acgccaagat gatcgtggag gctaagccgg gccacgcgtt gatcggcttc 1080
 gagatcagca acgacagcat caccgtgctg aagggtgtacg aggccaagct gaagcagaac 1140
 taccaggtag acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgctg 1200
 tgtccggacc agagcgagca aatctactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtac 1260
 gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagacc tgcgctacga ggtgaccgcc 1320
 aacttctacg acagcagcac cggcgagatc gacctgaaca agaagaagg ggagagcagc 1380
 gaggccgagt accgcaccct gagcgcgaac gacgacggcg tctacatgcc actgggcgtg 1440
 atcagcgaga ccttcctgac cccgatcaac ggctttggcc tgcaggccga cgagaacagc 1500
 cgctgatca cctgacctg taagagctac ctgcgcgagc tgctgctagc caccgacctg 1560
 agcaacaagg agaccaagct gatcgtgcc aagcggcgt tcacatgcaa catcgtggag 1620
 aacggcagca tcgaggagga caacctggag ccgtggaagg ccaacaacaa gaacgcctac 1680
 gtggaccaca ccggcggcgt gaacggcacc aaggccctgt acgtgcacaa ggacggcggc 1740
 atcagccagt tcacggcga caagctgaag ccgaagaccg agtacgtgat ccagtacacc 1800
 gtgaagggca agccatcgt tcacctgaag gacgagaaca ccggctacat cactacgag 1860
 gacaccaaca acaacctgga ggactaccag accatcaaca agcgcttcac caccggcacc 1920
 gacctgaagg gcgtgtacct gatcctgaag agccagaacg gcgacgaggc ctggggcgac 1980
 aacttcatca tcctggagat cagcccagc gagaagctgc tgagcccgga gctgatcaac 2040
 accaacaact ggaccagcac cggcagcacc aacatcagcg gcaacaccct gaccctgtac 2100
 cagggcggcc gcggcatcct gaagcagaac ctgcagctgg acagcttcag cacctaccgc 2160
 gtgtacttca gcgtgagcgg cgacgccaac gtgcgcatcc gcaactcccg cgaggtgctg 2220
 ttcgagaaga ggtacatgag cggcgccaag gacgtgagcg agatgttcac caccaagttc 2280
 gagaaggaca acttctacat cgagctgagc cagggcaaca acctgtacgg cggcccgatc 2340
 gtgcacttct acgacgtgag catcaagtag 2370

<210> 14
 <211> 1176
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda pmi químicamente sintetizada

ES 2 473 602 T3

<400> 14
atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact 60
gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120
catccgaaaa gcagttcacg agtgacagaat gccgccggag atatcgtttc actgctgat 180
gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaacg ctttggcgaa 240
ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300
aacaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat 360
gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg 420
cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg 480
gtcgcagggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540
agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg 600
attttaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt 660
tctgaat ttt acccggaaga cagcggctctg ttctccccgc tattgtctgaa tgtggtgaaa 720
ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc 780
gtggcgtgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840
tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag 900
ttgttgacc agccggtgaa acaaggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat 960
tttgcccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020
gccat tttgt tctgctcga aggcgatgca acgttggtgga aaggttctca gcagttacag 1080
cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc 1140
cacggccgtt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa 1176

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Cebador MOV3Aa-01-5' químicamente sintetizado

<400> 15
atgaacaaga acaacaccaa 20

10

<210> 16
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Cebador MOV3Aa-01-3' químicamente sintetizado

<400> 16
ctactgatg ctcacgtcgt ag 22

20

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Químicamente sintetizado

<400> 17
 acgagcagaa ccaggtgc 18

5
 <210> 18
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

10
 <400> 18
 ggtgaagaag gacggcag 18

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 19
 acctgtcgca agctgctggg 20

20
 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

25
 <400> 20
 tggacaagct gctgtgtc 18

<210> 21
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 21
 tgcaggccga cgagaacag 19

35
 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 22
 tgatccagta caccgtgaa 19

<210> 23
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

5 <400> 23
 accctgacctggtaccag 18

<210> 24
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 24
 gtgttgccgc tgatgtg 18

15 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Químicamente sintetizado

<400> 25
 cgtactcggc ctcggct 18

<210> 26
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 26
 30 ctgcaggcca aagccgtt 18

<210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 27
 tgcgcgtaga tcacctg 18

<210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 28
 gcttgcgaca ggtgtca 18

5
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

10
 <400> 29
 ttgctgctgg tctcgggg 19

<210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 30
 cgttggcgat ctaaggat 19

20
 <210> 31
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

25
 <400> 31
 gcaagccatc gattcac 17

<210> 32
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 32
 gcaacaccct gaccctg 17

35
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 33
 tctacgacgt gagcatcaag 20

<210> 34
 <211> 19

ES 2 473 602 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Químicamente sintetizado

5 <400> 34
gtagaagtgc acgatcggg 19

<210> 35
<211> 17
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Químicamente sintetizado

<400> 35
cggtgctggt ccagttg 17

15 <210> 36
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Cebador 162INSERT-F2 químicamente sintetizado

<400> 36
acaccaatga tgcaaatagg c 21

<210> 37
<211> 25
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador VIP_R4 químicamente sintetizado

<400> 37
30 gaaggtgttc aggtagaact cgaag 25

<210> 38
<211> 2946
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Amplicón vip3Aa20 5' químicamente sintetizado

<400> 38
acaccaatga tgcaaatagg ctgggaatag tctgtctaag agtttgagtg aatcatgtca 60
ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgatc atgagcggag aattaaggga 120
gtcacggttat gacccccgcc gatgacgcgg gacaagccgt tttacgtttg gaactgacag 180
aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gctggtacaa gcttgcagtc ctgcagtgca 240
gcggtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcagtgcta agttataaaa 300
aattaccaca tattttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta tctttataca 360

ES 2 473 602 T3

tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa tatcagtgtt 420
 ttagagaatc atataaatga acagttagac atggctctaaa ggacaattga gtattttgac 480
 aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt ttttgcaaat 540
 agcttcacct atataaact tcatccatth tattagtaca tccatttagg gtttagggtt 600
 aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctattht attctattht agcctctaaa 660
 ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata taaaatagaa 720
 taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa aactaaggaa 780
 acatthttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga cgagtctaac 840
 ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcaa gcgaagcaga cggcacggca 900
 tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttg acttgctccg 960
 ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac ggcaggcggc 1020
 ctctctctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc gctccttcgc 1080
 tttcccttcc tgcgccgccc taataaatag acacccccct cacaccctct tttcccacc 1140
 tctgtttggt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca cccgtcggca 1200
 cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtctc ccccccccc cctctctacc ttctctagat 1260
 cggcgttccg gtccatggtt agggcccggg agttctactt ctgttcatgt ttgtgttaga 1320
 tccgtgtttg tgttagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac ctgtacgtca 1380
 gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg gatggctcta 1440
 gccgttccgc agacgggatc gatttcatga tttttttgt ttcgttgcac agggtttggg 1500
 ttgccctttt cttttatttc aatatatgcc gtgacttgt ttgtcgggtc atcttttcat 1560
 gctttttttt gtcttgggtg tgatgatgtg gtctggttgg gcggtcgttc tagatcggag 1620
 tagaattctg tttcaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta tgtgtgtgcc 1680
 atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atatcgatct aggataggtg 1740
 tacatgttga tgccgggttt actgatgcat atacagagat gctttttggt cgcttggtg 1800
 tgatgatgtg gtgtggttgg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta gaatactgtt 1860
 tcaaactacc tgggtgattt attaattht gaactgtatg tgtgtgtcat acatcttcat 1920
 agttacgagt ttaagatgga tggaaatatc gatctaggat aggtatacat gttgatgtgg 1980
 gttttactga tgcatataca tgatggcata tgcagcatct attcatatgc tctaacttg 2040
 agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt atthtgatct tgatataact 2100
 ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt catacgctat 2160
 ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgctcaccct gttgtttggg gttacttctg 2220
 caggctgact ctagaggatc caccatgaac aagaacaaca ccaagctgag caccgcgcc 2280
 ctgccgagct tcatcgacta cttcaacggc atctacggct tgcgccccgg catcaaggac 2340
 atcatgaaca tgatcttcaa gaccgacacc ggcggcgacc tgaccctgga cgagatcctg 2400

ES 2 473 602 T3

	aagaaccagc agctgctgaa cgacatcagc ggcaagctgg acggcgtgaa cggcagcctg	2460
	aacgacctga tcgcccaggg caacctgaac accgagctga gcaaggagat ccttaagatc	2520
	gccaacgagc agaaccaggt gctgaacgac gtgaacaaca agctggacgc catcaacacc	2580
	atgctgctgc tgtacctgcc gaagatcacc agcatgctga gcgacgtgat taagcagaac	2640
	tacgccctga gcctgcagat cgagtacctg agcaagcagc tgcaggagat cagcgacaag	2700
	ctggacatca tcaacgtgaa cgtcctgatc aacagcacc tgaccgagat caccctggcc	2760
	taccagcgca tcaagtacgt gaacgagaag ttcgaagagc tgaccttcgc caccgagacc	2820
	agcagcaagg tgaagaagga cggcagccc gccgacatcc tggacgagct gaccgagctg	2880
	accgagctgg cgaagagcgt gaccaagaac gacgtggacg gcttcgagtt ctacctgaac	2940
	accttc	2946
5	<210> 39 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador CJB179 químicamente sintetizado	
10	<400> 39 atgcaaatag gctggaata gtc 23	
	<210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Cebador inverso CTB3116 químicamente sintetizado	
	<400> 40 gtaccagctt gctgagtgcc t 21	
20	<210> 41 <211> 209 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Amplicón CJB134/179 5' químicamente sintetizado	
25	<400> 41 atgcaaatag gctggaata gtctgtctaa tagtttgagt gaatcatgtc actgatagtt 60 taaactgaag gcgggaaacg acaatctgat catgagcggg gaattaaggg agtcacgtta 120 tgacccccgc cgatgacgcg ggacaagccg ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac 180 gttgaaggag ccaactcagca agctggtac 209	
30	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

ES 2 473 602 T3

<220>
 <223> Cebador VIP-F3 químicamente sintetizado

<400> 42
 ggtgctgttc gagaagaggt 20

5 <210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PMI_REV1 químicamente sintetizado

<400> 43
 cgatttatca ctctcaatca cat 23

15 <210> 44
 <211> 2577
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Amplicón vip3Aa20 3' químicamente sintetizado

<400> 44
 ggtgctgttc gagaagaggt acatgagcgg cgccaaggac gtgagcgaga tgttcaccac 60
 caagttcgag aaggacaact tctacatcga gctgagccag ggcaacaacc tgtacggcgg 120
 cccgatcgtg cacttctacg acgtgagcat caagtaggag ctctagatct gttctgcaca 180
 aagtggagta gtcagtcacg gatcaggaac cagacaccag acttttattc atacagtga 240
 gtgaagtga gtcagtgca gtgagttgct ggtttttgta caacttagta tgtatttgta 300
 tttgtaaaat acttctatca ataaaatttc taattcctaa aaccaaatac caggggtacc 360
 agcttgcag cctgcagtc agcgtgacct ggctgtgccc ctctctagag ataagagca 420
 ttgcatgtct aagttataaa aaattaccac atattttttt tgtcacactt gtttgaagtg 480
 cagtttatct atctttatac atatatttaa actttactct acgaataata taatctatag 540
 tactacaata atatcagtg tttagagaat catataaatg aacagttaga catggtctaa 600
 aggacaattg agtattttga caacaggact ctacagtttt atcttttttag tgtgcatgtg 660
 ttctcctttt tttttgcaaa tagcttcacc tatataatac ttcattccatt ttattagtag 720
 atccatttag ggtttagggg taatggtttt tatagactaa ttttttagt acatctattt 780
 tattctattt tagcctctaa attaagaaaa ctaaaactct attttagttt ttttatttaa 840
 taatttagat ataaaataga ataaaataaa gtgactaaaa attaaacaaa taccctttaa 900
 gaaattaaaa aaactaagga aacatttttc ttgtttcgag tagataatgc cagcctgtta 960
 aacgccgtcg acgagtctaa cggacaccaa ccagcgaacc agcagcgtcg cgtcgggcca 1020
 agcgaagcag acggcacggc atctctgtcg ctgcctctgg acccctctcg agagttccgc 1080
 tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt gcgtggcgga gcggcagacg 1140
 20 tgagccggca cggcagggcg cctcctcctc ctctcacggc accggcagct acgggggatt 1200

ES 2 473 602 T3

cttttccac cgctccttcg ctttcccttc ctcgccgcc gtaataaata gacaccccct 1260
 ccacaccctc tttccccaac ctcgtgttgt tcggagcgca cacacacaca accagatctc 1320
 ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtacgc cgctcgtcct ccccccccc 1380
 ccctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt tagggcccgg tagttctact 1440
 tctgttcatg tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac 1500
 acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg 1560
 gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcatg attttttttg 1620
 tttcgttgca tagggtttgg tttgcccttt tcctttatct caatatatgc cgtgcacttg 1680
 tttgtcgggt catcttttca tgcttttttt tgccttggtt gtgatgatgt ggtctggttg 1740
 ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga tttattaatt 1800
 ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttaag aattgaagat gatggatgga 1860
 aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcggggtt tactgatgca tatacagaga 1920
 tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggctcgtt cattcgttct 1980
 agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat 2040
 gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat cgatctagga 2100
 taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc 2160
 tattcatatg ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat 2220
 tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt 2280
 agccctgcct tcatacgcta tttatttctt tggactgtt tcttttgctg atgctcacc 2340
 tgttgttttg tgttacttct gcagggatcc ccgatcatgc aaaaactcat taactcagtg 2400
 caaaactatg cctggggcag caaaacggcg ttgactgaac tttatggtat ggaaaatccg 2460
 tccagccagc cgatggccga gctgtggatg ggcgcacatc cgaaaagcag ttcacgagtg 2520
 cagaatgccg ccggagatat cgtttctact cgtgatgtga ttgagagtga taaatcg 2577

<210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de unión 5' entre el genoma de maíz y el ADN de inserción

<400> 45
 tgaatcatgt cactgatagt 20

10

<210> 46
 <211> 1088
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Secuencia flanqueante 5'

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(236)
 <223> Secuencia flanqueante 5'

20

ES 2 473 602 T3

<400> 46
 tcctgtggtg ttggaacaga cttctgtctc ttctggtgat cataaatatt taaatgaacc 60
 agttgtggtg gaaaatggtg ttttcttttg tctctagact ggaaagcgga gttctcgta 120
 acacggttct ttcaactagg gatgaaagtg gtaatccgaa ttgtagtac aaatttaata 180
 ttttaaata gatatgtata aaattttatg ttgatctttt ttatggtatc aagcacatta 240
 gtataaatta gtataaatat gaataaaaata ttacataaaa tgttttatgt attatgtggt 300
 ccctacaaca taaatagttg aaaaaattac taaatttggtt ttcgaatcta tatcgaagtt 360
 tataatctatt atttaagaaa aatataggat gaaaaggttt atcttttatg aatctttaca 420
 agctggatct tataaacaag aaaataaatt tatattgtag attttatatc ctattttattc 480
 gcaatcaaag aaaagcgact aaaaaactga ttaccgagta aatactgttt ccaaccgttt 540
 tcgtccctac tatcaacgcc ttctccaac cgcagtcgat ctgtccgtct gtatcaggcg 600
 cagcggcacc cctgctgttc gactatctag accatagaat attttaggta tacaataatt 660
 ttagtccac gctagaacat tttagttaga ataataacaa gatttgctat tgatgtagga 720
 ctcgcccgtc actgtctaaa aaagcattct gtcggctta ttctttaggc atcagcgggt 780
 gtactatctc atttttccta tcatattcct cagtactctg ttaagtataa atggcttatt 840
 ttacatgatg aactaataaa actaattaag gatcctaact ttttggaag gtaatttgga 900
 tcattatgca ttaccatcct acgtatacct gctgcagcag catctgcgta agcacagcct 960
 agatatatgc ttctgtgtgg actgaaagga gactttgttt atcaattagt atactcccaa 1020
 aaaactgatg acaccaatga tgcaaatagg ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg 1080
 aatcatgt 1088

5
 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de unión 3' entre el ADN de inserción y el genoma de maíz

10
 <400> 47
 aaacgtccgc catggtctga 20

<210> 48
 <211> 1189
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> Secuencia flanqueante 3'

ES 2 473 602 T3

<400> 48
 catggtctga aggcaacaga taaggcatalc tgggccttgt ggtagtgtt ttactgggcc 60
 tttttgatg atctataaaa ttcactggga tcaaccggga gaggaatggc agcagatgca 120
 gtccccaggg tcctccgctc cgcctgagc acccggcacc cgcgctgaac cggagagggga 180
 cgcgaggagc cgtgagcct ggtgaggagg gggctgtggc agatgaggat gagacgagta 240
 cgtggctggg aagggcagca gggcaccggg tcttcgtcca gcccggcgcg agtggacagg 300
 actagagatg gcaacgggta caaacccgct gggttttacc gtcccaaacc cgtaccctg 360
 aaaaatatct atgccatta aaaaaccgct acccatgacg ggtttgagat tttgcccata 420
 cccgtaccca tcgggttaac gggtagccat gggtagccg cgggtttcat ctccaatata 480
 cctgttcttc tcataatcaa taagtatcgt aatgattaat gatatcatga tccaaaatct 540
 atgtaatgaa caacgagttc atgatttggg ataaaaatta ttagtagaga gaatgaaata 600
 caaataataa gttgtataat taagtacact tgcactaagt tatccatcca tcacatatat 660
 aacgtagta aaaactataa tatcaagcaa gcaacactct caccgactac tgatacatc 720
 accaattgat aaaaaatag aagtaataa ggaataacaa gtttgtgtt cgtttataaa 780
 ataaaatgac aatatgact aggtttggc gggtttaaaa aaccacggg ttcacgggtt 840
 tgggtactat aggaacaaac ccgtacccat aaaccattg ggtacagatt tatgcccgtt 900
 aacaaaccca tgggtatgaa aattgaccca aacctatacc ctaatggggg aaaaacccat 960
 cgggtttcgg atttcgggta ccattgcca tctctagaca ggacaacctc ggccggtcct 1020
 gtatgtaggc caccagcatc gggcagttgg tacatccagc cggggtcagg tcacttttac 1080
 tcgtctcaat cagacaatca ccgtccacca acgaacgcca acgttgtcac ttgtcaggtc 1140
 ggttagagact tgtatTTTTT tttgtcctcc gtaaaaatcg gttcaccag 1189

5 <210> 49
 <211> 10579
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencias flanqueantes y de inserción del Evento MIR162 de Vip3Aa20

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1088)
 <223> Secuencia flanqueante 5' del evento MIR162

<400> 49
 tcctgtggtg ttggaacaga cttctgtctc ttctgggtgat cataaatatt taaatgaacc 60
 agttgtggtg gaaaatggtg ttttcttttg tctctagact ggaaagcggg gttctctgca 120
 acacggttct ttcaactagg gatgaaagt gtaatccgaa ttgttagtac aaatttaata 180
 ttttaaaata gatatgtata aaattttatg ttgatctttt ttatgttatc aagcacatta 240
 gtataaatta gtataaatat gaataaata ttacataaaa tgttttatgt attatttggg 300
 ccctacaaca taaatagttg aaaaaattac taaatttggg ttcgaatcta tatcgaagtt 360
 15 tatatctatt atttaagaaa aatataggat gaaaagggtt atcttttatg aatctttaca 420

ES 2 473 602 T3

agctggatct tataaacaag aaaataaatt tatattgtag attttatatc ctatztatc 480
 gcaatcaaag aaaagcgact aaaaaactga ttaccgagta aatactgttt ccaaccgttt 540
 tcgtccctac tatcaacgcc ttctcccaac cgcagtcgat ctgtccgtct gtatcaggcg 600
 cagcggcacc cctgctgttc gactatctag accatagaat attttaggta tacaataatt 660
 ttagttccac gctagaacat tttagttaga ataataacaa gatttgctat tgatgtagga 720
 ctgccccgtc actgtctaaa aaagcattct gtcggctcta ttctttaggc atcagcgggt 780
 gtactatctc atttttccta tcatattcct cagtactctg ttaagtataa atgggtctatt 840
 ttacatgatg aactaataaa actaattaag gatcctaact ttttggaag gtaatttgga 900
 tcattatgca ttaccatcct acgtatacct gctgcagcag catctgcgta agcacagcct 960
 agatatatgc ttctgtgtgg actgaaagga gactttgttt atcaattagt atactcccaa 1020
 aaaactgatg acaccaatga tgcaaatagg ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg 1080
 aatcatgtca ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgac atgagcggag 1140
 aattaagga gtcacgttat gacccccgcc gatgacggg gacaagccgt tttacgtttg 1200
 gaactgacag aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gctggtacaa gcttgcatgc 1260
 ctgcagtgca gcgtgaccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgcta 1320
 agttataaaa aattaccaca ttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 1380
 tctttataca tatatttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 1440
 ttcagtggtt ttgagaatc atataaatga acagttagac atgggtctaaa ggacaattga 1500
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tctttttagt gtgcatgtgt tctcctttt 1560
 ttttgcaaat agcttcacct atataaact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 1620
 gtttaggggt aatggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 1680
 agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaata aatttagata 1740
 taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaaat accctttaag aaattaaaaa 1800
 aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 1860
 cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcaa gcgaagcaga 1920
 cggcacggca tctctgtcgc tgctctgga cccctctcga gagtccgct ccaccgttgg 1980
 acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 2040
 ggcaggcggc ctctctctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttccacc 2100
 gtccttctgc tttcccttcc tcgcccgcg taataaatag acacccctc cacaccctct 2160
 ttcccaacc tcgtgttggt cggagcgac acacacaaa ccagatctcc cccaaatcca 2220
 cccgtcggca cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtctc cccccccc cctctctacc 2280
 ttctctagat cggcgttccg gtccatggtt agggccggg agttctactt ctgttcattg 2340
 ttgtgttaga tccgtgtttg tgttagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac 2400
 ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttg ggaatcctgg 2460

ES 2 473 602 T3

gatggctcta gccgttccgc agacgggatc gatttcatga ttttttttgt ttcggttgc 2520
agggtttggg ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc 2580
atcttttcat gctttttttt gtcttgggtg tgatgatgtg gtctgggttg gcggtcgttc 2640
tagatcggag tagaattctg tttcaaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta 2700
tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atacgatct 2760
aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttgtt 2820
cgcttgggtg tgatgatgtg gtgtgggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 2880
gaatactggt tcaaactacc tgggtgattt attaattttg gaactgtatg tgtgtgtcat 2940
acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatc gatctaggat aggtatacat 3000
gttgatgtgg gttttactga tgcataata tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 3060
tctaaccttg agtacctatc tattataata aacaagtatg tttataatt attttgatct 3120
tgataactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 3180
catacgtat ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgcaccct gttgtttggg 3240
gttacttctg caggtcgact ctagaggatc caccatgaac aagaacaaca ccaagctgag 3300
caccgcgccc ctgccgagct tcatcgaacta cttcaacggc atctacggct tcgccaccgg 3360
catcaaggac atcatgaaca tgatcttcaa gaccgacacc ggcggcgacc tgaccctgga 3420
cgagatcctg aagaaccagc agctgctgaa cgacatcagc ggcaagctgg acggcgtgaa 3480
cggcagcctg aacgacctga tcgcccaggg caacctgaac accgagctga gcaaggagat 3540
ccttaagatc gccaacgagc agaaccaggt gctgaacgac gtgaacaaca agctggacgc 3600
catcaacacc atgctgcgcg tgtacctgcc gaagatcacc agcatgctga gcgacgtgat 3660
gaagcagaac tacgccctga gcctgcagat cgagtacctg agcaagcagc tgcaggagat 3720
cagcgacaag ctggacatca tcaacgtgaa cgtcctgatc aacagcaccc tgaccgagat 3780
caccgggccc taccagcgca tcaagtacgt gaacgagaag ttcaagagc tgaccttcgc 3840
caccgagacc agcagcaagg tgaagaagga cggcagcccg gccgacatcc tggacgagct 3900
gaccgagctg accgagctgg cgaagagcgt gaccaagaac gacgtggacg gcttcgagtt 3960
ctacctgaac accttccacg acgtgatggt gggcaacaac ctgttcggcc gcagcgcct 4020
gaagaccgcc agcgagctga tcaccaagga gaacgtgaag accagcggca gcgaggtggg 4080
caacgtgtac aacttctga tcgtgctgac cgccctgcag gccagcct tcctgacct 4140
gaccacctgt cgcaagctgc tgggcctggc cgacatcgac tacaccagca tcatgaacga 4200
gcacttgaac aaggagaagg aggagtccg cgtgaacatc ctgccgacc tgagcaacac 4260
cttcagcaac ccgaactacg ccaaggtgaa gggcagcgac gaggacgcca agatgatcgt 4320
ggaggctaag ccgggcccag cgttgatcgg cttcgagatc agcaacgaca gcatcaccgt 4380
gctgaagggtg tacgaggcca agctgaagca gaactaccag gtggacaagg acagcttgag 4440
cgagggtgatc tacggcgaca tggacaagct gr+gtgtccg gaccagagcg agcaaatcta 4500

ES 2 473 602 T3

ctacaccaac aacatcgtgt tcccgaacga gtacgtgac accaagatcg acttcaccaa 4560
gaagatgaag accctgcgct acgaggtgac cgccaacttc tacgacagca gcaccggcga 4620
gatcgacctg aacaagaaga aggtggagag cagcgaggcc gagtaccgca ccctgagcgc 4680
gaacgacgac ggcgtctaca tgccactggg cgtgatcagc gagaccttcc tgaccccgat 4740
caacggcttt ggcctgcagg ccgacgagaa cagccgcctg atcaccttga cctgtaagag 4800
ctacctgcgc gagctgctgc tagccaccga cctgagcaac aaggagacca agctgatcgt 4860
gccaccgagc ggcttcatca gcaacatcgt ggagaacggc agcatcgagg aggacaacct 4920
ggagccgtgg aaggccaaca acaagaacgc ctacgtggac cacaccggcg gcgtgaacgg 4980
caccaaggcc ctgtacgtgc acaaggacgg cggcatcagc cagttcatcg gcgacaagct 5040
gaagccgaag accgagtagc tgatccagta caccgtgaag ggcaagccat cgattcacct 5100
gaaggacgag aacaccggct acatccacta cgaggacacc aacaacaacc tggaggacta 5160
ccagaccatc aacaagcgcct tcaccaccgg caccgacctg aagggcgtgt acctgatcct 5220
gaagagccag aacggcgacg aggcctgggg cgacaacttc atcatcctgg agatcagccc 5280
gagcgagaag ctgctgagcc cggagctgat caacaccaac aactggacca gcaccggcag 5340
caccaacatc agcggcaaca ccctgaccct gtaccagggc ggccgcggca tcctgaagca 5400
gaacctgcag ctggacagct tcagcaccta ccgcgtgtac ttcagcgtga gcggcgacgc 5460
caacgtgcgc atccgcaact cccgcgaggt gctgttcgag aagaggtaca tgagcggcgc 5520
caaggacgtg agcgagatgt tcaccacca gttcgagaag gacaacttct acatcgagct 5580
gagccagggc aacaacctgt acggcggccc gatcgtgcac ttctacgacg tgagcatcaa 5640
gtaggagctc tagatctggt ctgcacaaag tggagtagtc agtcatcgat caggaaccag 5700
acaccagact tttattcata cagtgaagtg aagtgaagtg cagtgcagtg agttgctggt 5760
ttttgtacaa cttagtagt atttgtattt gtaaaatact tctatcaata aaatttctaa 5820
ttcctaaaac caaaatccag gggtagcagc ttgcatgcct gcagtgcagc gtgaccgggt 5880
cgtgccctc tctagagata atgagcattg catgtctaag ttataaaaaa ttaccacata 5940
tttttttgt cacacttgtt tgaagtgcag tttatctatc tttatacata tatttaact 6000
ttactctacg aataatataa tctatagtac tacaataata tcagtgtttt agagaatcat 6060
ataaatgaac agttagacat ggtctaaagg acaattgagt attttgacaa caggactcta 6120
cagttttatc ttttagtgt gcatgtgttc tcctttttt ttgcaaatag cttcacctat 6180
ataatacttc atccatttta ttagtacatc catttagggt ttagggtaa tggttttat 6240
agactaattt ttttagtaca tctattttat tctattttag cctctaaatt aagaaaacta 6300
aaactctatt ttagttttt tatttaataa tttagatata aatagaata aaataaagtg 6360
actaaaaatt aaacaaatac cctttaagaa attaaaaaaa ctaaggaaac attttcttg 6420
tttcgagtag ataatgccag cctgttaaac gccgtcgacg agtctaacgg acaccaacca 6480
gcgaaccagc agcgtcgcgt cgggccaagc gaagcagacg gcacggcatc tctgtcgtg 6540

ES 2 473 602 T3

cctctggacc cctctcgaga gttccgctcc accgttggac ttgctccgct gtcggcatcc 6600
 agaaattgcy tggcggagcy gcagacgtga gccggcacgg caggcggcct cctcctcctc 6660
 tcacggcacc ggcagctacg ggggattcct ttcccaccgc tccttcgctt tcccttcctc 6720
 gcccgcgta ataaatagac accccctcca caccctcttt ccccaacctc gtggtgttcg 6780
 gagcgcacac acacacaacc agatctcccc caaatccacc cgtcggcacc tccgcttcaa 6840
 ggtacgccgc tcgtcctccc ccccccccc tctctacctt ctctagatcg gcgttccggt 6900
 ccatggttag ggcccggtag ttctacttct gttcatgttt gtgtagatc cgtgtttgtg 6960
 ttgatccgt gctgctagcy ttcgtacacg gatgcgacct gtacgtcaga cacgttctga 7020
 ttgctaactt gccagtgttt ctctttgggg aatcctggga tggctctagc cgttccgcag 7080
 acgggatcga tttcatgatt tttttgttt cgttgcatag ggtttggttt gcccttttcc 7140
 tttatttcaa tatatgccgt gcacttgttt gtcgggtcat cttttcatgc tttttttgt 7200
 cttggttgtg atgatgtggt ctggttgggc ggtcgttcta gatcggagta gaattctgtt 7260
 tcaaactacc tggtggtatt attaattttg gatcgtgatg tgtgtgccat acatattcat 7320
 agttacgaat tgaagatgat ggatggaaat atcgatctag gataggtata catgttgatg 7380
 cgggttttac tgatgcatat acagagatgc tttttgttcg cttggttgtg atgatgtggt 7440
 gtggttgggc ggtcgttcat tcgttctaga tcggagtaga atactgtttc aaactacctg 7500
 gtgtatztat taattttgga actgtatgtg tgtgtcatac atcttcatag ttacgagttt 7560
 aagatggatg gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgtgggt tttactgatg 7620
 catatacatg atggcatatg cagcatctat tcatatgctc taaccttgag tacctatcta 7680
 ttataataaa caagtatggt ttataattat tttgatcttg atatacttgg atgatggcat 7740
 atgcagcagc tatatgtgga tttttttagc cctgccttca tacgctattt atttgcttgg 7800
 tactgtttct tttgtcagat ctcaccctgt tgtttggtgt tacttctgca gggatccccg 7860
 atcatgcaa aactcattaa ctcagtgcaa aactatgcct ggggcagcaa aacggcggtg 7920
 actgaacttt atggtatgga aaatccgtcc agccagccga tggccgagct gtggatgggc 7980
 gcacatccga aaagcagttc acgagtgcag aatgccgccg gagatategt ttcactgcgt 8040
 gatgtgattg agagtataa atcgactctg ctcggagagg ccgttgccaa acgctttggc 8100
 gaactgcctt tcctgttcaa agtattatgc gcagcacagc cactctccat tcaggttcat 8160
 ccaaacaac acaattctga aatcggtttt gccaaagaaa atgccgcagg tatcccgatg 8220
 gatgccgccg agcgtaacta taaagatcct aaccacaagc cggagctggt ttttgcgctg 8280
 acgcttttcc ttgcgatgaa cgcgtttcgt gaattttccg agattgtctc cctactccag 8340
 ccggtcgcag gtgcacatcc ggcgattgct cactttttac aacagcctga tgccgaacgt 8400
 ttaagcgaac tgttcgccag cctggttgaat atgcaggggt aagaaaaatc ccgcgcgctg 8460
 gcgattttaa aatcgccctt cgatagccag caggggtgaac cgtggcaaac gattcgttta 8520
 atttctgaat tttaccggga agacagcgggt ctgttctccc cgctattgct gaatgtggtg 8580

ES 2 473 602 T3

aaattgaacc ctggcgaagc gatgttcctg ttcgctgaaa caccgcacgc ttacctgcaa 8640
 ggcgtggcgc tggaaagtgat ggcaaaactcc gataacgtgc tgcgtgcggg tctgacgcct 8700
 aaatacattg atattccgga actggttgcc aatgtgaaat tcgaagccaa accggctaac 8760
 cagttgttga cccagccggt gaaacaaggt gcagaactgg acttcccgat tccagtggat 8820
 gattttgcct tctcgtgca tgaccttagt gataaagaaa ccaccattag ccagcagagt 8880
 gccgccattt tgttctgcgt cgaaggcgat gcaacgttgt ggaaagggtc tcagcagtta 8940
 cagcttaaac cgggtgaatc agcgtttatt gccccaacg aatcaccggt gactgtcaaa 9000
 ggccacggcc gtttagcgcg tgtttacaac aagctgtaag agcttactga aaaaattaac 9060
 atctcttgct aagctgggag ctcgatccgt cgacctgcag atcgttcaaa catttgcaa 9120
 taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat ataatttctg 9180
 ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg 9240
 gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag 9300
 cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tccccgggtc 9360
 tagacaattc agtacattaa aaacgtccgc catggtctga aggcaacaga taaggcatac 9420
 tggcccttgt ggtagttggt ttactgggcc tttttgtatg atctataaaa ttcactggga 9480
 tcaaccggga gaggaatggc agcagatgca gtccccaggg tcctccgctc cgcctgagc 9540
 acccggcacc cgcgctgaac cggagaggga cgcgcggacg ccgtgcagct ggtgcggagg 9600
 gggctgtggc agatgaggat gagacgcgta cgtggctggg aaggccagca ggccaccggg 9660
 tcttcgtcca gcccggcgcg agtggacagg actagagatg gcaacggtta caaacccgct 9720
 gggttttacc gtcccaaacc cgtaccgctg aaaaatatct atgcccatta aaaaaccgct 9780
 acccatgacg ggtttgagat tttgccaaa cccgtacca tcgggttaac gggtagccat 9840
 gggtagccg cgggtttcat ctccaatata cctgttcttc tcataatcaa taagtatcgt 9900
 aatgattaat gatatcatga tccaaaatct atgtaatgaa caacgagttc atgatttggg 9960
 ataaaaatta ttagtagaga gaatgaaata caaataataa gttgtataat taagtgacct 10020
 tgcactaagt tatccatcca tcacatatat aacgctagta aaaactataa tatcaagcaa 10080
 gcaacactct caccgactac tgatacattc accaattgat aaaaaatag aagtaataa 10140
 ggaataacaa gtttgttgtt cgtttataaa ataaaatgac aatatgcact aggtttggtc 10200
 gggtttaaaa aaccacggg ttcacgggtt tgggtactat aggaacaaac ccgtacccat 10260
 aaaccattg ggtacagatt tatgcccgtt acaaaacca tgggtatgaa aattgacca 10320
 aacctatacc ctaatggggt aaaaaccat cgggtttcgg atttcgggta cccattgcca 10380
 tctctagaca ggacaacctc ggccggtcct gtatgtaggc caccagcatc ggccagttgg 10440
 tacatccagc cggggtcagg tcacttttac tcgtctcaat cagacaatca ccgtccacca 10500
 acgaacgcca acgttgtcac ttgtcaggtc ggttgagact tgtatttttt tttgtcctcc 10560
 gtaaaaatcg gttcaccag 10579

<210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cebador FE1002 químicamente sintetizado

<400> 50
 cgtgactccc ttaattctcc gct 23

5
 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador FE1003 químicamente sintetizado

10
 <400> 51
 gatcagattg tcggttcccg cctt 24

<210> 52
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> Cebador FE1004 químicamente sintetizado

<400> 52
 gattgtcgtt tccgccttc agtt 24

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

<220>
 <223> Cebador 162_DW_Conf3 Químicamente sintetizado

25
 <400> 53
 cctgtgtgtg tgaacagac ttctgtc 27

<210> 54
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Cebador FE0900 químicamente sintetizado

<400> 54
 ggctcctca acgttgcggt tctgtc 26

35
 <210> 55
 <211> 1230
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Amplicón de PCR 5' químicamente sintetizado

ES 2 473 602 T3

<400> 55
cctgtgttgt tggaacagac ttctgtctct tctggtgatc ataaatattt aaatgaacca 60
gttgtgttgg aaaatgttgt tttcttttgt ctctagactg gaaagcggag ttctcgtcaa 120
cacggttctt tcaactaggg atgaaagtgg taatccgaat tgtagtaca aatttaatat 180
tttaaaatag atatgtataa aattttatgt tgatcttttt tatgttatca agcacattag 240
tataaattag tataaatatg aataaaatat tacataaaat gttttatgta ttatttggtc 300
cctacaacat aaatagttga aaaaattact aaatttgttt tcgaatctat atcgaagttt 360
atatctatta ttttaagaaaa atataggatg aaaaggttta tcttttatga atctttacaa 420
gctggatctt ataaacaaga aaataaattt atattgtaga ttttatatcc tattttattcg 480
caatcaaaga aaagcgacta aaaaactgat taccgagtaa atactgtttc caaccgtttt 540
cgtccctact atcaacgcct tctcccaacc gcagtcgatc tgtccgctg tatcaggcgc 600
agcggcacc cgtctgttcg actatctaga ccatagaata ttttaggtat acaataattt 660
tagttccacg ctagaacatt ttagttagaa taataacaag atttgcatt gatgtaggac 720
tcgcccgtca ctgtctaaaa aagcattctg tcggtcttat tctttaggca tcagcgggtg 780
tactatctca tttttcctat catattcctc agtactctgt taagtataaa tggctattt 840
tacatgatga actaataaaa ctaattaagg atcctaactt tttgtgaagg taatttgat 900
cattatgcat taccatccta cgtatacctg ctgcagcagc atctgcgtaa gcacagccta 960
gatatatgct tctgtgtgga ctgaaaggag actttgttta tcaattagta tactcccaaa 1020
aaactgatga caccaatgat gcaaataggc tgggaatagt ctgtctaata gtttgagtga 1080
atcatgtcac tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga 1140
attaagggag tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg acaagccggt ttacgtttgg 1200
aactgacaga accgcaacgt tgaaggagcc 1230

<210> 56
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Cebador 162_GW_3_F1 químicamente sintetizado

<400> 56
tctcttgcta agctgggagc tcgatccg 28

10

<210> 57
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Cebador 162_GW_3_F2 químicamente sintetizado

<400> 57
aagattgaat cctgttgccg gtcttgcg 28

20

<210> 58
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 473 602 T3

<220>
 <223> Cebador 162_3'GW_R1 químicamente sintetizado

<400> 58
 ctggtgaacc gattttacg gagg 24

5 <210> 59
 <211> 1518
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Amplicón de PCR 3' químicamente sintetizado

<400> 59
 tctcttgcta agctgggagc tcgatccgtc gacctgcaga tcgttcaaac atttggaat 60
 aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgccgat gattatcata taatttctgt 120
 tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg 180
 tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc 240
 gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgcctatctat gttactagat ccccgggtct 300
 agacaattca gtacattaa aacgtccgcc atggtctgaa ggcaacagat aaggcatact 360
 gggccttggtg gtagttggtt tactgggcct ttttgatga tctataaaat tctactgggat 420
 caacccggag aggaatggca gcagatgcag tccccagggt cctccgtcgc cgctgagca 480
 cccggcacc gcgctgaacc ggagagggac gcgcggacgc cgtgcagctg gtgcggaggg 540
 ggctgtggca gatgaggatg agacgcgtac gtggctggga aggccagcag gccaccgggt 600
 cttcgtccag cccggcgcga gtggacagga ctagagatgg caacggttac aaaccgctg 660
 ggttttaccg tcccaaacc gtaccctgta aaaatatcta tgcccattaa aaaaccgta 720
 cccatgacgg gtttgagatt ttgccc aaac ccgtaccat cgggtaaac ggtaccatg 780
 ggttaccgc gggtttcatc tccaatatac ctgttcttct cataatcaat aagtatcgta 840
 atgattaatg atatcatgat ccaaaatcta tgtaatgaac aacgagttca tgatttggtgta 900
 taaaaattat tagtagagag aatgaaatac aaataataag ttgtataatt aagtgcctt 960
 gactaagtt atccatccat cacatatata acgctagtaa aaactataat atcaagcaag 1020
 caacactctc accgactact gatacattca ccaattgata aaaaatatga agtaaataag 1080
 gaataacaag tttgttggtc gtttataaaa taaaatgaca atatgacta ggtttggctc 1140
 ggtttaaaaa acccacgggt tcacgggttt gggactata ggaacaaacc cgtaccata 1200
 aaccattgg gtacagattt atgcccgtta acaaacccat gggatgaaa attgacccaa 1260
 acctataccc taatggggta aaaaccatc gggtttcgga tttcgggtac ccattgccat 1320
 ctctagacag gacaacctcg gccggtcctg tatgtaggcc accagcatcg gccagttggt 1380
 acatccagcc ggggtcaggt cacttttact cgtctcaatc agacaatcac cgtccaccaa 1440
 cgaacgcaa cgttgtcact tgcaggtcg gttgagactt gtattttttt ttgtcctccg 1500
 taaaaatcgg ttcaccag 1518

15 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 60
 ttcacgggag actttatctg 20

5 <210> 61
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

 <400> 61
 ccgattcatt aatgcag 17

15 <210> 62
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

20 <400> 62
 acgtaaaacg gctgtgc 17

 <210> 63
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

 <400> 63
 gtttaaactg aaggcgg 17

30 <210> 64
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

35 <400> 64
 aataatatca ctctgtacat cc 22

 <210> 65
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Químicamente sintetizado

 <400> 65
 gttgtaaac gacgg 15

<210> 66
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 66
 taggcacccc aggcttta 18

10

<210> 67
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

15

<400> 67
 aattgaattt agcggccg 18

20

<210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 68
 ggtccctaca acataaatag 20

25

<210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 69
 ttcgtcccta ctatcaacgc 20

35

<210> 70
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

40

<400> 70
 ctttagcat cagcgggt 18

<210> 71
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 71
 agcatctgcg taagcaca 18

5

<210> 72
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 72
 ctgatgacac caatgatgc 19

15

<210> 73
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 73
 gatcagattg tcgittccc 19

25

<210> 74
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 74
 gcatcattgg tgtcatcag 19

35

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 75
 tgtgcttacg cagatgct 18

<210> 76
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 76
 acccgctgat gcctaaag 18

<210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 77
 gcgttgatag tagggacgaa 20

10

<210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

15

<400> 78
 ctatttatgt tgtagggacc 20

20

<210> 79
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 79
 ctagactgga aagcggag 18

25

<210> 80
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 80
 ccacttcat ccctagtg 19

35

<210> 81
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

40

<400> 81
 gattgaatcc tgttgcc 17

<210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 82
 tctcataaat aacgcatgc 20

5

<210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 83
 tctgtggata accgtattac 20

15

<210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 84
 agtaacatag atgacaccgc 20

25

<210> 85
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 85
 ccagtgct ggaattcg 18

30

<210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 86
 ccagtgat gatatctgc 20

40

<210> 87
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 87
 ccagtgct ggaattcg 18

<210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 88
 ccagtgatg g gatattgc 20

10

<210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

15

<400> 89
 gtgtgctgga attgccctt 20

20

<210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 90
 tatctgcaga attgccctt 20

25

<210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 91
 gtgtgctgga attgccctt 20

35

<210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

40

<400> 92
 tatctgcaga attgccctt 20

<210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 93
 gtgtgctgga attgccctt 20

5

<210> 94
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 94
 tatctgcaga attgccctt 20

15

<210> 95
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 95
 gtgtgctgga attgccctt 20

25

<210> 96
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 96
 ggtcttgca tgattatc 18

35

<210> 97
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 97
 gagaggaatg gcagcaga 18

<210> 98
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 98
 catgacgggt ttgagatt 18

<210> 99
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 99
 aatctcaaac ccgcatg 18

10

<210> 100
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

15

<400> 100
 tctgctgcca ttcctctc 18

20

<210> 101
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 101
 gatcaaccg gagaggaat 19

25

<210> 102
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Cebador de secuenciamiento b05104h químicamente sintetizado

<400> 102
 ccatgacggg tttgagat 18

35

<210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de secuenciamiento b05105c químicamente sintetizado

40

<400> 103
 caaccgacct gacaagtgc 20

<210> 104
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 473 602 T3

<220>
 <223> Cebador de secuenciamiento b05105e químicamente sintetizado

<400> 104
 atctcaaacc cgtcattg 18

5 <210> 105
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador de secuenciamiento b05105f químicamente sintetizado

<400> 105
 attcctctcc gggttgatc 19

15 <210> 106
 <211> 51328
 <212> ADN
 <213> zea mays

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1680)..(3338)
 <223> Marcador opie2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25455)..(25512)
 <223> Secuencia genómica de maíz desplazada por ADN heterólogo de MIR162

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43275)..(45086)
 <223> marcador gag

<400> 106
 agatctagag attcgtcatt tgtagaaaagg atagaaaagg gattgctagg aagttagggg 60
 caaaaatgcaa gggtgataaa acttgcatth ggatccctaa ggaatttgtag actaaccttg 120
 taggacccaa caagagttgg gtacctaatg cccaagccta aatttgctt gcaggtttat 180
 gcatccgggg gttcaagctg gattattgat agcggatgca caaacatat gacgggggag 240
 aagaagatgt tcacctccta tgtcaagaat aaggattccc aagattcaat tatattcggg 300
 gatgggaatc aaggcaagggt aaaagggtta ggtaaaattg caatttctaa tgagcactcc 360
 atatctaagt tgtttttagt agagtctctc agatataatt tgctatctgt tagtcaatta 420
 tgcaacatgg ggtataactg tctatttacc aatgtagatg tgtctgtctt tagaagaagt 480
 gatggttcac tagcttttaa ggggtgatta gacggcaaac tttatttagt tgattttgca 540
 aaagaagagg ccggtctaga tgcatgctta atagctaaga ctagcatggg ctggctgtgg 600
 catcgccgct tagcacatgt ggggatgaag aaccttcaca agcttctaaa gggagaacac 660
 gtgataggtt tgactaatgt gcaattcgaa aaagatagac cttgtgcagc ttgtcaagca 720
 gggaaacagg tgggaagcgc tcatcacacc aaaaatgtga tgacaacatc aagaccctg 780
 gagctgctac atatggacct cttcgaccc gtcgcctatc tgagcatagg aggaagtaag 840
 30 tatggtctag ttatcgttga tgacttttcc cgcttactt ggggtgtctt tttgcaggat 900

ES 2 473 602 T3

aaatctgaaa cccaagggac cctcaagcgc ttcctcagga gatctcaaaa tgagtttgag 960
 ctcaaggtga agaagataag gagcgacaac ggggccgagt tcaagaacct tcaagtgagg 1020
 gagttccttg aggaggaagg gatcaagcac gagttctccg ctccctacac accacagcaa 1080
 aatggtgtgg tagagaggaa gaacatgacg ctaatcgata tggcgagaac gatgcttgga 1140
 gaattcaaga cccccgagt tttctggtcg gaagccgtga acacggcttg ccacgccatc 1200
 aacagggctt accttcaccg cctcctcaag aagacgtcgt atgagcttct aaccggtaac 1260
 aaaccaatg tatcttactt tcgtgtattt gggagcaaat gctacattct agtgaagaag 1320
 ggtagaaatt ctaagtttgc tcccaaagct gtagaagggt tttgttagg ttatgactca 1380
 aatacaaagg cgtatagagt cttcaacaaa tcatcgggtt tggttgaaat ctctagcgac 1440
 gttgtatttg atgagactaa tggctctcca agagagcaag ttgttgattg tgatgatgta 1500
 gatgaagaag atgttccaac ggctgctata cgaacatgg cgattggaga agtgcgcca 1560
 caggaacaag atgaacgaga tcaaccttct tcctcaacaa cggtgcatcc cccaactcaa 1620
 gacgatgaac aggttcatca acaggaggca tgtgatcaag gggagcacia gatgatcatg 1680
 tgatggagga agaagcgcaa ccggcacctc caaccaagt tcgagcgatg attcaaagga 1740
 atcatcccgt cgatcaaatt ctgggtgata ttagcaaggg agtaactact cgatctcgat 1800
 tagttaattt ttgtgagcat tactccttg tctcttctat tgagcctttc agggtagaag 1860
 aggcttggct agatccggac tgggtgttag ccatgcagga ggaactcaac aacttcaagc 1920
 gcaatgaagt ttggacactg gtgcctcgtc ccaagcaaaa tgttgtggga accaagtggg 1980
 tgttccgcaa caaacaggac gagcacgggg tggtgacgag gaacaaggct cgacttgtgg 2040
 caaaaggtta tgcccaagtc gcaggtttgg actttgagga gacgtttgct cctgtggcta 2100
 ggctagagtc aattcgcatc ttgctagcat atgccgctca cactctttc aggttgtacc 2160
 aaatggatgt gaagagcgct ttcctcaacg ggccgatcaa ggaagagggtg tacgtggagc 2220
 aacccccctg cttcgaggat gaacgggtacc ccgaccacgt gtgtaagctc tctaaggcgc 2280
 tctatggact taagcaagcc ccaagagcat ggtatgaatg ccttagagac tttttacttg 2340
 ctaatgcttt caaggttggg aaagccgatc caactctggt cactaagaca tgtgatgggtg 2400
 atttgtttgt gtgccaaatt tatgtcgacg acataatatt tggttctact aacccaaagt 2460
 cttgtgaaga gtttagcagg gtaatggcgc agaaattcga gatgtcaatg atgggagagt 2520
 tgaactactt ccttgggttc caagtgaagc aactcaagga tggcaccttc atctcccaaa 2580
 cgaagtacac gcaagatcta ctaaagcggg ttgggatgaa ggacgccaag cccgcaaaga 2640
 ctccgatggg gaccgacgga cacaccgacc tcaacaagg aggtaagtcc gttgatcaaa 2700
 aagcataccg gtcaatgata ggttctttac tttacttatg tgctagtaga ccggatatta 2760
 tgcttagcgt atgcatgtgt gctagatttc aatccgatcc taaggagtgt cacttagtgg 2820
 cggtgaagcg aattattaga tatttgggtg ctacgccttg cttcgggctc tggatccaa 2880
 aggggtctac ctttgacctg gttggatact cagattccga ctatgttga tgtaaggctc 2940

ES 2 473 602 T3

ataggaagag tacatcgggg acgtgccaat tcttaggaag gtccctggg tcgtggaact 3000
 ctaagaaaca aacctccgtt gccctatcca ccgctgaggc cgagtatgtt gccgcaggac 3060
 agtgttgccg gcaactactt tggatgaggc aaacctccg ggactttggc tacaatctga 3120
 gcaaagtccc actcctatgt gacaatgaga gtgctatccg catggcggaa aatcctgttg 3180
 aacacagccg cacaaagcac atagacatcc ggcatacctt ttgagagac caccagcaa 3240
 agggagatat cgaagtgttt catgttagca ccgagaacca gctagctgat atcgaagtgt 3300
 ttcattgttag caccgagaac cttttgcagg ctgcgtagta agctaaatgt cttagattcg 3360
 cggaacttgg attgaattgt agcatacatg tgtttatgcc ttgatcatg ttcattctgc 3420
 attttgttgc ttattgtggt gctcaagttg tacaacact ccctggatct cacaagtccg 3480
 ttgcaaagtg atgctgagag cacctagagg ggggtggaat aggtgatcct gtaaaaactt 3540
 aacttatagc cacaaaaact tgtaaaggt tagcacaata attgccagt ggctaaagag 3600
 gagatcttgc acaatacgat tatcacagag aattcaacac agaggagaca tagtgattta 3660
 tcccgtgggt cggccaagta caaaacttgc ctacttccac gttgtggcgt cccaacggac 3720
 gagggttgca atcaaccctt ctcaagcggc ccaaagacc acttgaatac cacgggtgtt 3780
 ttgccttgc tctctttatc ccacttacga ggaatctcca cagattggag tctctcggcc 3840
 ttacacttaa gattcacaaa gaagcacgga gtaagggagg gaagcaacac acacaaatcc 3900
 acagcgaat gcgcacacac acggccaaga atcgagctca aagactatct cacagtttct 3960
 cacaagaaca gagctcgaat cacttagaat cacaaacgga tgcgcaaaga ctgagtgtgg 4020
 atgatcaaga atgctcaaag gttgcttggg gtctccctcc atgctctag gggccctt 4080
 tatagcccca aggcagctag gagccgttga gaacaaatct ggaaggccat ctttgcctc 4140
 tgcgctcggg cgcaccggac agtccggtgc ccgattcctt tccttaattg gcgaagccga 4200
 ccgttgcaga tgcgggagcc gttggcgcac cggacatgtc cggtcacac cggacagtcc 4260
 ggtccccct tccgaccgtt ggctcggcca cgtgtcccgc gcagatcgcg cggtcgaccg 4320
 ttggctcagc cgaccgttgg ctcaccggac agtccggtgc acaccggaca gtccggtgca 4380
 caccggacag tccggtgaat tttagccgta cgccgtcagc aaattcccga gagcggcctc 4440
 ttcggccaag gcagcctggc gcaccggaca ctgtccggtg caccaccgga cagtccggtg 4500
 cccagaccg aacagcctc ttggctgtac acagccaagt cttctcttct cttcttctt 4560
 ctgtttctaa cacttagaca aatatattag tacacaaaac caatgtacta aggcttagaa 4620
 acatacctt gctctagatt ttcactttgt tcatccatgg gcattgattc acatttaagc 4680
 acttgtgttg aactcaatc accaaaatac ttagaaatgg cccaagggca catttccctt 4740
 tcagatgcac agtttgaggg ggagatgtgt tacaacttga ccctttgaga ctaaccgat 4800
 gcttgagttt gcttgtttta gtctcaaagg agaattaaaa gggaaaaggg ggacttggac 4860
 catgaaagac ttccactgca ctccgatgag agggtagctt attccaagtt catctcatgt 4920
 actcttattg cctttgtatt cttattgaag attttgggtga ggcaatgggg ttcttgggcc 4980

ES 2 473 602 T3

aagattgatc ctgttttggg gcttgatgcc aaagggggag aaaataaggg ccaaagcaat 5040
aaatggatca gctaccactt gagaaatttt gaaaacagta gaatagagct tttggtttgt 5100
caaatctctt ttgttgcttc ttttgcataa agttggcctc ttgtggggag aagtgttgat 5160
tatgggaaaa agggggagtt tttgaaatct ttcctttgga atgactctcc ttatgcttca 5220
acatgtgtgt ttgacttaga gatagagatt tgagtttgat ttgcaaaaac aaaccaagtg 5280
gtggcaaagg atgatccata tatgccaaat tgaatcaaaa taaatttgag tttttatttg 5340
aagtaatatt gcacttgttc tagttgcttt atgtagtgtt ggcataaatc accaaaaagg 5400
gggagattga aagggaaatg tgcccttggg ccatttctaa gtattttggg gattgagtgc 5460
caacacaagt gcttaaatgt gaattcatgt ttatggatga ataaagtga aatcaagagc 5520
aaaggatgtt ttctaagtct tagtacattg gttttgtgta ctaataact tgtctaagta 5580
ttgaaacag gaagaaaaag aaaagaaaag agttggctgt gtacagccaa gaggctgttt 5640
cggctcgggg caccggactg tccggtgggt caccggacag tgcgggtgg tgcaccggac 5700
agtgtccggt gcgccaggct gcctcggccg aagtagccgc tctcgggaat tcgctgacgg 5760
cgtacgacta taattcaccg gactgtccgg tgtgcaccgg actgtccggt gtgcaccgga 5820
ctgtccggtg agccaacggt cggccgggcc aacggtcggc cgcgcatct gcgctgaca 5880
cgtggccgag ccaacggcta gaagggggca ccggactgtc cgggtgtcac cggacatgtc 5940
cggtgcgcca acggctctct ggcgggcaac ggcggctgc gccattttag gaaggaaatc 6000
gggcaccgga cagtgtccgg tgtgcaccgg actgtccggt gcgcccagc acagaaggca 6060
aggatggcct tccagatttg ttctcaacgg ctcttagctg tcttggggct ataaaagga 6120
cccctaggcg catggaggag tacaccaagc attcctaaa cttcctaag caccaagaca 6180
tcgatctcac gcattcgttt cattgtgata gcatctagag ctcttgttga gttgcgaact 6240
ctttgagttg tgttgcgagc tcttgttgag acttggtgtc gtgttgttgc tctgatcttt 6300
tgaagtcttg tgtgcgttgc tcattcccc tttgctctgt gttcttttg aacttcaatt 6360
gtaagggcga gaggtccaa gttgtggaga ttcctcgca acgggattga gaaaaaagc 6420
aagcaaaaca ccgtggatc caagtgggtc tttggaccgc ttgagagggg ttgattgcaa 6480
ccctcgtccg ttgggacgcc acaacatgga gtaggcaagc gttggtcttg gccgaaccac 6540
gggataaacc actgtgtcgt ctctgtgatt gatctcttgt ggtattgtgt tttgttgaga 6600
ctcctttcta gccacttggc atttattgtg ctaacactta acaagtttt gtggctataa 6660
gtttaagttt tacaggatca cctattcacc cccccccct ctagggtgtc tcacctatgc 6720
accgtagct aggccttgagt caattcgcatt attattggcc tatgctactt accatggctt 6780
taagctttat caaatggacg tgaagagtc cttcctcaac ggaccaatca aggaagaggt 6840
ctatgttgag caacctccc gctttgaaga cagtgagtat cctaaccatg tttataggct 6900
ctctaaggcg ctttatgggc tcaagcaagc cccaagagca tggatgaat gccttagaga 6960
tttccttatc gctaattggc tcaaagtcgg caaggccgat cctactctat ccaactaaaac 7020

ES 2 473 602 T3

tcttgacaat gatttgtttg tatgccaaat ttatgttgat gatatacatat ttgggtctac 7080
taacgaatct acttgtgagg aatttagtag gatcatgaca cagaaattcg agatgtctat 7140
gatgggggag ttgaaatatt tcttaggatt tcaagtgaag caactccaag agggcacctt 7200
cattagccaa acgaagtaca ctcaagacat tctaaacaag tttggaatga aggatgccaa 7260
gcccatcaaa acacccatgg gaacaaatgg gcatctcggc ctcgacacgg gaggtaagtc 7320
cgtggatcaa aagggtatacc ggtcgatgat tggttcattg ctttatttat gtgcatctcg 7380
accggacatt atgctttccg tatgcatgtg tgcaagattc caatccgacc ctaaggaatc 7440
ccaccttacg gccgtaaaac gaatcttgag atatttggct tatactccta agtttgggct 7500
ttggtaccct cggggatcca cttttgattt aattggttat tccgatgctg attgggcggg 7560
gtgtaagatt aataggaaga gcacatcggg gacttgcag ttcttgggaa gatccttggg 7620
gtcttgggct tcaaagaagc aaaattcggg tgctctttcc accgccgaag ccgagtacat 7680
tgccgcaggt cattgttcg cgcaattgct ttggatgagg caaacctgc gggactatgg 7740
ttacaaatta accaaagtcc ctttgctatg tgataatgag agtgcaatca aaatggccga 7800
caatcccgtc gagcatagcc gcactaagca catagccatt cggtatcatt ttcttaggga 7860
tcaccaacaa aagggagata tcgagatttc ttatattaac actaaagatc aattagccga 7920
tatctttacc aagcctcttg atgaacaaac ttttaccaaa cttaggcatg agctcaatat 7980
tcttgattcg cgcaattttt tttgctagat tgacacgta gctcatttat atacctttga 8040
tcatatctct ttcatatgct atgactaatg tgtttttcaa gtccatttca caccaagtca 8100
taggtatatt gaaaggaat tggagttttc ggcgaagaca aaggcttcca ctccgtaact 8160
catcctttgc catcgctcca agaaaaggac cttgtctttg ggggagagag taaaagccca 8220
aagcaaaagg actggacttc gtctttggtg taatcttaac tcatttactt atgaccaaag 8280
gggaagatag tacttctatg ggctctaatag attccgtttt tggcgattca tgccaaaggg 8340
gggaaagta tgagcccaaa gcaaaaaggac cgcaccacca ccaatttcaa aaacttagtg 8400
ctttctaaga gtatttatca attggtatcc tattgtgttc aaaaggagga gaaaattagt 8460
tttttcaaaa atgtatatca aaaccctctt gaacactaag aggtggatct cttttagggg 8520
gaattttttg ttaagtcaa ggaaaagcat ttgaaacagg gggagaaaat ttcaaatctt 8580
gaaaatgctt tgcaaaactct tattcattta cttttgacta tttgcaaaag atcttttgaa 8640
atggatttac aaaaagaatt tgcaaaaaca aaacatgtgg tgcaaacgtg gtccaaaatg 8700
ttaaataaga aagaaacaat ccatgcatat cttgtaagta gttatattgg ctcaattcca 8760
agcaaccctt acacttacat tatgcaaaact agttcaatta tgcacttcta tatttgcttt 8820
ggtttgtggt ggcataatc accaaaaagg gggagattga aaggaatta ggcttacacc 8880
tagttcctaa ataatttttg tggttgaatt gaccaacaca aataattgga ctaactagtt 8940
tgcccaagtg tatagattat acaggtgtaa aaggttcaca ctgagccaat aaaaagacca 9000
agttttggat tcaacaaagg agcaaagggg caaccgaagg cacccttggg ctggcgcacc 9060

ES 2 473 602 T3

ggactgtccg gtgtgccacc ggacatgtcc ggtgcaccag ggggactcag actcaaactc 9120
 gccaccttcg ggaatttcca gaggcgactc ggctataatt caccggactg tccgggtgtac 9180
 accggacatg tccgggtgctc caaggaaggt cggcctcagg aactcgccag cctcgggttt 9240
 tctccctcgc cgctccgcta taattcaccg gactgtccgg tgtgcaccgg actgtccgg 9300
 gcaacctcgg agcaacggct acttcgcgcc aacggctacc tgcaacggca tttaatgcgc 9360
 gcgcagcacg cgcaggagtc agaatcgccc atgctggcac accggacagc aaacagtaca 9420
 tgtccgggtg gcaccggaca cccagggtgg cccacaagtc agaagctcca acggtcagaa 9480
 tccaacggca gtgatgacgt ggcagggggc accggactgt ccgggtgtgca ccggactgtc 9540
 cgggtgcgcca tcgaacagac agcctcccaa cggccacttt tgggtggttg ggctataaat 9600
 accccaacca cccaccatt cattgcatcc aagttttcca cttctcaacc acttacaaga 9660
 gctaggcatt caattctaga cacacccaaa gtgatcaaat cctctccaat tcaacacaaa 9720
 gccctagtga ctagtgagag tgatttgccg tgttcatttg agctcttgcg cttggattgc 9780
 tttctctctt tcattctttc ttgtgttcaa tactcacttg taaccaaggc aagagacacc 9840
 aattgtgtgg tggtccttgc ggggaggttt ttctcccggt tgatttgaga agagaaagct 9900
 cactcggctc gagggaccgt ttgagagagg gaaagggttg aaaaagacc ggctttgtg 9960
 gcctcctcaa cggggagtag gtttgagaga accgaacctc ggtaaaaca atcctcgtgt 10020
 ctacttcat tatttgcttg cgatttgttt tcacgccctc tctcggactc gattatattt 10080
 ctaacgctaa cccggcttgt agttgtgttt atatttgtaa atttcagttt cgccctattc 10140
 accccccccc ctctaggcga ctatcaccag gcggtagtcc gcgagccaca gttccggctc 10200
 cgtttcccc gaatacttcg tgatagtagt cgggggtcgg aaccgggtcg ggaacgacgc 10260
 ccgtcggatg gcccgactga aggcttgccg accgggtggt tcgggagagg gactccgatc 10320
 cctccccact gtcgtagcgc cccccacgc ctgggggtgg agcctcggcg cacccttctg 10380
 tcgaggtggg cccgacggtc gcgtcgatgg tgctcgttgc cgaggtggcc cggggccgca 10440
 ggcgcggtgt tgcgcgtgcg tccggtatag accgaggctt cccgcataaa ttgggaagtc 10500
 gcggcgtgag gttccgaggg gtatccccgc ctccgggagg cagtgtctc ggcccgtcg 10560
 gccgcagcgc ctccaggag attcttgagc tctccctgga ttcgccgacc ctcggtggtt 10620
 gatggctccc gcatcgtgcg gaggagcatc gctgcggctg ccaggttctg accaaccctg 10680
 ctggatgcgg gcggcggcct gagcctgaca tcgttggcga cgcggtgctg gagacctgg 10740
 ggcaggtgac gtatttctcc ggccgagggt tggcccgcc atacctgcc gacgtcccgg 10800
 cggatcgtct caagcgcctc tgttccctcg tcgagcctgg cctgcgcccc gcggacttgc 10860
 tcgagctgtg ggtcgtgacc ccccgccgga acggggacca cagctagctc ccgcgggatg 10920
 tcggcgcgag ggcaccggcc taggaaaatc accgtcctcc ggcatgcaa gatggttgc 10980
 ttcggagggg tccccagct cgacgtggaa acattcgcgg cttgggccc agtcctcgtc 11040
 gtcaaggctg cggcttccgt cggaacagtc ggagaggcag tagtcacatg cggctatgaa 11100

ES 2 473 602 T3

gtcccgatg gcaactggggg tgccaagtcc agagaaaacc caacagatgc tgggatcgtc 11160
 atcttcctcg gacccagagg gcccgtaggt cgagacgtcc gtcaatcggg cccaaggcga 11220
 ccgcatacga aaccccagtg gggttgcact cgcctcaatg agagcgcgcc ccaaagcgag 11280
 gtcgcttggc gggtcgaggc cgagtcgaaa tgacgtaaga tgggagttag ttagtacctt 11340
 ttggtcgacg cggagcgacg tagtcacatc ggggactggt tgcaccgtca tctcaggtac 11400
 gagggcgacg tcctgcaggc tttccgcgag cgtgctggcg tcttcttctt gctcgggatc 11460
 agcgtgtcgc ggggggacgg cgcttgctt cgtctcgaac gcgaggtcga cgcccggcgt 11520
 gccctccgtg ggggcgctgg ggacgtgat tcgctcgaca gccgacgaag cgcggcctcc 11580
 cacttgccct tggttgcccc gcctcctcct ccgttggcgg gggagaggac ggggcgagct 11640
 cgaatgttgt ttttcaccg cgcggggaag atgtcgtcgg ttccgccgcc gacgggcggg 11700
 atgtcggccc ccattgtcgt tgtcgcgcgg cggtggaagg agtatcatgt cgtagctgcc 11760
 gtcgaaggac atgaactcaa gactcccga acggagcacc gtcccgggcc ggagagggtg 11820
 ctggagactg cccatctgga gcttgacggg aagctgttcg tcagcacgca gcaggccccct 11880
 acctggcgca ccaactgtcg gcgtttcgag accggggggg ccccagaccg acgagtgagt 11940
 gtgccgcgtg ccccagccca gatgggtcga gcgcgtgggc gagcgcgaag gggggagagg 12000
 cgaggtgtcc ggagacgggc gtgagagagg tggagatccc gcggccttcg tgttcgtccc 12060
 gcgcccaggt cgggtgcgct tgcagtaggg gggttacaag ctccacgcg ggtgagggaa 12120
 gcgagcggcc ccaagagagc gcctgtctcg tcctcgtccc cgcgcggcca accttctcta 12180
 agaaggccct ggtccttctt tttataggcg taaggagagg atccaggtgt acaatggggg 12240
 tgtagcagag tgctacgtgt ctagcggagg gagagctagc gccctaagta catgccaatg 12300
 tggcagccgg agagatcttg gcaccctact ggcgtgatgt cgtggctgtc ggaggagcaa 12360
 cggagcctgg cggagggaca gctgtcggag cggtcgagtc cttgctgacg tccccttgct 12420
 tccgtaagag agctgagagc cgccgtcgtc acagagcttg tggggcgcca tcattgcca 12480
 tctggtggag ctagccagag gggacaccgg tcttgttctt cgtgaccga gtcggctcgg 12540
 ggtaggatga tgatggcgt tcccgttgac gtggcgggcc tgtgccctag gtcgggcgac 12600
 gtgggggctc ctccgaagcc gaggtcgaat ctgtcttccg tggccgaggc cgagcccag 12660
 cccctgggtc gggcgaggcg gaggtcgttc ggtagaggcc agggcgaggt ccgagccctg 12720
 gggtcgggcg aagcggagtt tgtcgtcttc cgggtctcag cccgagtcg agctttgggg 12780
 tcgggtggag cggagttcgt cgtcttccgg gtcttagccc gagtccgagc cctggggctg 12840
 ggcggagcgg agttcgccgt cttccgggtc ttagcccag tccgagccct ggggtcgggc 12900
 ggagcggagt tcgtcgtctt ccgaggctga gcccgagtc gagccctggg tcgggcggag 12960
 cggagcttcc tatggcgcct ttggcaaggc ctgactgcct gtcagactca ctttgtcgag 13020
 tggcactgca gtcggagtgg cgcaggcggc gctgtccttc tgtcagaccg gtcagtggtg 13080
 cggcggagtg acggcggta cttcggctct gccggggggc gcgcgtcagg ataaatgtgt 13140

ES 2 473 602 T3

caggccacct ttgcgttaaa tgctcctgca actcggtcag tcggtgcggc gatttagtca 13200
 ggggttgcttc ttagcgaagc caaggcctcg ggcgagccgg agatgcgtcc gccggttaaaa 13260
 ggggggcctc gggcgagaca gaagtccttc gaggtcggct gcccttggcc gaggctaggc 13320
 tcgggcgaag cgtgatcgag tcactcgtat ggactgatcc ctgacttaat cgcacccatc 13380
 aggcctctgc agctttatgc tgatgggggt taccagctga gaattaggcg tcttgagggt 13440
 acccctaatt atggtccccg acaactataa accccaaagg gttgttttag aagtctaggt 13500
 agcttttttg tctattagag agagagtata ttagaaatth attttagtgt gtgatttctc 13560
 gcaattgaga tatgttttta aagtagataa taataataaa ataaacatct atgatggagt 13620
 tttgttgctc atttgattt tgaatctcaa cttcaaaact gtattagaat ttgaaacttg 13680
 aaaataaaaa ctgaaataaa aagataagga aaaaacaaaa cactgtcgg gccactatct 13740
 cccctagtc tagccatgcc ccctcttcca tcagtcgagt gggtcagttg gccggcccaa 13800
 caccgcacca gcatgatagc atctcgcacc cgcctgggtg gtttcacagg cgaccatgcg 13860
 ggaccacgt tcagcctctc cgcgctcgtg cctatggagc gtagtcggca gacaccaatc 13920
 aatggggctc gcgcgaccgc gcttcagttt ctctcgtcgc tacgcatggg tcaactgttag 13980
 caccacggaa cacagaagac agcaaggaa agaggaagg caacttgag cagaagaaga 14040
 agaatagggt acgcaacgtg gcggatgttc tttgttattt cgttcatatc ctcaagcagc 14100
 tagcacatag tctatatatg tcactcctga actggactgc cacaatacgg cttacacggg 14160
 cactgcggc ccaaccacat ttaagtttg cttcctggtc ctcaagcagc gaggctgcat 14220
 catctcctga tgtgttgccg ctgtctccag gtcttgattc cacttgctg ccagcttctt 14280
 cttgtcttcc gacgacgctt tgctgacatt cccctgtcct cgagcggcag cttggctcca 14340
 gatcaacgt tttgaaacc gagcacgag tgcctcaacg tcctcccagg tagccagatc 14400
 ctcaactatg cctgaccaga ccaccttgac ctgctcgatt aactcaccac cacgggtcaat 14460
 gaagcggcat tgtagaatac atgtaggcac ctggataggg ccaacatctt ggggcagctg 14520
 aggtgaggcc cgttgatcac gcccgatgac ccgtttgagc tgtgacacat gaaaaattgg 14580
 gtgaatagag ctggaggccg gtaaagctag acggttaaggc acggaacca gacgatcgta 14640
 atctggaaag gaccaaagaa tttgaaggac aacttgatg tggagcgtgt agcaaccgaa 14700
 gattggatat aaggttgtaa cttcaagtaa acccaatcac ccaccaaaaa cacgcgttca 14760
 ctgcgctgct tgtcagcttg ccgtttcata cggctctgag ctcgatgcag atgcaattta 14820
 atgactttgg tcataagctc tcgttccttc aaccaagttt cgagctctgg ctgtggcacc 14880
 acaatatcaa ccaaaattcc aaaatatcgc ggagtgtggc catataacac ttcaaagggt 14940
 gtacgcccc aaggttgaatg tactgtggtg ttgtaccagt attcagcaac tgacagccaa 15000
 gctgaccaac gtgaaggaca agtgtgcaca tagcaacgaa gaaaagtth caagcattga 15060
 ttcaagcgt ctgtttgtcc atcggattgg ggatggtaag aagaggacat ggacagattg 15120
 gtaccctgga tctgaaatag ttgttgccag aatgagctag taaaaattct gtcgcatct 15180

ES 2 473 602 T3

gaaatgatgt tgacaggtaa cccgtgtagc ttgtacacat tgtcaagaaa aacacgagcc 15240
 actttagcag ctgtgaaggg atggagtaaa ggtaagaagt gtccatactt cgaaaattta 15300
 tccacaacca ccaagatgca gttatagtga gctgaacggg gcaaaccctc aataaaatcc 15360
 aatgaaactg tatgccacgc ttgtggtgga acttccaaag gctgcaatag gccaggatat 15420
 ttagcacgat cgggcttggga ttgctggcat accgtacaag attgaacgta ctgtagcaca 15480
 tcagcacaca tacctggcca atagaacatt tgtttcactt tgtgatatgt tgctggggct 15540
 ccagaatgac ctccgaccgc cgtatcatgc atagcttcta ataccttctg ttgcagctgc 15600
 aaattgcccg ccaccagat tctatttttg tgtcgaatga ttccttgatg caaggaaaaa 15660
 ggagctttgt ctgcagaatt caaaattaat tgagccagca actgtttact agtaggatcc 15720
 ttgtcatagc cttccactcc ctccctgagc caagtaggca cactgtgaga aatagcacia 15780
 cagtgactat cttcctggac ttttcgagac agtgcatctg cagctccatt atccaccct 15840
 tttctgtaga caatcttata ttgcaagcca gccaatctcg tatacatttt ctgttgccag 15900
 atagtatgta aacgctgctc attcagttgt gctaaactcc tgtgatctgt atagataatg 15960
 aactcagcca actgaagata ggacctccat tgagcaatgg ctaaaataat ggccatgtat 16020
 tccttttcat aggtcgagag tccctgattt ttcggtccaa gagccttgct cagaaacgct 16080
 aaaggatgtc cactttgcat aagcaccgca cccacaccat aataggaagc ataagtatga 16140
 atataaaatg gctgggaaaa tcaggcagag ctaacactgg tgcagtgacc aatgcttgtt 16200
 tcaaaacttc aaaagcttta aaatgatcca ctgtccacac aaataaagtg tgtttcttca 16260
 agagatcaaa taaaggctca ctgataattc caaagtgtt gacaaatttt ctgtaaaaaac 16320
 cggctagacc caggaaacat cgcagttcct tagcattggt tggactgccc caagaggata 16380
 tggcttgaat ttacttagga tctgtggata ccccttgctc actgatgata tggcccaagt 16440
 aagcaatatt tgtttgagca aattcacact tagataattt gactttccaa ttatcagaca 16500
 acaataattg caaaaccctc tgcagatgca gtagatgctc ttcaaatgac ttactgtaaa 16560
 ccaagatgtc atcaaaaaaa ccagagcaca ttttctcaat actggtttca gggtttcatt 16620
 cgttgcaact aagaatgtgt taggagcacc tgtcaagtca aaagccatca ctctaaactc 16680
 atagtggccc acatgagttt gaaatgctgt tttatattct tcgccagatt tcaaaagaat 16740
 ttggtgatat ccagctctga gatccagttt actaaacctt ttagagtggg cgagctcatc 16800
 aatcaattgg tcaaacacag gaactgggta tttgctcttg agagtgaggg cattcaataa 16860
 cctatagtcc acacaaaatc gccatgtcat gtcttttttc ttgaccaaca ccatagggga 16920
 agcaaaagaa ctattgcttt tctgaataac acctgatga aacatctctt gaacttgttt 16980
 ttcaatttca tccttcaggg ctggaggata cctgtaaggt ctgacagaca ctggctgagc 17040
 acctccacc aaaggaatag catggtcaca atccctgctt gggggcaaac cctgaggttc 17100
 gtcaaagact gagctgaact gttgtagcaa tgcttgaatt gcaggatggc tgtcaggaga 17160
 agagcctacg gaactgacag attccatgaa caacaactct atcatagtat cagcaggtac 17220

ES 2 473 602 T3

ccctggggtg ttgccctgca gcagcacaga agagccttga tatggtataa ttagccactt 17280
 ttgagcccaa tccactctca tgggactaaa ggatttaagc caatccatgc ctaccacat 17340
 gtcgtagtag ggaaggggca ggaatgaaac gtccgaagta aaactgcagt tctgaatctg 17400
 ccattgtgcc tgcaacaatt tgtaatgaca agtcaccata gcccattgg ccacttgac 17460
 ttgcagagta gatgccatag atgtcacccc ttgcaagtgt ggtctaagtt gatcattcaa 17520
 aaagtggtgt gagctgccac tatctatcag aataagtaag ggatgattct gaatgctccc 17580
 atttaatttc agagtttgtc gaccagtcga ccccgccat gcagatttg aaatagtcac 17640
 gaacaactgt tctagagcag gttcaggtgg agataagtca gattcgggta cttcttcac 17700
 caccaataat gaccaaact cctccatagc atgaagttga gcagtggcaa cacatttgtg 17760
 accgggattc cacttttctg cacacttgc acaaagacc tttgctcgac gaaaacgtcg 17820
 caacgattcc agcttatcag aatgagatgc agattgagtt gaatccttgt ttgaagtcca 17880
 tttagttgaa gcagacaact gcacaccagt cttggggcca gcatgacttg aatatggttc 17940
 agaacggcgc caacgtctcg ccgttgtggc ctctctctgc accaacgcga gagaacaggc 18000
 agtgtccaaa ttcgacgggc gttgcaccat aataacagct ttaatatcat cacgcaaacc 18060
 atctatgaac cgcatttgtt aatacaatgg gtcagcattt gcttcatatg cagacaagtg 18120
 atcaacaagt attgaaaatt gttctacata ctgagctacg ataccggact gatgtatgtg 18180
 gaaaagttga cgaattaagg attcatgctg ctctctacca aatctatcat gaagctggcg 18240
 acaaaattca gaccacgaca acatacgcac cctctgacca acagactgta accatgatgc 18300
 agcacgccc ataaaatgca tagtagctac acgaatccac atatatggtt ccacgtcata 18360
 catatcaaag taattttcac aaagcgtctt ccacaactga ggattgtccc cgtcaaagtg 18420
 agggaaatta accctcggtg ggttaccgtg cccacagcga aaccctcgt gaccgccatt 18480
 cagttcagtg tgacgaacag aatcatcaaa tggatcaata cgaggtgaat cgtggtagct 18540
 acccttgacc gggacatggg tttgagcatg accatgccc aaccacgcg cccggtgaca 18600
 tggttcagcg tggtgccaa atggcccgtc agcgggttgt ttcccggcag atggatgctc 18660
 ggacgccaac ccggaaggag tgaagagacc tggcttggc tgatcagcgg cgtcgtctc 18720
 acgctccatg aacttgggtg cacgcttctc ctgaggaag aggttctcca gacgcctctc 18780
 cacttctggg cgccaagtat ccacctgga atgccccatc ttgagtgaga tgaagcgtgc 18840
 ctccgcttgt tgcgccatcg cgtcgatccg ttgctcaatc gcgccgcagc gattctccag 18900
 cgtcgcagcc atgcgctctt ccatctgca caaggcctct agaaccttct gcatcgcgga 18960
 atccataccg gcgaccgagc tggatcgagg gcgccgacc ggtatgggat ccagattctc 19020
 taggatgaac tagtctgata ccacctgtta gcaccacgga acacagaaga cagtaaggga 19080
 aggaggaagg gcaacttggg gcagaagaag aagaataggg tacgcaacgt ggcggctgtt 19140
 cttgttatt tcgttcatat cctcagcagc ctagcacata gtctatata gtcactcctg 19200
 aactggactg ccacaatagc gcttacacgg cccactgcgg cccaaccaca ttttaagttt 19260

ES 2 473 602 T3

gcttcctggt cctcagcacg cgaggttgca tcgtctcctg atgtgttgct gctatctcca 19320
ggtcttgatt cccacttgct gccagcttct tcttgtcttc cgacgacgct ctgctgacag 19380
tcaccgcccg acagacttgt gggcccgtt cgccagaacc ttcgtctccc tcccgtaacg 19440
aactagggca caacacaaac ttgtacttgt gtagccgggg tgtgtttact ggccgaccgc 19500
accgccttg gactcgtcca ctgcccctat ataaacggtc gcccccgcc ctcgatcaat 19560
cagagtttag gagcccctgc tacctgttgt cgtgtggcgc cgtcgcaatg agctcgacgc 19620
cgcacgccat cgtaattcag ccacacctac gcttttgctt tgctttcggg aggaggtttg 19680
agggtttcgc cgtcgtacgt gggagctgct ggatgtttcg ttaggtgagg gaatctactg 19740
gaggcaggca ctgctgccc aggatcacg ttgcatccca agccaccgtt cgacgtccc 19800
gactctcgcc ctcaatttag ttaccgacga ggacccttg actgtttcgt ttgcttctca 19860
ctcgtacctg ggcacgagta gcgctttaga tcggttttg ggactcggg ttgctcgccg 19920
gtgttcagag attaccacag agtcacgctg tgctgagcgc gaggctcgac gctgcatgat 19980
cattgatcag accttgtccg tgttgtcttc attgaccaca gcttcgcata ccaccatttg 20040
gattggagaa atagagcga aggtcgtcgg ttcgctgtg ctagcgagct gtcagggcgg 20100
agctctatth ctgccaccat gacgcgttgg tagagaaagg agcggcatca gttgatcagg 20160
attaaatccc gcgtaccctc tcagcacatt aaatcaaagc cgtcagatct aatctagacg 20220
tttgtgattc gataatagcg tgtcggttta gtatttaaht ctggaccgtt gatctctaga 20280
tgatgcctt aggtcgtgta ccagtttagt tagttgggtg aactttatta aagagcccct 20340
ataaaattha ggaattaacc tgcaatcacg tgatatttag aaagtcatgt agctaggtea 20400
tgttttaac atattagacc cgatggattt tagaatcgga agtacacatt aaaggtatga 20460
ttctatactt agtacattag tttttgtgta ctaacacatt tgtctaagtg ctagaatgag 20520
aaaaaagaca aaaggaaaa gagttggctg tgtacagcca actgctgttc agtctgggtg 20580
caccggactg tccggtgagc ctacagtcgg ccgcgcaatc tgcgctgac gcgtggccgg 20640
gccaacggtc tgatgggggc accggagtgt ccggtgtgca ccagacagtg tccggtgccc 20700
caacggctcc aaatcttcaa cggtcggctg cgccaaaata ggaaagcaat cagcaccggg 20760
cagtgtccgg tgggtgcaccg gactgtccgg tgcaccaccg gacagaaggc aaggataacc 20820
ttcctggatt gctctcaatg gctcctagct gccttggggc tataaaaggg acccctaggc 20880
gcatagagga gtacaccaag catactataa gcattcttga tcattcacac tccgtctctg 20940
ctcactcgat tgactttctt agtgatttga gctccgttct tgtggcgaat cttgtgctat 21000
tcatttgagc tcaagtcttg gctgtgtgtg cgtattgctg tggatttgtg tgtgttgctt 21060
ccctccccta ctctagtgtt ttcacttga tccttattgt aagagcgaga gactccaagt 21120
tgtggagtaa atgaaactga accctaaacc ctaaaccctc taaaaatgac taaaatgcaa 21180
aatagacggc gcatacataa ctaggagtaa aatgtccgaa aaaaaatcgg ctcgagtctc 21240
gagactcgag tgccctctct gcctataaat cgaaccctaa ccctttttcg tacctgtttg 21300

ES 2 473 602 T3

tgccttagg gtttaggggt cctcgtcat tcgttcgcca cctcgcccca agacgtctcg 21360
 ctagggtttc gccacagccg ccgcatgcc tcgccgcaag cttaggtaac cttctcctct 21420
 ggcgcctcct agggttttgt ttcgagattc ggttgttcct tgcgttgacg ggccggggct 21480
 ggctcctcct ggatctgggg ctcaggcgcg taggcttggg cgttagtaga tttgattcag 21540
 tcggtatgat gtcgttaatc gtttgtttta gtatgtgcaa atgatactgg ggttggtggg 21600
 ataggattgc gcatgtttgc catgtttagt tgcagaaata tccggatctg tttcttgcgt 21660
 tcaatgggct ggggtctctc ctgttttagat aattgtaaga aatggacggg tgttcataat 21720
 cgacagagat ccgattgctt ctcgaataac cgattgcaga tactatctgt tcgcaggcgg 21780
 ttcagacagg ggcataagaac aaatctgaat cccacgagg gaaggtttat ttccattaat 21840
 cctttctcgt taggattcgt atagatttac atatatacta caggttgtct tatgaggtgt 21900
 ttggtatatt cttgaaagt aattcaccag ggtagtggac tgaatcttat gaatgttgta 21960
 tgtgtgtagc tgtattgat tgtccgttta taatgcctct ttgagtagcc attacagtc 22020
 ctgagtactg tcttggttta gttagggggc gcaaagcact ggacatctga tgtccactca 22080
 ggccttttga gggggtacct cacctgtctt accaagaagt gcccccaag cagccttaga 22140
 catacatcta cataatctct gtttgaagt gcctcttga gtagcatta cagtccttgg 22200
 gtactgtctt ggtttagtta gggggcacia agcaatggg atctgatgtc cactcacctt 22260
 ttgaggggca ccttatctgt cttacaaaga agtgccctc aagcagccct agacataat 22320
 ctacattatc actgtttgat ctgtcctcaa tgccacgtct tttcacttag tttttggcac 22380
 tcatatttgc tttattgagt tgccactgta gttgtatata caatcttggg ttagttagga 22440
 ggcacatgtg atcttgaaaa aaactgacat tgtagtgtta tcatctttcc tgttgaatgg 22500
 tagacatgta atgcaaaaca ttcaaaagat tgcttgtgta cttgattagt atcaaggttt 22560
 cagggagcga tgacatttct taatatattt ggaggactca acttagttac taactggact 22620
 acaagtaaca aataatgtgc ctcttgtctt tattcatccc ttcttagatt gattcctaca 22680
 gttaaactgct attttcatca tttttgctgg tggaagatgt ggttgagctt gctttacagt 22740
 attttggttt tgttagcttg tgttgcactc ctctctctac atttattatg tgttgatttt 22800
 tgagttaaaa ctttgtttat gataaacat gttgctttct ttggtaatt tttttgctt 22860
 aatgcttatt cccccactgt actgtcagga aggtccgcg ctcacgccc gctccacatg 22920
 ctgctccagt gaggaaccca ccacagcctg gtaaagtgat tcacgcagac aataagtatc 22980
 tttagaactg acattggcat ggtaatcatg cctcttttga ctctgcagta ttctattgtg 23040
 gacatgtggt tcaattatgt aacttttagt atatttttgt ataactgttt gctcagttgt 23100
 tgagaatgtg ttcggtttgt tactataaca atgttgatga cataaatata ctgttaagtt 23160
 tatattggaa tttgtggtag aagtctgaag ttgttgattg tgtttgaagc agagtcaatg 23220
 gcatttcggt ttatatagag aattacagtt ccttgttttt tggtagaact ggaacctgtt 23280
 tcagttctgt tcctaagtct tacacatggg tttgtgctac aagtatagta ttagtattac 23340

ES 2 473 602 T3

agagctcatt gttttggaat cttgattgct ttggaatcag aatcgtttat gtttagctca 23400
 tattagtatt agtattacag ctcattgtgt ttatatagga gttttaatct gttctatttc 23460
 tgttcctaag tgtcttctga cttttctttt tggcagcgcg ctaggctcgt cctccagctc 23520
 ctgttcgtga tgggtggtgg ggctccattc ttggaggaat tgggtccacc attgcttaag 23580
 gtagttttca aagcttgttc ttttttgaat aacttcagca acaaacatta tcataatcct 23640
 tgaattgatt tgaacgaaca cattgtttta ggtatgccat ttggtacgag tagtgccatg 23700
 gcacacaggg ctgttgatgc tgtaatgggt ctccggactg ttcggcatga gattgttatc 23760
 tcagaagctg ctgctgctgc ccctcctgct ccagtgatga acgctaatgc ttgcagcatc 23820
 cattctaagg ctttccaaga tgtatgtctg cttgccacct ttatgctgcc ttgttttccc 23880
 tcaatttgat gcatgaaaca tttggttact cacttctgtg atgtagtagt gaagttttat 23940
 ggtgtctttt tttttccttt actgaacctg caaattactt aatcatcaaa ccttggccat 24000
 caatcaagtt ttaatattat gggcatgatc ctaccgttgg ctttgttgag gtcatgttaa 24060
 gaattgttaa cctgcatttt gtatactcat tctgatgatg gttctcaccg attttcttgg 24120
 ttgatgcagt gtcttaacaa ctatggcagt gagatcagca agtgccagtt ctacctgac 24180
 atgttgaacg agtgccgcg tggtgttgtc tgcctgagct tttgctcaa ttgggattat 24240
 tcatggattc tcttttctc cccatgtatc tcattaataa gacaccgtga aacttttaac 24300
 cctctccacg aatgcaccat ggcacacgg gttcatcttg ttgaatctgt ggttacgttc 24360
 tctttatcct gtgttggttg aacagacttc tgtctcttct ggtgatcata aatattttaa 24420
 tgaaccagtt gtgttgaaa atgttgttt cttttgtctc tagactggaa agcggagttc 24480
 tctcaacac ggttctttca actagggatg aaagtggtaa tccgaattgt tagtacaat 24540
 ttaatatttt aaaatagata tgtataaaat tttatgttga tcttttttat gttatcaagc 24600
 acattagtat aaattagtat aaatatgaat aaaatattac ataaaatgtt ttatgtatta 24660
 tttggtcctt acaacataaa tagttgaaaa aattactaaa tttgttttcg aatctataatc 24720
 gaagtttata tctattattt aagaaaaata taggatgaaa aggtttatct tttatgaatc 24780
 tttacaagct ggatcttata aacaagaaaa taaatttata ttgtagattt tatatcctat 24840
 ttattcgcga tcaaagaaaa gcgactaaaa aactgattac cgagtaaata ctgtttccaa 24900
 ccgttttctg ccctactatc aacgccttct cccaaccgca gtcgatctgt ccgtctgtat 24960
 caggcgcagc ggcacccctg ctgttcgact atctagacca tagaatattt taggtataca 25020
 ataattttag ttccacgcta gaacatttta gttagaataa taacaagatt tgctattgat 25080
 gtaggactcg cccgtcactg tctaaaaaag cattctgtcg gtcttattct ttaggcatca 25140
 gcgggtgtac tatctcattt ttctatcat attcctcagt actctgttaa gtataaatgg 25200
 tctattttac atgatgaact aataaaacta attaaggatc ctaactttt gtgaaggtaa 25260
 tttggatcat tatgcattac catcctacgt atacctgctg cagcagcatc tgcgtaagca 25320
 cagcctagat atatgcttct gtgtggactg aaaggagact ttgtttatca attagtatac 25380

ES 2 473 602 T3

tccccaaaaa ctgatgacac caatgatgca aataggctgg gaatagtctg tctaatagtt 25440
 tgagtgaatc atgtcactgt gcgtcctctg caggcagttg ttgacatgag cgcacgcgca 25500
 ctgctgaatc gccatggtct gaaggcaaca gataaggcat actgggcctt gtggtagttg 25560
 ttttactggg cctttttgta tgatctataa aattcactgg gatcaaccg gagaggaatg 25620
 gcagcagatg cagtccccag ggtcctccgt cgccgcctga gcacccggca cccgcgctga 25680
 accggagagg gacgcgcgga cgccgtgcag ctggtgcgga gggggctgtg gcagatgagg 25740
 atgagacgcg tacgtggctg ggaaggccag caggccaccg ggtcttcgtc cagccccggc 25800
 cgagtggaca ggactagaga tggcaacggt tacaaccg ctgggtttta cgcgccaaa 25860
 cccgtaccg tgaaaaatat ctatgccat taaaaacc gtaccatga cgggtttgag 25920
 atttgcccc aaccgctacc catcgggtta acgggtacc atgggttacc cgcgggttc 25980
 atctccaata tacctgttct tctcataatc aataagtatc gtaatgatta atgatcat 26040
 gatccaaat ctatgtaatg aacaacgagt tcatgattg gtataaaat tattagtaga 26100
 gagaatgaaa tacaataat aagttgtata attaagtac cttgcactaa gttatccatc 26160
 catcacatat ataacgctag taaaaactat aatatcaagc aagcaacact ctcaccgact 26220
 actgatacat tcaccaatg ataaaaata tgaagtaaat aaggaataac aagtttgtg 26280
 ttcgtttata aaataaaatg acaatatgca ctaggtttg tcgggtttaa aaaaccacg 26340
 gggtcacggg tttgggtact ataggaacaa acccgctacc ataaacccat tgggtacaga 26400
 tttatgccc ttaacaaacc catgggtatg aaaattgacc caaacctata ccctaaggg 26460
 gtaaaacc atcgggttc ggatttcggg taccattgc catctctaga caggacaacc 26520
 tcggccggtc ctgtatgtag gccaccagca tcggccagtt ggtacatcca gccggggtca 26580
 ggtcactttt actcgtctca atcagacaat caccgtccac caacgaacgc caacgtgtc 26640
 acttgtcagg tcggttgaga cttgtatttt tttttgtcct ccgtaaaaat cagttccaac 26700
 gacagatacc ccgacggtaa gcggacagcg ctgtcgtagt cgttttgtt gagtccacaa 26760
 atgagccgaa gatgcaagca gcatatgcaa cgtgtgttac aaagaaaaga agtggatgca 26820
 aaggcactac gagaatgaac tgggtgccag gaaagatgga accaaaccaa cgaactattt 26880
 tttccctcct ttttttatt aatgcttcgg acgacgatag cagtttctgt acaactctg 26940
 atatataaaa aacaaacaat atgacggatt aacctaggca tccaatgcc cccaatttc 27000
 ctctgctat agcgcacac cttgctgctg cgacgactgg agccttcct tgaggaagcc 27060
 cctgcacacc ttgtccaca gctcctgtc cggctgccgc acgtcgaagc tcgtcttggc 27120
 cacttcacc tggcagtcct gccacaaca aacaaaacaa ggacagatat tttttttgt 27180
 cctccgtaaa aatcagctcc aacgacagat accccgacgg taagcggaca gcgctgtcgt 27240
 agtcgtttag tttgagtcca caaatgagcc gaagatgaaa gcagcatatg caaggtgtgt 27300
 taaaaagaaa agaagtggat gcaaaggcac tacgagaatg aactggtgcc acggaaagat 27360
 ggaaccaa caacgaacaa tttttccct cttttttt tattaatgct tcggacgaag 27420

ES 2 473 602 T3

atagcagttt ctgtacaact cttgagttct gaagcacata taataaaaaa caaacaatat 27480
 gacggattaa cctagggatc caatgcccc caatttcctc ctgctatagc gccacacctt 27540
 gctgctgca cgactggagc cttccctga ggaagcccct gcacaccttg ctccacagct 27600
 ccttgctcgg ctgccgcacg tcgaagctcg tcttgccac ttccacctgg cagtctgcc 27660
 aacaacaaac aaaacaagga cagatatttt ttttccatgt cacagacaga cagacagaca 27720
 gacagacaga gagacaaacg aacctcggc acgctgtcgt tactattatg attaattacc 27780
 agtatgtggt tgtggcggag gaggcggtcg gcgatgctca tgaggacgtc cttgctgtac 27840
 tccgggtggc cctggacgcc catggcgcgg ccgccgaggc ggaacatctc gacgcggtc 27900
 ttgtcggacc gcgccagcgc ctcggcgcgg gggggcagct cccacacctc gtcctggtgg 27960
 aactcgatca ccggcatgtg cacgggcagc ttcagcggcg cgaacagccg cgccgccgc 28020
 gccgtcgggt ggatgcagct caccctgatg tcccagccct tggccgaccg ccccgctgcg 28080
 ccgccagcg cccggcacag gatctgcgtg ccgcaatcaa acagcttcag gagttaagac 28140
 ggaagtgtag tagccacagg agtttagagg tacgtgtcgc taacgtggac gcgtgcaagt 28200
 ctgcctggca tcggcgcacc accaccgaca gggccgatgg acgcaactaa aacgttttct 28260
 tcgggaacac gccaaagtaat tgattcatgt gcacacagac tgtccccctt ctgtttgtag 28320
 tacgatattg ggaacctcct aggattccac tgctaaacaa ttggtgtctc ctgttcctgc 28380
 gtacgagtac gacgacggaa gacttcgcgg ccacaagagc aatccaaatc caaggctctg 28440
 gctctcggac cacagggaca gcgacagtgt aagagctctt tgaagttgcg agtgttatta 28500
 acatagaacc aagtaataat taggagaaga ggtcagtagc tcctcacgcg tcgaggcacg 28560
 tctctgacaa aagcgtggtt cgcgcgggcg attgcgtgcg cttgggcttg ggcgctacc 28620
 gcacgccctt gggcgtgatc tgatcccctg agctgctggg ttggtacgct agtagcatcg 28680
 tcatcccaaa agcaatctcg ctcggcagc gagatgcgtc acgccatttg cgttctctgt 28740
 cctctctcct cttcccgggg gatttgattt taaaatttgc aggcgcgggt tacgcgccac 28800
 tttgaggcaa acaaaccggc gaaccggaat aggggaaccg ctcgctctc taagccaggg 28860
 caggggcgca gggctctgtg actgtgagcc aaacgtccgg ccacagacgc agcgggcccgt 28920
 aggagatcct gcagaacaga taccactcc acttgctgtg gtgccaacaa caacagcaac 28980
 ccagctgcca cggccacgtc acaccagtg aatcagcgat gtcagcctcg agccttaacc 29040
 cttgtttga gagatgctgc cgtgtcttaa acctagatta gcgtggagtt tgtagtcact 29100
 aatccatcca atcagtcctg tgtccgtctg tttgcttga cccgaatcaa accaggggcc 29160
 tctgcttcta tgaactgaac tggcatggac tgaacaacaa cagcgtcatg gcagaagcaa 29220
 gagctctata ttgtgcgctc taaatggaga ttggtaaaac tcgtagaatt gggggttcgt 29280
 ttcttccgct aaactctaac tgtgggcttg atgctagcac tgagtcacct ttgtcattct 29340
 ctggggaaaa aaaataaggc atctttccgt cccattgct actgctcacc aattaagcag 29400
 ccagtaccgt ttgtactagt caaatgcat caagaacgac cacgggtcgc cgtaaaaaaa 29460

ES 2 473 602 T3

aagaaagaaa ataatagaaa agaaaagggtg cgccgggtgg acggaagggc gctaggctag 29520
aagagcggca gccccaccag gtggtgcccg cagcgtcccg cggccccgtg attcaccagc 29580
gacgacggag aaaccagct acgcgcggaa gggactagac gagaaccaac cgcaccgcac 29640
ctaaacccaa ccaaacagca agtcgaacca aacatggacg gatgggatgg gcacctggtg 29700
gccgaagcag acgcccagga cgcgcttgcc ggcggcgtgg acgcccggg tgaggtcgac 29760
gagcgcgagg atccagggct cgtcgccgtg cgcgtcggcg cagctcccgg agatgacgaa 29820
cccgtcgaac ccggctgcct cggcgtcggc ggggagctcc ccgaggacgg cgctgtacac 29880
ccgccacctc tcgccgtcct cctccagcag cgcgcggaag acggcgaagt agccgccgta 29940
cttctgccgc acgtactccg agtcctcgcc gcactgcagc accgcgtacg agcccgccg 30000
cgagggggcg gcggcggcg cggcggcggc ctccagcgcg gccgacgcgg cgttgtcgag 30060
cggccccatt cccatggctg gcggcgtcgc ggccaggcag gcgctctcc ggcccgggaa 30120
tggagggcgg ggttgggctg cgcttggtt ggctgactcg cttgcggggg gtgagaggtg 30180
gcggggagga tggggggaga acggcgaggc gaggcgaggg cgatatata agtaagcacg 30240
agcggttttc cctcggattt tttttattt ttcgtcgtg gttttccatt ttgtattat 30300
agtactgttt ctgtttttt ttactggtac tgggctggc cgctaccggc ctaccgtaa 30360
catttggtat ggacgtatgg catggcaacg gccagcaggc gcgggacggg ggctaccggc 30420
gagcggcggg tttgctcggg tcccctcac tgctcgggtc tttggccggg tcctagtaat 30480
gggtacccaa aatcgggtat ccgatagata aaaatcctat tagagcatgg atgtagcga 30540
ttttaatatc tatggatatt ttattaggtc atttatata tttcactcgc tcatgcatac 30600
aatatactta acaagcaaag aagacaaacg tggaccctt aatctcacct ttaaacata 30660
tattgataaa agagttttt tttctagacc gatcttgtca aatactgtat ctacctgcct 30720
gataaaagat tcaaacagga agagcaaaag cgtatatcaa attaattgac acgggagtc 30780
atctctgtgc tcagagtaag cgagccctac aattgcaaaa aaaagggggg ggggggggg 30840
atgcatatgt aatatctgat gtcatttata tatagtcaa cgattctctt tcgtaccaag 30900
ttgcaagtcc tcatatcgaa tcgtaagtta ttctgtttc ctgtgtacat atgaacatat 30960
ctatctttta atacaaacag cattttttat agttttttct aagtacatat gaacatata 31020
ctatcttcta atacaaacaa catatttttt gtatagttt tgttatgatc atatgtttc 31080
ccatgctacc gtttgatta aaacacggaa actaaactac actaatttat tttattcata 31140
tttctttctt taaaaaatg tttttatcg ttccatctc tctatttcaa accgtaagct 31200
gttctggctt ttttttcta aatgcgtatt ttagttatat ttctagatat aattagagtg 31260
tacataaaca cataaaaacc cacttactaa aatcacaaca acttacagca atttaaac 31320
gtgagattgc cgagcagggc gagaaccgac tgtagacat gctcacatgc atgtctggg 31380
cattgtttga ttttatttgc ccgagaaatt gctctgtttt cattcgtaga atttgtacta 31440
gtattttctt accgaggctg gctgggcata cgtgcacgcg cgcgatcgtg cagcgacatg 31500

ES 2 473 602 T3

cacatgcaat gcaatcaccg cgtgacggag taccgagcg aggtcgtcga ccacgtgccg 31560
tatggggccg tggcacgtga caccaccgat tcggatcctt atttattcat tcatttgtca 31620
gtccccacgc attgtattta aaaattcaga aacgtaagcc cacttttacg caaaaacaac 31680
tttactgtcc gaaacgcctt gtgcaactag ctaggctagg aggctaactc attagtaaaa 31740
tgttgtgttt tccacccttc ctttgtacta attttataga ctattagccc ggacgagctg 31800
gctaggccag acagggaaat tatattttac tttgacgcct catctggatc attggaattg 31860
aattccattc taacaatatt aatttaggta tatatcaatt aagctaattc ggttttatgc 31920
aaaatatatt tatatactat tattagcaag atgtcggaga tttttatgtg ctacattttt 31980
actataaagg agtgaaacga agagtgtcat gtaaattaca gactagaaac gaattctact 32040
aatgcataaa atcatttcac acactccacc ccatgaattt gagatagcct tatatctgaa 32100
ctttggaaag tggtggaatg tcaaattcca aactaaataa gttattttat tgagtgaatt 32160
ccaattcctc taaaatgaag ggatccaaat gccccgtgac tgggaatttg agacgaagcg 32220
cgcgcagaat attcgggtca aatagaatca gctacatact atgtgcatta gggctcacat 32280
aaataatcca tatcttgagg agtatcaaga gagtaagtgt aaaaaaata caagagacat 32340
atcttgatga agagatgtat ctagctcagt tctctaagtc tagatacagt ttcgtccata 32400
caaccacat aaatgagtta tatcatgaga gattctagtg aataagatat atgattatat 32460
acaaaaatag tttcttatat gttttttgt attttgaaaa ccgaactgga gtcttaagggt 32520
tgcacatgcc ctggatgtat ctagtgtttg taaaacctgt ttgtaaaacc gcaacaaagt 32580
ttctacattg tacatgccct tagggatggt accaattttg gtagtgaaac gcaataatga 32640
attaagcaat aattcaagcg gatcagaatt aaatgagacg tgtggtgtag actgtagaga 32700
gtactctacg atatgtagtg ggatacttgg agcagtaatt attactaac atgaggtgta 32760
gtaaacattg acgggataac gctgcacatt aaatactagt atcagtaaac gatgcaatat 32820
gcacgatcat ggtccgagag aatattcggg tcaacacatc tatctcctgc gtttatatat 32880
tattaaaact gaacgttacc gttttttgtt agtagtgata aagatcgatt aaggtaactc 32940
cagcaacggt ggatgtgtat aacctgttt tgtattgtag atgtactctt tttatataag 33000
gagaagttta aaatagaaat tacgataacg taaagtgggt tttaccggc taaattgaa 33060
cgttttccct ttccttccct ggtcctgtac ttgcagtatt gcaactgctgc ctgctcggtc 33120
atcgatcggg acgacgacgt cgtcgcgcgc ggcactatgg gcaactagtag tttggtggca 33180
gtggcacacg ttcgtagtgt gtgtcacttt ggtgtctgga gcctgctgga gcaagacagc 33240
aagtcaggct gaggccggct actcagctgg gcgagtgggt gttgctgcga gctttggcgg 33300
atatcagggg atgcatatat ggcaacggct ccaaaaacgc gctgctgcga ctgcatgcc 33360
ctgcagcatt gcaatggctg gccggccggg gcgcgttgct tggagaagaa atgctgtccg 33420
gtcggcgaac cagcctcgat cagccatgcg gttgtgatgc atgcgatgc ttaacagtct 33480
ggaccctaac acgggctggg tgaagctgaa gaggacctaa tttttggtag ttttgtttga 33540

ES 2 473 602 T3

ctgaattatt ggtagttaag ctagattagt cctacttttg ggccggggct ggctttctgg 33600
 cctagctcaa cacataattg ttttttttc tccatacggg cggcgtacat gcgttcaaat 33660
 tttaaacctt gaccttttac ttttattcac gtacggtgta ctgaacccgc cgtagtcggg 33720
 tagaaaaaag tttaaaaatg agagacacga cctcatgtta accgtcaccg gtgcatcatc 33780
 gatggacgta cgttgacagc atcacaacga ctacaaaaat atcaataat gcatgttaat 33840
 ctgattctta gtatagcctt tcggtgtcgg caaattgcaa tgccgtgtgc cactatgttc 33900
 attctcaaaa aaactgacca attgacgccc gactaatgct ggatcaacaa cgaccgcaca 33960
 agtcgtgata gtaacggctc agctagtttt cacttttcag agattaattt agagacagct 34020
 agctagctca ttagttagtt agcaaattag ctagttattt gttagttagc taatttcaact 34080
 aatatttttt agccaactaa ctatatatat cttcagtgca ttcaaacagt ccctatataa 34140
 tctagattaa tttagttgta gctatttggc atcctagatt aatggaactc agattttcat 34200
 cattagacaa cactgtccac ggtcgtatct cttcattatt tatgatactg tagcagtttg 34260
 taggtacata aaaacgttga acatgttcaa acacattaaa aataaatatt tcatacacat 34320
 tttgtgccc aatcatacta catttgaat taaattacat tcttctcgca aataatacat 34380
 tgacaatttt atctagaaaa gtattcgcgg ttcctcttc atctccaat ccggtatcgt 34440
 gatgacttga tggatattaa tcgttgtcgt cttcatcaca tcaatcaaat agttcttccc 34500
 gtatatgtta ctacctcaa tgaaaaaatt attccttcaa cattggataa cttggtaagt 34560
 ccaataaaat tatgaatttc atcttcgaga cagcgaaga ttgctcaata tgataagtg 34620
 aattggttga atacatctca tcatcacatg tcagtcaatt aattagtcga tcaacgatga 34680
 aaattaagcc ctgaggttca ccgtgtcaca aaacgacatg attgtgtgta cagttttcgt 34740
 actatttaag ttttacctcc ttcctatatg aaacataatt cctcaacgat tgtttgcttc 34800
 ggattaaagc ggactattta gattggtgta ggtgtaattc ataaaaacaa aagtactata 34860
 gaaccagtag aaaccggtat agattaaagt caagggaacg actgaaagtc cacaaagcta 34920
 ctggattcca tgagcttctg tagataacaa gcccgcacatg gcgacgtcca catgggcccg 34980
 gtctgaaaat tcccttccca gcaataaag agaaactagc aaattgttca tatatgtac 35040
 ggttctattt atacttatgt atagaatata aatataaag atatgagtgt attgttagtt 35100
 atgtggatat gaatgtgagt ttagagctaa taatcatagt tcgaatctct atttgtatat 35160
 aattttagca tttttataat ttaaatgtga ggtatacgat gaaaatcata aaactaggaa 35220
 aattagtgtt ttaatatagt acagatatta ttctctgaac caaagacaca caccagaata 35280
 caactcacat atgcattgca cgtgtgaagc tccgacacac agggcgcaac aactcagctg 35340
 ctttctttac gtgatcagat tgctagagta cttcaciaag ggacgcccag agagtatcgt 35400
 tcaccaacct ggcagtgcca gttgccgat tgtactagtg tacaaaagcc cagctgaacg 35460
 gtgatcagtg gcctcccaat gccattctgt gtagggcgtc acagatctat caacaccacc 35520
 aaaccaagc cagcacactg caaaacacca aaaggattga agcaagctgc caaatggcac 35580

ES 2 473 602 T3

gcgttgacagg aacaccgacc ctgcctgatt cagagtcaga aatgcaatta tagacgagtc 35640
 tatgggcatt gtcactgaca gaatgacagg gcaaagatac cacagtttca cgcgaaaaca 35700
 tggccgtggc acgttggccg ctcgaggcaa caacttctat attggcatag ccagaatgat 35760
 aatattgttg tacaactcag ttagagatcg agtcgcacga tcatgctcgc actctctgat 35820
 tagggacgta acaatctggt ggtaataag ttctcctttc ataccacata ataaatagtc 35880
 aaagaaccga tacgcgaacc aacattcata ccgagattcg atctaatac taccggccat 35940
 cttttcgact ccccgaacca tagccggagt ggccatgggc atttctccgc ccttgatcag 36000
 catggcatct cttccaatt ctggaggtag aaatctatgt tctatgattt ctaatggcta 36060
 ggattacgag tcgaggtcct aaaatctaata agtggtatca aagccatggt tttaggctcg 36120
 ggctctaact ataaatgaca gttttcctta agttttatga caaaatccga gaaaaacacc 36180
 tcttaactct ttgtattcgt gttcctactc acgtagaaca agcaaaaagg gagaaagaaa 36240
 cttaaccca acatctccac ctttccaaa ctctaatacct aaggcagtc ataactctgag 36300
 cacccaagca cacaaagaaa gggaaagcag acgttaggaa agcagccatg tgctatata 36360
 tcgaagacct agcctacaca cacatctgtg aaactgtatt aaattgttaa atatttttag 36420
 tttgttaaat atttttaaat tacgttaact cgtcttttct agttattact tatagcttca 36480
 aatctagttt catttacgat aaagttcaat aatcattatc cttctcttga ttactatttt 36540
 catttggtat gaatcatgat cggttgtttt tctctaaatg tttgggtgag taatctttag 36600
 gcttgacaaa cgaggatggt gaattcattt tttacgcatc tcatattatt taaagtgcag 36660
 cacttgatac cgagcacaaa ctcgatggca tgtaagtgat tttagggtgt gattgacaca 36720
 caaaataggc tattgggagt gacaaacaac tcctcaagtc taaggactaa ataagaatat 36780
 ttagaaaatt agtatatttg gatattctcat ttaaaaacc attgaagctt gatttttgg 36840
 taataacatc ctacattatt tttaggcct gttttgggaa ctagagatgt tctaaggcct 36900
 accactcaat tggataccta attagttgtt gactaatctt gattagttgg atgacagaaa 36960
 atagaatgga actaggtaac taagggggtg ttggattaca ctagagataa tagttagctg 37020
 ctaaaattag ctgaagacat ccaaactt tagctaatag ttaaactatt agctatttt 37080
 agcaaattag ctaatactcc ctccgatttt tttatttgac gtttgtagt gaaaatctga 37140
 actattgagt gtcaaataaa taaaatgga ggtagtagtt aggtagacat ttgttaggta 37200
 gctaattaca ctaacaatgt ttagccaact aactattagt tctagtgcag taaaacatcc 37260
 tctgaggtga tgacctgcat gtggtatgac ttaagtcact tggcctcatt agcctaattt 37320
 gcaactctac atgcagccat cgtcctagag ttaattggtc actagttagt tgctaactgg 37380
 tcatagttag ttgtccgtgt gtgctaggtt ttctttatac catatagata ggctttatcg 37440
 aaaaaagata tttattttaa cacgatctaa actcatagat tctcatatcg cacaattata 37500
 tttttttatt tttaaattat ttgtatata atttacaata tcaattctta ggacaaaatg 37560
 aacatgtggt atactggtta gagactctt gttttgtctc tcaactgagt agcaggattt 37620

ES 2 473 602 T3

gaaccctcat aggctgctgt ggacgcacgg ccgcgagagt tagacgatcc acgataaaac 37680
 tcatgtttta aggggtgtgt tggttgtaat gatgggaatg agacagaatg aaatgtgatg 37740
 atcctcaaat aaggttgttt agtttagggt caaggggttg aacaagactg tcccagtatt 37800
 gtcccagtta tccctcgaaa ttagagagac gagaggggac gcgaggaaac gtctctgacc 37860
 tggctatccc tatgtgtacc gcaaccaaac gcaccataaa ttaatgatga tgatgcttat 37920
 tgttgttgaa agggttgcaa ccttaactac agcactaacc gccttatcca aggatcaaac 37980
 acaaaaggcc aaacctgtga agatttactg ttgtattaca taattacaag attaccctgg 38040
 aatgtttcgc atgtctgtaa accgaagaaa aatagttggt tccaaacatc ccaggacta 38100
 gcctgtgtgc accttggcgc gcagaggctg gagttgattt ttcctttatc gaaaaggaaa 38160
 tatttctaag cctctaacca tttttgcatt ctatgcagtg tcacctcatc agagagttaa 38220
 tagttaatca agcctcccaa aaccttcatt tattaatgag ccagtgaaac tacatgatac 38280
 catcatagta agaagttcca tgagtaacag gtcagcagat tcatttttca tttgtgaaac 38340
 tagattaaac aaaatattcc tttgggttga agttttttt gtctatttga cttttgggtt 38400
 gtaacatgaa caaaaatata ccacctgcaa ctgaaacatt caaagattca aaggtaacct 38460
 cctttggaat gtttacaagc tcaaatgcct ggagggctc tgcagtgagg ccattgccct 38520
 cacttcctaa cactaagcac agagattcat tcaacatcga atcagctagt tctttggaca 38580
 gcgagtagat ttttttggat gcagcactac tactttctgg atggcctgcc atcatcttca 38640
 taccatactt tgtcatcaat gcatgcaggt catgccaggt accagagaca ataggaagct 38700
 gcaaaggggc tccacgggct gcacgaacag cttttccatt gaaaggacca caacaagccg 38760
 gaagaaggaa tactccatcc tgatggcatt tgggttcaga ggttgtaag aggtgtagag 38820
 ttggaacagc aaaaactaga gtgtttggtt ttctctattg gagattgta gtttctatgg 38880
 tgccaaagat cgattcctaa gtccctaata ctaatccgta acagaaagta aaacctcgat 38940
 gacgagtaga tctgatctac tgagatcaat agggaaacac acttttgttg ttgttgttgg 39000
 agcgttgtcg cagttgccgt cttcataccg ttgccctgca gagaagcagc aggcacgga 39060
 ttcgagccgc tgtgggttgt agcgtttcca ggcactccga cgcttaggtg atggggcctc 39120
 tggggactag ggttttgggg cgaggtacta gtgttagtct ttcctgcgac ctttagtctt 39180
 atatttatag cgttgtgtgc ccggaggctc caaccgaggt taacgtggcc cctctcaatc 39240
 aaggttccgt ttaaggagat agatagttgg gattagccca atctgatcac tgatgaccag 39300
 ctatagagga cacacccaac agagataact aatacatata aatcatgtat tgtgtatcct 39360
 ataaaaata ttgtgtaccg gaatcagaga taaggaggta aggacatcca tcctatctta 39420
 cttaagagca gaatcaaatt ctttttagca aaggagaact ggagcacaat gaaatttagt 39480
 ggcatcctc aaattctatg gtagagtagc aagattatct aacactatgc aatgcagcaa 39540
 taatacagtc tgacatactt caataagcgg ctttcagaaa agaatatggc ataccattt 39600
 gaaagcacia gctgatctta tcagtgttcc gaggttacca gggctctgca aggtaggggc 39660

ES 2 473 602 T3

accagtgac catgcttacc atgagaccca ctgaacggat atgcataact acatttgctt 39720
 caaacaaaa cagcatgcat agattgaatt atgccttgca ttctactccg tccgttcttt 39780
 tttatgttc acggtttatt agtttagttc aaaaatgaac tagcgggga caaatattcg 39840
 agaatggata tagtattatt taaggatgac agcaatcatc tctctgcaca atggtggcct 39900
 tgatgggtac tgcatacct cacctgaatc ccatcaagga ctagaatcct ctttgacaa 39960
 ctgaacaacc catcaagagc atcccatcct catggctcct gaggtcgcgg aaatggttag 40020
 gcatgtgcat gacagcaatc gcctcgggtg aatcagccga ttgcatcccg gacaccttct 40080
 tcatcaccgc gtcgctgcaa tacacgacat taaaggactc gcgcagcacc tccgggacct 40140
 aggataagca agtaatcgat gacaaggggt agaagcacag gtttaggaag agaagaaacc 40200
 tcgcaggaca tgtaaatacg acaagggcct ggagttgcag aggagtacag gatgggcacg 40260
 aggccgacaa aatttgacca tcacatttg gttgtttggt taactttcgc atcatatagg 40320
 ataggagtat aggactagga tccatttcaa attatcgtgc atttcataat ggtttctgaa 40380
 gctttggtca ccaagtattc ctatttctcg gctggaattt cacgtttgcg ctgagagga 40440
 gtgtttcgtc ttcgactctt cgttcagaca gaccccgcg ggactggagc caagccgctg 40500
 ctacctgccg cacgctgccg ctgtcaggtc cgctcggcac atagcgacac agcgagcgca 40560
 aacatttcgt tcgactggt ttagcaaccg aaacgctcct ctatctaac tcttatatca 40620
 tcccctatct catacttacc tctacaaaca gtgttatata tagttccacg tcatatattt 40680
 tccactctac tagaaacatg tttgattcgc ccctgactgt gccacaattt acaatttacc 40740
 taaggttagt aaaaaaagt tagataaagt atgataagat ggcgaactaa atatacccta 40800
 gcgacacaac agcttgaac aacttcaacc agccctagtt agccactcgt agcttcatgg 40860
 taaagatttt ggataatttt ttacaagttt acacacttca tcacgacaaa gattgtgaat 40920
 gctggatggt tttggatttt gacacctta cacacttcat aacgtgtgcc atctattaga 40980
 ggagaaacga gaactgcacg cagcaacgca ccaggctaat aagtgacaac cgaacaagga 41040
 aaggcgggaa gggggcaacc tggaaaatag agagcagagc agaactttat tcctcctctc 41100
 aggaagtgtc cttgtcactc taaacgctaa cagccgaagg aaagaaggct gagagtgaga 41160
 tttggagcca caaaaagata accggcatac tcagaactac atgggtcca atttgagatg 41220
 gtattcaaat tttagatggc aaggctctctt aggcacagct cattcgtctc ccattgcaag 41280
 ttctagcgcg taatcatctc tttcctgaaa aacaaggagt ccattttatc tcagtgaagt 41340
 gtctaataac ctataatcac actttgcaga tcagaaagta ttgttactca ccaactggccc 41400
 tcgtgcaaag tatctcccga attggagcca atatacctgc aaattgacaa acaacatgct 41460
 ttgaagagcg aatttctac tacatataga gctagatatt aattaatttc aaaaggtggt 41520
 ttagactacg tgcttgccct atcttcatct tgagctcga cttcaacatc gccagatggg 41580
 aaaccaaac acaacaaagc atagccctga aaaggaaacc atacaataga actctaaaat 41640
 ccttaagtac catacttgat aggcaacatc ggacaatgct cctttccact ttagctatga 41700

ES 2 473 602 T3

atttggattt atccgaattt atagctaagt gtctactatt ttaggacgaa gatagtactt 41760
 tataattggg agctaatttg tattgatgaa catttctatg ttgcttggcc aagaataact 41820
 gatcaataaa aaaatctatt gtcataatctg taacacaaaa aatacaaaaat aaattgtggg 41880
 tcacattgca atcataatcc ttccttaaaa gtcgacataa tagttatgca tcaaactcta 41940
 gcaattgccc aggaacattc aggaaattgt acaaactagg taactgacta aactggagga 42000
 caggttaaga gtgaaataca acctctcatt tccagaccat gtacacaggg aacaataata 42060
 tgtcatgggc acaatactcc aatcgtgctt caactagtgg aagaaaaaat ggatgtacct 42120
 tatcttttag ttctgcagat atcccaagtg cttcaggctg ccttatctgt cctgatttta 42180
 ttcggactgc acagcttgtg cagcaacctg attaccaaaa tgagttttca attgttatat 42240
 agaccacacg gaacaatcaa ataagagatg ctatccaatc aaaaggtatt catagttaaa 42300
 taatatatca aaagccaatg gcatgggtag tttttttttt aatttatagt tgctataagt 42360
 atttgacaaa tagaaagagt cccaaatgag tccaacatgg ttctgactac atattccaaa 42420
 atcaaaacca acatcacact cccacacgat actatctata tcaacataaa ggaggatgag 42480
 aatagccaa cattcagttt gcacatattg gagcagctag tggaggagct tggccataaa 42540
 aagaggacgg accattatga tatgaagtgt aaagagaagg gagacagatt agtatttcat 42600
 cagttccgcc actcaagaca gggcttcatc aggcctctatt tgtaacaaat gaagacggtt 42660
 caagctgaag ggtgacattc atgcttagca cttagtgtag ctgctactaa ctaggcatgc 42720
 ataatgagtc gcccaatagc ttactgtcat gtacggccgc acttacaggc gccgtcgtga 42780
 cgccaggagg gctgcagatc gcgcagccaa ggcaggcgcc acaatcagtg gctaagttta 42840
 gaaagataag gattagtttc cctcttgcat gccttaatca taggagggat tggttacgat 42900
 tagtttcctt ttcataatgc ttaataatag gagagattgg ttaagattag tttccttttc 42960
 atatgcctta atcataggaa aggttggttg aaccagaggc tatatatatg ccgtgtaata 43020
 ggttgggaaa taatcaagca agatcaatta tccaaaactg ctcttctcct ttgcctctct 43080
 caagccaccg gtgaggaatc cctcacggtg aaggcttaga gcgcgactac gaactgcgta 43140
 gccgcggtcc agcgacgttg ggcgtcgagg cgcttgacaa cctggtatca gcgtcacgtc 43200
 gatcctcacc caccgctctt tgccctccac catccccctc cacgcccacc acctccaccg 43260
 accactccat caccatggct gagcccacca tcaaggacct catggagctg atgcagtctt 43320
 tccaaaccga gttggctgcc gtgaaagcca ccatgaagga caagtcgtcc tcgtcgtcca 43380
 ccgacggcgg cggcgagcgc gaggatcccc ctctgtgtgga tcggcccccc aggttccaga 43440
 agctcgactt tccccggttc gatggcacca ccgacccgat gctcttcatc aacaaatgtg 43500
 aatcctatth tcgccaacag cgcacatggt cggaggaacg cgtgtggatg gcctcttata 43560
 atctggagga cgctcgcgag ctgtggttca tccagctgca ggacgacgag ggcacacat 43620
 cctggggggc gttcaaggac ctctcaatc ttcgcttcgg gccaccactc tgctcagcgc 43680
 ccctgttcga gttggcggag tgctcggcca ccgggaccgt ggaggaatac tccaaccggt 43740

ES 2 473 602 T3

tccaggccct gctgccgcgc gcgggtcgcc tcacggaggg ccagcgtgtc caactctaca 43800
 caggcggctt cttccccca ttgagccacg ttgttcgcat ccacaaccg gagacacttg 43860
 atggggccat gagtctcgcc cgtcaagccg agcagctgga gttggcacgg ggaccgccac 43920
 cggccgccag gggagcccc cgtctcttc ccccagcgc ggccccaag cagccgctgc 43980
 tcgccctccc tgcaccaccc gcgggcgcgc cccagccgcg accagagggg ccgcccttga 44040
 agcggctatc accggaggaa caggcggaac ggcgccgcct cggcctctgc ttcaactgca 44100
 atgagccgta caaccgccc cacaaccgtg tctgccgcg catcttctac ctccatggcg 44160
 tcgagctcac ggcgctgcc gaggaactcg taggggacga cccgcaggac ggcgccccg 44220
 tcttctccct cagggcagtc actggcatgc ccatctgaa ttccatgcag gtgccccca 44280
 ccctaggcgc caccaccctc ctccgctcc tggacaccg ctccacgcat aacttcattg 44340
 gggaggatgc cccccccgc accggcctgc cgatccagcc gcacctcac gccactgtgg 44400
 ccaacggtga acgtgtcacc tgcccaggag tcattcgccg cccccaggc atcatcgagg 44460
 gcgagccatt cttcatcgac ctcttcgtca tgccgctgc agggtagac ctcgtcctag 44520
 ggactcaatg gatggtcacc cttggtcgca tgggtgagg cttcgtcgac cgctccgtct 44580
 ccttctgca ccaaggtcgc caggtctcct ggtcggacgt cccgaccgt cagcatcccc 44640
 tgctcgccgc taccacgaca ccgagcgcct tccttgagga gctcttgac tccttcgacg 44700
 ggggttttgc tgagccggcg ggtctgcccc cacagcgagc tcgggaccac gccatcgctc 44760
 tcaagccagg ctctacacct gtggcggtcc ggccgtaccg ctaccgggtg gcgcacaagg 44820
 atgagttgga gcggcaatgt gccgccatgt tgaccaagg catcgtacac cgcagtgact 44880
 cggcgttctc ctcaccggtt ctgctggtca agaagcacga cggggcttgg cggttttgcg 44940
 tggactaccg cgcccttaat gccctcaccg tcaaagacgc cttccccatc cccatcgctc 45000
 acgagctcct tgacgagctg catggtgcgc agttcttcac gaagctggac cttcgtccg 45060
 gtgatagtcg cctagagggg ggggtgaatag ggcgaaactg aaatttaca atataaacac 45120
 aactacaaga cggggttagc gttaggaata agaaacgagt ccgcaagaga gggcgcaaaa 45180
 caaatcccaa gcgaataagc aagtgagaca cggagatttg tttaccgag gttcggttct 45240
 ctcaaaccta ctccccgtt aggaggccac aaaggcctgg tctcttcaa cccttcctc 45300
 tctcaaacga tccacggatc gagtgagctt tctcttctca atcacttgga acacaaagt 45360
 cccacaagga ccaccacaag attggtgttt cttgccttaa ttacaagtga gtttgattgc 45420
 aaagaaggat caagaaagaa gaaagcaatc caagcgaag agctcgaaag aacacgagta 45480
 aatcactctc tctagtcact atggcgttgt gtggaatttg gagaggattt gatctctttg 45540
 gcgtgtctag aattgaatgc tagagctctt gtagtagttg ggaagtggaa aacttgatg 45600
 caatgaatgg tggggtggtt ggggtattta tagcctcaac caccaaaagt ggccgttgg 45660
 aggctgtctg ttcgatggcg caccggacag tccggtgcac accggacagt ccggtgcccc 45720
 ctgccacgtc atcactgtcg ttggattctg accgttggag cttctgactt gtgggccccg 45780

ES 2 473 602 T3

ctgggtgtcc ggtgcacacc ggacaggtac tgtttgctgt ccggtgtgcc agcatgggcg 45840
tttctgactc ctgcgcgcg agagcgcgca ttaaattgctg gccagagagc cgttggcgcg 45900
gagaagaccg ttgctccgga gacgcaccgg acagtccggt gaattatagt ggactagccg 45960
ttggggtttc ccgaagctgg cgagttcctg aggccgacct cctttggcgc accggacact 46020
gtccgggtga caccggacag tccgggtgaat tatagcgcg gtgcctctgg aaattcccga 46080
aggtggcgag tttgagtctg agtccccctg gtgcaccgga cagtccggtg cgccagacca 46140
ggggtgcctt cggttgcccc tttgctcttt tgttgaatcc aaaactgggt ctttttattg 46200
gctgagtgtg aaccttttac acctgtgtaa tctatacact tgggcaaact agttagtcca 46260
attatttgtg ttgggcaatt caaccaccaa aattaattag ggactaggtg taagcctaata 46320
tccctttcaa tctccccctt tttggtgatt gatgccaaca caaaccaaag caaatataga 46380
agtgcataat tgaactagtt tgcataatgt aagagtaaag gttgcttggga attgagccaa 46440
tgtaaatact tacaagatat gcagggattg tttctttctt atatattatt ttggaccacg 46500
cttgaccac atgttttgtt tttgcaaatt ctttttgtaa atccatttca aagatctttt 46560
gcaaatggtc aaaggtaaat gaataagagt ttgcaaagca ttttcaagat ttgaaatttt 46620
ctccccctgt ttcaaatgct tttcctttga ctaaacaaaa ctccccctaa aagagatcct 46680
cctcttagtg ttcaagaggg ttttgatata tcatttttga aatactactt tctccccctt 46740
ttgaacacaa taggatacca attgataaat actcttggaa aacactaagt ttttgaaatt 46800
ggttgtggtg cggtcctttt tgctttgggc tcatactttc tccccctttg gcatgaatcg 46860
ccaaaaacgg aatcattaga gcctatcgaa gtactatcgt cccctttggt cataagtaaa 46920
tgagttaaga ttataccaaa gacgaaatcc ggtcttttag ctttgggttc ttactctctc 46980
cccaaagaca aggtccttta ttggagcgat ggcgaaggat gagttaccga gtggaagcct 47040
ttgtctttca ccgaagactc caattccctt tcaatatacc tatgacttgg tttgaaatag 47100
acttgaaaac acattagtca tagcatatat gattaaaagt ataaatgagc tatgtgtgca 47160
atctagcaaa agaagttgcg tgaatcaaga atattgagct catgcctaag tttggtaaaa 47220
gtttgttcat caagaggctt ggtaaagata tcggctaatt gatcttttag gttaatgtaa 47280
gaaatctcga tatccccctt ttgttgggtga tccctaagaa aatgataccg aatggctatg 47340
tgcttagtgc ggctatgctc gacgggattg tcggtcattt tgattgcact ctcattatca 47400
catagcaaag ggactttggt taatttgtaa ccgtagtccc gcagggtttg cctcatccaa 47460
agcaattgcg cgcaacaatg acctgcggca atgtactcag cttcggcggt ggaaagagcg 47520
accgaatttt gcttctttga agcccaagac accaaagatc ttccaagaa ctggcaagtc 47580
cctgatgtgc tcttcctatt aattttgcac cccgcccaat cggcatccga ataaccaatc 47640
aatcaaatg ttgatccccg agggtagcaa agtccaaact taggagtata agccaaatat 47700
ctcaagattc gttttacggc cgtaaggtgg gattccttag ggtcggattg gaatcttgca 47760
cacatgcata cggaaagcat aatgtccggt cgagaagcac ataaatagag taaagaacct 47820

ES 2 473 602 T3

atcatcgacc ggtatacctt ttgatccacg gacttacctc ccgtgtcgag gtcgagatgc 47880
ccattggttc ccatgggtgt cttgatgggc ttggcatcct tcattccaaa cttgcttaga 47940
atatcttgag tatactttgt ttggctaagg aagggtccct cttggagttg tttgacttgg 48000
aatcctagaa aatacttcaa ctccccatc atagacatct cgaatttctg tgtcatgatc 48060
ctactaaact cttcacatgt agactcgtta gtagacccaa atataatata atcaacataa 48120
atttggcata caaacaagtc attttcaaga gttttagtaa agagtgtagg atcggccttg 48180
ccgactttga agtcattagc aataagaaa tctctaaggc attcatacca tgcctcttggg 48240
ggcttgcttg agcccataaa gcgcctttga gagcctatag acatggttag ggtactcaact 48300
atcttcaaag ccgggaggtt gctcaacata gacctcttc ttgattggtc cgttgaggaa 48360
ggcacttttc acgtccattt gataaagctt aaagccatgg taagtagcat aggctaataa 48420
tattcgtatt gactcaagcc tagctacggg tgcataggtt tcaccgaaat ccaaaccctc 48480
gacttgggag tatcccttgg ccacaagtcg tgctttgttc cttgtcacca cccatgctc 48540
atcttgcttg ttgcggaaga cccatttggc ccctacaaca ttttgggtta ggacgtggaa 48600
ccaaatgcca tacctcattc ctctgtaaat tgttgagctc ctcttgcatc gccaccacc 48660
caatccgaat ctgaagtgtc tctctatcc tatgtggctc aatagaggaa acaaaagagt 48720
aatgctcaca aaaatgggca acacgagatc gagtagttac ccccttatga atgtcgccga 48780
ggatgggtgc gacggggtga tctcgttgta ttgcttggg gactcttggg tgtggcggtc 48840
ttggttcttc ctcatgctcc tctcttgat catttgcatc tcccccttga tcattgtcat 48900
tatcttgagg tggctcatct tcttgattt gcccttcatc aacttgagcc tcacctcat 48960
tttgagtttg tggagatgct tgcgtggtg aggatgattg atcttgtgca cttggaggct 49020
cttcggattc cttaggacac acatcccaa tggacatggt ccttagcgtc atgcatggag 49080
cctcttcatt acctatctca tcaagatcaa cttgctgtac ttgagagccg ttagtctcat 49140
caaacacaac gtcacatgag acttcaacta gtccagtga cttgttaaag accctatatg 49200
cccttggtt tgagtcataa ccaagtaaaa agccttctac agtttttaga gcaaatttag 49260
atcttctacc tctttaaca agaataaagc atttgtacc aaaaactcta aagtatgaaa 49320
tgttgggctt tttaccggtt aggagtcat atgatgtctt cttgaggatt cggatgaagat 49380
ataaccggtt gatggcgtag caggcgggtg tgaccgctgc ggccaaaac cggatccggtg 49440
tcttgactc atcaagcatg gttcttgcca tgtccaatag agttcgattc ttcctctcca 49500
ctacaccatt ttgttgagg gtgtaggag aagagaactc atgcttgatg cctcctcct 49560
caagaaagcc ttcaatttgt gagttctga actccgtccc gttgtcgtt cttattttct 49620
tgatccttaa gccgaactca ttttgagccc gtctcaagaa tcccttcaag gtctcttggg 49680
tttgagattt ttcctgtaaa agaataacc aagtgaagc agaataatca tccacaataa 49740
ctagacagta ctactccc ccgatgctta tgtaagcaat cgggccgaat agatccatgt 49800
gtaggagctc cagtggcctg tcggtcgtca tgatgttctt gtgtggatga tgagctccaa 49860

ES 2 473 602 T3

cttgcttccc cgctgacat gcgctacaaa tcctgtcttt ctcaaaatga acatttgtta 49920
 atcctaaaaat gtgttctccc tttagaagct tatgaagatt cttcatccca acatgggcta 49980
 gtcggcggtg ccagagccaa cccatgttag tcttagcaat taagcatgtg tcgagttcag 50040
 ctctatcaaa atctactaag tatagctgac cctctaacac acccttaa at gctattgaat 50100
 cactacttct tctaaagaca gtgacaccta catcagtaaa aagacagttg tagcctattt 50160
 gacataattg agaaacagaa agcaagttgt aatctaaaga atcaacaaga aaacattgga 50220
 aatagaatgg tcaggagata tagcaatttt accaagtcct ttgaccaa ac cttgatttcc 50280
 atccccgaat gtgatagctc gttggggatc ttggtttttc tcatatgagg agaacattct 50340
 tttctcccca gtcatatggt ttgtgcaccc gctgtcgagt atccaacttg agccccgga 50400
 tgataaacc taaaaaaca atttagttct tgactttagg taccxaaact gttttgggtc 50460
 ctttggcatt agaaacaaga actttgggta cccaaacaca agtcttgga cccttggtt 50520
 tgccccaac aaacttgga actactttgc cggatttgtt agtcaaaaca taggatgcat 50580
 caaaagtttt aatgaaata gcatgatcat ttgaagcatt aggagttttc tttctaggca 50640
 acttagcacg ggttggttgc ctagaactag atgtctcacc ctatacata aaagcatggt 50700
 tagggccaga gtgagacttc ctagaatgag ttctcctaat tttgctctca ggataaccgg 50760
 cagggtacaa aatgtaacc tcgttatcct gaggcattgg agccttgccc ttaacaaagt 50820
 tggacaagtt cttaggagg gcattaagtt tgacattgtc tccccttgg aagccaatgt 50880
 catccttaat gccggggcgt ctcccattat aaagcatgct acgagcaa at ttaaatttct 50940
 cattctctaa gttgtgctcg gcaatttttag catctagttt tgttatatga tcattttgtt 51000
 gtttaattaa agccatatga tcatgaatag catcaatc aacattttta catctagtgc 51060
 aaatagtgac atgctcaatg gtggatgtag atggtttgca agaattaagt tcaacaatct 51120
 tagcacgaag tatatcattc ttatctctaa gatcagaa at tgtaattttg caaacatcaa 51180
 aatcttttagc cttagcaatt aaattttcat tttctaact aaggctagca agagatacat 51240
 tcaattcatc aatcttaaca agcaaatcaa cattatcatc tctaagattg ggaattgaaa 51300
 catcaccaaa tatgtgaatc aaccttaa 51328

<210> 107
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Zea mays

5

<400> 107
 cactgtcgt cctctgcagg cagttgtga catgagcgca tcgtcactgc tgaatcgc 58

10

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es única para el evento de maíz MIR162, donde la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo constituido por SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.
2. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde la secuencia de nucleótidos codifica una proteína que comprende la SEC ID NO: 2.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, donde la molécula de ácido nucleico se encuentra en una semilla de maíz depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso PAT-8166.
4. Un par de cebadores de polinucleótidos que comprende un primer cebador de polinucleótido y un segundo cebador de polinucleótido que funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN del evento MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento de maíz MIR162, donde el primer cebador de polinucleótido comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende los nucleótidos 1-1088 de la SEC ID NO: 49, los nucleótidos 9391-10579 de la SEC ID NO: 49 y sus complementos, y donde el segundo cebador de polinucleótido comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 1089-9390 de la SEC ID NO: 49 o sus complementos, y donde dicho evento de maíz MIR162 está **caracterizado** por la presencia de la secuencia SEC ID NO: 49 en el genoma del maíz.
5. El par de cebadores de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 4, donde el primer cebador de polinucleótidos se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 58, SEC ID NOs: 68-72, SEC ID NO: 79, SEC ID NO: 80, SEC ID NOs: 97-105 y sus complementos, y donde el segundo cebador de polinucleótidos se selecciona del grupo que comprende SEC ID NOs: 15-35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 40, SEC ID NOs: 50-52, SEC ID NO: 54, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 73, SEC ID NO: 82, SEC ID NO: 96 y sus complementos.
6. Un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico que es única para el evento de maíz MIR162 en una muestra que comprende ácidos nucleicos de maíz, donde el método comprende:
- poner en contacto la muestra con un par de cebadores que, al utilizarse en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de maíz MIR162 produce un amplicón que es diagnóstico para el evento de maíz MIR162;
 - realizar una reacción de amplificación del ácido nucleico para producir así al amplicón; y
 - detectar al amplicón,
- donde dicho evento de maíz MIR162 está **caracterizado** por la presencia de la secuencia de la SEC ID NO: 49 en el genoma del maíz.
7. Un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico que es única para el evento de maíz MIR162 en una muestra que comprende ácidos nucleicos de maíz, donde el método comprende:
- poner en contacto la muestra con una sonda que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con ADN genómico del evento de maíz MIR162 y no se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con el ADN de la planta de maíz de control;
 - someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación de alta rigurosidad; y
 - detectar la hibridación de la sonda a la molécula de ácido nucleico,
- donde dicho evento de maíz MIR162 está **caracterizado** por la presencia de la secuencia de la SEC ID NO: 49 en el genoma del maíz.
8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, donde el amplicón o la sonda comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59 y sus complementos.
9. Un conjunto para detectar ácidos nucleicos que son únicos para el evento de maíz MIR162 que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico de suficiente longitud de polinucleótidos contiguos para funcionar como un cebador o una sonda en un método de detección de ácido nucleico, y que ante la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo o una hibridación a una secuencia de ácido nucleico objetivo en una muestra seguido de la detección del amplicón o la hibridación a la secuencia objetivo, sirven de diagnóstico para la presencia de secuencias de ácido nucleico únicas para el evento de maíz MIR162 en la muestra, donde dicho evento de maíz MIR162 está **caracterizado** por la presencia de la secuencia de la SEC ID NO: 49 en el genoma del maíz.

10. El conjunto de acuerdo con la reivindicación 9, donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 49.
- 5 11. Una planta de maíz transgénica, o sus células o tejidos, cada uno de los cuales comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
12. Una semilla de maíz que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 13. Una semilla de maíz de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha semilla de maíz es la semilla de maíz depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso PTA-8166.
- 15 14. Una muestra biológica derivada de una planta de maíz, tejido o semilla del evento de maíz MIR162, donde la muestra comprende una secuencia de nucleótidos que es la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, o SEC ID NO: 59 o complementaria de éstas y donde la secuencia es detectable en la muestra con el uso de un método de amplificación de ácido nucleico o de hibridación de ácido nucleico.
- 20 15. La muestra biológica de la reivindicación 14, donde la muestra se selecciona del grupo que comprende harina de maíz, polenta de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz y cereales fabricados total o parcialmente para que contengan subproductos del maíz.
16. Una proteína insecticida aislada que comprende la SEC ID NO: 2.