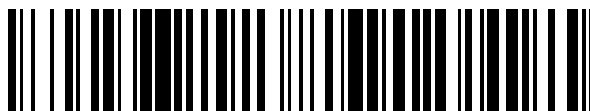


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 041**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009** **E 09709123 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014** **EP 2240580**

54 Título: **Vectores de closterovirus y métodos**

30 Prioridad:

31.01.2008 US 63305 P
24.07.2008 US 83504 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2014

73 Titular/es:

**THE STATE OF OREGON ACTING BY AND
THROUGH THE STATE BOARD OF HIGHER
EDUCATION ON BEHALF OF OREGON STATE
UNIVE (100.0%)
312 Kerr Administration Building
Corvallis, OR 97331 , US**

72 Inventor/es:

**DOLJA, VALERIAN, V. y
PEREMYSLOV, VALERA, V.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 478 041 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

Vectores de closterovirus y métodos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/063.305, presentada el 31 de enero de 2008 y N° 61/083.504, presentada el 24 de Julio de 2008.

10 Campo

La presente divulgación se refiere al campo de los closterovirus y su uso como vehículos de suministro génico para plantas.

15 Antecedentes

Las vides (*Vitis*) son un cultivo frutal global importante con enorme importancia económica y cultural, particularmente *Vitis vinifera*, que se usa para el cultivo del vino. Se usan comercialmente un número relativamente pequeño de cultivares de *V. vinifera* para mantener la uniformidad en el fruto dado que las plantas son heterocigotas y no de pura cepa. Por lo tanto, debido a que gran parte del cultivo de uva comercial depende de estos cultivares, que tienen diversidad limitada; la resistencia a enfermedad es una preocupación importante. Las técnicas de cultivo clásicas para aumentar la resistencia a enfermedad generalmente merman la igualdad del fruto, haciendo a las vides un candidato perfecto para la manipulación genética para mejorar la resistencia a enfermedad. Sin embargo, la producción de vides transgénicas ha resultado ser difícil, ya que se sabe que las especies perennes leñosas, tales como las vides, son resistentes a transformación, y el proceso de selección requerido por transformación mediada por *Agrobacterium* es significativamente más riguroso debido a la competición por las células no transformadas, lo que conduce a tasas de éxito altamente variables (Mullins *et al.*, Meth. Mol. Bio. 344: 273-285. 1990); Bouquet *et al.*, Methods Mol. Biol. 344: 273-285, 2006). Por lo tanto, existe la necesidad de un método fiable, eficaz, para el suministro de genes a vides para tratamientos de enfermedades y la modificación de vides para características deseadas.

Durante las últimas dos décadas, los vectores virales para la expresión de resistencia de las proteínas en plantas y animales se han convertido en herramientas indispensables de la biología molecular y la biomedicina (Pogue *et al.*, Annu. Rev. Phytopathol. 40: 45-74, 2002; Gleba *et al.*, Curr Opin Biotechnol 18: 134-141, 1007). Con la aparición de la interferencia de ARN (ARNi) o silenciamiento de ARN, también se han desarrollado vectores virales para silenciamiento de genes inducido por virus o VIGS (Godge *et al.*, Plant Cell Rep 27(2): 209-219, 2008; e-pub antes de la impresión, 2007). Tomadas juntas, una capacidad para sobreexpresar rápidamente o silenciar genes de interés ha hecho a los vectores virales herramientas importantes en la genómica funcional.

Se han introducido por ingeniería genética varios virus vegetales en vectores virales, cada uno con limitaciones y especificidad vegetal. La mayoría son adecuados solamente para su uso en plantas herbáceas dicotiledóneas. En su mayoría, los virus icosaédricos no están bien adaptados para acomodar genes ajenos principalmente debido al tamaño limitado de sus cápsidas. En general, los virus elongados han mostrado una mejor capacidad para tolerar genes recombinantes y expresarlos hasta niveles muy altos. En la actualidad, los vectores más habitualmente usados son los basados en el virus del mosaico del tabaco en forma de bastón (TMV, género *Tobamovirus*) (Pogue *et al.*, Annu. Rev. Phytopathol. 40: 45-74, 2002; Gleba *et al.*, Curr Opin Biotechnol 18: 134-141, 1007). Estos vectores se caracterizan por altos niveles de expresión pero estabilidad genética relativamente baja, especialmente en lo que se refiere a insertos ajenos grandes.

Otra serie de vectores se basa en el virus del rayado del tabaco con forma de bastón (TRV, género *Tobravirus*) (Godge *et al.*, Plant Cell Rep 27(2): 209-219, 2008; e-pub antes de la impresión, 2007). Los vectores derivados de virus filamentosos se basan habitualmente en el virus X de la patata (PVX, género *Potexvirus*) (Chapman *et al.*, Plant J 2: 549-557, 1992) y virus del marcado del tabaco (TEV, género *Potyvirus*) (Dolja *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10208-10212, 1992). Los vectores de TMV, TRV y PVX contienen un casete de expresión con un promotor de ARN subgenómico, mientras que los vectores de TEV usan un principio alternativo de expresión proteica basado en procesamiento de poliproteínas. Esta última característica proporciona a los vectores potyvirales una estabilidad genética mucho mayor que la hallada en vectores que contienen promotores (Dolja *et al.*, Virology 252: 269-274, 1998).

Se han desarrollado vectores de expresión génica basados en el virus del amarilleo de la remolacha (BYV, género *Closterovirus*) (Hagiwara *et al.*, J. Virol. 73: 7988-7993, 1999; Peremyslov *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96, 14771-14776, 1999). Aunque los niveles de expresión proteica que pueden conseguirse para vectores closterovirales pueden ser menores que los de TMV o TRV, se ha demostrado que estos vectores son muy estables genéticamente y capaces de acomodar varios casetes de expresión basándose en promotores de ARN subgenómico heterólogos adicionales o procesamiento de poliproteínas. Dicha versatilidad de vectores closterovirales se debe más probablemente al gran tamaño de genomas closterovirales y presencia de genes que

aumenta drásticamente la replicación genómica y capacidad de expresión génica y posiblemente proporcionan una mayor fidelidad de copia de ARN (Dolja *et al.*, Virus Res. 117: 38-51, 2006). Los supresores fuertes de ARNi (Reed *et al.*, Virology 306: 203-209, 2003; Chiba *et al.*, Virology 346: 7-14, 2006) y proteinasas líder de closterovirus (Peng *et al.*, J. Virol. 75(24), 12153-12160, 2001) están entre los genes que aseguran alto rendimiento genético y evolutivo de closterovirus y preconditionan sus genomas para acomodar genes adicionales, virales o ajenos.

Una de las características más críticas del vector viral es su serie de hospedadores que limita gravemente su utilidad potencial para las plantas de cultivo deseadas. Todos los vectores descritos anteriormente son capaces de infectar solamente plantas herbáceas dicotiledóneas. En otras palabras, la necesidad de generar un vector viral para monocotiledóneas o para cultivos leñosos tales como la vid dicta la necesidad de usar virus que infectan de forma natural a dichas plantas como una plataforma para el desarrollo de vectores.

Hasta la fecha, se han desarrollado muy pocos vectores virales potencialmente adecuados para plantas leñosas, y los datos muestran que la expresión se ha limitado normalmente a una serie estrecha de plantas modelo. Uno de estos vectores se basa en el ARN 2 de virus esférico latente de manzana (ALSV, familia *Sequiviridae*) (Li *et al.*, Arch. Virol. 149: 1541-1558, 2004). Aunque los autores reivindican que el vector de ALSV fue capaz de expresar la proteína verde fluorescente (GFP) por procesamiento de poliproteínas tras inoculación mecánica a plántulas de manzana, no se han presentado en el artículo pruebas experimentales convincentes de dicha capacidad. De forma similar, no están disponibles datos para apoyar reivindicaciones recientes de un vector "universal" basado en el geminivirus de la rizadura amarilla del tomate, que supuestamente es capaz de infectar de forma sistémica a una amplia diversidad de plantas de dicotiledóneas a monocotiledóneas a árboles y vides (Peretz *et al.*, Plant Physiol. 145(4): 1251-1263, 2007). Se ha desarrollado otro vector usando el virus A de la vid (GVA, un *Vitivirus*). Su capacidad para expresar una proteína ajena se ha demostrado en tabaco (Haviv *et al.*, J. Virol. Meth. 132: 227-231, 2006) y aún no se ha demostrado para la vid. Otro vector se basa en el virus de *Citrus tristeza* (CTV), un closterovirus estrechamente relacionado con BYV (Folimonov *et al.*, Virology 368(1): 205-216, 2007). Sin embargo, el CTV solamente es útil en especies de *Citrus*, y su propagación implica un proceso incómodo de ciclos en protoplastos antes de la inoculación por corte de árboles cítricos con viriones aislados. En consecuencia, existe una fuerte necesidad de vectores virales adecuados para transformar plantas leñosas, particularmente vides.

Sumario

La presente invención proporciona vectores de transferencia de genes vegetales, células vegetales, plantas y métodos como se exponen en las reivindicaciones.

La presente divulgación se refiere a vectores de transferencia de genes vegetales competentes para replicación que comprenden un ácido nucleico que codifica genes virales para virus asociados al enrollamiento de la vid 2 (LR-2) seleccionados del grupo que consiste en metiltransferasa, ARN helicasa, ARN polimerasa dependiente de ARN y p24; proteasas líder L1 y L2; y un polinucleótido heterólogo unido operativamente con un promotor, en el que el polinucleótido heterólogo se expresa en una célula vegetal y en el que el vector tiene capacidad de replicación infecciosa en la célula vegetal.

La presente divulgación abarca además vectores de transferencia de genes vegetales que se replican de forma condicional que comprenden un ácido nucleico que codifica genes virales del virus asociado con el enrollamiento de la vid 2 (LR-2) seleccionados del grupo que consiste en metiltransferasa, ARN helicasa, ARN polimerasa dependiente de ARN y p24; proteasas líderes L1 y L2, en las que al menos una proteasa líder está inactivada de modo que el vector no puede replicar de forma infecciosa independientemente; y un polinucleótido heterólogo unido operativamente con un promotor, en el que el polinucleótido heterólogo se expresa en una célula vegetal.

Opcionalmente, los vectores proporcionados en el presente documento también pueden incluir uno o más genes virales del virus asociado con el enrollamiento de la vid 2 (LR-2) que están implicados en el ensamblaje de viriones y/o transporte dentro de plantas. Dichos genes incluyen por ejemplo p6, Hsp70h, p63, CPm, CP y p19. En realizaciones particulares, todos estos genes se incluyen en un vector, facilitando de este modo la infección sistémica. Dicho vector puede denominarse vector de longitud completa; se describen en el presente documento ejemplos de estos.

El polinucleótido heterólogo en los vectores descritos puede codificar uno o más de una molécula indicadora, un marcador seleccionable o un gen terapéutico, que puede codificar una proteína deseada, tal como para mejorar las propiedades nutricionales o estéticas de la planta o un gen de resistencia a enfermedad, que puede ser antifúngico, antibacteriano o antiviral. El gen terapéutico puede ser para el tratamiento de enfermedad de Pierce, tal como un polinucleótido que desencadena el silenciamiento génico inducido por virus o codifica un polipéptido de lisozima.

Las proteasas líderes pueden ser L1 y/o L2 de LR-2. Las proteasas líder (por ejemplo, SEC ID N°: 4 o 6) pueden codificarse por SEC ID N°: 3 y/o SEC ID N°: 5. Una o ambas de las proteasas líder puede inactivarse por sustitución, inserción, delección parcial o alteración completa de la secuencia codificante para la proteasa líder en el vector.

El vector puede comprender además una secuencia de ADN T para la transformación de una célula vegetal. El vector puede comprender un virus del amarilleo de la remolacha u otro promotor de closterovirus relacionado o un promotor de LR-2 nativo. Puede introducirse más de un vector en la planta, tal como un vector que codifique un gen terapéutico y un vector que codifique el supresor de ARNi p24.

También se contempla una célula vegetal o planta que comprende un vector descrito en el presente documento, tal como una célula de vid o una vid.

También se proporcionan métodos para producir los vectores descritos, que comprenden cultivar una célula que comprende el vector y recuperar el vector de la célula o medio en el que se cultiva la célula. El vector puede opcionalmente estar en un plásmido, tal como un plásmido adecuado para amplificación bacteriana y/o un plásmido binario adecuado para agroinoculación.

Otra realización es un método para expresar un gen heterólogo en una célula vegetal que comprende introducir el vector de la presente invención en la célula vegetal. En una realización, la célula vegetal es una célula de vid. En otra realización, el vector se introduce por agroinoculación.

Otra realización es un método para expresar un gen heterólogo en una célula vegetal que comprende introducir un vector competente para replicación en la célula vegetal de modo que el vector se replique posteriormente e infecte al menos una célula vegetal adicional. El método comprende además la infección sistémica de una estructura vegetal seleccionada del grupo que consiste en tejido, hoja, tallo, raíz, fruto, semilla o planta completa.

Otra realización es un método para inducir resistencia a enfermedad que comprende introducir el vector de la presente invención en una célula vegetal. El vector puede introducirse más de una vez. El vector puede comprender un polinucleótido heterólogo que codifica un gen que confiere resistencia a la enfermedad. Dicho polinucleótido heterólogo puede ser, por ejemplo, un polinucleótido que desencadene el silenciamiento génico inducido por virus, un polinucleótido de *Run1* o que codifique un polipéptido de lisozima.

Otra realización es un método para tratar o prevenir la enfermedad de Pierce u oídio en una vid que comprende introducir en una célula de vid un vector de la presente invención. El vector puede introducirse por agroinoculación y puede introducirse más de una vez.

Otra realización es un método para modificar las propiedades estéticas, tales como sabor y aroma del jugo, o potenciar la característica nutricional u otra agrícola de una planta que comprende introducir el vector de la presente invención en una célula vegetal.

Otra realización es un método para realizar una planta transgénica que comprende introducir el vector de la presente invención en una célula vegetal, cultivar la célula vegetal en condiciones que promueven el crecimiento de una planta, en el que el gen heterólogo se expresa en la planta transgénica. La planta transgénica puede ser un vid.

Las anteriores y otras características y ventajas resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que se desarrolla con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C son mapas genéticos del genoma de GLRaV-2 que indican las funciones de los genes virales (Figura 1A), casete para expresión génica recombinante (Figura 1B) y vector binario que contiene el genoma de GLRaV-2 de longitud completa con inserto de ER-GFP (Figura 1C). (Figura 1A) los genes se diseñan de acuerdo con las proteínas codificadas: (Figura 1B) promotor de LR-2 CP, un promotor de LR-2 natural que conduce la expresión del gen de CP; ER-GFP, proteína verde fluorescente dirigida a retículo endoplásmico; promotor de BYV CP, un promotor heterólogo modificado por ingeniería genética derivado de *virus del amarilleo de la remolacha* donde conduce a la expresión de un gen de CP; *Pac I* y *Fse I*, sitios introducidos por ingeniería genética para endonucleasas de restricción correspondientes. (Figura 1C) Desde la izquierda, en sentido de las agujas del reloj: 35S, promotor de ARN polimerasa II 35S derivado de *virus del mosaico de la coliflor* (flecha); ~17.500 nt, el clon de ADNc de longitud completa, de ~17.500 nucleótidos de longitud, de LR-2 marcado por inserción de ER-GFP (rectángulo, marcado ~17.500 nt); RZ, una ribozima de diseño adaptado que promueve la liberación autocatalítica del extremo 3' de ARN r-LR tras la transcripción del ADN insertado en el núcleo de la célula vegetal (rectángulo con una flecha, marcado RZ); terminador NOS de la ARN polimerasa II; extremo derecho, secuencia de reconocimiento donde el ADN plasmídico se escinde por *Agrobacterium* para transferencia a la célula vegetal (flecha curvada); Ori, origen de replicación de plásmido (flecha); Kan^R, gen para resistencia a kanamicina; extremo izquierdo, secuencia de reconocimiento donde el ADN plasmídico se escinde por *Agrobacterium* para transferencia a la célula vegetal (flecha curvada).

La Figura 2 muestra células *N. benthamiana* infectadas con GLRaV-2/ER-GFP tras la agroinoculación a dos escalas diferentes usando microscopía de barrido con láser confocal. El color verde marca el retículo endoplásmico de la célula infectada por virus debido a la expresión del marcador de ER-GFP por virus. El fondo rojo se debe a la autofluorescencia de los cloroplastos. Barras, 50 mm.

La Figura 3 muestra imágenes tomadas por microscopía epifluorescente de tejidos de plantas de *N. benthamiana* infectadas de forma sistémica con GLRaV-2/ER-GFP tras la agroinoculación (fila inferior) en comparación con plantas de control, no infectadas (fila superior). El color verde destaca predominantemente células del floema infectadas por virus y que expresan ER-GFP. Los tallos y los petiolos se seccionaron transversalmente de forma manual antes de la captura de imágenes microscópicas. El fondo rojo se debe a la autofluorescencia de cloroplastos.

Figura 4 (Figura 4A) análisis de inmunotransferencia de los extractos de plantas infectadas con el virus de tipo silvestre y virus modificado para expresar ER-GFP usando anticuerpos específicos de CP como se muestra debajo de la imagen. Las diluciones de los extractos de hoja originales se muestran en la parte superior. (Figura 4B) análisis de RT-PCR de los ARN aislados de plantas de *N. benthamiana* infectadas con el virus de tipo silvestre y virus modificado para expresar ER-GFP. Los productos de RT-PCR se separaron en gel de agarosa al 1 % y se tiñeron con bromuro de etidio. M, marcadores de tamaño de ADN; las bandas correspondientes a ADN de 1 y 2 kb se marcan por flechas.

Figura 5. Parte superior, un diagrama que muestra el diseño de un vector binario que expresa p24, un supresor de LR-2 de 24 kDa de silenciamiento de ARN clonado en un vector binario pCB302. Líder de TEV, secuencia de ADNc correspondiente a la región no traducida 5' del virus del marcado del tabaco y usado para potenciar la traducción del p24. Parte inferior, imágenes confocales de la célula poco habitual infectada por miniBYV-GFP solamente (panel izquierdo) y miniBYV-GFP con coexpresión de p24 (panel derecho). Las imágenes son de Chiba *et al.* (Virology 346: 7-14, 2006).

Figura 6. Silenciamiento del transgén de GFP por el vector viral LR-GFP en *N. benthamiana* línea 16c. En el control, todas las células son verdes debido a la producción de GFP transgénico. En las plantas infectadas, las células verdes brillantes son en las que el virus realiza GFP adicional. Las áreas rojas contienen células en las que se silenció GFP transgénico debido a interferencia de ARN inducida por virus.

Figura 7. (Figura 7A) Expresión maximizada de GFP usando *Agrobacterium* introducida por sonicación en una hoja de Cabernet franc micropropagada. (Figura 7B) Una hoja menos susceptible que, sin embargo, muestra expresión de GFP en la vena. La GFP se expresa directamente a partir de un vector binario realizado por ingeniería genética como se muestra en (Figura 7C).

Figura 8. Infección de vid con miniLR-2-GFP introducida por agroinfiltración que muestra imágenes de la hoja inoculada y células verdes que expresan GFP individuales (fila superior) y un mapa genético del replicón de miniLR-GFP. L1 y L2, proteinasas líder; MET, dominio de metiltransferasa; HEL, dominio de ARN helicasa; POL, ARN polimerasa dependiente de ARN; GFP, proteína verde fluorescente; p24, una proteína de 24 kDa.

Figura 9. Infección de vid con el LR-2-GFP de longitud completa introducido por agroinfiltración que muestra imágenes de la hoja inoculada y células verdes que expresan GFP individuales.

Figura 10. (Figura 10A) Esquema del virus GLRaV-2, el vector de longitud completa (LR-GFP) y minivector (mLR-GFP/GUS). (Figura 10B) Dominios de las proteasas líder L1 y L2 con resultados de procesamiento proteolítico, expresión génica e infección en *N. benthamiana* indicados.

Figura 11. Procesamiento de vectores como se muestra por marcaje con HA (Figura 11A) y radiomarcaje (Figura 11B).

Figura 12. (Figura 12A) Transporte a larga distancia e infección sistémica de hojas de *N. benthamiana* con vectores. (Figura 12B) acumulación de GFP en hojas de *N. benthamiana*. (C) Ausencia de expresión génica en hojas superiores de *N. benthamiana* después de inoculación.

Figura 13. Análisis de inmunotransferencia de gradiente de fraccionamiento de sacarosa de viriones aislados de hojas de *N. benthamiana* infectadas.

Figura 14. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las variantes derivadas de *N. benthamiana* (Nb; carriles superiores) y derivadas de *V. vinifera* (Vv, carriles inferiores) del vector GLRaV-2. Los nucleótidos diferentes en dos aislados se muestran en negrita y subrayados.

LISTA DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácido nucleico y/o aminoácidos enumeradas en el presente documento y/o en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases nucleotídicas, y el código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. §1.822. Se muestra solamente una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria se incluye por cualquier referencia a la cadena presentada. En la lista de secuencias adjunta:

SEC ID N°: 1 es la secuencia de ácido nucleico de p35S-LR-2/ERGFP, un vector de silenciamiento y de expresión génica derivado de virus de enrollamiento de la vid 2, de longitud completa, que contiene un gen recombinante que codifica el indicador de GFP dirigido a ER. La secuencia incluye el vector binario pCB301 (1-3305), y el casete de expresión viral completo (3306-21957). Los siguientes elementos que se muestran en la Figura 1C también se reflejan en la secuencia: promotor 35S (3306-4063), secuencia viral (4064-21643) incluyendo el casete de expresión de indicador-GFP (18648-19439), promotor de BYV CP heterólogo (18440-19723), ribozima (21644-21698) y terminador de NOS (21705-21957).

SEC ID N°: 2 es la secuencia de ácido nucleico de MiniLR-GFP/GUS.

SEC ID N°: 3 y 4 son las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de proteasa L1.

SEC ID N°: 5 y 6 son las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de proteasa L2.

SEC ID N°: 7 es la secuencia de nucleótidos de vector de silenciamiento y expresión de gen derivado de virus

asociado con enrollamiento de la vid 2, de longitud completa, que contiene un gen recombinante que codifica indicador GFP dirigido a ER (LR2-Vitis). Toda la secuencia de nucleótidos de virus asociado con el enrollamiento de la vid 2 se corresponde con una secuencia consenso del aislado viral presente de forma natural en la vid Pinot Noir. Los nucleótidos distintos de los presentes en el virus de *N. benthamiana*, original (SEC ID N°: 1) se destacan en la Figura 14. La secuencia de nucleótidos fuera del casete de expresión viral son iguales que en SEC ID N°: 1.

SEC ID N°: 8 es una secuencia genómica de cromosoma de *V. vinifera* representativa que abarca un promotor específico de floema potencial, promotor ortólogo de AtSUC2 (GSVIVT00002302001_VvSUC27_AF021810_Genomic), adecuado para expresión específica de floema de los vectores de LR-2.

SEC ID N°: 9 es una secuencia genómica de cromosoma de *V. vinifera* representativa que abarca un promotor específico de floema potencial, promotor ortólogo de AtAHA3 (VV78X258876_VITISV_014422_AM487422_CAN64375_Genomic), adecuado para expresión específica de floema de los vectores de LR-2.

SEC ID N°: 10 es una secuencia genómica de cromosoma de *V. vinifera* representativa que abarca un promotor específico de floema potencial, promotor ortólogo de AtAsus1 (VV78X051063_CAN82840_VITISV_024563_GI147856448_Genomic), adecuado para expresión específica de floema de los vectores de LR-2.

SEC ID N°: 11 es la secuencia de aminoácidos del marcador del epítipo de hemaglutinina (HA).

Descripción detallada

A no ser que se indique de otro modo, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la invención, se proporcionan en el presente documento explicaciones de términos específicos.

La expresión "vid", "planta de la uva" o "planta de vid" se refiere a cualquier planta del género *Vitis*, por ejemplo *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rotundifolia*, *V. aestivalis*, o del género *Muscadinia*, y especies del mismo. La vid puede ser un vástago, rizoma, cultivares o una planta híbrida. El término "uva" es la baya o fruto de la vid, que puede comerse completa o de la que puede extraerse el jugo para beber y/o para fermentación dando vino. Otras partes comestibles de una vid incluyen las hojas y las semillas.

A no ser que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Los términos singulares "un" y "el" incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. De forma similar, se entiende que la palabra "o" incluye "y" a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. Por lo tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A o B, o A y B. Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para descripción. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen posteriormente métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo cualquier explicación de términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Visión de conjunto de varias realizaciones

La presente divulgación proporciona vectores de transferencia génica que comprenden al menos los genes de replicación de virus asociado con enrollamiento de la vid 2 (LR-2). LR-2 se ha secuenciado (Meng *et al.*, Virus Genes 31: 31-41, 2005) y se ha comparado funcionalmente con otros closterovirus conocidos (Dolja *et al.*, Virus Res. 117(1): 38-51, 2006). Los genes virales del núcleo de LR-2 incluyen Met (metiltransferasa), Hel (ARN helicasa) y Pol (ARN polimerasa dependiente de ARN), mientras que L1, L2 y p24, por comparación con genes homólogos de BYV, desempeñan papeles accesorios en la replicación del genoma. Otros genes también pueden incluirse en el presente vector, tales como p6, Hsp70h, p63, CPm, CP y p19 (véase, por ejemplo, Peremyslov *et al.*, J. Virol. 72: 5870-5876, 1998).

La presente divulgación se refiere a vectores que comprenden las proteasas líder, L1 y L2, y vectores con una o ambas proteasas líder inactivadas. Un experto en la materia reconocerá inmediatamente que hay múltiples maneras en las que puede inactivarse una proteasa, y todos estos métodos se contemplan en el presente documento. Se ha mostrado previamente que para un closterovirus relacionado, BYV, se requiere la proteasa líder correspondiente L-Pro para amplificación de ARN eficaz y transporte a larga distancia del virus (Peng *et al.*, J. Virol. 77, 2843-2849, 2003; Peng & Dolja, J. Virol. 74, 9766-9770, 2000). Resulta interesante que el reemplazo de L-Pro por las proteasas

de otros closterovirus (Peng *et al.*, J. Virol. 75(24), 12153-12160, 2001) o incluso de un arterivirus animal (Peng *et al.*, Virology 294, 75-84, 2002) puede rescatar la amplificación de ARN, pero no la función de transporte de la proteasa líder. El virus asociado con enrollamiento de la vid 2 (GLRaV-2) es un pariente cercano de BYV en el género *Closterovirus* cuya organización genética es casi idéntica a la de BYV (Zhu *et al.*, J. Gen. Virol. 79: 1289-1298, 1998). Sin embargo, a diferencia de BYV que posee una proteasa líder GLRaV-2 codifica dos proteasas líder, L1 y L2 (Meng *et al.*, Virus Genes 31, 31-41, 2005; Peng *et al.*, J. Virol. 75(24), 12153-12160, 2001) (Figura 1A, diagrama superior). Se muestra en el presente documento por primera vez que L1 y L2 tienen funciones complementarias en el establecimiento de la infección por GLRaV-2 en las células inoculadas inicialmente y el transporte sistémico. Sorprendentemente, la contribución global de L1 y L2 a la infección de virus es mucho más crítica en un hospedador de virus natural, la vid, en comparación con un hospedador herbáceo experimental, *N. benthamiana*. Por lo tanto, usando las propiedades de L1 y L2, pueden reconstruirse vectores para la introducción de genes heterólogos en vides como competentes para replicación (que comprenden tanto L1 como L2) o de replicación condicionada (con una o ambas proteasas líder inactivadas).

Son vectores competentes para replicación los vectores que son capaces de producir viriones infecciosos sin necesitar factores adicionales aportados en *trans*. Dichos vectores, después de inoculación o transducción en una célula vegetal pueden producir viriones infecciosos e infectar otras células. Dichos vectores pueden ser útiles cuando se desee la infección sistémica de una planta, dado que el vector puede proliferar más allá de la célula originalmente transducida y aumentar la transducción global. Por ejemplo, el vector puede propagarse dentro de un tejido, entre tejidos, en toda la planta o incluso entre plantas. Por ejemplo, el vector puede infectar una hoja entera, más de una hoja, una o más hojas y el tallo o fruto de la planta, así como las raíces.

Los vectores de replicación condicionada carecen de factores virales necesarios para la producción de viriones infecciosos de forma independiente. La presente divulgación abarca vectores que tienen una o ambas proteasas líder inactivadas de modo que el vector no es capaz de producir viriones infecciosos y no pueden infectar células adicionales después de inoculación o transducción. Dichos vectores pueden ser útiles cuando no se desee la proliferación del vector, o cuando sea beneficiosa la proliferación limitada. Dichos vectores pueden tener seguridad aumentada dado que la proliferación del vector así como la expresión del gen heterólogo no va más allá de la transducción original.

En realizaciones específicas, los vectores de transformación de plantas proporcionados en el presente documento incluyen uno o más genes virales del virus asociado con enrollamiento de la vid 2 (LR-2) que están implicados en el ensamblaje de viriones y/o transporte dentro de plantas. Dichos genes incluyen por ejemplo p6, Hsp70h, p63, CPm, CP y p19. En realizaciones particulares, todos estos genes están incluidos en el vector, facilitando de este modo la infección sistémica. Dicho vector puede denominarse vector de longitud completa.

El genoma de LR-2 completo (o esencialmente todo el genoma, o el equivalente del mismo) puede incluirse en el vector. El vector puede comprender secuencias heterólogas adicionales, tales como secuencias que faciliten la propagación o transformación. Dichas secuencias pueden ser elementos de control para la agroinfección, tales como un vector binario, que se conoce bien en la técnica. El vector puede tener la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, bien como se proporciona en el presente documento o con diferentes secuencias heterólogas que reemplazan los genes indicadores proporcionados como los ejemplos (GFP y GUS). Las proteasas líder del vector pueden ser L1 (SEC ID N°: 4) y/o L2 (SEC ID N°: 6) de LR-2 y pueden codificarse por SEC ID N°: 3 y 5, respectivamente. Además, puede introducirse también un supresor de silenciamiento de ARN con el vector. Dicho supresores pueden ser LR-2 p24 o p21 del virus del amarilleo de la remolacha (Chiba *et al.*, Virology 346: 7-14, 2006).

El vector incluye un polinucleótido heterólogo unido operativamente con un promotor. El promotor puede ser un promotor de LR-2 nativo, por ejemplo promotor de CP LR-2, o puede ser un promotor heterólogo, tal como un promotor de otros virus que pertenecen al género *Closterovirus*, tales como virus del amarilleo de la remolacha, por ejemplo promotor de CP BYV, virus de *malformación del amarilleo de la remolacha*, virus de *moteado amarillo del clavel*, virus de *la tristeza de los cítricos*, virus de *la menta 1*, etc. Aunque el promotor de CP de estos virus normalmente proporciona mayor niveles de expresión, podrían ser útiles varios promotores adicionales de estos virus. Se conocen en la técnica muchos promotores adecuados. El polinucleótido heterólogo puede codificar una molécula indicadora, un marcador seleccionable y/o un gen terapéutico. Los ejemplos de moléculas indicadoras incluyen proteínas fluorescentes, tales como proteína verde fluorescente, luciferasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa y otras moléculas indicadoras conocidas en la técnica. Los ejemplos de marcadores seleccionables también incluyen marcadores de resistencia a antibióticos, marcadores epítópicos útiles para purificación de afinidad y similares. Los ejemplos de genes terapéuticos incluyen los que confieren resistencia a una patología o enfermedad.

La presente divulgación abarca métodos para inducir resistencia a enfermedad en una planta o célula vegetal introduciendo el vector de expresión génica vegetal de la presente divulgación en la célula. Dichas enfermedades de plantas de la uva incluyen, pero sin limitación, agentes fúngicos, agentes bacterianos, agentes virales, parásitos y tensión ambiental. Los ejemplos de enfermedades fúngicas incluyen *Guignardia bidwellii* (podredumbre negra), *Plasmopara viticola* (mildió algodonoso), *Erysiphe necator* (oidio, previamente *Uncinula necator*), *Botrytis cinerea*

(podredumbre peduncular), *Sclerotinia sclerotiorum* (podredumbre de los brotes de *Sclerotinia*), *Eutypia armenicae* (degeneración de *Eutypia*), *Elsinoe ampelina* (antracnosis), *Alternaria alternata* (podredumbre de alternia), *Pseudopeziza tetraspora*, *Cercospora brachypus*, *Sphaceloma ampelinum*, *Ascochyta* sp. *Aspergillus aculeatus*, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Helminthosporium* spp., *Monilia* sp., *Stemphylium botryosum*, *Pleospora tarda*, *Torula* sp., *Greeneria uvicola*, *Botryosphaeria stevensii*, *Diplodia mutila*, *Penicillium* spp., *Botryotinia fuckeliana*, *Anthostomella pullulans*, *Clostridium* spp., *Libertella blepharis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Rosellinia necatrix*, *Dematophora necatrix*, *Roesleria subterranea*, *Mycosphaerella personata*, *Pseudocercospora vitis*, *Isariopsis clavispora*, *Briosia ampelophaga*, *Phymatotrichopsis omnivora*, *Dematophora necatrix*, *Cristulariella moricola*, *Grovesinia pyramidalis*, *Cephalosporium* spp., *Phellinus igniarius*, *Stereum hirsutum*, *Physopella ampelopsidis* y *Phomopsis viticola* (enfermedad de manchas de la caña y hoja de *Phomopsis*).

Los ejemplos de enfermedades bacterianas incluyen *Xylella fastidiosa* (enfermedad de Pierce), *Agrobacterium tumefaciens* (agalla de corona), *Pseudomonas syringae* y *Xylophilus ampelinus* (roya bacteriana).

Los ejemplos de enfermedades virales incluyen virus asociados con enrollamiento de la vid, virus del raquitismo de la vid, virus de la vid A, virus de la vid B, mosaico anular del tomate, virus asociado con erosión del tallo de *Rupestris*, mosaico anular del tabaco, virus del mosaico de *Arabis*, virus latente italiano de la alcachofa, virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico de *Bratislava*, virus del marchitamiento del haba, virus del mosaico anular latente del fresal de vid, virus de necrosis del tabaco, virus del mosaico del tabaco, virus del mosaico amarillo de la vid, virus del mosaico en asteroide de la petunia y virus de la mancha anular negra del tomate.

Los ejemplos de plagas incluyen *Daktulosphaira vitifoliae*, *Lepidoptera*, *Otiorthynchus sulcatus*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema* spp., *Pratylenchus* spp., *Longidorus* spp., *Paratylenchus hamatus*, *Paratylenchus hamatus*, *Rotylenchulus* spp., *Criconebella xenoplax*, *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* spp., *Paratrichodorus christiei*, y *Tylenchorhynchus* spp.

Los ejemplos de tensión ambiental incluyen sequía, tensión por calor, tensión salina, deficiencia de hierro, deficiencia de cinc, ozono y toxinas ambientales. Como alternativa, el presente vector puede usarse para conferir resistencia a herbicidas, fungicidas, pesticidas y viricidas.

La enfermedad de Pierce (PD), provocada por una infección por la bacteria *Xylella fastidiosa*, es particularmente importante para cultivadores de cultivos de uva. Las bacterias se multiplican en el xilema de la planta, provocando el bloqueo del movimiento y la roya o necrosis de la hoja característica, particularmente durante tensión por calor o agua. El tratamiento se centra en la actualidad en la prevención de la infección dirigiendo el vehículo de insecto que transmite las bacterias de planta a planta durante la alimentación. Se conocen varios vectores de insecto, incluyendo varios proconinos, tales como el *Homalodisca vitripennis*. Muchos cultivos comercialmente importantes son susceptibles de PD, haciendo de este modo urgentemente necesario combatir esta enfermedad.

Los tratamientos para dichas enfermedades pueden incluir la expresión de proteínas terapéuticas, tales como los genes de organismos patógenos o infecciosos o represión de genes de hospedadores para mitigar una respuesta no deseada. Los ejemplos de proteínas terapéuticas incluyen proteínas que se dirigen al organismo patógeno o agente directamente, tales como quitinasas, que degradan las paredes fúngicas protectoras (por ejemplo, Adams, Microbiology 150: 2029-2035, 2004), replicasas, que inhiben la replicación (por ejemplo, documento WO 98/052964), lisozimas, que atacan a las paredes bacterianas, o genes que se han descubierto en plantas resistentes a enfermedad. Se ha mostrado que las lisozimas tienen propiedades antibacterianas y pueden ser eficaces contra *Xylella*. La Solicitud de Estados Unidos N° 20020104126 muestra que la lisozima bovina, que está activa a un pH muy bajo, puede expresarse en plantas del tabaco y conserva actividad en ensayos *in vitro*. Sin embargo, la viabilidad de expresar lisozima en plantas leñosas, concretamente vides, o su eficacia contra *Xylella* o tratamiento de PD no se ha ensayado. Se ha mostrado que el gen de resistencia a oídio de la vid, *Rnn1* confiere resistencia a *V. vinifera* susceptible cuando se transfiere mediante una estrategia de pseudo-retrocruzamiento y se suministra usando un cromosoma artificial de bacteria (Barker *et al.*, Theor. Appl. Genet. 111: 370-377, 2005). Por lo tanto, *Run1* y otros genes asociados con la resistencia a enfermedad son adecuados para su uso en los métodos y construcciones/vectores descritos en el presente documento.

Como alternativa, el presente vector puede usarse para inducir silenciamiento de ARN (silenciamiento génico inducido por virus o VIGS) para reprimir la expresión génica no deseada, tal como expresión de genes de organismos patógenos o genes de hospedadores no deseados. El VIGS es un fenómeno bien conocido en la técnica como un mecanismo usado para examinar las funciones de genes vegetales (Godge *et al.*, Plant Cell Rep 27(2): 209-219, 2008; e-pub antes de la impresión, 2007). Para inducir el VIGS, el vector puede codificar una parte de una secuencia de nucleótidos del gen diana. La secuencia de nucleótidos puede ser de cualquier parte del transcrito expresado a partir del gen, incluyendo una región codificante de proteína o secuencias no traducidas.

Otra realización de la presente divulgación es el uso del vector de la invención para introducir genes que están implicados en la modificación estética de las partes comestibles de la planta transgénica o transgénica, tal como sabor o aroma del jugo. Dichas partes comestibles incluyen las raíces, tallos, hojas, flores, semillas y/o fruto de la planta, o cualquier sustancia comestible derivada de las mismas. En particular, las uvas, o el jugo derivado de las

5 mismas, puede modificarse de modo que los agentes que interaccionan con los receptores del sabor bloqueen o potencien ciertos sabores, tales como amargo, dulce, agrio y similares. Como alternativa, los agentes potencian los compuestos aromáticos hallados en las uvas o el jugo. Dichos agentes pueden ser proteínas, tales como monelina, taumatinas, gustducina, terpenoides y otras de dichas proteínas conocidas en la técnica. Para modificación estética, el vector de la presente divulgación puede modificarse por ingeniería genética para codificar una molécula modificadora de la estética, tal como una proteína, y usarse después el vector para transformar una célula vegetal, que después expresa la molécula.

10 Los métodos y vectores de la presente divulgación también pueden usarse para introducir genes que están implicados en las rutas metabólicas de uvas (metabolómicas) para la mejora de las características nutricionales. Por ejemplo, se ha descubierto que el resveratrol, un compuesto polifenólico (3, 4', 5-trihidroxiestilbeno) hallado en uvas, tiene ciertos beneficios para la salud, tales como propiedades antineoplásicas y asociación con una reducción en enfermedad cardiovascular. Otros compuestos hallados en uvas con beneficios para la salud potenciales incluyen fitonutrientes tales como quercetina, catequinas, antocianinas y proantocianidinas. La secuenciación de la variedad de uva pinot noir así como el desarrollo de técnicas de realización de perfiles metabólicos, tales como técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear, proporcionan información valiosa para desarrollar genes adecuados para su uso con los vectores y sistemas de expresión descritos en el presente documento. Genes adicionales de interés están implicados en la maduración, tales como el gen *flb*, así como cualquier aspecto del cultivo de plantas, desarrollo y producción agrícola que pueda desearse.

20 La presente divulgación abarca métodos para expresar un gen heterólogo en una célula vegetal introduciendo un vector de expresión génica vegetal descrito en la célula. El vector de transferencia génica vegetal puede introducirse en la célula vegetal por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por infiltración de vacío, sonicación, de forma balística, precipitación con fosfato cálcico, electroporación, fusión de polietilenglicol, transformación directa (Lorz *et al.*, Mol. Genet. 199: 179-182, 1985) y otros métodos. El vector puede introducirse como una partícula viral infecciosa o como un nucleótido no infeccioso. Un método es la agroinoculación, por ejemplo, incorporando el vector en un plásmido binario con elementos de control adecuados para expresar el vector en una especie de *Agrobacterium*, tal como *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis*. Dichos métodos se conocen en la técnica, tales como los descritos en Leiser *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9136-9140, 1992 y Bouquet *et al.*, Methods in Mol. Bio. 344: 273-285, *Agrobacterium* Protocols, 2ª ed. vol. 2, Wang ed (2006). Puede introducirse *Agrobacterium* en plantas de vid micropropagadas por medio de infiltración de vacío o sonicación. Las cepas de *Agrobacterium* modificadas por ingeniería genética para expresar el vector viral pueden mezclarse con otra cepa modificada por ingeniería genética para expresar el supresor viral de ARNi para aumentar la infecciosidad del vector (Chiba *et al.*, Virology 346: 7-14, 2006).

35 El vector puede introducirse para expresión estable o expresión transitoria. Puede conseguirse expresión estable por varios métodos conocidos, tales como cocultivo de tejido de uva embrionario con *Agrobacterium* que contiene el vector usando los métodos de Bouquet *et al.* (Methods Mol. Biol. 344: 273-285, 2006). También puede conseguirse expresión transitoria por métodos conocidos, tales como los métodos descritos en los ejemplos de la presente solicitud. Otros métodos incluyen, pero sin limitación, infiltración de hojas, infiltración de vacío y bombardeo de tejidos diana con partículas recubiertas de ADN.

40 El vector también puede aplicarse a la vid o a cualquier parte de la misma mediante aplicación de una solución que contiene el vector, tal como por pulverización. Dichas soluciones contienen el vector como ADN, partículas recubiertas de ADN o contenidas en *Agrobacterium*, así como sales y tampones. La solución puede contener, por ejemplo, un tampón fosfato a 0,1 M, pH 7 o puede contener nicotina. Dichas formulaciones se conocen bien en la técnica y pueden usarse según sea adecuado para los presentes métodos. La solución puede contener además un abrasivo, tal como carborundum, por ejemplo carborundum de malla 500, caolín o tierra diatomea Celite®. La solución puede comprender también un tensioactivo, tal como Triton o Tween, que se conocen bien en la técnica. La solución puede aplicarse a la planta mediante frotado, goteo, inmersión, pulverización u otros medios. Véase, por ejemplo, enfermedades transmisibles por injerto de vides. Martelli ed. 1993, Roma, Italia, Food and Agriculture Organization of the United Nations publ.

45 La presente divulgación incluye además composiciones que comprenden el vector o los vectores descritos en el presente documento. Además del vector y opcionalmente otros ingredientes funcionales tales como abrasivos y/o tensioactivos, dichas composiciones pueden incluir excipientes adecuados para introducir el vector en una célula vegetal, tales como sales, por ejemplo, cloruro de magnesio y tampones, tales como MES o fosfato, y son normalmente soluciones acuosas. Véase, por ejemplo, enfermedades transmisibles por injerto de vides. Martelli ed. 1993, Roma, Italia, Food and Agriculture Organization of the United Nations publ.

50 El vector puede aplicarse diariamente, mensualmente, por temporadas o anualmente. El vector puede aplicarse durante o después de la aparición de enfermedad o la infestación de los vehículos de enfermedad. Por ejemplo, los síntomas de la enfermedad pueden leerse dos veces al año: al final de la primavera para deformaciones de la hoja y la caña y necrosis y en otoño para pigmentación anómala y otras deformidades ((Graft transmissible diseases of grapevines. Martelli ed. 1993, Roma, Italia, Food and Agriculture Organization of the United Nations publ). Tras la identificación de los síntomas, el vector puede aplicarse, tal como pulverización con una solución que contiene un

abrasivo. Como alternativa, las plantas pueden pulverizarse tras la infestación con un vehículo conocido de una enfermedad, tal como ciertos nematodos o cicadas de vides, o en ciertas condiciones climáticas o estaciones que se sabe que inducen condiciones favorables a una enfermedad, tales como clima húmedo y oídio. Se conocen bien en la técnica directrices e índices para dichas condiciones, tales como las Directrices del Control de Plagas de la Universidad de California, los Sistemas de Control de Plagas Integrados Estatales, disponibles en internet en at.ipim.ucdavis.edu/PMG/r302101211.html (accedida por última vez el 27 de enero de 2008). Además, el presente vector puede aplicarse con otros agentes antienfermedad conocidos, tales como aceites, fungicidas y similares.

La presente divulgación incluye un método para transformar una planta que comprende introducir la transferencia génica vegetal descrita en la planta una vez o más de una vez. El vector puede introducirse dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez veces en la planta. La planta puede expresar el polinucleótido heterólogo de forma sistémica o local.

La célula vegetal puede cultivarse en una planta transgénica, tal como usando los métodos de Bouquet *et al.* (Methods Mol. Biol. 344: 273-285, 2006). Como alternativa, la célula vegetal puede ser parte de una planta multicelular de modo que se transforme solamente una parte de la planta. Por ejemplo, puede transformarse el rizoma, el tallo o las hojas. El vector puede introducirse antes de la aparición de enfermedad para conferir resistencia, o puede introducirse después de observar la enfermedad para reducir o aliviar la enfermedad, para proteger las partes no infectadas restantes de la planta o para prevenir la propagación de la enfermedad a otras plantas.

Referencias adicionales

- Agranovsky *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92(7), 2470-2473, 1995
 Alzhanova *et al.*, Virology 268(1), 192-200, 2000
 Alzhanova, EMBO J. 20, 6997-7007, 2001
 Alzhanova *et al.*, Virology 359, 220-226, 2007
 Barrett y Rawlings, Biol. Chem. 382, 727-733, 2001
 Boyko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 9156-9160, 1992
 De los Santos *et al.*, J. Virol. 80, 1906-1914, 2006
 Ding y Voinnet, Cell 130, 413-426, 2007
 Donson *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 88: 7204-7208, 1991
 Dougherty y Semler, Microbiol. Rev. 57(4), 781-822, 1993
 Gabrenaite-Verkhovskaya *et al.*, J. Gen. Virol. 89, 829-838, 2008
 Gorbalenya *et al.*, FEBS Lett 243, 103-114, 1989
 Gorbalenya *et al.*, Virus Res., 117(1):17-37, 2006
 Gorbalenya *et al.*, FEBS Lett. 288(1-2), 201-5, 1991
 Karasev, Annu. Rev. Phytopathol. 38, 293-324, 2000
 Kasschau *et al.*, Virology 228(2), 251-62, 1997
 Koonin y Dolja, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28(5), 375-430, 1993
 Koonin y Dolja, Virus Res 117, 1-4, 2006
 Lakatos *et al.*, EMBO J. 25, 2768-2780, 2006
 Lu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101, 15742-15747, 2004
 Marillonnet *et al.*, Nat. Biotechnol. 23: 718-723, 2005
 Napuli *et al.*, J. Virol. 77, 2377-2384, 2003
 Ng y Falk, Annu. Rev. Phytopathol. 44, 183-212, 2006
 Satyanarayana *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101, 799-804, 2004
 Satyanarayana *et al.*, Virology 278(1), 253-265, 2000
 Segers *et al.*, Eukaryot. Cell 5, 896-904, 2006
 Susaimuthu *et al.*, Virus Res. 131, 145-151, 2008
 Tian *et al.*, J. Gen. Virol. 80, 1111-1117, 1999
 Tijms *et al.*, J. Virol. 81, 10496-10505, 2007
 Torrance *et al.*, J. Mol. Biol 357, 1-8, 2005
 Valli *et al.*, J. Virol. 80, 10055-10063, 2006
 Ziebuhr *et al.*, J. Virol 81, 3922-3932, 2007
 Ziebuhr *et al.*, J. Gen. Virol. 81, 853-879, 2000

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones particulares. No debería interpretarse que estos ejemplos limiten la invención a las características o realizaciones particulares descritas.

Ejemplos

Búsqueda de un aislado de virus local. Se realizó un estudio de vides locales para determinar si LR-2 está presente de forma natural en Oregón, y se descubrieron vides que mostraban síntomas de tipo LR-2 de enrojecimiento de la hoja temprana. Se realizó análisis de inmunotransferencia con el kit de inmunodetección de LR-

2 disponible en el mercado (Bioreba AG, Reinach, Suiza; Cat. Nº 120775) y se generaron anticuerpos adaptados usando los viriones de LR-2 aislados de *N. benthamiana* como se describe posteriormente. El análisis de RT-PCR usando los cebadores diseñados para amplificar una región de aproximadamente 2 kb del genoma de LR-2 que contenía el gen de proteína de cápsida viral también demostró que las vides contenían de hecho el virus.

Clonación molecular y secuenciación de nucleótidos. Para facilitar la acumulación y aislamiento de LR-2, se usó material de vides infectadas para inocular mecánicamente *N. benthamiana*. Se usaron partículas de virus purificadas para obtener ARN viral, amplificarlo por RT-PCR y clonar los productos de ADNc en el plásmido del vector pBlueScript. Las secuencias terminales del genoma viral se clonaron usando RLM-RACE. Se secuenció un gran número de clones independientes para proporcionar cobertura múltiple del genoma viral. La secuencia de nucleótidos consenso resultante por primera vez incluyó el genoma viral completo y contenía regiones terminal 5' y terminal 3' exactas. El análisis comparativo de esta secuencia reveló 99,9 % de identidad con la secuencia incompleta publicada previamente del aislado del LR-2 de Nueva York sobre las regiones de solapamiento (Zhu *et al.*, J. Gen. Virol. 79: 1289-1298, 1998). Se muestra un mapa funcional del genoma de LR-2 de ~16.500 nucleótidos de longitud en la Figura 1A.

El inóculo inicial de *N. benthamiana* con LR-2 se realizó como se describe en Goszczynski *et al.* (Vitis 35: 133-135, 1996). Posteriormente, se usaron hojas infectadas de *N. benthamiana* para realizar un inóculo para propagación de virus en este hospedador de virus experimental. De forma rutinaria, se molió 1 g de tejido infectado en 5 ml de tampón de Na-fosfato 0,05, pH 7,0, y se usó para inoculación manual de las nuevas plantas con ayuda de carborundum.

Se realizó amplificación por RT-PCR, clonación y ensamblaje del clon de ADNc de longitud completa como se describe en Peremyslov y Dolja (Curr. Protocols Microbiol., "Cloning of Large Positive-Strand RNA Viruses" Supl. 7., Coico, ed., noviembre, 2007).

Inserción del casete de expresión génica. Se clonó un promotor de ARN subgenómico fuerte que conduce la expresión de la proteína de cápsida principal en el pariente de LR-2, virus del amarilleo de la remolacha (BYV), y se insertó cadena abajo del promotor de LR-2 análogo junto con sitios de restricción únicos *Pac* I y *Fse* I en uno de los clones de ADNc de LR-2 parciales. Se insertó un gen indicador que codificaba proteína verde fluorescente dirigida a retículo endoplásmico (ER-GFP) entre los dos promotores (Figura 1B). Se esperaba que este diseño diera como resultado una producción de alto nivel de ER-GFP de promotor de LR-2 auténtico y proteína de la cápsida de LR-2 de un promotor de BYV recombinante descrito en (Agranovsky *et al.*, J. Gen. Virol. 72: 15-23, 1991) e ilustrado en la SEC ID Nº: 1.

Generación de un clon de ADNc de longitud completa de LR-2. Usando clones de ADNc parciales solapantes, se ensamblaron varios clones de LR-2 de longitud completa prototípicos que contenían casete de expresión en pBlueScript® (Stratagene, La Jolla, CA) bajo el control del promotor de ARN polimerasa SP6 de fago. Se obtuvieron transcritos de ARN de extremos recubiertos correspondientes *in vitro* y se usaron para transfectar protoplastos de cultivo en suspensión del tabaco e inocular plantas de *N. benthamiana*. Debido a que ninguno de estos experimentos dio como resultado multiplicación e infección de virus, se volvió a secuenciar el genoma viral clonado. Se detectaron múltiples mutaciones perjudiciales en todo el genoma lo que sugiere que se introdujeron errores durante la amplificación por RT-PCR de fragmentos genómicos. Para superar este importante obstáculo, se volvió a ensamblar el genoma de LR-2 completo a partir de los fragmentos de ADNc obtenidos usando transcripción inversa y ADN polimerasa de Klenow en lugar de PCR. Aunque este enfoque dio como resultado una reducción drástica del número de mutaciones letales, ninguno de los clones resultantes estaba completamente libre de ellas. Estos resultados indicaron que el ADNc de LR-2 en forma sin mutaciones, funcional, era probablemente tóxico para *E. coli* usada para clonación.

Uno de los enfoques que pueden aliviar la toxicidad de ADN recombinante es usar un número de copias de plásmido para la clonación. Para ensayar esta posibilidad, se usó pCB-302 (Xiang *et al.*, Plant Mol. Biol. 40: 711-717, 1999), un mini-vector binario adecuado para clonar tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Este vector se ha modificado para acomodar todos los elementos de control requeridos para expresión posterior del genoma de LR-2 en plantas usando agroinoculación. Estos elementos incluyeron el promotor de ARN polimerasa de 35S, terminador de NOS y una ribozima diseñada a medida para una liberación de un extremo 3' auténtico de ARN de LR-2 tras su transcripción. Este último acontecimiento de procesamiento es crítico para la capacidad del ARN viral para replicar en la planta. Después de estas modificaciones, se clonó el ADNc de LR-2 de longitud completa en pCB-302 y se designó el plásmido pCB-LR-GFP (SEC ID Nº: 1).

El ADNc de LR-2 se clonó entre los extremos derecho e izquierdo de ADN-T del plásmido pCB-302. Se muestra un mapa del plásmido resultante en la Figura 1C. La secuenciación de nucleótidos del genoma viral clonado completo no reveló ninguna mutación perjudicial.

Ensayos de infecciosidad en *N. benthamiana*. Se transformó pCB-LR-GFP en agrobacterium y la cepa resultante se cultivó, se indujo y se usó para agroinfiltración de las plantas de *N. benthamiana*. De media a las 2-3 semanas después de la inoculación, algunas de las plantas mostraron síntomas de infección típicos. La microscopía de

barrido de láser confocal detectó fuerte expresión de GFP en las células epidérmicas de las hojas infiltradas. Como se esperaba, la fluorescencia de GFP se limitó a una red característica del retículo endoplásmico (ER) y complejos de replicación de viral derivados de ER (Fig. 2). El examen de las hojas superiores, tallos y peciolo de las plantas sintomáticas reveló altos niveles de acumulación de ER-GFP en los tejidos del floema por toda la planta que son típicos de LR-2 y otros closterovirus (Fig. 3). El análisis ultraestructural del tejido infectado confirmó la acumulación de las grandes cantidades de viriones de LR-2 filamentosos en las células de floema, especialmente en las células de la vaina de haz que rodean al xilema y elementos de tamiz. Además, el análisis de inmunotransferencia confirmó la acumulación eficaz de proteína de la cápsida de LR-2 (Fig. 4A). Estos experimentos demuestran que el LR-2 clonado, recombinante es altamente infeccioso, es capaz de proliferar de forma sistémica y expresar un proteína recombinante en un hospedador experimental *N. benthamiana*.

Mejora del eficacia de agroinfección. Aunque se produjo uniformemente infección por LR-2 tras la agroinoculación, el número de células infectadas de forma primaria en las hojas inoculadas fue baja y solamente una fracción de las plantas inoculadas desarrolló infección sistémica. Para potenciar la capacidad del virus recombinante para establecer la infección, se usó un método basado en la expresión de supresores virales de ARNi en el momento de la inoculación (Chiba *et al.* Virology 346: 7-14, 2006). Además, se demostró que LR-2 codifica un supresor muy potente de ARNi, p24. Por lo tanto, se añadió agrobacterium que se había modificado por ingeniería genética para expresar p24 a inóculo. Esta técnica dio como resultado un aumento de aproximadamente 5000 veces en la infecciosidad específica del virus introducido por agrobacterium (Fig. 5) (Chiba *et al.* Virology 346: 7-14, 2006). En la actualidad se obtiene rutinariamente 100 % de infección de las plantas agroinoculadas *N. benthamiana*.

Estabilidad genética del vector de expresión génica de LR-2. Para ensayar si el vector de LR-2 es capaz de conservar un inserto ajeno intacto que codifique proteína indicadora, se han aislado ARN de las hojas superiores de las cuatro plantas individuales de *N. benthamiana* infectadas. Se ha realizado RT-PCR usando estos ARN y cebadores localizados cadena arriba y cadena abajo del casete de expresión de ER-GFP. Los productos de PCR resultantes eran del tamaño esperado lo que indica conservación del casete completo en cada una de las plantas ensayadas (Fig. 4B). Resulta importante que no se detectaron productos más cortos que podrían originarse de pérdida completa o parcial del casete. Estos datos confirmaron que el vector modificado por ingeniería genética es genéticamente estable y puede usarse para la expresión eficaz de las proteínas recombinantes.

Desarrollo del vector de silenciamiento génico para genómica funcional y control de virus. Para ensayar un potencial del vector de LR-2 para silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), se usó la línea de *N. benthamiana* transgénica para GFP 16c y LR-2 que expresaba GFP. Se observó el silenciamiento de GFP fuerte en las hojas infectadas de forma sistémica de plantas 16c después de inoculación con LR-2 GFP (Fig. 6). Este experimento demostró que LR-2-GFP actúa de forma similar a vectores de VIGS conocidos induciendo ARNi del transgén en respuesta a sobreexpresión del gen afín por virus, proporcionando prueba de concepto para la utilidad del vector de LR-2 para VIGS.

Micropropagación de vid y transferencia a suelo. Se desarrolló un aporte fiable de plantas de vides experimentales en todo el año para ensayar los nuevos vectores usando una técnica para micropropagación de vid en condiciones estériles en cajas de plástico usando medio de cultivo basado en agar. Dichas plantas pueden usarse para ensayos de infecciosidad directamente. Además, hay informes anecdóticos que indican que las plantas micropropagadas han aumentado la susceptibilidad a infección viral. Como alternativa, pueden transferirse plantas micropropagadas a suelo y cultivarse en el invernadero para obtener plantas leñosas que son más similares en su susceptibilidad a plantas cultivadas en el suelo abierto. Las condiciones se optimizaron para dicha transferencia y se obtuvo aporte constante de las plantas de vides micropropagadas y de invernadero.

Brevemente, se agruparon recortes de 30,48 centímetros con al menos dos brotes en grupos de 20-30 y se empaparon en una solución de lejía al 10 % durante 10 minutos, se aclararon tres veces en agua, después se sumergieron en agua durante 12-24 horas. Los haces se sumergieron después en solución de arraigo (Dip'N Grow, Dip'N Grow Inc., Clackamas, OR) y se plantaron en vermiculita húmeda calentada a 29,44 °C. El arraigo se produjo en 3-4 semanas. Los recortes se plantaron después a 10,16-15,24 centímetros de profundidad en suelo de maceta bajo un lecho de nebulización ajustado para 3 segundos cada ocho unidades solares (día) y 3 segundos cada 2 horas (noche); una vez que las hojas aparecieron en aproximadamente dos semanas, se redujo la nebulización para evitar el crecimiento de moho y mildiú.

Para establecer vides en cultivo tisular, se retiraron nuevos brotes y se retiraron todas excepto una hoja de la punta del brote. Los brotes se incubaron en jabón líquido Ivory al 0,05 % (Proctor and Gamble, Cincinnati, OH) durante 10 minutos, se aclararon en agua durante una hora, después se sonicaron durante diez minutos en un baño de agua de sonicación. Los brotes se esterilizaron en superficie en una solución de lejía al 5 % durante seis minutos y se movieron a una campana de flujo laminar para manipulación estéril. Los brotes se aclararon en agua desionizada estéril, se recortaron en la base y se plantaron en medio de agar OH. Los brotes se incubaron en una campana de cultivo durante dos semanas; se añadió líquido GS1, se incubó durante otras dos semanas, y después se transfirieron a medio de agar GS1. Cada dos semanas, se añadió medio nuevo, a continuación después de un mes, los brotes se cambiaron al medio del siguiente estadio (GS2, GS3). Las raíces se desarrollaron en medio GS3.

Medio OH de uva

Ingrediente	Concentración g/l
Sales M y S	3,22 g
Tiamina	reserva de 0,8 ml ()
Inositol	0,100 g 0,5 ng/ml
Sacarosa	7 g
NaH ₂ PO ₄	0,170 g
Sulfato de adenina	0,08 g
Ajustar pH a 5,7	
Agar	3 g

- 5 Esterilizar por autoclave durante 20 minutos, enfriar en baño de agua a 50 °C durante 30 minutos, después añadir antibiótico: Cefotaxima 0,2 g. Esterilizar por filtración en medio frío y mezclar. Distribuir a tubos de ensayo estériles.

Medio de estadio de uva 1 (GS1)

Ingrediente	Concentración g/l
Sales M y S	3,22 g
Tiamina	reserva de 0,8 ml (0,5 mg/ml)
Inositol	0,1 g
Sacarosa	20 g
BAP	reserva de 2 ml (0,5 mg/ml))

- 10 Esterilizar por autoclave durante 20 minutos, enfriar en baño de agua a 50 °C durante 30 minutos, después añadir antibiótico: Cefotaxima 0,2 g. Esterilizar por filtración en medio frío y mezclar. Distribuir en 24 cajas Magenta estériles.

15 *Medio de estadio de uva 2*

Ingrediente	Concentración g/l
Sales M y S	3,22 g
Tiamina	reserva de 0,8 ml (0,5 mg/ml)
Inositol	0,25 g
Sacarosa	15 g
NaH ₂ PO ₄	0,05 g
BAP	reserva de 4 ml (0,5 mg/ml)
IAA	reserva de 0,5 ml de IAA (1 mg/ml)
Ajustar pH a 5,3	
Agar	2 g
Goma gellan Gelrite®	1,2 g

- 20 Esterilizar por autoclave durante 20 minutos, enfriar en baño de agua a 50 °C durante 30 minutos, después añadir antibiótico: Cefotaxima 0,2 g. Esterilizar por filtración en medio frío y mezclar. Distribuir en 24 cajas Magenta estériles.

Medio de estadio de uva 3 (GS3)

Ingrediente	Concentración g/l
Sales M y S	3,22 g
Tiamina	reserva de 0,8 ml (0,5 mg/ml)
Inositol	0,025 g
Sacarosa	15 g
NaH ₂ PO ₄	0,05 g
IAA	reserva de 1 ml (1 mg/ml)
Ajustar pH a 5,3	
Agar	1 g
Goma gellan Gelrite®	1 g

- 25 Esterilizar por autoclave durante 20 minutos, enfriar en baño de agua a 50 °C durante 30 minutos, después añadir antibiótico: Cefotaxima 0,2 g. Esterilizar por filtración en medio frío y mezclar. Distribuir a 24 cajas Magenta estériles o 12 cajas Magenta de dos pisos.

- 30 Se están micropropagando y examinando numerosas variedades de uva con respecto a su susceptibilidad a la agroinfiltración y expresión de proteínas ajenas. Las variedades Carbernet franc y Sirah han demostrado

propiedades deseables. Además, se ha descubierto preliminarmente que las plantas estériles transferidas a medios sin antibióticos son más susceptibles a agroinfiltración.

Preparación de agrobacterium. Para preparar el *Agrobacterium*, la construcción de agro se sembró en estrías en placa de agar LB Kan (50 µg/ml) y se incubó a 28 °C durante tres días. Se seleccionaron colonias individuales y se añadieron a un cultivo de 5 ml en LB Kan (50 µg/ml), MES (10 mM) y acetosiringona (20 µM) y se agitó a 220 rpm y 28 °C. Se añadió rifampicina (50 µg/ml) si se usó la cepa de Agro C58 GV2260. Los cultivos de partida se transfirieron a 500 ml de LB Kan (50 µg/ml), MES (10 mM) y acetosiringona (20 µM) y se agitaron durante una noche (1-20 horas) a 28 °C. El cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento celular se suspendió en 20 ml en tampón de inducción para una concentración final de DO₆₀₀ 2,0 para construcciones de virus completo o DO₆₀₀ 0,7 para construcciones solamente con marcador de GFP combinando con DO₆₀₀ 0,1-0,14 para p24 supresor y añadiendo tampón de inducción adicional.

Para preparar la construcción de p24 supresora, se preparó la reserva de Agro como anteriormente, después se suspendió en 20 ml de tampón de inducción a una concentración final de DO₆₀₀ 0,1 para combinar con la suspensión de construcción de virus completo o DO₆₀₀ 0,14 para combinar con suspensión solamente con marcador de GFP.

Tampón de inducción

MgCl₂ 10 mM = 2 ml de MgCl₂ 0,5
MES 10 mM pH 5,85 = 2 ml de MES 0,5 M pH 5,85 por 100 ml
acetosiringona 150 µM = 100 µl de acetosiringona 150 mM

Infiltración por agrobacterium de hojas de vid micropropagadas o plantas completas. Se hirieron hojas sanas de plantas micropropagadas con aguja de 31 g agujereando las venas grandes y la superficie de la hoja. Se colocaron hojas individuales en tubos con 5-10 ml de suspensión de inducción, o la planta completa se soltó en un vaso de precipitados grande con 200 ml de suspensión de inducción. Las suspensiones de vid/agro se sonicaron durante 10 minutos en un baño de agua de sonicación Branson 3510, después se empaparon en suspensión de inducción durante 2-3 horas después de la sonicación. Las hojas o plantas de vid se secaron en toallas de papel estériles, después las hojas se colocaron en placas de agar con agua (7 g de agar/1 l de agua) y se sembraron plantas completas en macetas de 10,16 centímetros que contenían mezcla de macetas y se regaron abundantemente. Se colocaron vasos de plástico estrechamente sobre las plantas para reducir la transpiración en la cámara de cultivo. El aire ambiental se introdujo gradualmente en plantas sembradas inclinando el ángulo de los vasos durante un periodo de dos semanas hasta retirar con el tiempo los vasos de plástico.

Las hojas se controlaron con respecto a expresión de GFP por microscopio después del día 4 para construcciones solamente con el marcador de GFP y después del día 12-14 para construcciones de GFP/virales completas.

Pueden usarse técnicas similares con otras partes de la planta, tales como el rizoma.

Expresión de GFP en vid usando agrobacterium. De forma paralela a los intentos de generar un clon infeccioso de LR-2, se realizaron experimentos dirigidos a desarrollar tecnologías para la expresión transitoria mediada por agrobacterium de genes recombinantes en la vid. Estos experimentos se diseñaron para facilitar ensayos de infecciosidad futuros en la vid. Usando agrobacterium modificada por ingeniería genética para expresar indicador de GFP libre (Fig. 7C) y una técnica de infiltración de vacío de suspensión bacteriana en hojas o plantas completas, se demostró la acumulación de GFP en plantas micropropagadas. Para este fin, se dejaron hojas agroinfiltradas separadas en placas de Petri sobre agar con agua en una cámara de cultivo de plantas a 22 °C durante 4 días y se exploró con respecto a expresión de GFP usando el estereoscopio epifluorescente Leica MZ 16F equipado con un filtro de GFP2 y cámara digital (como se muestra en la Fig. 7A y B) o microscopio de láser confocal. Se realizó microscopía de exploración de láser confocal usando el microscopio Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Alemania) equipado con los filtros de excitación a 488 nm y emisión a 508 nm. El paquete de software proporcionado por el fabricante se usó para procesamiento de imágenes.

También se ensayó una técnica alternativa de agroinoculación usando inmersión de las plantas en baño ultrasónico con suspensión bacteriana como se ha descrito anteriormente. Este enfoque demostró ser tan exitoso como la infiltración con el beneficio adicional de la simplicidad (Fig. 7A). Además, la sonicación dio como resultado una expresión frecuente de GFP en el tejido de hoja vascular (Fig. 7B). Debido a que LR-2 está asociado preferentemente con el floema, se espera que esta técnica facilite la infección.

Se realizan ensayos adicionales utilizando aislados de *Agrobacterium vitis* y *A. rhizogenes* para determinar si estas bacterias pueden proporcionar mejor eficacia de agroinoculación en uvas en comparación con *A. tumefaciens* tradicional. Además, está en curso para mejorar la transformación la optimización de los protocolos para agroinfiltración y sonicación, ensayo de la utilidad de agroinfección combinada con injertos (cortes injertados Omega tratados con suspensión bacteriana) y una técnica de agroinoculación de pelar-curar por la que se aplica suspensión bacteriana al floema expuesto pelando la corteza.

Ensayos de infecciosidad en vid. Se usaron dos clones de LR-2 diferentes para agroinoculación: i) *miniLR-GFP/GUS* (este mini-genoma incluye solamente los genes requeridos para replicación más un gen indicador GFP/GUS y carece de genes requeridos para el ensamblaje de viriones y transporte en plantas; SEC ID N°: 2). El indicador GFP/GUS representa una fusión de GFP que puede detectarse por microscopía epifluorescente y GUS (β -glucuronidasa) que posee actividad enzimática que proporciona ensayos sensibles *in situ* e *in vitro*. El papel de *miniLR-GFP/GUS* se muestra en la Fig. 8; la secuencia de nucleótidos correspondiente se proporciona como SEC ID N°: 2; y ii) *LR-2-GFP de longitud completa* (SEC ID N°: 1). Cuando se exploraron las plantas micropropagadas agroinoculadas con *miniLR-2GFP/GUS* mezclado con plásmido que expresa p24, se observaron grandes números de células infectadas que expresaban indicador de ER-GFP en el ER (Fig. 8) lo que demuestra la capacidad del mini-vector para replicar y expresar proteína indicadora en las células de hojas de la vid. Por lo tanto, cada célula positiva para GFP detectada por microscopía de barrido de láser confocal o epifluorescente representa un acontecimiento exitoso de la introducción del vector viral y obtención de expresión del indicador por el vector viral en este caso presentado por el minirreplicón.

Sin embargo, experimentos similares con el vector de longitud completa dieron como resultado infección del número limitado de células (Fig. 9). De hecho, en trabajos anteriores con BYV, se ha descubierto que el nuni-genoma tenía infecciosidad muy superior tras agroinfección (Chiba *et al.*, Virology 346: 7-14, 2006).

Desarrollo adicional del vector de LR-2 de longitud completa. El clon de LR-2 de longitud completa original se generó usando ARN genómico de LR-2 aislado del virus que se propagó en *N. benthamiana*. Para mejorar la infecciosidad de la vid y reducir la posible mutación debido a la adaptación de virus a un hospedador experimental, el clon de longitud completa se reensambló de fragmentos de ADNc derivados directamente de vid infectada por LR-2 de Pinot Noir obtenida de un viñedo de Oregón local.

Se purificó ARN total de hojas usando un kit RNeasy Vegetal (QIAGEN) y se usó como un molde para construcción de ADNc de cebadores aleatorios. Después se amplificaron por PCR fragmentos contiguos de 2 a 4 kb a partir de este ADNc. Se diseñaron oligonucleótidos para las PCR basándose en la secuencia publicada de los sitios de clonación únicos solapados y de GRLaV-2 presentes en el ADNc de este virus. Los fragmentos de PCR amplificados se clonaron después en un plásmido binario que portaba la variante original del ADNc de LR-2 para reemplazar partes existentes con las derivadas de un virus presente en la vid. Para cada uno de los fragmentos se secuenciaron al menos cuatro clones para deducir secuencias consenso que corresponden a la variante predominante y completamente biológicamente activa del genoma de LR2 presente en la vid. El ADNc genómico completo que comprende los trozos consenso se reensambló *de novo*. El nuevo plásmido binario que portaba el ADNc para el virus derivado de la vid derivado de la Pinot Noir y que no había pasado nunca a través *N. benthamiana* se designó LR2-Vitis.

La secuencia de nucleótidos completa de este casete de expresión LR2-Vitis derivado de la vid se muestra en SEC ID N°: 7. Esta secuencia contiene 74 diferencias de nucleótidos de un casete viral derivado de *N. benthamiana* original (FIG. 14). Parece probable que estas diferencias reflejen adaptaciones del virus a la infección sistémica de la planta hospedadora natural (vid) o experimental (*N. benthamiana*). Por lo tanto, se espera que el vector LR2-Vitis derivado de la vid posea una capacidad aumentada de propagación en la vid.

Utilización de los promotores específicos del floema de *V. vinifera*. Los vectores LR-2 y LR2-Vitis se introducen usando el promotor de ARN polimerasa II de 35S de CaMV (POL II) que conduce la transcripción de ARN viral tras la agroinoculación. Aunque el promotor de 35S se usa rutinariamente para dichos fines, podría ser subóptimo para la infección de la vid usando vectores LR-2. De hecho, el LR-2 infecta de forma natural la vid y se limita al tejido del floema, mientras que el promotor de 35S no es específico ni de la vid ni del floema. Por lo tanto, los inventores usaron bioinformática para identificar los promotores específicos de floema de la vid candidatos que pueden usarse para el reemplazo del promotor de 35S para mejorar la infección de la vid por LR2-Vitis.

Se identificaron tres genes de *A. thaliana* específicos de floema, altamente expresados, y se usaron las secuencias proteicas correspondientes y búsqueda de BLASTP para identificar ortólogos de *V. vinifera* aparentes. Se propone que las secuencias genómicas de *V. vinifera* cadena arriba de secuencias codificantes de proteínas correspondientes (SEC ID N°: 8-10) son útiles como promotores específicos del floema en lugar del promotor de 35S ejemplificado en un casete de LR2-Vitis. La naturaleza y propiedades específicas de los promotores de *V. vinifera* se perfilan a continuación.

1. El promotor del gen de TRANSPORTADOR SACAROSA 2 de *A. thaliana* (simportador SUC2 de sacarosa-H⁺) (At1g22710) se caracterizó en primer lugar por Truernit y Sauer (Planta 196: 564-570, 1995). En *Arabidopsis*, este promotor regula la expresión del gen de simportador de sacarosa-H⁺ AtSUC2 específico de célula compañera de floema en la red venosa completa de hojas completamente desarrolladas (Imlau *et al.*, Plant Cell 11: 309-322, 1999). Imlau *et al.* también descubrió que un fragmento de 939 nt 3' de este promotor es suficiente para conducir la expresión de alto nivel, específica del floema, de un gen indicador.

2. El gen de *Arabidopsis* At5g57350 codifica una H⁺-ATPasa 3 de membrana plasmática (bomba de protones) y se expresa en el floema en toda la planta (DeWit *et al.*, Plant J. 1, 121-128, 1991). El fragmento promotor de 2.467 kb de esta ORF fue suficiente para conducir la expresión génica en células compañeras del floema presentes en

hojas, tallos y raíces (Hong Yu *et al.*, Chinese Science Bulletin, 52: 1949-1956, 2007).

3. Gen de Sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis* (At5g20830). Una región promotora de 2 kb de esta ORF fusionada con un gen indicador dirige su expresión en el floema de hojas maduras (Bieniawska *et al.*, The Plant Journal 49, 810-828, 2007). El extremo 5' del ARNm comienza con ATCTTA (Martin *et al.*, Plant J 4: 367-377, 1993) que está muy cerca de la secuencia 5' terminal de LR-2 que hace a este promotor un candidato muy atractivo para la mejora de la infecciosidad de LR2-Vitis en la vid.

Las secuencias de nucleótidos de los promotores de la vid localizados cadena arriba de las ORF de la vid que codifican ortólogos aparentes de los genes de *Arabidopsis* Atlg22710, At5g57350 y At5g57350 se muestran en SEC ID N°: 8-10 (respectivamente), junto con identificadores de base de datos que proporcionan sus posiciones respectivas en el genoma de *V. vitis*.

Caracterización de los efectos de proteasas líder en replicación

Generación de replicones de GLRaV-2 marcados por inserción de los indicadores fluorescentes, enzimáticos y epítópicos

Se generaron clones para GLRaV-2 para determinar perfiles funcionales de L1 y L2. Se secuenció el genoma de GLRaV-2 de 16.486 nt de longitud, completo (GenBank número de referencia FJ436234; el gen ID es: gi:213958313) y se comparó con los otros aislados de este virus para revelar la relación más estrecha (identidad de nt del 99,6 %) con el aislado 94/970 (Meng *et al.*, Virus Genes 31, 31-41, 2005). El clon de longitud completa inicial se ensambló usando un vector binario y principalmente clonación de ADNc convencional para evitar la introducción de las mutaciones generadas por PCR, y se secuenció para confirmar su correspondencia con la secuencia de nucleótidos consenso del genoma viral. Para facilitar la introducción de la infección viral por agroinoculación, se insertaron promotor de ARN polimerasa 35S del virus del mosaico de la Coliflor (CaMV) y una secuencia de ribozima cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de GLRaV-2, respectivamente.

El clon de GLRaV-2 de longitud completa resultante se modificó adicionalmente para acomodar un casete de expresión de gen indicador inmediatamente cadena arriba de la fase abierta de lectura de CP. Este casete contenía la fase abierta de lectura de GFP seguida del promotor de ARN sub-genómico de BYV CP. Como resultado, éste último promotor dirigió la expresión del GLRaV-2 CP, mientras que el auténtico promotor de GLRaV-2 CP expresó el indicador de GFP. Este replicón de GLRaV-2 de longitud completa marcado se designó LR-GFP (Fig. 10A, diagrama medio).

La delección de los genes que no se requieren para la amplificación de ARN viral en las células individuales facilita la experimentación con los genes restantes que codifican la proteasa líder, ARN replicasa y supresor de ARNi. En el caso de GLRaV-2, dicho minirreplicón se generó por delección de la región de genoma que abarca el bloque génico de las fases abiertas de lectura de p6 a p19 y la retención del gen indicador. El casete de expresión indicador se modificó adicionalmente para expresar una fusión de GFP con b-glucuronidasa para dar como resultado el minirreplicón GLRaV-2 marcado designado mLR-GFP/GUS (Fig. 10A, diagrama inferior).

Para permitir la detección inmunoquímica de L2_{HA} usando anticuerpo monoclonal específico de HA comercial, se modificaron tanto LR-GFP como mLR-GFP/GUS por una inserción del marcador de epítipo de hemaglutinina (HA) triple en el dominio N-terminal de L2 (Fig. 10B y 11A). Se ensayó la infecciosidad de las variantes de longitud completa y minirreplicón usando agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*, un hospedador experimental sistémico de GLRaV-2 (Goszczynski *et al.*, Vitis 35, 133-133, 1996). Para mLR-GFP/GUS, dicha agroinfiltración dio como resultado la acumulación de ARN de minirreplicón y expresión eficaz del indicador de GFP/GUS fluorescente y enzimáticamente activo en las células inoculadas inicialmente (Fig. 10B). Resulta importante que el nivel de la actividad GUS en una variante marcada con HA fue de ~85 % de la del mLR-GFP/GUS original. Debido a que esta reducción modesta era solo marginalmente estadísticamente significativa (*p* valor ~0,001), se concluyó que la inserción de marcador HA en L2 no afectaba significativamente a la amplificación del genoma viral. Los intentos de insertar un marcador HA en L1 dio como resultado replicones no infecciosos y se abandonaron.

Tanto el original como las variantes marcadas con HA del LR-GFP de longitud completa eran sistémicamente infecciosos en *N. benthamiana*; se detectaron síntomas típicos de la infección viral y fluorescencia de GFP en las hojas no inoculadas superiores a las 3 semanas después de la agroinfiltración de las hojas inferiores (Fig. 10A). Por lo tanto, se generó una serie de los replicones de GLRaV-2 marcados infecciosos que podían introducirse en *N. benthamiana* y usarse para abordar las funciones de L1 y L2 en el ciclo de infección viral.

Análisis de mutación de las funciones de L1 y L2 en el procesamiento de proteínas y acumulación de ARN en las células inoculadas inicialmente de *N. benthamiana*

Para abordar las funciones de L1 y L2, se introdujeron siete mutaciones puntuales y delecciones en la región codificante correspondiente (Fig. 10B). En particular, para determinar los requisitos para el autoprosesamiento en los extremos C respectivos de L1 y L2, se reemplazaron los restos de cisteína catalíticos predichos de cada proteasa (Cys₄₉₃ y Cys₇₆₇) por restos de alanina para dar como resultado variantes de M1 y M2, respectivamente (Fig. 10B).

Se investigó la competencia de procesamiento de cada variante usando traducción *in vitro* del ARNm recubierto en el extremo que abarca la región no traducida 5' terminal, la fase abierta de lectura L1-L2 completa y una región cadena abajo corta que codifica una parte del dominio de metiltransferasa (Fig. 10B). Los productos de traducción resultantes se analizaron usando inmunotransferencia y anticuerpo específico de HA (Fig. 11A), o marcaje con ³⁵S-metionina (Fig. 11B). Como se esperaba, una variante no mutante marcada produjo banda positiva para HA individual correspondiente al L2 marcado con HA, completamente procesado (Fig. 10B y Fig. 11A, carril L2_{HA}) y, además, L1 completamente procesado, marcado con isótopo (Fig. 10B y Fig. 11B, carril L2_{HA}).

En cambio, la traducción de la variante de M1 dio como resultado la acumulación de un único producto principal correspondiente a una fusión L1-L2 (Fig. 1B; Fig. 2A y 2B, carriles M1). De forma análoga, el reemplazo mutacional de la cisteína catalítica predicha en L2 dio como resultado una falta de autoproteólisis de L2, pero no afectó a la liberación autocatalítica de L1 (Fig. 10B; Fig. 11A y 11B, carriles M2). Debido a que la mutación de los restos de sitio activos predichos sí inactivó la autoproteólisis por cada proteasa líder, se concluyó que L1 y L2 son de hecho las proteasas de tipo papáina, catalíticamente activas.

Para determinar si el procesamiento por L1 y L2 se requería para amplificación de ARN viral, se usaron las variantes M1 y M2 de mLR-GFP/GUS para agroinfiltrar hojas de *N. benthamiana* y para determinar la actividad GUS resultante. Como se ha mostrado previamente para el minirreplicón de BYV, la actividad GUS proporciona un marcador sustituido fiable para medir la acumulación de los ARN virales en las células infectadas (Penga y Dolja, J Virol. 74, 9766-9770, 2000). Usando este marcador, se descubrió que, inesperadamente, la inactivación de la escisión de L1 dio como resultado expresión de GUS más eficaz; se detectó un aumento de casi 2 veces en la actividad GUS en tres experimentos independientes (Fig. 10B). Por el contrario, la inactivación de la escisión de L2 prácticamente anuló la infecciosidad del minirreplicón: el nivel de expresión de GUS correspondiente fue menor del 0,5 % el del mLR-GFP/GUS parental (Fig. 10B). Este resultado está de acuerdo con el requisito estricto de la escisión por L-Pro para infecciosidad del minirreplicón BYV (Peremyslov *et al.*, J. Virol. 72, 5870-5876, 1998); de hecho la fusión de L-Pro o L2 con la replicasa probablemente interfiera con la síntesis de los ARN virales.

Para determinar los papeles individuales de L1 y L2 en la acumulación de ARN, se generaron los mutantes en los que las regiones codificantes de L1, L2, o ambas, estaban suprimidas. Resulta interesante que el mutante nulo para L1 DL1 tenía capacidad de replicación, aunque un nivel correspondiente de actividad GUS era aproximadamente 5 veces menor que la de la variante de mLR-GFP/GUS parental (Fig. 10B). Inesperadamente, la delección de L2 en la variante de DL2 dio como resultado un ligero aumento de la expresión de GUS lo que sugiere que L2 no es esencial para la acumulación de minirreplicón en las células de *N. benthamiana* aisladas (Fig. 10B). Sin embargo, la delección simultánea de L1 y L2 produjo el minirreplicón de DL1/2 que expresó solamente ~1 % de la actividad GUS observada en una variante de mLR-GFP/GUS parental (Fig. 10B). Tomados juntos, estos resultados indicaron que aunque el papel de L1 en la amplificación de ARN viral es más prominente que la de L3, esta última proteasa puede rescatar la acumulación de ARN del mutante deficiente L1, y por lo tanto L1 y L2 tienen funciones parcialmente solapantes en este proceso.

Tanto L1 y L2 poseen los dominios proteasa de tipo papáina C terminales (Pro1 y 2, respectivamente) y los dominios N terminales (NTD1 y NTD2, respectivamente; Fig. 10B). Para determinar las contribuciones relativas de NTD1 y Pro1 en la función de L1, se generaron variantes de DNTD1 y DPro1 en las que esos dominios estaban suprimidos (Fig. 10B). La primera de estas variantes de minirreplicón mostró una reducción de 3 veces en la acumulación de GUS, mientras que la última produjo aún más GUS que en la variante parental (Fig. 10B). Estos datos indicaron que el dominio no proteolítico más que el proteasa de L1 proporcionaba una contribución importante a la acumulación de ARN viral en células de *N. benthamiana*. Debería enfatizarse que el requisito observado para NTD 1 para acumulación de ARN óptima puede reflejar un papel de un dominio proteico, o de una región codificante correspondiente al nivel de ARN, o ambas.

Papeles de L1 y L2 en la infecciosidad del virión y propagación sistémica de GLRaV-2 en *N. benthamiana*

Para definir las funciones potenciales de L1 y L2 en el movimiento de célula-a-célula viral y transporte a larga distancia, se introdujeron las delecciones de DL1 y DL2 en el fondo de la variante de LR-GFP de longitud completa. Después de la agroinfiltración, se aislaron viriones de las hojas inoculadas y se usaron las suspensiones de virión de las concentraciones iguales para inocular manualmente hojas de *N. benthamiana* y para caracterizar los focos de infección resultantes usando fluorescencia de GFP a los 8 días después de la inoculación. Para la variante de LR-GFP parental, la inoculación produjo $9,9 \pm 5,6$ focos de infección por hoja con el diámetro medio de $4,3 \pm 1,4$ células. Se obtuvieron resultados muy similares ($8,2 \pm 4,8$ focos por hoja; diámetro medio de $4,1 \pm 1,3$ células) para la variante de LR-GFPDL2 lo que indica que L2 es prescindible tanto para la infecciosidad como para el movimiento de célula-a-célula del GLRaV-2 en *N. benthamiana*. Sorprendentemente, la delección de L1 dio como resultado una reducción de 25 veces, drástica, en la infecciosidad específica de la variante de LR-GFPDL1 (0,4 células por hoja). Además, los muy pocos focos positivos para GFP detectados fueron unicelulares lo que sugiere que L1 o la región codificante correspondiente es esencial para la capacidad del virión para establecer infección en las células inoculadas inicialmente y moverse a las células cercanas.

Para determinar si L1 y L2 están implicados en el transporte sistémico de GLRaV-2, se ensayaron seis variantes competentes para replicación en un contexto del LR-GFP de longitud completa introducido en plantas de *N. benthamiana* usando agroinfiltración. Las plantas inoculadas se exploraron con respecto a síntoma, GFP y expresión de CP a las 3, 4 y 5 semanas después de la inoculación. Resulta interesante que la mayoría o todas las plantas inoculadas con variantes M1 y DL2 se infectaron sistémicamente lo que indica que ni L2 ni la escisión entre L1 y L2 son necesarios para el transporte a la distancia del virus en *N. benthamiana* (Fig. 10B y Fig. 12A). Se encontró competencia similar para la proliferación sistémica en el caso de mutante de DPro1. Sin embargo, la delección del dominio L1 o su N terminal dio como resultado la pérdida completa de la capacidad del replicón para establecer infección sistémica (Fig. 10B y 12A).

La observación de las hojas infectadas de forma sistémica reveló aparentes diferencias en la acumulación de GFP entre las variantes experimentales (Fig. 10A). Para evaluar adicionalmente estas diferencias, se evaluó la acumulación de GLRaV-2 CP en las hojas superiores no inoculadas. Visiblemente, se descubrió que solamente el mutante de DPro1 se acumulaba hasta los niveles comparables a los de la variante parental (Fig. 12B). Las dos variantes mutantes restantes, M1, y especialmente DL2, se acumularon cada una hasta niveles significativamente más bajos que los de la variante de LR-GFP tanto a las 3 como a las 4 semanas después de la inoculación (Fig. 3B). Colectivamente, estos resultados demostraron que el L2 por sí solo y la escisión entre L1 y L2 eran necesarios para la propagación sistémica óptima de GLRaV-2 en *N. benthamiana*. Además, L1 y su dominio no proteolítico N terminal o las regiones codificantes correspondientes son esenciales para la capacidad de GLRaV-2 para establecer infección sistémica dado que ni GFP ni CP viral eran detectables en las hojas superiores de las plantas inoculadas con las variantes de DNTD1 o DL1 incluso a las cinco semanas después de la inoculación (Fig. 12C y 12D).

En BYV, tanto p20 como L-Pro están implicados en la proliferación sistémica viral (Peng *et al.*, J. Virol. 77, 2843-2849, 2003; Prokhnevsky *et al.*, J. Virol. 76, 11003-11011, 2002). De éstos, p20 es un componente integral de la cola del virión (Peremyslov *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101, 5030-5035, 2004), mientras que no se sabe si L-Pro está presente en los viriones debido a la no disponibilidad del anticuerpo específico de L-Pro. Debido a que se generaron variantes marcadas con HA, funcionales, de L2, se usó para determinar si esta proteasa está asociada con los viriones. Los viriones de GLFRaV-2 se aislaron de hojas infectadas de forma sistémica y se fraccionaron usando gradiente de densidad de sacarosa. El pico de los viriones se detectó en las fracciones 12-14 usando anticuerpo específico para CP (Fig. 13). Sin embargo, el análisis de inmunotransferencia de las fracciones del mismo gradiente usando anticuerpos específicos de HA mostró el pico de L2 en las fracciones 15-17, lo que sugiere que L2 presente en la suspensión de virión no se asocia físicamente con los viriones (Fig. 13). Esta conclusión se vio apoyada adicionalmente por la microscopía electrónica específica de inmuno-oro usada para detectar epítopos de HA presentes en L2. De hecho, solamente se encontró marcaje de oro muy débil en las fracciones 12-14 que contenían el volumen de los viriones. Además, algunas microesferas de oro detectadas en estas fracciones no estaban asociadas directamente con los viriones (Fig. 13, inserto superior). Las fracciones máximas de L2 15-17 contenían números mucho mayores de microesferas de oro, pero prácticamente ningún virión (Fig. 13, inserto inferior), lo que sugiere que L2 no está asociado directamente con viriones GLRaV-2.

L1 y L2 son críticos para la infección de minirreplicón de la *V. vinifera*

Se acepta en general que *N. benthamiana* es, quizás, el hospedador más promiscuo para una gran diversidad de virus vegetales. Para determinar si los papeles aparentemente no esenciales y principalmente redundantes desempeñados por L1 y L2 en la infección de GLRaV-2 en este hospedador experimental reflejan fielmente sus papeles en una infección de vid, se agroinfiltraron cuatro variantes de minirreplicón en hojas de *V. vinifera* (Gamacha) (Tabla 1). A los 8 días después de inoculación con la variante de mLR-GFP/GUS parental, se observaron ~300 focos de infección fluorescentes para GFP, unicelulares, por hoja. Sorprendentemente, la infiltración usando variantes de DL1 y DL2 dio como resultado una reducción de ~100 veces y ~7 veces en los números de focos, respectivamente, lo que indica que cada una de las proteasas líder se requiere para la capacidad del minirreplicón para establecer infección en células de vid (Tabla 1). Sin embargo, de forma similar a lo observado en *N. benthamiana*, la infecciosidad de la variante M1 no fue significativamente diferente de la de la variante parental.

Notablemente, las mediciones de la actividad GUS en las hojas infiltradas se correlacionó bien con los datos sobre los números de las células infectadas (Tabla 1) lo que sugiere que la función principal de las proteasas líder es ayudar al establecimiento de infección viral en lugar de aumentar la acumulación de ARN viral en las células infectadas. Debido a que los efectos de la delección de L1 y L2 en *V. vinifera* fueron muchos más drásticos en comparación con los de *N. benthamiana*, se concluyó que cada proteasa proporciona una contribución significativa y específica en infección de GLRaV-2 en su planta hospedadora natural.

Tabla 1. Infecciosidad y expresión de GUS por variantes de minirreplicón mLR-GFP/GUS en *V. vinifera*

Experimento	Variante	Número medio de los focos de infección (% de los de la variante parental)	Actividad GUS media (% del nivel en la variante parental)
1	mLR-GFP/GUS	100,00	100,00

1	Δ L1	1,03	4,16
1	Δ L2	14,96	10,03
1	M1	104,44	103,11
1	mLR-GFP/GUS	100,00	100,00
2	Δ L1	1,58	2,93
2	Δ L2	10,44	10,87
2	M1	133,43	118,08

Análisis

5 Sin quedar ligado a ninguna teoría particular, se proporciona el siguiente análisis. La presente divulgación permitió la delimitación de tres funciones principales de L1 y L2 en el ciclo de infección de GLRaV-2: i) procesamiento de poliproteínas; ii) acumulación de virus en las células infectadas inicialmente; y iii) transporte sistémico de la infección.

10 En particular, se descubrió que tanto L1 como L2 son proteasas activas con las cisteínas catalíticas conservadas (Figs. 10B y 11). La escisión cadena arriba del dominio metiltransferasa de la poliproteína de ARN replicasa viral es esencial para la viabilidad de GLRaV-2 (Fig. 10B). Sorprendentemente, aunque L1 sí escinde en su propio extremo C terminal tanto *in vitro* (Fig. 11) como *in vivo* (Fig. 13), ni esta escisión ni el dominio proteasa de L1 en sí mismo son esenciales para la infección sistémica en *N. benthamiana* como resulta evidente a partir de los fenotipos de las variantes M1 y DPro1 (Fig. 10B y 12). Sin embargo, la acumulación de virus más lento en las hojas no inoculadas en estos mutantes (Fig. 12A y 12B) sugiere que se requiere la escisión mediada por L1 para el desarrollo óptimo de infección sistémica.

20 El análisis de delección indicó que L1 y L2 desempeñan papeles parcialmente solapantes en la acumulación de ARN viral en las células inoculadas inicialmente. Cuando se introdujo minirreplicón viral por agroinfiltración, la delección completa de L1 dio como resultado una reducción de ~5 veces de la acumulación y expresión de ARN. Se observó un efecto similar tras la delección del dominio N terminal no proteolítico de L1 lo que indica su papel principal en la función de L1 (Fig. 10B). Aunque la delección de L2 no afectó a la acumulación de ARN, la delección combinada de L1 y L2 dio como resultado un minirreplicón prácticamente no viable lo que indica que L2 proporcionó una contribución significativa a la infecciosidad viral en ausencia de L1.

25 Resulta interesante que, cuando se usaron viriones aislados que contenían genoma de longitud completa para inoculación vegetal, la infecciosidad y el movimiento de célula a célula de la variante DL2 eran indistinguibles de los de la variante parental, mientras que los viriones de la variante DL1 han perdido su infecciosidad. La delección de L1 pero no la región codificante de L2 podría afectar a la estructura, estabilidad e infecciosidad del virión. Por lo tanto, es posible que además de la función de L1 en la acumulación de ARN revelada por la agroinoculación con minirreplicón, la región codificante correspondiente también actúe al nivel de ARN para facilitar la formación de los viriones con cola con capacidad de transporte local y sistémico.

35 De acuerdo con esta última suposición, los mutantes DL1 y DNTD1 fueron incapaces de establecer una infección sistémica tras la agroinfiltración usando replicones de longitud completa (Fig. 12C). Por el contrario, la delección del dominio proteasa en la variante DPro1 no afectó a la infecciosidad sistémica lo que indica que la formación de la cola del virión probablemente no se vio afectada. La delección de L2 dio como resultado una variante DL2 sistémicamente infecciosa que, sin embargo, mostró una acumulación mucho más lenta en las hojas superiores (Fig. 11A y 11B). Este resultado indicó que se requiere L2 para la proliferación sistémica eficaz de GLRaV-2 en *N. benthamiana*.

40 Quizás los resultados más significativos de este estudio se obtuvieron cuando las variantes de minirreplicón se agroinocularon en las hojas del hospedador natural de GLRaV-2, la vid. En claro contraste con un hospedador experimental permisivo *N. benthamiana* en el que L2 era superfluo para la infecciosidad por minirreplicón, la variante DL2 mostró una reducción de ~10 veces en la acumulación de ARN tras agroinfiltración en hojas de *V. vinifera* (Tabla 1). La infecciosidad específica de la variante DL2 medida como un número medio de las células infectadas con fluorescencia de GFP por hoja también se redujo ~10 veces. Esta correlación en la acumulación del ARN del minirreplicón y los números de las células infectadas claramente apunta al papel crítico de L2 en la invasividad del virus, es decir, la capacidad para establecer infección en las células inoculadas. Un papel en la invasividad de GLRaV-2 en la vid es aún más drástico en el caso de L1. De hecho, la delección de L1 dio como resultado una reducción de ~100 veces en la acumulación de ARN e infecciosidad específica de la variante DL1 (Tabla 1). Se concluyó que tanto L1 como L2 son esenciales para la infección por GLRaV-2 de la vid.

55 ¿Cuál es una significación funcional específica de la duplicación y diversificación de las proteasas líder en GLRaV-2? Parece que la respuesta, al menos en parte, yace en los efectos específicos de hospedador de L1 y L2 cuya cooperación funcional se requiere para la infección de la vid pero no de *N. benthamiana*. En otras palabras, podría haber evolucionado un tándem de proteasas virales para reforzar la función de una única proteasa para trastornar a

un hospedador leñoso perenne potencialmente resistente a infección por virus. Esta hipótesis es compatible con el hecho de que además de GLRaV-2, se encuentra duplicación de proteasa en CTV (Karasev *et al.*, Virology 208, 511-520, 1995), virus del moteado de la frambuesa (Tzanetakis *et al.*, Virus Res. 127, 26-33, 2007), y virus de manchas cloróticas de la fresa (Tzanetakis & Martin, Virus Res. 124, 88-94, 2007), cada uno de los cuales infecta hospedadores leñosos y/o perennes, pero no en BYV, virus de la menta 1 (Tzanetakis *et al.*, Virus Res. 127, 26-33, 2007), o virus de las manchas amarillas del clavel que infectan hospedadores anuales herbáceos.

¿Cuál es el posible mecanismo por el que L1 y L2 facilitan la infección por GLRaV-2? El hecho de que cada una de estas proteasas líderes actúe de una manera específica de hospedador para reforzar la infecciosidad viral sugiere que L1 y L2 podrían estar implicados en la supresión de la respuesta de defensa antiviral. Una posibilidad es que L1 y L2 estén implicados en la supresión de la interferencia de ARN (ARNi) bien de forma independiente de o en comparación con el supresor de ARNi p24 (Fig. 1A) Chiba *et al.*, Virology 346: 7-14, 2006). Sin embargo, los intentos de identificar efectos de GLRaV-2 L1 y L2 o BYV L-Pro en la respuesta de ARNi en varios sistemas modelo invariablemente han fracasado. Además, se descubrió que la coexpresión ectópica de L-Pro con el indicador reducía la acumulación de este último, lo que sugiere la posible implicación de las proteasas líder en la regulación génica al nivel de ARN o proteico.

Por analogía con las proteasas de tipo papaína de coronavirus (Lindner, Virology 362, 245-256, 2007), se puede plantear la hipótesis de que las proteasas closterovirales actúan como enzimas de desubiquitinación (DUB) por lo que afectan a la regulación de la defensa de la planta. El único hecho que está en desacuerdo con la hipótesis de DUB es que la inactivación de la actividad proteolítica de L1 en la variante M1 tiene poco efecto en la infección viral. Esta aparente discrepancia puede explicarse si la unión mediada por L1 en lugar de la escisión de las proteínas relacionadas con la defensa del hospedador es suficiente para ejercer la función de L1.

La generación del tamaño completo y minirreplicones de GLRaV-2 marcados mediante inserción de los genes indicadores o epítomos destaca un potencial de este virus como un vector de expresión génica para la vid. En general, los vectores derivados de closterovirus proporcionan fuertes ventajas de capacidad y estabilidad genética relativamente grandes (Dolja *et al.*, Virus Res. 117: 38-51, 2006; Folimonov *et al.*, Virology 368(1): 205-216, 2007). La utilidad de los vectores closterovirales se potencia además por un aumento drástico de la infecciosidad del vector por coexpresión de los supresores de ARNi homólogos de los que p24 de GLRaV-2 parece ser el más fuerte (Chiba *et al.*, Virology 346: 7-14, 2006). La realización completa del potencial del vector GLRaV-2 requiere el desarrollo de la técnica de inoculación eficaz para la vid.

Materiales y métodos

Generación del clon de ADNc de longitud completa, marcado con GFP, de GLRaV-2

El aislado de GLRaV-2 obtenido de un viñedo de Oregón local se propagó en plantas de *N. benthamiana* como se ha descrito anteriormente (Goszczyński *et al.*, Vitis 35, 133-133, 1996). Se aislaron viriones (Napuli *et al.*, Virology 274(1), 232-239, 2000) y el ARN viral se obtuvo usando reactivo de TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una estrategia para secuenciación de nucleótidos del genoma viral y la generación del intermedio y clones de ADNc viral de longitud completa fue como se ha descrito para BYV (Peremyslov y Dolja, Curr. Protocols Microbiol. (Sup. 7), 16F.1.1-16F.1.26, 2007). La secuencia resultante de ARN de GLRaV-2 se depositó en GenBank (Nº de Referencia FJ436234). Las secuencias de los numerosos cebadores usados en procedimientos de clonación están disponibles bajo demanda.

Brevemente, se ensambló un clon de ADNc de longitud completa de GLRaV-2 usando el mini-vector binario pCB301 (Xiang *et al.*, Plant Mol. Biol. 40: 711-717, 1999), mientras que la clonación de ADNc se realizó usando transcripción inversa y síntesis convencional de un ADNc bicatenario (bc) o amplificación por PCR. Se añadió terminador de NOS al pCB301 usando sitios únicos *Sac* I y *Kpn* I y se insertó un polienlazador que contenía los sitios de restricción *Sac* I, *Bam* HI, *Aat* I, *Bbv* I, *Rsr* II, *Bst* EI y *Sma* I entre el sitio *Sac* I y el terminador NOS para producir pCB301-NOS-PL. Para añadir un promotor de ARN polimerasa de 35S de CaMV fusionado con el fragmento 5' del ADNc viral (nt 1-2.034), se usó una técnica de corte y empalme de ADN mediada por PCR. Se realizaron PCR separadas para amplificar el promotor de 35S y el extremo 5' de ADNc de GLRaV2 y para generar productos con extremos solapantes. Estos productos se combinaron y se usaron como moldes para otro ciclo de PCR usando los cebadores complementarios de los extremos 5' y 3' del producto de longitud completa. Este último producto se clonó en pCB301-NOS-PL usando *Sac* I (añadido al extremo 5' del promotor 35S) y *Bnm* HI (nt 2034) para producir un p35S5'LR.

Para añadir una ribozima en el extremo 3' del ADNc viral, se usó con megacebador con una parte específica de virus complementaria del extremo 3' del ADNc viral seguido de una secuencia de ribozima diseñada como se ha descrito (Prokhnevsky *et al.*, J. Virol. 76, 11003-11011, 2002) y un sitio *Sma* I en combinación con un cebador regular para amplificar la región 3' terminal del ADNc de GLRaV-2 (nt 14.842-16.486). Se clonó el producto de PCR resultante en p35S5'LR usando los sitios de restricción *Bst* EI (nt 14.842) y *Sma* I (añadido al extremo 3' del megacebador) para producir un p35S5'3'LR-Rib.

Para clonar la región interna de ADNc viral (nt 2.029-10.827), se obtuvieron tres fragmentos parcialmente solapantes de ADNc bc usando clonación de ADNc convencional y el protocolo de Gibco-BRL para transcriptasa inversa SuperScript II. Estos fragmentos se insertaron en p35S5'3'LR-Rib usando los sitios de restricción *Bam* HI (nt 2.029), *Aaf* II (nt 3.394), *Bbv* CI (nt 6.281) y *Rsr* II (nt 10.821) para generar p35S-5'BR3'LR-Rib. La parte restante del ADNc viral (nt 10.821-14.848) se amplificó por PCR y se clonó en un vector intermedio pGEM-3Zf(+) (Promega). Se insertó una secuencia de nucleótidos codificante de una GFP dirigida a retículo endoplásmico (Haseloff *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 94(6), 2122-2127, 1997) seguido de un promotor de BYV CP cadena arriba del extremo 5' de ORF de GLRaV-2 CP. El fragmento de ADNc resultante se clonó en p35S5'-BR-3'LR-Rib usando sitios *Rsr* II (nt 10.821) y *Bst* EII (nt 14.842) para generar el clon de ADNc de GLRaV-2 de longitud completa p35S-LR-GFP o LR-GFP para mayor brevedad.

Generación de las variantes de GLRaV-2 modificadas y mutantes

Se obtuvo por ingeniería genética la variante de minirreplicón mLR-GFP/GUS modificando el ADNc LR-GFP mediante delección de los fragmentos de ADNc del codón de inicio de la ORF p6 (Fig. 1A) al nt 14.185 y del sitio *Fse* I en el extremo 3' de la ORF de GFP al nt 15.285 (los números de nt corresponden al ADNc de GLRaV-2 original). Como resultado, se suprimieron las ORF de GLRaV-2 que codificaban p6, Hsp70h, p63, CPm, CP y p19 (Fig. 1A). La ORF de GFP se reemplazó después con una ORF híbrida de GFP/GUS descrita anteriormente (Peng *et al.*, Virology 294, 75-84, 2002) usando *Pac* I en el extremo 5' de la ORF de GFP y *Fse* I en el extremo 3' de la ORF de GUS.

Se generaron dos plásmidos, pGEM-35SLR-Pro y pGEM-SP6LR-Pro, que contenían la región codificante de L1 y L2 completa y un fragmento de la región codificante de metiltransferasa (nt 1-3.071) clonando los fragmentos amplificados por PCR correspondientes (Fig. 1B) en pGEM-3Zf(+). Tanto pGEM-35SLR-Pro como pGEM-SP6LR-Pro se usaron para generar pGEM-35SLR-L2_{HA} y pGEM-SP635SLR-L2_{HA} insertando tres copias de la secuencia codificante de marcador de epítipo de hemaglutinina (HA) (YPY-DVPDYA; SEC ID N°: 11) cadena abajo del codón 663 dentro de la región codificante de L2. Cada uno de estos plásmidos se usó para introducir las siguientes mutaciones en el L1 o L2.

La mutación 1 (M1) se generó reemplazando el resto de Cys₄₉₃ catalítico de L1 con Ala usando mutagénesis dirigida. De forma análoga, la mutación 2 (M2) se obtuvo mediante sustitución con Ala de Cys₇₆₇ de L2. En la mutación de DL2, la reacción codificante de L2 completa se suprimió y se reemplazó el resto Lys₈₄₈ cadena debajo del enlace escindible de L2 con Gly para regenerar un auténtico sitio de escisión de L1. Se realizó una mutación de DL1 suprimiendo la región codificante de L1 completa excepto por el codón de inicio 5' terminal. En la mutación DNTD1, se suprimió la región no proteolítica, N terminal completa de L1, de nuevo excepto por el codón de inicio. En la mutación DPro1, se suprimió el dominio proteinasa C terminal de L1 mientras que la región N terminal de L1 se fusionó con la región N terminal de L2. En la última mutación DL1/2, tanto L1 como L2 se suprimieron excepto por el codón de inicio que se fusionó con el primer codón de Lys de la replicasa de GLRaV-2, dando como resultado la formación de una replicasa que difería de la replicasa de tipo silvestre, procesada proteolíticamente solamente por la presencia de la Met N terminal. Los diagramas de todas las mutaciones se muestran en la Fig. 1B.

Las variantes de pGEM-SP6LR-L2_{HA} se usaron para analizar la actividad proteolítica de las proteasas mutadas *in vitro*. Los fragmentos de ADN de los derivados mutantes de pGEM-35SLR-L3_{HA} se clonaron en mLR-GFP/GUS usando sitios *Sbf* I (localizado en la parte de vector del plásmido) y *Stu* I (nt 3.063). Los fragmentos de ADN de derivados mutantes de p35S-miniV94-GFP/GUS también se clonaron en el clon de ADNc de longitud completa LR-GFP usando *Sfi* I (localizado en la parte de vector del plásmido) y *Bbv* CI (nt 6.282).

Análisis de mutación de la actividad proteolítica de L1 y L2

Las variantes de pGEM-SP6LR-L2_{HA} se linealizaron usando *Sma* I y los transcritos de ARN *in vitro* correspondientes se generaron usando el kit mMessage Machine (Ambion). Para ensayar la actividad proteolítica de las proteasas líder, los transcritos de ARN con extremo recubierto resultantes se tradujeron usando los extractos de germen de trigo (Promega) y [³⁵S]-Met (Amersham/Pharmacia Biotech) o una mezcla de aminoácidos no marcados. Después de 1 h de incubación a 25 °C, los productos se separaron por PAGE, se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa PROTRAN y se usaron para autorradiografía o para inmunotransferencia usando anticuerpo monoclonal de rata anti-HA (Roche) como primer anticuerpo y anti-peroxidasa de rata de cabra como anticuerpo secundario.

Análisis de mutación de los papeles de L1 y L2 en la acumulación de ARN

Se transformó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 GV2260 por cada una de las variantes de mLR-GFP/GUS por electroporación. Los cultivos correspondientes se dejaron crecer durante una noche a 28 °C con agitación, se centrifugaron y se resuspendieron en un tampón que contenía MES-KOH 10 mM (pH 5.85), MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 150 mM. Se mezclaron suspensiones bacterianas de cada variante con cultivos correspondientes transformados para expresar un supresor de ARNi P1/HC-Pro de virus del mosaico del nabo para potenciar la infecciosidad del minirreplicón (Chiba *et al.*, Virology 346: 7-14, 2006). Las concentraciones bacterianas finales

fueron DO₆₀₀ 1,0 para variantes que expresan minirreplicón y DO₆₀₀ 0,1 para la variante que expresa P1/HC-Pro. Los cultivos bacterianos inducidos se infiltraron en la superficie inferior de las hojas de *N. benthamiana* usando una jeringa sin una aguja o se infiltraron por vacío en las hojas de la vid. Las células de hojas fluorescentes por GFP se visualizaron usando el estereomicroscopio epifluorescente Leica MZ 16F (Deerfield, IL) a los 8 días después de la infiltración. Se prepararon muestras para ensayos de GUS y se midió la actividad de GUS usando un fluorímetro de ADN Hoefer TKO100 (Hoefer Scientific Instruments) como se ha descrito previamente (Dolja *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10208-10212, 1992).

Análisis de transporte de virus local y sistémico

Para ensayar el movimiento de célula a célula de las variantes de virus marcadas con GFP, se aislaron viriones de las hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* a las 2 semanas después de la inoculación (Napuli *et al.*, Virology 274(1), 232-239, 2000), se resuspendieron en un tampón que contenía fosfato sódico 20 mM (pH 7,4) y Na₂-EDTA 1 mM y se inocularon manualmente a hojas de *N. benthamiana*. Los focos de infección fluorescentes se analizaron usando el estereomicroscopio epifluorescente a los 8 días después de la inoculación.

Para investigar la proliferación sistémica en *N. benthamiana*, se movilizaron plásmidos que portaban las variantes correspondientes en un contexto de LR-GFP en *A. tumefaciens*, se mezclaron las suspensiones bacterianas resultantes con las modificadas por ingeniería genética para expresar P1/HC-Pro como se ha descrito anteriormente, y se infiltraron en hojas de plantas *N. benthamiana* jóvenes (estadio de 6-8 hojas). Después de 3, 4 o 5 semanas, las hojas superiores de estas plantas se exploraron con respecto al desarrollo de síntomas, mientras que se usó microscopía de epifluorescencia y una cámara de puntos MicroPublisher3.3 RTV (QImaging) para documentar la acumulación de la GFP expresada por virus. Se usaron inmunotransferencia y antisuero específico de GLRaV-2 realizado a medida en una dilución 1:5.000 para documentar la acumulación de CP.

Análisis de viriones

Para determinar si L2 marcado con HA estaba asociado con los viriones, se usó el fraccionamiento de gradiente de sacarosa seguido de inmunotransferencia. Se resuspendieron viriones aislados como se ha descrito anteriormente en un tampón que contenía Na-fosfato 20 mM (pH 7,4) y Na₂-EDTA 1 mM, cargado hasta la parte superior de los gradientes de sacarosa 10-40 % preparados en el mismo tampón, y se centrifugó a 25.000 RPM durante 4 horas en un rotor Beckman SW40 a 4 °C. Los gradientes se separaron en 25 fracciones y el análisis de inmunotransferencia se realizó usando anticuerpo monoclonal de rata anti-HA (Roche) y anticuerpo específico de GLRaV-2 para detectar L2_{HA} y CP, respectivamente. Se realizó la microscopía electrónica específica de inmuno-oro para detectar L2_{HA} esencialmente como se ha descrito (Medina *et al.* Virology 260(1), 173-181, 1999).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> > El Estado de Oregón actuando por y a través del Comité Estatal de Educación Superior en representación de la Universidad del Estado de Oregón Dolja, Valerian M Peremyslov, Valera V

<120> VECTORES Y MÉTODOS DE CLOSTEROVIRUS

<130> 245-79793-03

<150> US 61/063.305

<151> 31-01-2008

<150> US 61/083.504

<151> 24-07-2008

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22166

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector viral obtenido por ingeniería genética

<220>

<221> > misc_feature

<222> (1)..(3305)

	<223> Secuencia de vector binario pCB301
	<220>
5	<221> misc_feature
	<222> (3306)..(21957)
	<223> Casete de expresión viral
	<220>
10	<221 > promotor
	<222> (3306)..(4063)
	<223> Promotor 35S
	<220>
15	<221> misc_feature
	<222> (4064)..(21643)
	<223> Secuencia viral
	<220>
20	<221> misc_feature
	<222> (18648)..(19439)
	<223> Casete de expresión indicador de GFP
	<220>
25	<221 > promotor
	<222> (19440)..(19723)
	<223> promotor BYV CP heterólogo
	<220>
30	<221> misc_feature
	<222> (21644)..(21698)
	<223> ribozima
	<220>
35	<221 > terminador
	<222> (21705)..(21957)
	<223> terminador NOS
	<400> 1

ES 2 478 041 T3

cgctcaccgg gctggttgcc ctgcccgtg ggctggcggc cgtctatggc cctgcaaacg	60
cgccagaaac gccgtcgaag ccgtgtgcga gacaccgcgg ccgccggcgt tgtggatacc	120
tcgcggaaaa cttggccctc actgacagat gaggggcgga cgttgacact tgaggggccg	180
actcaccgg cgcggcgttg acagatgagg ggcaggctcg atttcggccg gcgacgtgga	240
gctggccagc ctgcaaatac ggcgaaaacg cctgatttta cgcgagtttc ccacagatga	300
tgtggacaag cctggggata agtgccctgc ggtattgaca cttgaggggc gcgactactg	360
acagatgagg ggcgcgatcc ttgacacttg aggggcagag tgctgacaga tgaggggcgc	420
acctattgac atttgagggg ctgtccacag gcagaaaatc cagcatttgc aagggtttcc	480
gcccgttttt cggccaccgc taacctgtct tttaacctgc ttttaaacca atatttataa	540
accttgtttt taaccagggc tgcgccctgt gcgcgtgacc gcgcacgccg aaggggggtg	600
cccccccttc tcgaaccctc ccggcccgtc ctcgagttgg cagcatcacc cataattgtg	660
gtttcaaaat cggtccgtc gatactatgt tatacgccaa ctttgaaaac aactttgaaa	720
aagctgtttt ctggtattta aggttttaga atgcaaggaa cagtgaattg gagttcgtct	780
tgttataatt agcttcttgg ggtatcttta aatactgtag aaaagaggaa ggaaataata	840
aatggctaaa atgagaatat caccggaatt gaaaaaactg atcgaaaaat accgctgcgt	900
aaaagatacg gaaggaatgt ctctgctaa ggtatataag ctggtgggag aaaatgaaaa	960
cctatattta aaaatgacgg acagccggtg taaagggacc acctatgatg tggaacggga	1020
aaaggacatg atgctatggc tggaaaggaaa gctgcctgtt ccaaagggtcc tgcactttga	1080
acggcatgat ggctggagca atctgctcat gagtgaggcc gatggcgtcc tttgctcgga	1140
agagtatgaa gatgaacaaa gccctgaaaa gattatcgag ctgtatgcgg agtgcacag	1200
gctctttcac tccatcgaca tatcggattg tccctatacg aatagcttag acagccgctt	1260
agccgaattg gattacttac tgaataacga tctggccgat gtggattgcg aaaactggga	1320
agaagacact ccatttaaag atccgcgcga gctgtatgat tttttaaaga cggaaaagcc	1380
cgaagaggaa cttgtctttt ccacgcgcga cctgggagac agcaacatct ttgtgaaaga	1440
tggaagata agtggtctta ttgatcttgg gagaagcggc agggcggaca agtggtatga	1500
cattgccttc tgcgtccggt cgatcaggga ggatatcggg gaagaacagt atgtcgagct	1560

ES 2 478 041 T3

atatttttgac ttactgggga tcaagcctga ttgggagaaa ataaaatatt atatttttact	1620
ggatgaattg ttttagtacc tagatgtggc gcaacgatgc cggcgacaag caggagcgca	1680
ccgacttctt ccgcatcaag tgttttggct ctcaggccga ggcccacggc aagtatttgg	1740
gcaaggggtc gctggtattc gtgcagggca agattcggaa taccaagtac gagaaggacg	1800
gccagacggt ctacgggacc gacttcattg ccgataaggt ggattatctg gacaccaagg	1860
caccaggcgg gtcaaatcag gaataagggc acattgcccc ggctgagtc ggggcaatcc	1920
cgcaaggagg gtgaatgaat cggacgtttg accggaaggc atacaggcaa gaactgatcg	1980
acgcgggggtt ttccgccgag gatgccgaaa ccacgcgaag ccgcaccgtc atgcgtgcgc	2040
cccgcgaaac cttccagtcc gtcggctcga tgggtccagca agctacggcc aagatcgagc	2100
gcgacagcgt gcaactggct cccctgccc tgcccgccc atcgccccc gtggagcgtt	2160
cgctcgtct cgaacaggag gcggcaggtt tggcgaagtc gatgaccatc gacacgcgag	2220
gaactatgac gaccaagaag cgaaaaaccg ccggcgaggc cctggcaaaa caggtcagcg	2280
aggccaagca ggccgcgttg ctgaaacaca cgaagcagca gatcaaggaa atgcagcttt	2340
ccttgttcga tattgcgccg tggccggaca cgatgcgagc gatgccaaac gacacggccc	2400
gctctgccct gttcaccacg cgcaacaaga aaatcccgcg cgaggcgctg caaaacaagg	2460
tcattttcca cgtcaacaag gacgtgaaga tcacctacac cggcgtcgag ctgcgggccg	2520
acgatgacga actggtgtgg cagcaggtgt tggagtacgc gaagcgcacc cctatcggcg	2580
agccgatcac cttcacgttc tacgagcttt gccaggacct gggctggtcg atcaatggcc	2640
ggtattacac gaaggccgag gaatgcctgt cgcgcctaca ggcgacggcg atgggcttca	2700
cgtccgaccg cgttgggcac ctggaatcgg tgtcgtgct gcaccgcttc cgctcctgg	2760
accgtggcaa gaaaacgtcc cgttgccagg tcctgatcga cgaggaaatc gtcgtgctgt	2820
ttgctggcga ccactacacg aaattcatat gggagaagta ccgcaagctg tcgccgacgg	2880
cccgacggat gttcgactat ttcagctcgc accgggagcc gtacccgctc aagctggaac	2940
ccttccgcct catgtgcgga tcggattcca cccgcgtgaa gaagtggcgc gagcaggtcg	3000
gcgaagcctg cgaagagttg cgaggcagcg gcctggtgga acacgcctgg gtcaatgatg	3060
acctggtgca ttgcaaacgc tagggccttg tggggtcagt tccggctggg ggttcagcca	3120
gcgctttact gagatctcct gtggttgga tgcacataca aatggacgaa cgataaacc	3180
ttttcacgcc cttttaataa tccgattatt ctaataaacg ctcttttctc ttaggtttac	3240
ccgccaatat atcctgtcaa aactgatag tttaaaactga aggcgggaaa cgacaatctg	3300
agctcgcatg cctgcaggtc aacatggtgg agcacgacac gcttgtctac tccaaaaata	3360

ES 2 478 041 T3

tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa agggtaatat	3420
coggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg	3480
aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag	3540
atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cagaggagc atcgtggaaa	3600
aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgataaa tggaggagca	3660
cgacacgctt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat	3720
tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat	3780
ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaata ggaagggtgc tcctacaaat gccatcattg	3840
cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggccca aagatggacc	3900
cccaccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt	3960
ggattgatgt gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca	4020
agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag agcatattct gttggctttc	4080
atctgtgctt gtgcttcggc tcaatcacac tctgaaagt ttagttcccc ggaatttcgg	4140
ttttcttcat aagccttatt cctacaggat gtctagcctt gctatctctg ccttccctg	4200
ttcagtcgct caactgagcg ttggtcagcc tgttgccacg gttgccaggt catttttgat	4260
gacttccctt ccgtcccttc agacttacct atcttcgtct gagttgactt cctttttatt	4320
ttgttttggt gctttccaaa aaataaaaat gtttttatct ttctacggt cgggtgcagc	4380
ctttgcgcct ttttctgaaa ttccacgat tggttcatgc tatgaattca ttcggttggg	4440
agggtgtgct taccctctct ttttctgttc cttccaatgc ggaccttctg ccgtttcttt	4500
gggttttggt aacggcggtt ttgctgtttt aaacatgtca tttcctttct taagcaacgc	4560
atctcttttg acgggcgtcg gaaaaaatgt tgttcaagag aaaataaaaa ttccaaatt	4620
tgagaagaaa cagaagaagc gcgttttttc gatagctcgc gctaccgcgc gtcattgtcc	4680
ttcccgctcg aatcctaagg agaagcgtgt tgtccatgta cagcatctcc ctagtggttc	4740
tttacgcttt tcccaaaaca aaaacaaaac agaactgctc atcttaaaag aggaagtcgg	4800
aattgtcgcg cgcgttaagt gtccggcaag cgctcgtcgc cgtcgcgttt gtggcggtgt	4860
ggttaagtgc aaaccctaa tagccgtttc tccctctggc gtgaaattcc gttgtttcgc	4920
gccgtcttgc agcacgtccg cttgtttaaa gctcaaaatc atgcgccgtg ttgccgtcg	4980
tgactgccga ggtgagaaga taatcgcggc acgacgtcgc gcgctgcaga agcaggtttt	5040
caacagccgc acaccgaaga aagtgcgaga gaacccatt agcgtctccg gggagaactt	5100
gggaaggctc gccgcgctc aggttattta ttccggcagt ttcacgcagc ccttcgcgtt	5160
gtatccgcgc caagagagcg cgatcgtaaa aacgcaacct ccaccggtca gtgtagtgaa	5220

ES 2 478 041 T3

ggtggagtgc gtagctgcgg aggtagctcc cgaçaggggc gtggtcgaca agaaacctac 5280
 gtctgttggc gttccccgc agcgcggtgt gctttctttt ccgacggtgg ttcggaaccg 5340
 cggcgacgtg ataatcacag ggggtgtgca tgaagccctg aagaaaatta aagacgggct 5400
 cttacgcttc cgcgtaggcg gtgacatgcg tttttcgaga tttttctcat cgaactacgg 5460
 ctgcagattc gtcgcgagcg tgcgtacgaa cactacagtt tggctaaatt gcacgaaagc 5520
 gagtggtagg aaattctcac tcgccgccgc gtgcacggcg gattacgtgg cgatgctgcg 5580
 ttatgtgtgt ggcgggaaat ttcctctcgt cctcatgagt 'agagtatttt acccggtatg 5640
 gcgctgttac ttggcccata tgaggtatth gtgcgccttt tactgtcgcc cgttttagaga 5700
 gtcggattat gccctcggaa tgtggcctac ggtggcgcggt ctcagggcat gcgttgagaa 5760
 gaacttcggt gtcgaagctt gtggcatagc tcttcgtggc tattacacct ctcgcaatgt 5820
 ttatcactgt gattatgact ctgcttatgt aaaaatthtt agaaaccttt ccggccgcac 5880
 tggcggtggt tcgttcgac cgcacatcttt aacctccgta ataacggtga agattagcgg 5940
 tcttcaggt ggtcttccta aaaatatagc gtttggtgcc ttcctgtgcg atatacgtta 6000
 cgtcgaaccg gtagactcgg gcggcattca atcgagcgtt aagacgaaac gtgaagatgc 6060
 gcaccgaacc gtagaggaac gggcggccgg cggatccgtc gagcaaccgc gacaaaagag 6120
 gatagatgag aaagggtgcg gcagagttcc tagtgaggt ttttcgcac tctgtgctcg 6180
 cagccttaac gaagttagga ggaaggtagc tgccggactt ctacgctttc gcgttgccgg 6240
 tgatatggat tttcatcgct cgttctccac ccaagcgggc caccgcttgc tgggtgtggc 6300
 ccgctcgagc cggagcgtgt gccttgaact ttactacca tctaaaaact ttttcggtta 6360
 cgatgtcttg ccttgttctg gagactatgc agcgatgttt tctttcgcg cgggcgccg 6420
 tttcccttta gttttgatga ctagaattag ataccgaaac gggttttgtt acttggtca 6480
 ctgccggtac gcgtgcgcgt ttctcttaag gggttttgat ccgaagcgtt tcgacatcgg 6540
 tgctttcccc accgcagcca agctcagaaa ccgtatggtt tcggagcttg gtgaaagaag 6600
 tttaggtttg aacttgtagc gcgcatatac gtcacgcggc gtctttcact gcgattatga 6660
 cgctaagttt ataaaggatt tgcgtcttat gtcagcagtt atagctggaa aggacggagt 6720
 ggaagagggt gtaccttctg acataactcc tgccatgaag cagaaaacga tcgaagccgt 6780
 gtatgataga ttatatggcg gcaactgact gttgctgaaa ctgagcatcg agaaagactt 6840
 aatcgatttc aaaaatgacg tgcagagttt gaagaaagat cggccgattg tcaaagtgcc 6900
 cttttatatg tcggaagcaa cacagaattc gctgacgcgt ttctaccctc agttcgaact 6960
 taagttttcg cactcctcgc attcagatca tcccgcggcc gccgcttcta gactgctgga 7020

aatgaaacg ttagtgcgct tatgtggtaa tagcgtttca gatattggag gttgtcctct	7080
tttccatttg cattccaaga cgcaaagacg ggttcacgta tgtaggcctg tgttgcatgg	7140
caaggatgcg cagcgtcgcg tgggtcggtga tttgcagtat tccaacgtgc gttggggaga	7200
cgatgataaa attttggaag ggccacgcaa tatcgacatt tgccactatc ctctgggcgc	7260
gtgtgaccac gaaagtagtg ctatgatgat ggtgcaggtg tatgacgcgt ccctttatga	7320
gatatgtggc gccatgatca agaagaaaag ccgcataacg tacttaacca tggtcacgcc	7380
cgggcagttt cttgacggac gcgaatgcgt ctatatggag tcgttagact gtgagattga	7440
ggttgatgtg cacgcggac tcgtaatgta caaattcggg agttcttgct attcgcacaa	7500
gctttcaatc atcaaggaca tcatgaccac tccgtacttg aactaggtg gttttctatt	7560
cagcgtggag atgtatgagg tgcgtatggg cgtgaattac ttcaagatta cgaagtccga	7620
agtatcgct agcattagct gcaccaagct cctgagatac cgaagagcta atagtacgt	7680
ggttaaagtt aaacttcac gtttcgataa gaaacgtcgc atgtgtctgc ctgggtatga	7740
caccatatac ctagattcga agtttgtgag tcgcgttttc gattatgtcg tgtgtaattg	7800
ctctgccgtg aactcaaaaa ctttcgagtg ggtgtggagt ttcattaagt ctagtaagtc	7860
gagggtgatt attagcggta aaataattca caaggatgtg aatttggacc ttaagtacgt	7920
cgagagtttc gcccggtta tgttgccctc tggcgtgcgc agcagactag cgtccgagta	7980
ccttgctaag aaccttagtc atttttcggg agattgctcc ttattgaag ccacgtcttt	8040
cgtgttcgct gagaaaatca gaaacatgac tctgaatttt aacgaaagac ttttacagtt	8100
agtgaagcgc gttgccttg cgaccttga cgtgagtttt ctagatttag attcaactct	8160
tgaatcaata actgattttg ccgagtgtaa ggtagcgatt gaactcgacg agttgggttg	8220
cttgagagcg gaggccgaga atgaaaaaat caggaatctg gcgggagatt cgattgcggc	8280
taaactcgcg agcgagatag tggtcgatat tgactetaag ccttcaccga agcaggtggg	8340
taattcgtca tccgaaaacg ccgataagcg ggaagttag aggcccggtt tgcgtggtgg	8400
ttctagaaac ggggttgttg gggagttcct tcaacttcgtc gtggattctg ccttcgtct	8460
tttcaaatac gcgacggatc aacaacggat caagtcttac gtgcgtttct tggactcggc	8520
ggtctcattc ttggattaca actacgataa tctatcgttt atactgcgag tgctttcgga	8580
aggttatctg tgtatgttcg cgtttttggc gaatcgcggc gacttatcta gtcgtgtccg	8640
tagcgcggtg cgtgctgtga aagaagttgc tacctcatgc gcgaacgcga gcgtttctaa	8700
agccaaggtt atgattacct tcgcagcggc cgtgtgtgct atgatgttta atagctgcgg	8760
tttttcaggc gacggtcggg agtataaatc gtatatacat cgttacacgc aagtattgtt	8820
tgacactatc ttttttgagg acagcagtta cctaccata gaagttctga gttcggcgat	8880

ES 2 478 041 T3

atgcggtgct atcgtcacac ttttctcctc gggctcgtcc ataagtttaa acgccttctt	8940
acttcaaatt accaaaggat tctccctaga ggttgctgtc cggaatggtg tgcgagtcac	9000
gcatggtttg agcaccacag cgaccgacgg cgtcatacgt ggggttttct cccaaattgt	9060
gtctcactta cttgttgga ataccggtaa tgtggcttac cagtcagctt tcattgccgg	9120
ggtggtgcct cttttagtta aaaagtgtgt gagcttaatc ttcattcttc gtgaagatac	9180
ttattccggt tttattaagc acggaatcag tgaattctct ttccttagta gtattctgaa	9240
gttcttgaag ggtaagcttg tggacgagtt gaaatcgatt attcaagggg tttttgattc	9300
caacaagcac gtgtttaaag aagctactca ggaagcgatt cgtacgacgg tcatgcaagt	9360
gcctgtcgct gtagtggatg cccttaagag cgccgcggga aaaatttata acaattttac	9420
tagtcgacgt acctttggtg aggatgaagg ctctctagc gacggcgcat gtgaagagta	9480
tttctcatgc gacgaaggtg aaggctccggg tctgaaaggg ggttccagct atggcttctc	9540
aatttttagcg ttcttttcac gcattatgtg gggagctcgt cggcttattg ttaaagtga	9600
gcatgagtggt tttgggaaac tttttgaatt tctatcgctc aagcttcacg aattcaggac	9660
tcgcgttttt gggatgaata gaacggacgt gggagtttac gattttttgc ccacggacat	9720
cgtggaacg ctctcatcga tagaagagtg cgaccaaatt gaagaacttc tcggcgacga	9780
cctgaaagggt gacaaggatg cttcgttgac cgatatgaat tactttgagt tctcagaaga	9840
cttcttagcc tctgtcgagg agccgccttt cgctggattg cgaggaggta gcaagaacgt	9900
cgcgattttg gcgattttgg aatacgcgca taatttgttt cgcatgtcgc caagcaagtg	9960
ttcgaaacga cttttatttc ttgctttcgc cgaactctca agcgccctta tcgagaaatt	10020
taaggagggtt ttccctcgta agagccagct cgtcgctatc gtgcgcgagt atactcagag	10080
attcctccga agtcgcatgc gtgcgttggg tttgaataac gagttcgtgg taaaatcttt	10140
cgccgatttg ctaccgcat taatgaagcg gaaggtttca ggttcgttct tagctagtgt	10200
ttatcgccca cttagagggt tctcatatat gtgtgtttca gcggagcgac gtgaaaagtt	10260
ttttgctctc gtgtgtttaa tcgggttaag tctccctttc ttcgtgcgca tcgtaggagc	10320
gaaagcgtgc gaagaactcg tgcctcagc gcgtcgcttt tatgagcgta ttaaaatttt	10380
tctcaggcag aagtatgtct ctctttctaa tttcttttgt cacttgttta gctctgacgt	10440
tgatgacagt tccgcatcag cagggttgaa aggtggtgcg tcgcgaatga cgctcttcca	10500
ccttctggtt cgccttgcta gtgccctcct atcgttaggg tgggaagggt taaagctact	10560
cttatcgcac cacaacttgt tatttttgtg ttttgcattg gttgacgatg tgaacgtctt	10620
atcaaagttc ttgggggtct ttctttcttt gtgcaaccag tcttttcctt gtttgcggcg	10680

ES 2 478 041 T3

atgctttttac aaccggacag gtttgtggg tattccgaga aacttggtac agcgtttgaa 10740
 tttttcttaa aatgttcgcc tcgcgcgcct gcactactca aagggttttt tgagtgcgtg 10800
 gcgaacagca ctgtgtcaaa aaccgttcga agacttcttc gctatttcgt gaggatgctc 10860
 aaacttcgaa aagggcgagg gttgcgtgcg gatggtaggg gtctccatcg gcagaaagcc 10920
 gtaccogtca taccttctaa tcgggtcgtg accgacgggg ttgaaagact ttcggtaaag 10980
 atgcaaggag ttgaagcgtt gcgtaccgaa ttgagaatct tagaagattt agattctgcc 11040
 gtgatcgaaa aactcaatag acgcagaaat cgtgacacta atgacgacga atttacgcgc 11100
 cctgctcatg agcagatgca agaagtcacc actttctgtt cgaaagccaa ctctgctggt 11160
 ttggccctgg aaagggcagt gcttgtggaa gacgctataa agtcggagaa actttctaag 11220
 acggttaatg agatggtag gaaagggagt accaccagcg aagaagtggc cgtcgctttg 11280
 tcggacgatg aagccgtgga agaaatctct gtigtgcagc agcgagacga ttcgcctaag 11340
 acagtcagga taagcgaata cctaaatagg ttaaactcaa gcttcgaatt cccgaagcct 11400
 attgttgtgg acgacaacaa ggataccggg ggtctaacga acgccgtgag ggagttttat 11460
 tatatgcaag aacttgctct tttcgaaatc cacagcaaac tgtgcgccca ctacgatcaa 11520
 ctgcgcatag tcaacttcga tcgttccgta gcaccatgca gcgaagatgc tcagctgtac 11580
 gtacggaaga gcggctcaac gatagtgcag ggtaaagagg tacgtttgca cattaaggat 11640
 ttccacgatc acgatttcct gtttgacggg aaaatttcta ttaacaagcg gcggcgaggc 11700
 ggaaacgttt tatatcacga caacctcgcg ttcttggcga gtaatttgtt cttagccggc 11760
 tacccttttt caaggagctt cgtcttcacg aattcgtcgg tcgatattct cctctacgaa 11820
 gctccaccog gaggtggtaa gacgacgacg ctgattgact cgttcttgaa ggtcttcaag 11880
 aaaggtgag tttccaccat gatcttaacc gccacaacaa gttcgcaggt tgagatccta 11940
 aagaaagtgg agaaggaagt gtctaacatt gaatgccaga aacgtaaaga caagagatct 12000
 ccgaaaaaga gcatttacac catcgacgct tatttaatgc atcacctggg ttgtgatgca 12060
 gacgttcttt tcatcgatga gtgtttcatg gttcatgcgg gtagcgtact agcttgcat 12120
 gagttcacga ggtgtcataa agtaatgatc ttcggggata gccggcagat tcaactacatt 12180
 gaaaggaacg aattggacaa gtgtttgtat ggggatctcg ataggttcgt ggacctgcag 12240
 tgtcggggtt atggtaatat ttcgtaccgt tgtccatggg atgtgtgcgc ttggttaagc 12300
 acagtgtatg gcaacctaat cgccaccgtg aagggtgaaa gcgaaggtaa gagcagcatg 12360
 cgcattaacg aaattaattc agtcgacgat ttagtccccg acgtgggttc cacgtttctg 12420
 tgtatgcttc agtcggagaa gttggaaatc agcaagcact ttattcgcaa gggtttgcc 12480
 aaacttaacg ttctaactgt gcatgaggcg caaggtaga cgtatgcgcg tgtgaacctt 12540

gtgcgactta agtttcagga ggatgaaccc tttaaactta tcaggcacat aaccgtcgct	12600
ctttctcgtc acaccgacag cttaacttat aacgtcttag ctgctcgtcg aggtgacgcc	12660
acttgcgatg ccatccagaa ggctgcggaa ttggtgaaca agtttcgctt ttttcctaca	12720
tcttttggtg gtagtggtat caatctcaac gtgaaaaagg acgtggaaga taacagtagg	12780
tgcaaggctt cgtcggcacc attgagcgta atcaacgact ttttgaacga agttaatccc	12840
ggtactgcgg tgattgattt tgggtgatttg tccgcggact tcagtactgg gccttttgag	12900
tgcggtgcca gcggtattgt ggtgcgggac aacatctcct ccagcaacat cactgatcac	12960
gataagcagc gtgttttagcg tagttcggtc gcaggcgatt ccgcgtagaa aaccttctct	13020
acaagaaaat ttgtattcgt ttgaagcgcg gaattataac ttctcgactt gcgaccgtta	13080
cacatctgct tcaatgttcg gagaggctat ggcgatgaac tgtcttcgtc gttgcttcga	13140
cctagatgcc ttttcgtccc tgcgtaatga tgtgattagt atcacacgtt caggcatcga	13200
acaatggctg gagaaacgta ctcttagtca gattaaagca ttaatgaagg atgttgaatc	13260
gcctttggaa attgacgatg aaatttgcg ttttaagttg atggtgaagc gtgacgctaa	13320
ggtgaagtta gactcttctt gtttaactaa acacagcgcc gctcaaaata tcatgtttca	13380
tcgcaagagc attaatgcta tcttctctcc tatctttaac gaggtgaaaa accgaataat	13440
gtgctgtctt aagcctaaca taaagttttt tacggagatg actaacaggg attttgcttc	13500
tgttgtcagc aacatgcttg gtgacgacga tgtgtaccat ataggtgaag ttgatttctc	13560
aaagtaacgac aagtctcaag atgctttcgt gaaggctttt gaagaagtga tgtataagga	13620
actcgggtgt gatgaagagt tgctggctat ctggatgtgc ggcgagcggc tatcgatagc	13680
taacactctc gatggtcagt tgctcttcac gatcgagaat caaaggaagt cgggagcttc	13740
gaacacttgg attggttaact ctctcgtcac tttgggtatt ttaagtcttt actacgacgt	13800
tagaaatttc gaggcgttgt acatctcggg cgatgattct ttaatttttt ctgcgacga	13860
gatttcgaat tatgccgacg acatatgcac tgacatgggt tttgagacaa aatttatgtc	13920
cccaagtgtc ccgtactttt gttctaaatt tgttggtatg tgtggtcata agacgttttt	13980
tgttcccgac ccgtacaagc tttttgtcaa gttgggagca gtcaaagagg atgtttcaat	14040
ggatttcctt ttcgaaactt ttacctcctt taaagactta acctccgatt ttaacgacga	14100
gcgcttaatt caaaagctcg ctgaacttgt ggctttaaaa tatgaggttc aaaccggcaa	14160
caccaccttg gcgttaagtg tgatacattg tttgcgttcg aatttcctct cgttttagcaa	14220
gttgatcct cgcgtaaggg gatggcaggt tttttacacg tcggttaaga aagcgcttct	14280
caagagtggg tgttctctct tcgacagttt catgaccctt tttggtcagg ctgtcatggt	14340

ES 2 478 041 T3

ttgggatgat gagtagcgct aacttgtgcg cagtttcttt gttcgtgaca tacaccttgt	14400
gtgtcaccgt gcgtttataa tgaatcaggt tttgcagttt gaatgtttat ttctgctgaa	14460
tctcgcggtt tttgctgtga ctttcatttt cattcttctg gtcttccgcg tgattaagtc	14520
ttttcgccag aagggtcacg aagcgcctgt tcccgttgtt cgtggcgggg gtttttcaac	14580
cgtagtgtag tcaaaagacg cgcataatgt agttttcggg ttggactttg gcaccacatt	14640
ctctacgggtg tgtgtgtaca aggatggacg agttttttca ttcaagcaga ataattcggc	14700
gtacatcccc acttacctct atctcttctc cgattctaac cacatgactt ttggttacga	14760
ggccgaatca ctgatgagta atctgaaagt taaaggttcg ttttatagag atttaaacg	14820
ttgggtgggt tgcgattcga gtaacctcga cgcgtacctt gaccgtttaa aacctcatta	14880
ctcggtcgcg ttggttaaga tcggctctgg cttgaacgaa actgtttcaa ttggaaactt	14940
tgggggcact gttaagtctg aggctcatct gccagggttg atagctctct ttattaaggc	15000
tgtcattagt tgcgcggagg gcgcgtttgc gtgcacttgc accggggtta tttgttcagt	15060
acctgccaat tatgatagcg ttcaaaggaa tttcactgat cagtgtgttt cactcagcgg	15120
ttatcaatgc gtatatatga tcaatgaacc ttcagcggct gcgctatctg cgtgtaattc	15180
ggttggaaag aagtcgcaa atttggctgt ttacgatttc ggtggtggga ccttcgacgt	15240
gtctatcatt tcataaccga acaatacttt tgttgtgcga gcttctggag gcgatctaaa	15300
tctcgggtga agggatgttg atcgtgcgtt tctcacgcac ctcttctctt taacatcgct	15360
ggaacctgac ctcaactttg atatctcgaa tctgaaagaa tctttatcaa aaacggacgc	15420
agagatagtt tacactttga gaggtgtcga tggaagaaaa gaagacgtta gagtaaacaa	15480
aaacattctt acgtcgggtga tgctcccta cgtgaacaga acgcttaaga tattagagtc	15540
aaccttaaaa acgtatgcta agagtatgaa tgagagtgcg cgagttaagt gcgatttagt	15600
gctgatagga ggatcttcat atcttctctg cctggcagac gtactaacga agcatcagag	15660
cgttgatcgt atcttaagag tttcggatcc tcgggctgcc gtggccgtcg gttgcgcact	15720
atattcttca tgctctcag gatctggggg gttgctactg atcgactgtg cagctcacac	15780
tgtcgtata gcggacagaa gttgtcagca aatcatttgc gctccagcgg gggcaccgat	15840
ccccttttca ggaagcatgc cttgtactt agccagggtc aacaagaact cgcagcgtga	15900
aatcgccgtg tttgaagggg agtacgttaa gtgccctaag aacagaaaga tctgtggagc	15960
aaatataaga ttttttgata taggagtgac ggtgattcg tacgcacccg ttaccttcta	16020
tatggatttc tccatttcaa gcgtaggagc cgtttcattc gtggtgagag gtcctgaggg	16080
taagcaagtg tcaactactg gaactccagc gtataacttt tcgtctgtgg ctctcggatc	16140
acgcagtgtc cgagaattgc atattagttt aaataataaa gtttttctcg gtttgcttct	16200

ES 2 478 041 T3

```

acatagaaag gcggatcgac gaatactttt cactaaggat gaagcgattc gatacgccga 16260
ttcaattgat atcgcggatg tgctaaagga atataaaagt tacgcggcca gtgccttacc 16320
accagacgag gatgtcgaat tactcctggg aaagtctgtt caaaaagttt tacggggaag 16380
cagactggaa gaaatacctc tctaggagca tagcagcaca ctcaagtga attaaaactc 16440
taccagacat tcgattgtac ggcggtaggg ttgtaaagaa gtccgatttc gaatcagcac 16500
ttcctaattc ttttgaacag gaattaggac tgttcatact gagcgaacgg gaagtgggat 16560
ggagcaaatt atgcggaata acggtggaag aagcagcata cgatcttacg aatcccaagg 16620
cttataaatt cactgccgag acatgtagcc cggatgtaaa aggtgaagga caaaaatact 16680
ctatggaaga cgtgatgaat ttcattcggt tatcaaactt ggatgttaac gacaagatgc 16740
tggcggaaca gtgttggtcg ctgtccaatt catgcggtga attgatcaac ccagacgaca 16800
aagggcgatt cgtggctctc acctttaagg acagagacac agctgatgac acgggtgccg 16860
ccaacgtgga atgtcgctg ggcgactatc tagtttacgc tatgtccctg tttgagcaga 16920
ggacccaaaa atcgcagtct ggcaacatct ctctgtacga aaagtactgc gaatacatca 16980
ggacctactt agggagtaca gacctgtttt tcacagcgcc ggacaggatt ccgttactta 17040
cgggcaccc atacgatttt tgtaaggaat acaacatttt ctactcgtca tataagagaa 17100
acgtcgataa tttcagattc ttcttgcgga attatatgcc tttgatatct gacgtctttg 17160
tcttccagtg ggtaaaaccc gcgccggatg ttccgctgct ttttgagtta agtgcagcgg 17220
aactaacgct ggaggttccc aactgagtt tgatagattc tcaagttgtg gtaggtcata 17280
tcttaagata cgtagaatcc tacacatcag atccagccat cgacgcgtta gaagacaaac 17340
tggaagcgat actgaaaagt agcaatcccc gtctatcgac agcgcaacta tgggttggtt 17400
tcttttggtta ctatggtgag ttctgtacgg ctcaaagtag agtagtgcaa agaccaggcg 17460
tatacaaaac acctgactca gtgggtggat ttgaaataaa catgaaagat gttgagaaat 17520
tcttcgataa acttcagaga gaattgccta atgtatcttt gcggcgtcag tttaacggag 17580
ctagagcgca tgaggctttc aaaatattta aaaacggaaa tataagtttc aaacctatat 17640
cgcgtttaaa cgtgcctaga gagttctggt atctgaacat agactacttc aggcacgcga 17700
ataggtccgg gtttaaccgaa gaagaaatac tcatcctaaa caacataagc gttgatgtta 17760
ggaagttatg cgctgagaga gcgtgcaata ccctacctag cgcgaagcgc tttagtaaaa 17820
atcataagag taatatacaa tcatcacgcc aagagcggag gattaaagac ccattggtag 17880
tcctgaaaga cactttatat gagttccaac gcaagcgtgc cggttggggg tctcgaagca 17940
ctcgagacct cgggagtcgt gctgaccacg cgaaaggaag cggttgataa gttttttaat 18000

```

ES 2 478 041 T3

gaactaaaaa acgaaaatta ctcatcagtt gacagcagcc gattaagcga ttcggaagta 18060
 aaagaagtgt tagagaaaag taaagaaagt ttcaaaagcg aactggcctc cactgacgag 18120
 cacttcgtct accacattat atttttctta atccgatgtg ctaagatata gacgagtga 18180
 aaagtgaagt acgttggttag tcatatgtac gtggtcgacg gaaaaacgta caccgttctt 18240
 gagccttggg tattcaacat gatgaaaagt ctacgaaga agtacaacg agtgaatggt 18300
 ctgctgctgct tctgttgcgc gtgcgaagat ctatatctaa ccgtcgcacc aataatgtca 18360
 gaacgcttta agactaaagc cgtagggatg aaaggtttgc ctggttgaaa ggaatactta 18420
 ggcgccgact ttctttcggg aactagcaaa ctgatgagcg atcacgacag ggcggtctcc 18480
 atcgttgacg cgaaaaacgc tgtcgatcgt agcgttttca cgggtgggga gagaaagata 18540
 gttagtttgt atgatctagg gaggtactaa gcacggtgtg ctatagtgcg tgctataata 18600
 ataaacacta gtgcttaagt cgcgcagaag aaaacgctta attaacaatg aagactaatc 18660
 tttttctctt tctcatcttt tcacttctcc tatcattatc ctcgccgaa ttcagtaaag 18720
 gagaagaact ttctactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt gatgttaatg 18780
 ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggatgatgc aacatacga aaacttacct 18840
 ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt gtcactactt 18900
 tctcttatgg tgttcaatgc ttttcaagat acccagatca tatgaagcgg cagcacttct 18960
 tcaagagcgc catgcctgag ggatacgtgc aggagaggac catcttcttc aaggacgacg 19020
 ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt ttgagggaga caccctcgtc aacaggatcg 19080
 agcttaaggg aatcgatttc aaggaggacg gaaacatcct cggccacaag ttggaataca 19140
 actacaactc ccacaacgta tacatcatgg ccgacaagca aaagaacggc atcaaagcca 19200
 acttcaagac ccgccacaac atcgaagacg gcggcgtgca actcgctgat cattatcaac 19260
 aaaatactcc aattggcgat gccctgtcc ttttaccaga caaccattac ctgtccacac 19320
 aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt cttgagtttg 19380
 taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaacatgat gagctttagt 19440
 aaactgttcc tgaatagaac cattggcaaa cgtgggatcc cgtcagggtg tgagttcttc 19500
 ggggcagatt ttctaactgc gaccagcgtg tgtttgaacg atcacgaaa agctatcgta 19560
 ctacaggcct caagagctgc cattgataga gcagtctctt cgtcggtcga cgggaagatc 19620
 gtcagtcttt tcgacctcgg tcgtcttagt taacacagtt actaagggtc cattttatta 19680
 ttgcattgtt ttcatcttag tgtaatcgta cttgagttct aatcctgcag gctatggagt 19740
 tgatgtccga cagcaacctt agcaacctgg tgataaccga cgctcttagt ctaaagtgtg 19800
 tcgacaagaa gcttttatct gctgaagttg taaaaatgct ggtgcagaaa ggggtccta 19860

ES 2 478 041 T3

acgaggggtat agaagtgggtg ttcgggtctac tcctttacgc actcgcggca agaaccacgt	19920
ctcctaaggt tcagcgcgca gattcagacg ttatatatttc aaatagtttc ggagagagga	19980
atgtggtagt aacagaggggt gaccttaaga aggtactcga cgggtgtgcg cctctcacta	20040
ggttcactaa taaacttaga acgttcggtc gtactttcac tgaggcttac gttgactttt	20100
gtatcgcgta taagcacaaa ttacccaac tcaacgccgc ggcggaattg gggattccag	20160
ctgaagattc gtacttagct gcagattttc tgggtacttg cccgaagctc tctgaattac	20220
agcaaagtag gaagatgttc gcgagtatgt acgctctaaa aactgaaggt ggagtggtaa	20280
atacaccagt gagcaatctg cgtcagctag gtagaaggga agttatgtaa tggaagatta	20340
cgaagaaaaa tccgaatcgc tcatactgct acgcacgaat ctgaacacta tgcttttagt	20400
ggtcgaagtc gatgctagt tagagctgcc taaactacta atttgcggtt acttacgagt	20460
gtcaggacgt ggggagglga cgtgttgcaa ccgtgaggaa ttaacaagag altttgaggg	20520
caatcatcat acggtgatcc gttctagaat catacaatat gacagcgagt ctgcttttga	20580
ggaattcaac aactctgatt gcgtagttaa gtttttcta gagactggtg gtgtcttttg	20640
gtttttcctt cgaagtgaac ccaaaggtag agcggtgcca catttgcgca ccttcttcga	20700
agctaacaat ttcttctttg gatcgcatcg cgtaccatg gagtattgtt tgaagcaggt	20760
actatctgaa actgaatcta taatcgattc tttttgcgaa gaaagaaatc gttaagatga	20820
gggttatagt gtctccttat gaagctgaag acattctgaa aagatcgact gacatgttac	20880
gaaacataga cagtggggtc ttgagcacta aagaatgtat caaggcattc tcgacgataa	20940
cgcgagacct acattgtgcg aaggcttcct accagtgagg tggtgacact gggttatatac	21000
agcgtaatg cgctgaaaaa catttaattg acacgggtga gtcaaacata cggttggctc	21060
aacctctcgt gcgtgaaaaa gtggcgggtc atttttgtaa ggatgaacca aaagagctag	21120
tagcattcat cacgcgaaa g tacgtggaac tcacgggcgt gggagtgaga gaagcgggtga	21180
agagggaaat gcgctctctt accaaaacag ttttaaataa aatgtctttg gaaatggcgt	21240
tttacatgtc accacgagcg tggaaaaacg ctgaatggtt agaactaaaa ttttcacctg	21300
tgaaaatctt tagagatctt ttattagacg tggaaacgct caacgaattg tgcgccgaag	21360
atgatgttca cgctgacaaa gtaaatgaga atggggacga aaatcacgac ctcgaactcc	21420
aagacgaatg ttaaaccattg gttaagttaa acgaaaatga ttagtaata ataaatcgaa	21480
cgtgggtgta tctacctgac gtatcaactt aagctgttac tgagtaatta aaccaacaag	21540
tggtggtgta atgtgtatgt tgatgtagag aaaaatccgt ttgtagaacg gtgtttttct	21600
cttctttatt tttaaaaaaa aataaaaaaa aaaaaaaga agctcaagac atgattcaca	21660

ES 2 478 041 T3

tgtcttctga	tgagtccgtg	aggacgaaag	cttcttttcc	cggggatcgt	tcaaacattt	21720
ggcaataaag	tttcttaaga	ttgaatcctg	ttgccgtct	tgcatgatt	atcatataat	21780
ttctgttgaa	ttacgttaag	catgtaataa	ttaacatgta	atgcatgacg	ttatttatga	21840
gatgggtttt	tatgattaga	gtcccgcgaat	tatacattta	atacgcgata	gaaaacagaa	21900
tatagcgcgc	aaactaggat	aaattatcgc	gcgcggtgtc	atctatgtta	ctagatcaag	21960
cttatcgata	ccgtcgacct	cgaggggggg	cccggtagca	aaaccacccc	agtacattaa	22020
aaacgtccgc	aatgtgttat	taagttgtct	aagcgtcaat	ttgtttacac	cacaatatat	22080
cctgccacca	gccagccaac	agctccccga	ccggcagctc	ggcacaaaat	caccactcga	22140
tacaggcagc	ccatcagtc	actaga				22166

<210>2

<211> 14508

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector viral obtenido por ingeniería genética

<400> 2

atattctgtt	ggctttcatc	tgtgcttg	cttcggttca	atcacactct	gaaagtttca	60
gttccccgga	atttcggttt	tcttcataag	ccttattcct	acaggatgtc	tagccttgct	120
atctctgccc	ttccctgttc	agtcgctcaa	ctgagcgttg	gtcagcctgt	tgccacgggt	180
gccagggtcat	ttttgatgac	ttcccttcgc	tcccttcaga	cttaccatc	ttcgtctgag	240
ttgacttcct	ttttattttg	ttttggtgct	ttccaaaaaa	taaaaatgtt	tttatctttc	300
ctacgttcgg	tgcacgtctt	tgcgcctttt	tctgaaat	ccacgattgg	ttcatgctat	360
gaattcattc	ggttgggagg	tggtgcttac	cctctctttt	tctgttcctt	ccaatgcgga	420
cctttgtccg	tttctttggg	ttttgttaac	ggcgtttttg	ctgtttttaa	catgtcattt	480
cctttcttaa	gcaacgcac	tcttttgacg	ggcgtcggaa	aaaatgttgt	tcaagagaaa	540
ataaaaattt	ccaaatttga	gaagaaacag	aagaagcgcg	ttttttcgat	agctcgcgct	600
accgcgcgtc	atgtgccttc	ccgtcgcaat	cctaaggaga	agcgtgttgt	ccatgtacag	660
catctcccta	gtggttcttt	acgtctttcc	caaaacaaaa	acaaaacaga	actgctcatc	720
ttaaaagagg	aagtcggaat	tgtcgcgcgc	gttaagtgtt	cggcaagcgt	cgtgcgccgt	780
cgcgtttgtg	gcggtgtggt	taagtgcata	ccctaataag	ccgtttctcc	ctctggcgtg	840
aaattccgtt	gtttcgcgcc	gtcttcgacg	acgtccgctt	gtttaaagct	caaaatcatg	900
cgcgtgtgtg	ccgtcggtga	ctgccgaggt	gagaagataa	tcgcggcacg	acgtgcggcg	960
ctgcagaagc	aggctttcaa	cagccgcaca	ccgaagaaag	tgcgagagaa	ccccattagc	1020

ES 2 478 041 T3

gtctccgggg tgaacttggg aaggctctgcc gccgctcagg ttatttattt cggcagtttc	1080
acgcagccct tcgcgttgta tccgcgccaa gagagcgcga tcgtaaaaac gcaacctcca	1140
ccggtcagtg tagtgaaggt ggagtgcgta gctgcggagg tagctccccga caggggagtg	1200
gtcgacaaga aacctacgtc tgttggcggt ccccgccagc gcggtgtgct ttcttttccg	1260
acggtgggtc ggaaccgcgg cgacgtgata atcacagggg tgggtcatga agccctgaag	1320
aaaattaaag acgggctctt acgcttccgc gtaggcgggtg acatgcgttt ttcgagattt	1380
ttctcatcga actacggctg cagattcgtc gcgagcgtgc gtacgaacac tacagtttgg	1440
ctaaattgca cgaaagcgag tggtagaaaa ttctcactcg ccgccgcgtg cacggcggat	1500
tacgtggcga tgctgcgtta tgtgtgtggc gggaaatttc ctctcgtcct catgagtaga	1560
gttatttacc cggatgggag ctgttacttg gcccatatga ggtatttgtg cgccttttac	1620
tgctgcccgt ttagagagtc ggattatgcc ctccgaatgt ggctacggg ggcgcgcttc	1680
agggcatgcg ttgagaagaa ctccggtgtc gaagcttgtg gcatagctct tcgtggctat	1740
tacacctctc gcaatgttta tcaactgtgat tatgactctg cttatgtaaa atattttaga	1800
aacctttccg gccgcattgg cgggtggttcg ttccgatccga catctttaac ctccgtaata	1860
acggtgaaga ttagcgggtc tccaggtggg ctccctaaaa atatagcgtt tgggtgccttc	1920
ctgtgcgata tacgttacgt cgaaccggta gactcgggag gcattcaatc gagcggttaag	1980
acgaaacgtg aagatgcgca ccgaaccgta gaggaacggg cggccggcgg atccgctgag	2040
caaccgcgac aaaagaggat agatgagaaa ggttgcggca gagttcctag tggaggtttt	2100
tcgcatctcc tggtcggcag ccttaacgaa gttaggagga aggtagctgc cggacttcta	2160
cgctttcgcg ttggcggtga tatggatttt catcgctcgt tctccacca agcggggccac	2220
cgtttgctgg tgtggcgccg ctccgagccg agcgtgtgcc ttgaacttta ctcaccatct	2280
aaaaactttt tgcgttacga tgtcttgctt tgttctggag actatgcagc gatgttttct	2340
ttcgcgccgg gcggccgttt ccctttagtt ttgatgacta gaattagata cccgaacggg	2400
ttttgttact tggctcactg ccggtacgcg tgcgcgtttc tcttaagggg ttttgatccg	2460
aagcggttcg acatcgggtc ttcccccacc gcagccaagc tcagaaaccg tatgggttcg	2520
gagcttggtg aaagaagttt aggtttgaac ttgtacggc catatacgtc acgcggcgctc	2580
tttactgcg attatgacgc taagtttata aaggatttgc gtcttatgtc agcagttata	2640
gctggaaagg acggagtggg agaggtggta ccttctgaca taactcctgc catgaagcag	2700
aaaacgatcg aagccgtgta tgatagatta tatggcggca ctgactcgtt gctgaaactg	2760
agcatcgaga aagacttaat cgatttcaaa aatgacgtgc agagtttgaa gaaagatcgg	2820

ES 2 478 041 T3

ccgattgtca aagtgccctt ttatatgtcg gaagcaacac agaattcgct gacgcgtttc	2880
taccctcagt tcgaacttaa gttttcgac tcctcgcat cagatcatcc cgccgccgcc	2940
gcttctagac tgctggaaaa tgaaacgtta gtgcgcttat gtggtaatag cgtttcagat	3000
attggagggt gtcctctttt ccatttgcac tccaagacgc aaagacgggt tcacgtatgt	3060
aggcctgtgt tggatggcaa ggatgcgcag cgtcgcgtgg tgcgtgattt gcagtattcc	3120
aacgtgcgtt ggggagacga tgataaaatt ttggaagggc cagcaatat cgacatttgc	3180
cactatcctc tgggcgcgtg tgaccacgaa agtagtgcta tgatgatggt gcagggtgat	3240
gacgcgtccc tttatgagat atgtggcgcc atgatcaaga agaaaagccg cataacgtac	3300
ttaaccatgg tcacgcccg cgagtttctt gacggacgcg aatgcgtcta tatggagtcg	3360
ttagactgtg agattgaggt tgatgtgcac gcggacgtcg taatgtacaa attcggtagt	3420
tcttgcatt cgcacaagct ttcaatcatc aaggacatca tgaccactcc gtacttgaca	3480
ctagggtggt ttctattcag cgtggagatg tatgaggtgc gtatgggcgt gaattacttc	3540
aagattacga agtccgaagt atcgccatgc attagctgca ccaagctcct gagataccga	3600
agagctaata gtgacgtggt taaagttaaa cttccacgtt tcgataagaa acgtcgcgtg	3660
tgtctgcctg ggtatgacac catataccta gattcgaagt ttgtgagtcg cgttttcgat	3720
tatgtcgtgt gtaattgctc tgccgtgaac tcaaaaactt tcgagtgggt gtggagtttc	3780
attaagtcta gtaagtcgag ggtgattatt agcggtaaaa taattcaciaa ggatgtgaat	3840
ttggacctta agtacgtcga gagtttcgcc gcggttatgt tggcctctgg cgtgcgcagc	3900
agactagcgt ccgagtacct tgctaagaac cttagtcatt ttccgggaga ttgctccttt	3960
attgaagcca cgtctttcgt gttgcgtgag aaaatcagaa acatgactct gaattttaac	4020
gaaagacttt tacagttagt gaagcgcgtt gcctttgcga ccttgagcgt gagttttcta	4080
gatttagatt caactcttga atcaataact gattttgccg agtgaaggt agcgattgaa	4140
ctcgacgagt tgggttgctt gagagcggag gccgagaatg aaaaaatcag gaatctggcg	4200
ggagattcga ttgcggctaa actcgcgagc gagatagtgg tcgatattga ctctaagcct	4260
tcaccgaagc aggtgggtaa ttcgatcatcc gaaaacgccg ataagcggga agttcagagg	4320
cccggtttgc gtggtggttc tagaaacggg gttggtgggg agttccttca cttcgtcgtg	4380
gattctgcct tgcgtctttt caaatcgcg acggatcaac aacggatcaa gtcttacgtg	4440
cgtttcttgg actcggcggg ctcatctctg gattacaact acgataatct atcgtttata	4500
ctgcgagtg tttcggaagg ttattcgtgt atgttcgcgt ttttggcgaa tcgcggcgac	4560
ttatctagtc gtgtccgtag cgcggtgcgt gctgtgaaag aagttgctac ctcatgcgcg	4620
aacgcgagcg tttctaaagc caaggttatg attaccttcg cagcggccgt gtgtgctatg	4680

ES 2 478 041 T3

atgtttaata gctgcggttt ttcaggcgac ggtcgggagt ataaatcgta tatacatcgt	4740
tacacgcaag tattgtttga cactatcttt tttagaggaca gcagttacct acccatagaa	4800
gttctgagtt cggcgatatg cggtgctatc gtcacacttt tctcctcggg ctcgctcata	4860
agtttaaacg ccttcttact tcaaattacc aaaggattct ccctagaggt tgcgtccgg	4920
aatgttgtgc gagtcacgca tggtttgagc accacagcga ccgacggcgt catacgtggg	4980
gttttctccc aaatttgtgc tcaacttactt gttggaaata ccggtaatgt ggcttaccag	5040
tcagctttca ttgccggggt ggtgcctctt ttagttaaaa agtgtgtgag cttaatcttc	5100
atcttgctg aagatactta ttccggtttt attaaagcac gaatcagtga attctctttc	5160
cttagtagta ttctgaagtt cttgaagggt aagcttgtgg acgagttgaa atcgattatt	5220
caaggggttt ttgattccaa caagcacgtg tttaaagaag ctactcagga agcgattcgt	5280
acgacgggtca tgcaagtgcc tgctgctgta gtggatgccc ttaagagcgc cgcgggaaaa	5340
atttataaca attttactag tcgacgtacc tttagtaagg atgaaggctc ctctagcgac	5400
ggcgcatgtg aagagtattt ctcatgcgac gaagggtgaag gtccgggtct gaaagggggt	5460
tccagctatg gcttctcaat tttagcgttc ttttcacgca ttatgtgggg agctcgtcgg	5520
cttattgtta aagtgaagca tgagtgtttt gggaaacttt ttgaatttct atcgctcaag	5580
cttcacgaat tcaggactcg cgtttttggg atgaatagaa cggacgtggg agtttacgat	5640
tttttgccca cggacatcgt ggaaacgctc tcacgatag aagagtgcga ccaaattgaa	5700
gaacttctcg gcgacgacct gaaagggtgac aaggatgctt cgttgaccga tatgaattac	5760
tttgagttct cagaagactt cttagcctct gtcgaggagc cgcctttcgc tggattgcga	5820
ggaggtagca agaacgtcgc gattttggcg attttggaat acgcgcataa tttgtttcgc	5880
attgtcgcaa gcaagtgttc gaaacgacct ttatttcttg ctttcgccga actctcaagc	5940
gcccttateg agaaatttaa ggaggttttc cctcgtaaga gccagctcgt cgctatcgtg	6000
cgcgagtata cttagagatt cctccgaagt cgcagcgtg cgttggggtt gaataacgag	6060
ttcgtggtaa aatctttcgc cgatttgcta cccgcattaa tgaagcggaa ggtttcaggt	6120
tcgttcttag ctagtgttta tcgccactt agagggttct catatatgtg tgtttcagcg	6180
gagcgacgtg aaaagttttt tgctctcgtg tgtttaatcg ggttaagtct ccctttcttc	6240
gtgcgcatcg taggagcgaa agcgtgcgaa gaactcgtgt cctcagcgcg tcgcttttat	6300
gagcgtatta aaatttttct caggcagaag tatgtctctc tttctaattt cttttgtcac	6360
ttgtttagct ctgacgttga tgacagttcc gcatcagcag ggttgaaagg tggcgctcg	6420
cgaatgacgc tcttccacct tctggttcgc cttgctagtg ccctcctatc gttagggtgg	6480

ES 2 478 041 T3

gaaggggttaa agctactctt atcgcaccac aacttggttat ttttgtgttt tgcattgggtt	6540
gacgatgtga acgtccttat caaagttctt ggggggtcttt ctttctttgt gcaaccagtc	6600
ttttccttgt ttgcggcgat gcttttaciaa ccggacaggt ttgtggggta ttccgagaaa	6660
cttgttacag cgtttgaatt tttcttaaaa tgttcgcctc gcgcgcctgc actactcaaa	6720
gggttttttg agtgcggtgc gaacagcact gtgtcaaaaa ccgttcgaag acttcttcgc	6780
tatttcgtga ggatgctcaa acttcgaaaa gggcgaggggt tgcgtgcgga tggtaggggt	6840
ctccatcggc agaaagccgt acccgctcata ccttctaatac gggtcgtgac cgacgggggt	6900
gaaagacttt cggtaaagat gcaaggagtt gaagcgttgc gtaccgaatt gagaatctta	6960
gaagatttag attctgccgt gatcgaaaaa ctcaatagac gcagaaatcg tgacactaat	7020
gacgacgaat ttacgcgccc tgctcatgag cagatgcaag aagtcaccac tttctgttcg	7080
aaagccaact ctgctggttt ggccctggaa agggcagtc ttgtggaaga cgctataaag	7140
tcggagaaac tttctaagac ggttaatgag atggtgagga aaggagtag caccagcgaa	7200
gaagtggccg tcgctttgtc ggacgatgaa gccgtggaag aaatctctgt tgctgacgag	7260
cgagacgatt cgcctaagac agtcaggata agcgaatacc taaatagggt aaactcaagc	7320
ttcgaattcc cgaagcctat tgttggtggac gacaacaagg ataccggggg tctaacgaac	7380
gccgtgaggg agttttatta tatgcaagaa cttgctcttt tcgaaatcca cagcaaactg	7440
tgcgcctact acgatcaact gcgcatagtc aacttcgata gttccgtagc accatgcagc	7500
gaagatgctc agctgtacgt acggaagagc ggctcaacga tagtgacagg taaagaggta	7560
cgtttgcaca ttaaggattt ccacgatcac gatttcctgt ttgacgggaa aatttctatt	7620
aacaagcggc ggcgagggcg aaacgtttta tatcacgaca acctcgcgtt cttggcgagt	7680
aatttgttct tagccggcta ccccttttca aggagcttcg tcttcacgaa ttcgtcggtc	7740
gatatttctc tctacgaagc tccacccgga ggtggttaaga cgacgacgct gattgactcg	7800
ttcttgaagg tcttcaagaa agtgagggtt tccaccatga tcttaaccgc caacaaaagt	7860
tcgcaggttg agatcctaaa gaaagtggag aaggaagtgt ctaacattga atgccagaaa	7920
cgtaaagaca agagatctcc gaaaaagagc atttacacca tcgacgctta tttaatgcat	7980
caccgtgggt gtgatgcaga cgttcttttc atcgatgagt gtttcatggt tcatgcgggt	8040
agcgtactag cttgcattga gttcacgagg tgcataaag taatgatctt cggggatagc	8100
cggcagattc actacattga aaggaacgaa ttggacaagt gtttgtatgg ggatctcgat	8160
aggttcgtgg acctgcagtg tcgggtttat ggtaaatatt cgtaccgttg tccatgggat	8220
gtgtgcgctt ggtaagcac agtgatggc aacctaatcg ccaccgtgaa gggtgaaagc	8280
gaaggtaaga gcagcatgcg cattaacgaa attaatcag tcgacgattt agtccccgac	8340

ES 2 478 041 T3

gtgggttcca cgtttctgtg tatgcttcag tcggagaagt tggaaatcag caagcacttt	8400
attcgcaagg gtttgcctaa acttaacgtt ctaactgtgc atgaggcgca aggtgagacg	8460
tatgcgcgtg tgaaccttgt gcgacttaag tttcaggagg atgaaccctt taaatctatc	8520
aggcacataa ccgtcgtctt ttctcgtcac accgacagct taacttataa cgtcttagct	8580
gctcgtcgag gtgacgccac ttgcgatgcc atccagaagg ctgcggaatt ggtgaacaag	8640
tttcgcgttt ttcctacatc ttttgggtgg agtggttatca atctcaacgt gaaaaaggac	8700
gtggaagata acagtaggtg caaggcttcg tcggcaccat tgagcgtaat caacgacttt	8760
ttgaacgaag ttaatcccgg tactgcggtg attgattttg gtgatttgtc cgcggacttc	8820
agtactgggc cttttgagtg cgggtgccagc ggtattgtgg tgcgggacaa catctcctcc	8880
agcaacatca ctgatcacga taagcagcgt gtttagcgta gttcggtcgc aggcgattcc	8940
gcgtagaaaa ccttctctac aagaaaattt gtattcgttt gaagcgcgga attataactt	9000
ctcgacttgc gaccgttaca catctgcttc aatgttcgga gaggctatgg cgatgaactg	9060
tcttcgtcgt tgcttcgacc tagatgcctt ttcgtccctg cgtaatgatg tgattagtat	9120
cacacgttca ggcacgaac aatggctgga gaaacgtact cctagtcaga ttaaagcatt	9180
aatgaaggat gttgaatcgc ctttggaat tgacgatgaa atttgtcgtt ttaagttgat	9240
ggtgaagcgt gacgctaagg tgaagttaga ctcttcttgt ttaactaaac acagcggcgc	9300
tcaaaatata atgtttcata gcaagagcat taatgctata ttctctccta tctttaacga	9360
ggtgaaaaac cgaataatgt gctgtcttaa gcctaacata aagtttttta cggagatgac	9420
taacagggat tttgcttctg ttgtcagcaa catgcttggg gacgacgatg tgtaccatat	9480
aggngaagtt gatttctcaa agtacgacaa gtctcaagat gctttcgtga aggcctttga	9540
agaagtgatg tataaggaac tcggtgttga tgaagagttg ctggctatct ggaagtgcgg	9600
cgagcggtta tcgatagcta acactctcga tggtcagttg tccttcacga tcgagaatca	9660
aaggaagtcg ggagcttcga acacttggat tggtaactct ctcgtcactt tgggtatttt	9720
aagtctttac tacgacgtta gaaatttcga ggcgttgtac atctcgggcg atgattcttt	9780
aattttttct cgcagcgaga ttctgaatta tgccgacgac atatgactg acatgggttt	9840
tgagacaaaa tttatgtccc caagtgtccc gtacttttgt tctaaatttg ttgttatgtg	9900
tggtcataag acgttttttg ttcccgaccc gtacaagctt tttgtcaagt tgggagcagt	9960
caaagaggat gtttcaatgg atttcctttt cgaaactttt acctccttta aagacttaac	10020
ctccgatttt aacgacgagc gcttaattca aaagctcgct gaacttgtgg ctttaaaata	10080
tgaggttcaa accggcaaca ccacctgggc gttaagtgtg atacattgtt tgcgttcgaa	10140

ES 2 478 041 T3

tttcctctcg tttagcaagt tgtatcctcg cgtgaaggga tggcaggttt tttacacgtc	10200
ggttaagaaa gcgcttctca agagtgggtg ttctctcttc gacagtttca tgaccccttt	10260
tggtcaggct gtcattggtt gggatgatga gtagcgctaa cttgtgcgca gtttctttgt	10320
tcgtgacata caccttgtgt gtcaccgtgc gtttatacgg tccgggtatt caacatgatg	10380
aaaagtctca cgaagaagta caaacgagtg aatggtctgc gtgcgttctg ttgcgcgtgc	10440
gaagatctat atctaaccgt cgcaccaata atgtcagaac gctttaagac taaagccgta	10500
gggatgaaag gtttgcctgt tggaaaggaa tacttaggcg ccgactttct ttcgggaact	10560
agcaaaactga tgagcgatca cgacagggcg gtctccatcg ttgcagcgaa aaacgctgtc	10620
gatcgtagcg ctttcacggg tggggagaga aagatagtta gtttgtatga tctagggagg	10680
tactaagcac ggtgtgctat agtgcgtgct ataataataa aactagtgc ttaagtgcg	10740
cagaagaaaa cgcttaatta atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc	10800
ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gtccagcgtg tccggcgagg	10860
gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc	10920
tgcccggtcc ctggcccacc ctctgacca ccctgacctg cggcggtcag tgcttcagcc	10980
gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg	11040
tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga	11100
agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tctagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg	11160
acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca	11220
tggccgacaa gcagaagaac ggcattcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg	11280
acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg	11340
tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca ccaggtccgc cctgagcaaa gaccccaacg	11400
agaagcgcgga tcacatggtc ctgctggagt tctgtaccgc cgccgggac actctcggca	11460
tggacgagct gtacaagtcc ctagggatgg tccgtcctgt agaaaccca acccgtgaaa	11520
tcaaaaaact cgacggcctg tgggcattca gtctggatcg cgaaaactgt ggaattgatc	11580
agcgttggtg ggaaagcgcg ttacaagaaa gccgggcaat tgctgtgcca ggcagtttta	11640
acgatcagtt cgccgatgca gatattcgta attatgcggg caacgtctgg tatcagcgcg	11700
aagtctttat accgaaagggt tgggcaggcc agcgtatcgt gctgcgtttc gatgcgggtca	11760
ctcattacgg caaagtgtgg gtcaataatc aggaagtgat ggagcatcag ggcggctata	11820
cgccatttga agccgatgtc acgccgatg ttattgcccg gaaaagtgt cgtatcaccg	11880
tttgtgtgaa caacgaactg aactggcaga ctatcccgcc gggaatggtg attaccgacg	11940
aaaacggcaa gaaaaagcag tcttacttcc atgatttctt taactatgcc ggaatccatc	12000

ES 2 478 041 T3

gcagcgtaat gctctacacc acgccgaaca cctgggtgga cgatatcacc gtggtgacgc	12060
atgtcgcgca agactgtaac caccgctctg ttgactggca ggtgggtggcc aatggtgatg	12120
tcagcgttga actgctgat gcggatcaac aggtggttgc aactggacaa ggcactagcg	12180
ggactttgca agtgggtgaat ccgcacctct ggcaaccggg tgaaggttat ctctatgaac	12240
tgtgcgtcac agccaaaagc cagacagagt gtgatatcta cccgcttcgc gtcggcatcc	12300
ggtcagtggc agtgaagggc gaacagttcc tgattaacca caaaccttc tactttactg	12360
gctttggtcg tcatgaagat gcggacttgc gtggcaaagg attcgataac gtgctgatgg	12420
tgcacgacca cgcattaatg gactggattg gggccaactc ctaccgtacc tcgcattacc	12480
cttacgctga agagatgctc gactgggcag atgaacatgg catcgtggtg attgatgaaa	12540
ctgctgctgt cggctttaac ctctctttag gcattggttt cgaagcgggc aacaagccga	12600
aagaactgta cagcgaagag gcagtcaacg gggaaactca gcaagcgcac ttacaggcga	12660
ttaaagagct gatagcgcgt gacaaaaacc acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcc	12720
acgaaccgga taccctccg caaggtgcac gggaatatct cgcgccactg gcggaagcaa	12780
cgcgtaaaact cgaccgcagc cgtccgatca cctgcgtcaa tgtaatgttc tgcgacgctc	12840
acaccgatac catcagcgat ctctttgatg tgctgtgcct gaaccgttat tacggatggt	12900
atgtccaaag cggcgatttg gaaacggcag agaaggact ggaaaaagaa cttctggcct	12960
ggcaggagaa actgcatcag ccgattatca tcaccgaata cggcgtggat acgttagccg	13020
ggctgcactc aatgtacacc gacatgtgga gtgaagagta tcagtgtgca tggctggata	13080
tgtatcaccg cgtctttgat cgcgtcagcg ccgtcgtcgg tgaacaggta tggaatttcg	13140
ccgattttgc gacctcgaa ggcataatgc gcgttgccg taacaagaaa gggatcttca	13200
ctcgcgaccg caaacccaag tcggcggtt ttctgctgca aaaacgctg actggcatga	13260
acttcggtga aaaaccgcag cagggaggca aacaatgagg ccggcctttg cggttactta	13320
cgagtgtcag gacgtgggga ggtgacgtgt tgcaaccgtg aggaattaac aagagatttt	13380
gagggcaatc atcatcgggt gatccgttct agaatcatc aatatgacag cgagtctgct	13440
tttgaggaat tcaacaactc tgattgcgta gtgaagtttt tcctagagac tggtagtctc	13500
ttttggtttt tccttcgaag tgaaaccaa ggtagagcgg tgcgacattt gcgcaccttc	13560
ttcgaagcta acaatttctt ctttgatcg cattgcggtta ccatggagta ttgtttgaag	13620
caggtactat ctgaaactga atctataatc gattcttttt gcgaagaaag aaatcgtaa	13680
gatgaggggt atagtgtctc cttatgaagc tgaagacatt ctgaaaagat cgactgacat	13740
gttacgaaac atagacagtg ggtcttgag cactaaagaa tgtatcaagg cattctcgac	13800

ES 2 478 041 T3

gataacgcga gacctacatt gtgcgaaggc ttcctaccag tggggtgttg acactgggtt 13860
 atatcagcgt aattgcgctg aaaaacattt aattgacacg gtggagtcaa acatacgggtt 13920
 ggctcaacct ctctgctgctg aaaaagtggc ggttcatttt tgtaaggatg aacccaaaaga 13980
 gctagtagca ttcatacgcg gaaagtacgt ggaactcacg ggcgtgggag tgagagaagc 14040
 ggtgaagagg gaaatgcgct ctcttaccaa aacagtttta aataaaatgt ctttggaat 14100
 ggcgttttac atgtcaccac gagcgtggaa aaacgctgaa tggttagaac taaaattttc 14160
 acctgtgaaa atcttttagag atcttttatt agacgtggaa acgctcaacg aattgtgcgc 14220
 cgaagatgat gttcacgtcg acaaagtaaa tgagaatggg gacgaaaatc acgacctcga 14280
 actccaagac gaatgttaaa cattgggttaa gtttaacgaa aatgattagt aaataataaa 14340
 tcgaacgtgg gtgtatctac ctgacgtatc aacttaagct gttactgagt aattaaacca 14400
 acaagtgttg gtgtaatgtg tatgttgatg tagagaaaaa tccgtttgta gaacgggtgtt 14460
 tttctcttct ttatttttaa aaaaaataa aaaaaaaaaa aaagaagc 14508

<210>3

<211> 1716

5 <212> ADN

<213> Virus del enrollamiento de la vid 2

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1716)

<400>3

atg tct agc ctt gct atc tct gcc ctt ccc tgt tca gtc gct caa ctg 48
 Met Ser Ser Leu Ala Ile Ser Ala Leu Pro Cys Ser Val Ala Gln Leu
 1 5 10 15
 agc gtt ggt cag cct gtt gcc acg gtt gcc agg tca ttt ttg atg act 96
 Ser Val Gly Gln Pro Val Ala Thr Val Ala Arg Ser Phe Leu Met Thr
 20 25 30
 tcc ctt ccg tcc ctt cag act tac cca tct tcg tct gag ttg act tcc 144
 Ser Leu Pro Ser Leu Gln Thr Tyr Pro Ser Ser Ser Glu Leu Thr Ser
 35 40 45
 ttt tta ttt tgt ttt ggt gct ttc caa aaa ata aaa atg ttt tta tct 192
 Phe Leu Phe Cys Phe Gly Ala Phe Gln Lys Ile Lys Met Phe Leu Ser
 50 55 60
 ttc cta cgt tcg gtg cac gtc ttt gcg cct ttt tct gaa att tcc acg 240
 Phe Leu Arg Ser Val His Val Phe Ala Pro Phe Ser Glu Ile Ser Thr
 65 70 75 80
 att ggt tca tgc tat gaa ttc att cgg ttg gga ggt ggt gct tac cct 288
 Ile Gly Ser Cys Tyr Glu Phe Ile Arg Leu Gly Gly Gly Ala Tyr Pro
 85 90 95
 ctc ttt ttc tgt tcc ttc caa tgc gga cct ttg tcc gtt tct ttg ggt 336

ES 2 478 041 T3

Leu	Phe	Phe	Cys	Ser	Phe	Gln	Cys	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Ser	Leu	Gly	
			100					105					110			
ttt	ggt	aac	ggc	ggt	ttt	gct	ggt	tta	aac	atg	tca	ttt	cct	ttc	tta	384
Phe	Val	Asn	Gly	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Asn	Met	Ser	Phe	Pro	Phe	Leu	
		115					120					125				
agc	aac	gca	tct	ctt	ttg	acg	ggc	gtc	gga	aaa	aat	ggt	ggt	caa	gag	432
Ser	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn	Val	Val	Gln	Glu	
		130					135				140					
aaa	ata	aaa	att	tcc	aaa	ttt	gag	aag	aaa	cag	aag	aag	cgc	ggt	ttt	480
Lys	Ile	Lys	Ile	Ser	Lys	Phe	Glu	Lys	Lys	Gln	Lys	Lys	Arg	Val	Phe	
145					150					155					160	
tcg	ata	gct	cgc	gct	acc	gcg	cgt	cat	gtg	cct	tcc	cgt	cgc	aat	cct	528
Ser	Ile	Ala	Arg	Thr	Ala	Arg	His	Val	Pro	Ser	Arg	Arg	Arg	Asn	Pro	
			165					170						175		
aag	gag	aag	cgt	ggt	gtc	cat	gta	cag	cat	ctc	cct	agt	ggt	tct	tta	576
Lys	Glu	Lys	Arg	Val	Val	His	Val	Gln	His	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Leu	
		180						185					190			
cgc	ttt	tcc	caa	aac	aaa	aac	aaa	aca	gaa	ctg	ctc	atc	tta	aaa	gag	624
Arg	Phe	Ser	Gln	Asn	Lys	Asn	Lys	Thr	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Glu	
		195					200					205				
gaa	gtc	gga	att	gtc	gcg	cgc	ggt	aag	tgt	tcg	gca	agc	gtc	gtg	cgc	672
Glu	Val	Gly	Ile	Val	Ala	Arg	Val	Lys	Cys	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Arg	
	210					215					220					
cgt	cgc	ggt	tgt	ggc	ggt	gtg	ggt	aag	tgc	aaa	ccc	cta	ata	gcc	ggt	720
Arg	Arg	Val	Cys	Gly	Gly	Val	Val	Lys	Cys	Lys	Pro	Leu	Ile	Ala	Val	
225				230						235					240	
tct	ccc	tct	ggc	gtg	aaa	ttc	cgt	tgt	ttc	gcg	ccg	tct	tgc	agc	acg	768
Ser	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Phe	Arg	Cys	Phe	Ala	Pro	Ser	Cys	Ser	Thr	
			245						250					255		
tcc	gct	tgt	tta	aag	ctc	aaa	atc	atg	cgc	cgt	ggt	gcc	gtc	ggt	gac	816
Ser	Ala	Cys	Leu	Lys	Leu	Lys	Ile	Met	Arg	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Asp	
		260						265					270			
tgc	cga	ggt	gag	aag	ata	atc	gcg	gca	cga	cgt	gcg	gcg	ctg	cag	aag	864
Cys	Arg	Gly	Glu	Lys	Ile	Ile	Ala	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Leu	Gln	Lys	
		275					280					285				
cag	gct	ttc	aac	agc	cgc	aca	ccg	aag	aaa	gtg	cga	gag	aac	ccc	att	912
Gln	Ala	Phe	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Lys	Lys	Val	Arg	Glu	Asn	Pro	Ile	
	290					295					300					
agc	gtc	tcc	ggg	gtg	aac	ttg	gga	agg	tct	gcc	gcc	gct	cag	ggt	att	960
Ser	Val	Ser	Gly	Val	Asn	Leu	Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Ala	Gln	Val	Ile	
305					310					315					320	
tat	ttc	ggc	agt	ttc	acg	cag	ccc	ttc	gcg	ttg	tat	ccg	cgc	caa	gag	1008
Tyr	Phe	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Phe	Ala	Leu	Tyr	Pro	Arg	Gln	Glu	
			325					330						335		
agc	gcg	atc	gta	aaa	acg	caa	cct	cca	ccg	gtc	agt	gta	gtg	aag	gtg	1056
Ser	Ala	Ile	Val	Lys	Thr	Gln	Pro	Pro	Pro	Val	Ser	Val	Val	Lys	Val	

ES 2 478 041 T3

340	345	350	
gag tgc gta gct gcg gag gta gct ccc gac agg ggc gtg gtc gac aag			1104
Glu Cys Val Ala Ala Glu Val Ala Pro Asp Arg Gly Val Val Asp Lys			
355	360	365	
aaa cct acg tct gtt ggc gtt ccc ccg cag cgc ggt gtg ctt tct ttt			1152
Lys Pro Thr Ser Val Gly Val Pro Pro Gln Arg Gly Val Leu Ser Phe			
370	375	380	
ccg acg gtg gtt cgg aac cgc ggc gac gtg ata atc aca ggg gtg gtg			1200
Pro Thr Val Val Arg Asn Arg Gly Asp Val Ile Ile Thr Gly Val Val			
385	390	395	400
cat gaa gcc ctg aag aaa att aaa gac ggg ctc tta cgc ttc cgc gta			1248
His Glu Ala Leu Lys Lys Ile Lys Asp Gly Leu Leu Arg Phe Arg Val			
405	410	415	
ggc ggt gac atg cgt ttt tcg aga ttt ttc tca tcg aac tac ggc tgc			1296
Gly Gly Asp Met Arg Phe Ser Arg Phe Phe Ser Ser Asn Tyr Gly Cys			
420	425	430	
aga ttc gtc gcg agc gtg cgt acg aac act aca gtt tgg cta aat tgc			1344
Arg Phe Val Ala Ser Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Trp Leu Asn Cys			
435	440	445	
acg aaa gcg agt ggt gag aaa ttc tca ctc gcc gcc gcg tgc acg gcg			1392
Thr Lys Ala Ser Gly Glu Lys Phe Ser Leu Ala Ala Ala Cys Thr Ala			
450	455	460	
gat tac gtg gcg atg ctg cgt tat gtg tgt ggc ggg aaa ttt cct ctc			1440
Asp Tyr Val Ala Met Leu Arg Tyr Val Cys Gly Gly Lys Phe Pro Leu			
465	470	475	480
gtc ctc atg agt aga gtt att tac ccg gat ggg cgc tgt tac ttg gcc			1488
Val Leu Met Ser Arg Val Ile Tyr Pro Asp Gly Arg Cys Tyr Leu Ala			
485	490	495	
cat atg agg tat ttg tgc gcc ttt tac tgt cgc ccg ttt aga gag tcg			1536
His Met Arg Tyr Leu Cys Ala Phe Tyr Cys Arg Pro Phe Arg Glu Ser			
500	505	510	
gat tat gcc ctc gga atg tgg cct acg gtg gcg cgt ctc agg gca tgc			1584
Asp Tyr Ala Leu Gly Met Trp Pro Thr Val Ala Arg Leu Arg Ala Cys			
515	520	525	
gtt gag aag aac ttc ggt gtc gaa gct tgt ggc ata gct ctt cgt ggc			1632
Val Glu Lys Asn Phe Gly Val Glu Ala Cys Gly Ile Ala Leu Arg Gly			
530	535	540	
tat tac acc tct cgc aat gtt tat cac tgt gat tat gac tct gct tat			1680
Tyr Tyr Thr Ser Arg Asn Val Tyr His Cys Asp Tyr Asp Ser Ala Tyr			
545	550	555	560
gta aaa tat ttt aga aac ctt tcc ggc cgc att ggc			1716
Val Lys Tyr Phe Arg Asn Leu Ser Gly Arg Ile Gly			
565	570		

<210>4

<211> 572

<212> PRT

<213> Virus del enrollamiento de la vid 2

<400> 4

ES 2 478 041 T3

Met Ser Ser Leu Ala Ile Ser Ala Leu Pro Cys Ser Val Ala Gln Leu
1 5 10 15

Ser Val Gly Gln Pro Val Ala Thr Val Ala Arg Ser Phe Leu Met Thr
20 25 30

Ser Leu Pro Ser Leu Gln Thr Tyr Pro Ser Ser Ser Glu Leu Thr Ser
35 40 45

Phe Leu Phe Cys Phe Gly Ala Phe Gln Lys Ile Lys Met Phe Leu Ser
50 55 60

Phe Leu Arg Ser Val His Val Phe Ala Pro Phe Ser Glu Ile Ser Thr
65 70 75 80

Ile Gly Ser Cys Tyr Glu Phe Ile Arg Leu Gly Gly Gly Ala Tyr Pro
85 90 95

Leu Phe Phe Cys Ser Phe Gln Cys Gly Pro Leu Ser Val Ser Leu Gly
100 105 110

Phe Val Asn Gly Val Phe Ala Val Leu Asn Met Ser Phe Pro Phe Leu
115 120 125

Ser Asn Ala Ser Leu Leu Thr Gly Val Gly Lys Asn Val Val Gln Glu
130 135 140

Lys Ile Lys Ile Ser Lys Phe Glu Lys Lys Gln Lys Lys Arg Val Phe
145 150 155 160

Ser Ile Ala Arg Ala Thr Ala Arg His Val Pro Ser Arg Arg Asn Pro
165 170 175

Lys Glu Lys Arg Val Val His Val Gln His Leu Pro Ser Gly Ser Leu
180 185 190

Arg Phe Ser Gln Asn Lys Asn Lys Thr Glu Leu Leu Ile Leu Lys Glu
195 200 205

Glu Val Gly Ile Val Ala Arg Val Lys Cys Ser Ala Ser Val Val Arg
210 215 220

ES 2 478 041 T3

Arg Arg Val Cys Gly Gly Val Val Lys Cys Lys Pro Leu Ile Ala Val
 225 230 235 240
 Ser Pro Ser Gly Val Lys Phe Arg Cys Phe Ala Pro Ser Cys Ser Thr
 245 250 255
 Ser Ala Cys Leu Lys Leu Lys Ile Met Arg Arg Val Ala Val Gly Asp
 260 265 270
 Cys Arg Gly Glu Lys Ile Ile Ala Ala Arg Arg Ala Ala Leu Gln Lys
 275 280 285
 Gln Ala Phe Asn Ser Arg Thr Pro Lys Lys Val Arg Glu Asn Pro Ile
 290 295 300
 Ser Val Ser Gly Val Asn Leu Gly Arg Ser Ala Ala Ala Gln Val Ile
 305 310 315 320
 Tyr Phe Gly Ser Phe Thr Gln Pro Phe Ala Leu Tyr Pro Arg Gln Glu
 325 330 335
 Ser Ala Ile Val Lys Thr Gln Pro Pro Pro Val Ser Val Val Lys Val
 340 345 350
 Glu Cys Val Ala Ala Glu Val Ala Pro Asp Arg Gly Val Val Asp Lys
 355 360 365
 Lys Pro Thr Ser Val Gly Val Pro Pro Gln Arg Gly Val Leu Ser Phe
 370 375 380
 Pro Thr Val Val Arg Asn Arg Gly Asp Val Ile Ile Thr Gly Val Val
 385 390 395 400
 His Glu Ala Leu Lys Lys Ile Lys Asp Gly Leu Leu Arg Phe Arg Val
 405 410 415
 Gly Gly Asp Met Arg Phe Ser Arg Phe Phe Ser Ser Asn Tyr Gly Cys
 420 425 430
 Arg Phe Val Ala Ser Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Trp Leu Asn Cys
 435 440 445
 Thr Lys Ala Ser Gly Glu Lys Phe Ser Leu Ala Ala Ala Cys Thr Ala
 450 455 460
 Asp Tyr Val Ala Met Leu Arg Tyr Val Cys Gly Gly Lys Phe Pro Leu

ES 2 478 041 T3

465		470		475		480									
Val	Leu	Met	Ser	Arg	Val	Ile	Tyr	Pro	Asp	Gly	Arg	Cys	Tyr	Leu	Ala
				485					490					495	
His	Met	Arg	Tyr	Leu	Cys	Ala	Phe	Tyr	Cys	Arg	Pro	Phe	Arg	Glu	Ser
			500					505					510		
Asp	Tyr	Ala	Leu	Gly	Met	Trp	Pro	Thr	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala	Cys
		515					520					525			
Val	Glu	Lys	Asn	Phe	Gly	Val	Glu	Ala	Cys	Gly	Ile	Ala	Leu	Arg	Gly
	530					535					540				
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Asn	Val	Tyr	His	Cys	Asp	Tyr	Asp	Ser	Ala	Tyr
545					550					555					560
Val	Lys	Tyr	Phe	Arg	Asn	Leu	Ser	Gly	Arg	Ile	Gly				
				565					570						

<210>5
 <211> 825
 <212> ADN
 <213> Virus del enrollamiento de la vid 2

<220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(825)

<400> 5

ES 2 478 041 T3

ggt ggt tgc ttc gat ccg aca tct tta acc tcc gta ata acg gtg aag	48
Gly Gly Ser Phe Asp Pro Thr Ser Leu Thr Ser Val Ile Thr Val Lys	
1 5 10 15	
att agc ggt ctt cca ggt ggt ctt cct aaa aat ata gcg ttt ggt gcc	96
Ile Ser Gly Leu Pro Gly Gly Leu Pro Lys Asn Ile Ala Phe Gly Ala	
20 25 30	
ttc ctg tgc gat ata cgt tac gtc gaa ccg gta gac tgc ggc ggc att	144
Phe Leu Cys Asp Ile Arg Tyr Val Glu Pro Val Asp Ser Gly Gly Ile	
35 40 45	
caa tgc agc gtt aag acg aaa cgt gaa gat gcg cac cga acc gta gag	192
Gln Ser Ser Val Lys Thr Lys Arg Glu Asp Ala His Arg Thr Val Glu	
50 55 60	
gaa cgg gcg gcc ggc gga tcc gtc gag caa ccg cga caa aag agg ata	240
Glu Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val Glu Gln Pro Arg Gln Lys Arg Ile	
65 70 75 80	
gat gag aaa ggt tgc ggc aga gtt cct agt gga ggt ttt tgc cat ctc	288
Asp Glu Lys Gly Cys Gly Arg Val Pro Ser Gly Gly Phe Ser His Leu	
85 90 95	

ES 2 478 041 T3

ctg gtc ggc agc ctt aac gaa gtt agg agg aag gta gct gcc gga ctt 336
 Leu Val Gly Ser Leu Asn Glu Val Arg Arg Lys Val Ala Ala Gly Leu
 100 105 110

cta cgc ttt cgc gtt ggc ggt gat atg gat ttt cat cgc tcg ttc tcc 384
 Leu Arg Phe Arg Val Gly Gly Asp Met Asp Phe His Arg Ser Phe Ser
 115 120 125

acc caa gcg ggc cac cgc ttg ctg gtg tgg cgc cgc tcg agc cgg agc 432
 Thr Gln Ala Gly His Arg Leu Leu Val Trp Arg Arg Ser Ser Arg Ser
 130 135 140

gtg tgc ctt gaa ctt tac tca cca tct aaa aac ttt ttg cgt tac gat 480
 Val Cys Leu Glu Leu Tyr Ser Pro Ser Lys Asn Phe Leu Arg Tyr Asp
 145 150 155 160

gtc ttg cct tgt tct gga gac tat gca gcg atg ttt tct ttc gcg gcg 528
 Val Leu Pro Cys Ser Gly Asp Tyr Ala Ala Met Phe Ser Phe Ala Ala
 165 170 175

ggc ggc cgt ttc cct tta gtt ttg atg act aga att aga tac ccg aac 576
 Gly Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Met Thr Arg Ile Arg Tyr Pro Asn
 180 185 190

ggg ttt tgt tac ttg gct cac tgc cgg tac gcg tgc gcg ttt ctc tta 624
 Gly Phe Cys Tyr Leu Ala His Cys Arg Tyr Ala Cys Ala Phe Leu Leu
 195 200 205

agg ggt ttt gat ccg aag cgt ttc gac atc ggt gct ttc ccc acc gca 672
 Arg Gly Phe Asp Pro Lys Arg Phe Asp Ile Gly Ala Phe Pro Thr Ala
 210 215 220

gcc aag ctc aga aac cgt atg gtt tcg gag ctt ggt gaa aga agt tta 720
 Ala Lys Leu Arg Asn Arg Met Val Ser Glu Leu Gly Glu Arg Ser Leu
 225 230 235 240

ggt ttg aac ttg tac ggc gca tat acg tca cgc ggc gtc ttt cac tgc 768
 Gly Leu Asn Leu Tyr Gly Ala Tyr Thr Ser Arg Gly Val Phe His Cys
 245 250 255

gat tat gac gct aag ttt ata aag gat ttg cgt ctt atg tca gca gtt 816
 Asp Tyr Asp Ala Lys Phe Ile Lys Asp Leu Arg Leu Met Ser Ala Val
 260 265 270

ata gct gga 825
 Ile Ala Gly
 275

<210>6
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Virus del enrollamiento de la vid 2
 <400> 6

Gly Gly Ser Phe Asp Pro Thr Ser Leu Thr Ser Val Ile Thr Val Lys
 1 5 10 15

ES 2 478 041 T3

Ile Ser Gly Leu Pro Gly Gly Leu Pro Lys Asn Ile Ala Phe Gly Ala
 20 25 30
 Phe Leu Cys Asp Ile Arg Tyr Val Glu Pro Val Asp Ser Gly Gly Ile
 35 40 45
 Gln Ser Ser Val Lys Thr Lys Arg Glu Asp Ala His Arg Thr Val Glu
 50 55 60
 Glu Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val Glu Gln Pro Arg Gln Lys Arg Ile
 65 70 75 80
 Asp Glu Lys Gly Cys Gly Arg Val Pro Ser Gly Gly Phe Ser His Leu
 85 90 95
 Leu Val Gly Ser Leu Asn Glu Val Arg Arg Lys Val Ala Ala Gly Leu
 100 105 110
 Leu Arg Phe Arg Val Gly Gly Asp Met Asp Phe His Arg Ser Phe Ser
 115 120 125
 Thr Gln Ala Gly His Arg Leu Leu Val Trp Arg Arg Ser Ser Arg Ser
 130 135 140
 Val Cys Leu Glu Leu Tyr Ser Pro Ser Lys Asn Phe Leu Arg Tyr Asp
 145 150 155 160
 Val Leu Pro Cys Ser Gly Asp Tyr Ala Ala Met Phe Ser Phe Ala Ala
 165 170 175
 Gly Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Met Thr Arg Ile Arg Tyr Pro Asn
 180 185 190
 Gly Phe Cys Tyr Leu Ala His Cys Arg Tyr Ala Cys Ala Phe Leu Leu
 195 200 205
 Arg Gly Phe Asp Pro Lys Arg Phe Asp Ile Gly Ala Phe Pro Thr Ala
 210 215 220
 Ala Lys Leu Arg Asn Arg Met Val Ser Glu Leu Gly Glu Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Leu Asn Leu Tyr Gly Ala Tyr Thr Ser Arg Gly Val Phe His Cys
 245 250 255
 Asp Tyr Asp Ala Lys Phe Ile Lys Asp Leu Arg Leu Met Ser Ala Val

260

265

270

Ile Ala Gly
275

5

<210>7
<211> 17588
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Vector viral obtenido por ingeniería genética
<400> 7

atattctgtt ggctttcatc tgtgcttggtg cttcggttca atcacactct gaaagtttca	60
gttccccgga atttcggttt tcttcataag ccttattctt acaggatgtc tagccttgct	120
atctctgccc ttcctgttc agtcgctcaa ctgagcgttg gtcagcctgt tgccacgggt	180
gccaggtcat ttttgatgac ttccttccg tcccttcaga cttacccatc ttcgtctgag	240
ttgacttcct ttttattttg ttttggtgct ttccaaaaaa taaaaatggt tttatctttc	300
ctacgttcgg tgcacgtctt tgcgcctttt tctgaaattt ccacgattgg ttcattgctat	360
gaattcatte ggttgggagg tgggtgcttac cctctctttt tctgttcctt ccaatgcgga	420
cctttgtccg tttcttttggg ttttggttaac ggcgtttttg ctgttttaaa catgtcattt	480
cctttcttaa gcaacgcac tcttttgacg ggcgtcggaa aaaatgttgt tcaagagaaa	540
ataaaaaattt ccaaatttga gaagaaacag aagaagcgcg ttttttcgat agctcgcgct	600
accgcgcgctc atgtgccttc ccgtcgcaat cctaaggaga agcgtgttgt ccatgtacag	660
catctcccta gtggttcttt acgcttttcc caaaacaaaa acaaaacaga actgctcatc	720
ttaaaagagg aagtcggaat tgtcgcgcgc gttaagtgtt cggcaagcgt cgtgcgccgt	780
cgcgtttgtg gcggtgtggt taagtgcgaa cccctaatag ccgtttctcc ctctggcgtg	840
aaattccggt gtttcgcgcc gtcttgacgc acgtccgctt gtttaaagct caaaatcatg	900
cgccgtgttg ccgtcgggtga ctgccgaggt gagaagataa tcgcggcacg acgtgcggcg	960
ctgcagaagc aggctttcaa cagccgcaca ccgaagaaaag tgcgagagaa cccattagc	1020
gtctccgggg tgaacttggg aaggctctgcc accgctcagg ttatttattt cggcagtttc	1080
acgcagccct tcgcgttgta tccgcgcaa gagagcgcga tcgtaaaaac gcaacctcca	1140
ccggtcagtg tagtgaaggt ggagtgcgta gctgcggagg tagctcccaa caggggcgtg	1200
gtcgacaaga aacctacgtc tgttggcgtt ccccgacgc gcggtgtgct ttcttttccg	1260
acggtgggtc ggaaccgcgg cgacgtgata atcgcagggg tgggtgcatga agccttgaag	1320
aaaattaaag acgggctctt acgcttccgc gtaggcggtg acatgcgttt ttcgagattt	1380

ES 2 478 041 T3

ttctcatcga actacggctg cagattcgtc gcgagcgtgc gtacgaacac tacagtttgg	1440
ctaaattgca cgaaagcgag tggtagagaaa ttctcactcg ccgccgcgtg cacggcggat	1500
tacgtggcga tgctgcgtta tgtatgtggc gggaaatttc ctctcgtcct catgagtaga	1560
gttattttacc cggaagggcg ctgttacttg gcccatatga ggtatttgtg cgccttttac	1620
tgtcgcccgt ttagagagtc ggattatgcc ctcggaatgt ggcctacggt ggcgcgtctc	1680
agggcatgcg ttgagaagaa cttcgggtgc gaagcttgtg gcatagctct tcgtggctat	1740
tacacctctc gcaatgttta tcaactgtgat tatgactctg cttatgtaaa atattttaga	1800
aacctttccg gccgcattgg cgggtggttcg ttcgatccga catctttaac ctccgtaata	1860
acggtgaaga ttagcgggtct tccaggtggc cttcctaata atatagcgtt tggcgccttc	1920
ctgtgcgata tacgttacgt cgaaccggta gactcgggcg gcattcaatc gagcgtaaag	1980
acgaaacgtg aagatgcgca ccgaaccgta gaggaacggg ccgccggcgg atccgtcgag	2040
caaccgcgac aaaagaggat agatgagaaa ggttgccgca gagttcctag tggaggtttt	2100
ccgcactctc tggcggcag ccttaacgaa gttaggagga aggtagctgc cggacttcta	2160
cgttttcgcg ttggcgggtga tatggatttt catcgctcgt tctccacca agcgggccac	2220
cgttgctggt tgtggcgccg ctcgagccgg agcgtgtgcc ttgaacttta ctaccatct	2280
aaaaactttt tgcgttgca tgtcttgccct tgttctggag actatgcagc gatgttttct	2340
ttcgcgccgg gcggccgttt ccttttagtt ttgatgacta gaattagata cccgaacggg	2400
ttttgttact tggctcactg ccggtacgcg tgcgcgtttc tcttaagggg ttttgatccg	2460
aagcgtttcg acatcgggtc tttccccacc gcggccaagc tcagaaaccg tatggtttcg	2520
gagcttggtg aaagaagttt aggtttgaac ttgtacggcg catatacgtc acgcggcgctc	2580
tttcaactgcg attatgacgc taagtttata aaggatttgc gtcttatgtc agcagttata	2640
gctggaaaagg acgggtgga agaggtggtg ccttctgaca taactoctgc catgaagcag	2700
aaaacgatcg aagccgtgta tgatagatta tatggcgga ctgactcgtt gctgaaactg	2760
agcatcgaga aagacttaat cgatttcaaa aatgacgtgc agagtttgaa gaaagatcgg	2820
ccgattgtca aagtgcctt ttacatgtcg gaagcaacac agaattcgct gacgcgtttc	2880
taccctcagt tcgaacttaa gttttcgcac tctcgcatt cagatcatcc cgccgccgcc	2940
gcttctagac tgctggaaaa tgaaacgtta gtgcgcttat gtggtaatag cgtttcagat	3000
attggaggtt gtcctctttt ccatttgcat tccaagacgc aaagacgggt tcacgtatgt	3060
aggcctgtgt tggatggcaa ggatgcgcag cgtcgcgtgg tgcgtgattt gcagtattcc	3120
aacgtgcgtt tgggagacga tgataaaatt ctggaagggc cagcaatat cgacatttgc	3180

ES 2 478 041 T3

cactatcctc tgggcgcgtg tgaccacgaa agtagtgcta tgatgatggt gcaggtgtat	3240
gacgcgtccc tttatgagat atgtggcgcc atgatcaaga agaaaagccg cataacgtac	3300
ttaaccatgg tcacgcccgg cgagtttctt gacggacgcg aatgcgtcta tatggagtcg	3360
ttagactgtg agattgaggt tgatgtgcac gcggacgtcg taatgtacaa attcggtagt	3420
tcttgctatt cgcacaagct ttcaatcatc aaggacatca tgaccactcc gtacttgaca	3480
ctaggtggtt ttctattcag cgtggagatg tatgaggtgc gtatgggcgt gaattacttc	3540
aagattacga agtccgaagt atcgcctagc attagctgca ccaagctcct gagatatcga	3600
agagctaata gcgacgtggt taaagttaaa cttccacgtt tcgataagaa acgtcgcgatg	3660
tgtctgcctg ggtatgacac catataccta gattcgaagt ttgtgagtcg cgttttcgat	3720
tatgtcgtgt gtaattgctc tgccgtgaac tcaaaaactt tcgagtgggt gtggagtttc	3780
attaagtcta gcaagtcgag ggtgattatt agcggtaaaa taattcacaa ggatgtgaat	3840
ttggacctca agtacgtcga gagtttcgcc gcggttatgt tggcctctgg cgtgcgcagc	3900
agactagcgt ccgagtacct tgctaagaac cttagtcatt tttcgggaga ttgctccttt	3960
attgaagcca cgtctttcgt gttgcgtgag aaaatcagaa acatgactct gaattttaac	4020
gaaagacttt tacagttagt gaagcgcgtt gcctttgcga ccttgacgt gagttttcta	4080
gatttagatt caactcttga atcaataact gattttgccg agtgtaaggt agcgattgaa	4140
ctcgacgagt tgggttgctt gagagcggag gccgagaatg aaaaaatcag gaatctagcg	4200
ggagattcga ttgcggctaa actcgcgagc gagatagtgg tcgatattga ctctaagcct	4260
tcaccgaagc aggtgggtaa ttcgtcatcc gaaaacgccg ataagcggga agttcagagg	4320
cccggtttgc gtggtggttc taggaacggg gttgttgggg agttccttca cttcgtcgtg	4380
gattctgcct tgcgtctttt cagatacgcg acggatcaac aacggatcaa gtcttacgtg	4440
cgtttcttgg actcggcgggt ctcatctttg gattacaact acgataatct atcgtttata	4500
ctgcgagtgc tttcggaaag ttattcgtgt atgttcgctt ttttggcgaa tcgcggcgac	4560
ttatctagtc gtgtccgtag cgcggtgctg gctgtgaaag aagttgctac ctcatgcgcg	4620
aacgcgagcg tttctaaagc caaggttatg attaccttcg cagcgccgt gtgtgctatg	4680
atgtttaata gctgcggttt ttcaggcgac ggtcgggagt ataaatcgta tatacatcgt	4740
tacacgcaag tattgttcga cactatcttt tttgaggaca gcagttacct acccatagaa	4800
gttctgagtt cggcgatatg cgggtctatc gtcacacttt tctcctcggg ctctgccata	4860
agtttaaagc ccttcttact tcaaattacc aaagattct ccctagaggt tgtcgtccgg	4920
aatgttgtgc gagtcacgca tggtttgagc accacagcga ccgacggcgt catacgtggg	4980
gttttctccc aaattgtgtc tcacttactt gttggaaata ccggtaatgt ggcttaccag	5040

ES 2 478 041 T3

tcagctttca ttgccggggt ggtgcctctt ttagttaaaa agtgtgtgag cttaatcttc	5100
atcttgctgt aagatactta ttccggtttt attaagcacg gaatcagtga attctctttc	5160
cttagtagta ttctgaagtt cttgaagggt aagcttgtgg acgagttgaa atcgattatt	5220
caaggggttt ttgattccaa caagcacgtg tttaaagaag ctactcagga agcgattcgt	5280
acgacggcca tgcaagtgcc tgtcgtgtga gtggatgcc ttaagagcgc cgcgggaaaa	5340
at ttataaca attttactag tcgacgtacc tttggtaagg atgaaggctc ctctagcgac	5400
ggcgcatgtg aagagtatct ctcacgtcac gaagggtgaag gtccgggtct gaaagggggt	5460
tccagctatg gcttctcaat tttagcgttc ttttcacgca ttatgtgggg agctcgtcgg	5520
cttattgtta aggtgaagca tgagtgtttt gggaaacttt ttgaatttct atcgctcaag	5580
cttcacgaat tcaggactcg cgtttttggg aagaatggaa cggacgtggg agtttacgat	5640
tttttgccca cggacatcgt ggaaacgctc tcacgatag aagagtgcga ccaaattgaa	5700
gaacttctcg gcgacgacct gaaagggtgac aaggatgctt cgttgaccga tatgaattac	5760
tttgagttct cagaagactt cttagcctct gtcgaggagc cgcttttcgc tggattgcga	5820
ggaggtagca agaacgtcgc gattttggcg attttggaat acgtgcataa tttgtttcgc	5880
attgtcgcaa gcaagtgttc gaaacgacct ttatttcttg ctttcgccga actctcaagc	5940
gcccttattg agaaatttaa ggaggttttc cctcgtaaga gccagctcgt cgctatcgtg	6000
cgcgagtata ctcagagatt cctccgaagt cgcacgtcgt cgttgggttt gaataacgag	6060
ttcgtggtaa aatctttcgc cgatttgcta cccgcattaa tgaagcgga ggtttcaggt	6120
tcgttcttag ctagtgttta tcgccactt agaggtttct catatatgtg tgtttcagcg	6180
gagcgacgtg aaaagttttt tgctctcgtg tgtttaatcg ggttaagtct ccctttcttc	6240
gtgcgcatcg taggagcgaa agcgtgcgaa gaactcgtgt cctcagcgcg tcgcctttat	6300
gagcgtatta aaatttttct aaggcagaag tatgtctctc tttctaattt cttttgtcac	6360
ttgttttagct ctgacgttga tgacagttcc gcatctgcag ggttgaaagg tgggtgcgtc	6420
cgaatgacgc tcttccacct tctggttcgc cttgctagtg .ccctcctatc gttaggggtg	6480
gaaggggtta agctactctt atcgaccac aacttgttat ttttgtgttt tgcattggtt	6540
gacgatgtga acgtccttat caaagtctt ggggggtctt ctttctttgt gcaaccaatc	6600
ttttccttgt ttgcggcgat gcttttacia cggacaggt ttgtggggta ttccgagaaa	6660
cttgttacag cgtttgaatt tttcttaaaa tgttcgcctc gcgcgcctgc actactcaaa	6720
gggttttttg agtgcgtggc gaacagcact gtgtcaaaaa ccgttcgaag acttcttcgt	6780
tatttcgtga ggatgctcaa acttcgaaaa gggcgagggt tgcgtgcgga tggtaggggt	6840

ES 2 478 041 T3

ctccatcggc agaaagccgt acccgtcata ctttctaate gggtcgtgac cgacgggggtt	6900
gaaagacttt cggtaaagat gcaaggagtt gaagcggttc gtaccgaatt gagaatctta	6960
gaagatttag attctgccgt gatcgaaaag ctcaatagac gcagaaatcg tgacactaat	7020
gacgacgaat ttacgcgccc tgctcatgag cagatgcaag aagtcaccac tttctgttcg	7080
aaagccaact ctgctgggtt ggccctggaa agggcagtcg ttgtggaaga cgctataaag	7140
tcggagaaac tttctaagac ggttaatgag atggtgagga aagggagtac caccagcgaa	7200
gaagtggccg tcgctttgtc ggacgatgaa gccgtggaag aaatctctgt tgctgacgag	7260
cgagacgatt cgcctaagac agtcaggata agcgaatacc taaataggtt aaactcaagc	7320
ttcgaattcc cgaagcctat tgttgtggac gacaacaagg ataccggggg tctaacgaac	7380
gccgtgaggg agttttatta tatgcaagaa cttgctcttt tcgaaatcca cagcaaactg	7440
tgccctact acgatcaact gcgcatagtc aatttcgatc gttccttagc accatgcagc	7500
gaagatgctc agctgtacgt acggaagaac ggctcaacga tagtgacggg taaagaggta	7560
cgtttgaca ttaaggattt ccacgatcac gatttctgt ttgacggaaa aatttctatt	7620
aacaagcggc ggcgagggc aaacgtttta tatcacgaca acctcgcggt cttggcgagt	7680
aatttgttct tagccggcta ccccttttca aggagcttcg tcttcacgaa ttctgcggtc	7740
gatattctcc tctacgaagc tccaccggga ggtggtaaga cgacgacgct gattgactcg	7800
ttcttgaagg tcttcaagaa aggtgaggtt tccaccatga tcttaaccgc caacaaaagt	7860
tcgcaggttg agatcctaaa gaaagtggag aaggaagtgt ctaacattga atgccagaaa	7920
cgtaaagaca agagatctcc gaaaaagagc atttacacca tcgacgctta tttaatgcat	7980
caccgtgggt gtgatgcaga cgttcttttc atcgatgagt gtttcatggt tcatgcgggt	8040
agcgctactag cttgcattga gttcacgagg tgcataaag taatgatctt cggggatagc	8100
cggcagatcc actacattga aaggaacgaa ttggacaagt gtttgtatgg ggatctcgac	8160
aggttcgtgg acctgcagtg tcgggtttat ggtaatatth cgtaccggtg tccatgggat	8220
gtgtgcgctt ggttaagcac agtgtatggc aacctaatcg ccaccgtgaa gggtgaaagc	8280
gaaggtaaga gcagcatgcg cattaacgaa attaatcag tcgacgattt agtccccgac	8340
gtgggttcca cgtttctgtg tatgcttcag tcggagaagt tggaatcag caagcacttt	8400
attcgcaagg gtttgactaa atttaacggt ctaacggtgc atgaggcgca aggtgagacg	8460
tatgcgcgtg tgaaccttgt gcgacttaag tttcaggagg atgaacctt taaatctatc	8520
aggcacataa ccgtcgctct ttctcgtcac accgacagct taacttataa cgtcttagct	8580
gctcgtcgag gtgacgccac ttgcgatgcc atccagaagg ctgcggaatt ggtgaacaag	8640
tttcgcgttt ttctacatc ttttgggtgt agtgttatca atctcaacgt gaagaaggac	8700

ES 2 478 041 T3

gtggaagata acagtaggtg caaggtctcg tcggcaccat tgagcgtaat caacgacttt	8760
ttgaacgaag ttaatcccgg tactgcggtg attgattttg gtgatttgtc cgcggacttc	8820
agtactgggc cttttgagtg cggtgccagc ggtattgtgg tcggggacaa catctcctcc	8880
agcaacatca ctgatcacga taagcagcgt gtttagcgta gttcggtcgc aagcgattcc	8940
gcgtagaaaa ctttctctac aagaaaattt gtattcgttt gaagcgcgga attataactt	9000
ctcgacttgc gaccgttaca catctgcttc aatgttcgga gaggctatgg cgatgaactg	9060
tcttcgtcgt tgcttcgacc tagatgcctt ttcgtccctg cgtaatgatg tgattagtat	9120
cacacgttca ggcacgaac aatggctgga gaaacgtact cctagtcaga ttaaagcatt	9180
aatgaaggat gttgaatcgc ctttggaat tgacgatgaa atttgtcgtt ttaagttgat	9240
ggtgaagcgt gacgctaagg tgaagttaga ctcttcttgt ttaactaac acagccccgc	9300
tcaaaatatc atgtttcatc gcaagagcat taatgctatc ttctctccta tctttaatga	9360
ggtgaaaaac cgaataatgt gctgtcttaa gcctaacata aagtttttta cggagatgac	9420
taacagggat tttgcttctg ttgtcagcaa catgcttggg gacgacgatg tgtaccatat	9480
aggtgaagtt gatttctcaa agtacgacaa gtctcaagat gctttcgtga aggcttttga	9540
agaagtgatg tataaggaac tcggtgttga tgaagagttg ctggctatct ggatgtgcgg	9600
cgagcggtta tcgatagcta acactctcga tggtcagttg tccttcacga tcgagaatca	9660
aaggaagtcg ggagcttcga acacttggat tggtaactct ctcgtcactt tgggtatttt	9720
aagtctttac tacgacgta gaaatttcga ggcgttgtag atctcgggcg atgattcttt	9780
aattttttct cgcagcgaga tttcgaatta tgccgacgac atatgcactg acatgggttt	9840
tgagacaaaa tttatgtccc caagtgtccc gtacttttgt tctaaatttg ttgttatgtg	9900
tggtcataag acgttttttg ttcccgaccc gtacaagctt ttcgtcaagt tgggagcagt	9960
caaagaggat gtttcaatgg atttcctttt cgagactttt acctccttta aagacttaac	10020
ctccgatttt aacgacgagc gcttaattca aaagctcgtt gaacttgtgg ctttaaaata	10080
tgaggttcaa accggcaata ccaccttggc gttaagtgtg atacattgtt tgcgttcgaa	10140
tttcctctcg tttagcaagt tgtatcctcg cgtgaagga tggcaggttt tttacacgtc	10200
ggttaagaaa gcgcttctca agagtgggtg ttctctcttc gacagtttca tgaccctttt	10260
tggtcaggct gtcattggtt gggatgatga gtagcgctaa cttgtgcgca gtttctttgt	10320
tcgtgacata caccttgtgt gtcaccgtgc gtttataatg aatcaggttt tgcagtttga	10380
atgtttgttt ctgctgaatc tcgcggtttt tgctgtgact ttcattttca ttcttctggt	10440
cttcgcgctg attaagtctt ttcgccagaa gggtcacgaa gcacctgttc ccgttggtcg	10500

ES 2 478 041 T3

tggcgggggt ttttcaaccg tagtgtagtc aaaagacgcg catatggtag ttttcggttt	10560
ggactttggc accacattct ctacggtgtg tgtgtacaag gatggacgag ttttttcatt	10620
caagcagaat aattcggcgt acatccccac ttacctctat ctcttctccg attctaacca	10680
catgactttt ggttacgagg ccgaatcact gatgagtaat ctgaaagtta aagggttcgtt	10740
ttatagagat ttaaaacgtt ggggtgggtg cgattcgagt aacctcgacg cgtaccttga	10800
ccgttttaaa cctcattact cggtcgcgtt ggtaagatc ggctctggct tgaacgaaac	10860
tgtttcaatt ggaaacttcg ggggcactgt taagtctgag gctcatctgc cagggttgat	10920
agctctcttt attaaaggctg tcattagttg cgcggagggc gcgtttgcgt gcacttgac	10980
cggggttatt tgttcagtac ctgccaatta tgatagcggt caaaggaatt tcactgatca	11040
gtgtgtttca ctacgcggtt atcagtgcgt atatatgac aatgaacctt cagcggctgc	11100
gctatctgcg tgtaattcgg ttggaagaa gtccgcaa attggtctgtt acgatttcg	11160
tgggtgggacc ttcgacgtgt ctatcatttc ataccgcaac aatacttttg ttgtgcgagc	11220
ttctggaggc gatctaaatc tcggtggaag ggatgttgat cgtgcgtttc tcacgcacct	11280
cttctcttta acatcgctgg aacctgacct cactttggat gtctcgaatc tgaagaatc	11340
tttatcaaaa acggacgcag agatagttaa cactttgaga ggtgtcgatg gaagaaaaga	11400
agacgttaga gtaaacaaaa acattcttac gtcggtgatg ctcccctacg tgaacagaac	11460
gcttaagata ttagagtcaa ccttaaaatc gtatgctaag agtatgaatg tgagtgcgcg	11520
agttaagtgc gatttagtgc tgataggagg atcttcatat ctctctggcc tggcagacgt	11580
actaacgaag catcagagcg ttgatcgtat cttaagagtt tcggatcctc gggctgccgt	11640
ggccgtcggg tgcgcattat attcttcatg cctctcagga tctggggggg tgctactgat	11700
cgactgtgca gctcacactg tcgctatagc ggacagaagt tgatcatcaa tcattttgcgc	11760
tccagcgggg gcaccgatcc ctttttcagg aagcatgcct ttgtacttag ccagggtcaa	11820
caagaactcg cagcgtgaag tcgccgtgtt tgaaggggag tacgttaa at gccctaagaa	11880
cagaaagatc tgtggagcaa atataagatt ttttgatata ggagtgcggt gtgattcgta	11940
cgcacccggt accttctata tggatttctc catttcaagc gtaggagccg tttcattcgt	12000
gggtgagagg cctgagggta agcaagtgtc actcactgga actccagcgt ataacttttc	12060
gtctgtggct ctcggtcac gcagtgtccg agaattgcat attagttaa ataataaagt	12120
ttttctcggg ttgcttctac atagaaaggc ggatcgacga atacttttca ctaaggatga	12180
agcgattcga tacgccgatt caattgatat cgcggatgtg cttaaaggaat ataaaagtta	12240
cgcggccagt gccttaccac cagacgagga tgtcgaatta ctccctggaa agtctgttca	12300
aaaagtttta cggggaagca gactggaaga aatacctctc taggagcata gcagcacact	12360

ES 2 478 041 T3

caagtgaat taaaactcta ccagacattc gattgtacgg cggtaggggt gtaaagaagt	12420
ccgatttcga atcagcactt cctaattctt ttgaacagga attaggactg ttcatactga	12480
gcgaacggga agtgggatgg agcaaattat gcggaataac ggtggaagaa gcagcatacg	12540
atcttacgaa tccaaggct tataaattca ctgccgagac atgtagcccg gatgtaaaaag	12600
gtgaaggaca aaaatactct atggaagacg tgatgaattt catgcgttta tcaaactctg	12660
atgttaacga caagatgctg gcggaacagt gttggtcgct gtccaattca tgcggtgaat	12720
tgatcaaccc agacgacaaa gggcgattcg tggctctcac cttaaggac agagacacag	12780
ctgatgacac gggcgccgcc aacgtggaat gtcgctggg cgactatcta gtttacgcta	12840
tgtccctgtt tgagcagagg acccaaaaat cgcagtctgg caacatctct ctgtacgaaa	12900
agtactgcga atatatcagg acctacttag ggagtagcga cctgtttttc acagcgccgg	12960
acaggattcc gttacttacg ggcactctgt acgatttttg taaggaatac aacattttct	13020
actcgtcata taagagaaac gtcgataatt tcagattctt ctgggcaaat tatatgcctt	13080
tgatatctga cgtctttgtc ttccagtggg taaaaccgc gccggatgtt cggctgcttt	13140
ttgagttaag tgcagcgga ctaacgctgg aggttccac actgagtttg atagattctc	13200
aagtgtggt aggccatc ttaagatacg tagaatccta cacatcagat ccagccatcg	13260
acgcgttaga agacaaactg gaagcgatac tgaaaagtag caatccccgt ctatcgacag	13320
cgcaactatg ggttggtttc ttttgttact atggtgagtt tcgtacggct caaagtagag	13380
tagtgcaaag accaggcgta tacaaaacac ctgactcagt ggggtgattt gaaataaaca	13440
tgaaagatgt tgagaaattc ttcgataaac ttcagagaga attgcctaata gtatctttgc	13500
ggcgtcagtt taacggagct agagcgcatg aggctttcaa aatattttaa aacggaata	13560
taagtttcag acctatatcg cgtttaaacg tgcccagaga gttctggtat ctgaacatag	13620
actacttcag gcacgcgaat aggtccgggt taaccgaaga agaaatactc atcctaataa	13680
acataagcgt tgatgttagg aagttatgct ctgagagagc gtgcaatacc ctacctagcg	13740
cgaagcgctt tagtaaaaat cataagagta atatacaatc atcacgcaa gagcggagga	13800
ttaaagaccc attggtagtc ctgaaagaca ctttatatga gttccaacac aagcgtgccg	13860
gttgggggtc tcgaagcact cgagacctcg ggagtcgtgc tgaccacgcg aaaggaagcg	13920
gttgataagt ttttcaatga actaaaaaac gaaaattact catcagttga cagcagccga	13980
ttaagcgatt cggaagtaaa agaagtgtta gagaaaagta aagaaagttt caaaagcgaa	14040
ctggcctcca ctgacgagca cttcgtctac cacattatat ttttcttaat ccgatgtgct	14100
aagatatcga cgagtgaaaa ggtgaagtac gttggtagtc atacgtacgt ggtcgacgga	14160

ES 2 478 041 T3

aaaacgtaca ccgttcttga cgcttgggta ttcaacatga tgaaaagtct cacgaagaag	14220
tacaaacgag tgaatggctc gcgtgcgttc tgttgccgct gcgaagatct atatctaacc	14280
gtcgcaccaaa taatgtcaga acgctttaag actaaagccg tagggatgaa aggtttgcct	14340
gttggaagg aatacttagg cgcgcacttt ctttcgggaa ctagcaaact gatgagcgat	14400
cacgacaggg cggctctccat cgctgcagcg aaaaacgctg tcgatcgtag cgctttcacg	14460
ggtggggaga gaaagatagt tagtttgtat gatctaggga ggtactaagc acggtgtgct	14520
atagtgcgtg ctataataat aaacactagt gcttaagtcg cgcagaagaa aacgcttaat	14580
taacaatgaa gactaatctt tttctctttc tcctcttttc acttctccta tcattatcct	14640
cggccgaatt cagtaaagga gaagaacttt tctactggagt tgtcccaatt cttgttgaat	14700
tagatggtga tgttaatggg cacaattttt ctgtcagtg agagggtgaa ggtgatgcaa	14760
catacggaaa acttaccctt aaatttattt gcactactgg aaaactacct gttccatggc	14820
caacacttgt cactactttc tcttatgggt ttcaatgctt ttcaagatac ccagatcata	14880
tgaagcggca cgacttcttc aagagcgcca tgcctgaggg atacgtgcag gagaggacca	14940
tcttcttcaa ggacgacggg aactacaaga cacgtgctga agtcaagttt gagggagaca	15000
ccctcgtaaa caggatcgag cttaaggga tgcatttcaa ggaggacgga aacatcctcg	15060
gccacaagtt ggaatacaac tacaactccc acaacgtata catcatggcc gacaagcaaa	15120
agaacggcat caaagccaac ttcaagaccc gccacaacat cgaagacggc ggcgtgcaac	15180
tcgctgatca ttatcaacaa aatactcaa ttggcgatgg ccctgtcctt ttaccagaca	15240
accattacct gtccacacaa tctgcccttt cgaaagatcc caacgaaaag agagaccaca	15300
tggctcctct tgagtttgta acagctgctg ggattacaca tggcatggat gaactataca	15360
aacatgatga gctttaggcc ggcctaaact gttcctgaat agaaccattg gcaaacgtgg	15420
gatcccgtca gggatagagt tcctcggggc agattttcta actgcgacca gcgtgtgttt	15480
gaacgatcac gaaaaagcta tcgtactaca ggcctcaaga gctgccattg atagagcagt	15540
ctcttcgtcg gtcgacggga agatcgtcag tcttttcgac ctcggtcgtc ttagttaaca	15600
cagttactaa ggttccattt tattattgca ttgtttttca tttagtgtaa tcgtacttga	15660
gttctaatac tgcaggctat ggagttgatg tccgacagca accttagcaa cctggtgata	15720
accgacgcct ctagtctaaa tgggtgtcgac aagaagcttt tatctgctga agttgtaaaa	15780
atgttgggtc agaaaggggc tcctaacgag ggtatagaag tgggtgtcgg tctactcctt	15840
tacgcactcg cggcaagaac cacgtctcct aaggttcagc gcgcagattc agacgttata	15900
ttttcaaata gtttcggaga gaggaatgtg gtagtaacag agggtgacct taagaaggta	15960
ctcgacgggt gtgcgcctct cactagggtc actaataaac ttagaacgtt cggtcgtact	16020

ES 2 478 041 T3

```

ttcactgagg cttacgttga cttttgtatc gcgtataagc acaaattacc ccaactcaac 16080
gctgcgggcg aattggggat tccagctgaa gattcgtact tagctgcaga ttttctgggt 16140
acttgcccga agctctctga attacagcaa agtaggaaga tgttcgagag tatgtacgct 16200
cttaaaactg aaggtggagt ggtaaatacg ccagtgaagca atctgcgtca gctaggtaga 16260
aggggaagtta tgtaatggaa gattacgaag aaaaatccga atcgctcata ctgctacgca 16320
cgaatctgaa cactatgctt ttagtggtca agtccgatgc tagttagag ctgcctaac 16380
tactaatttg cggttactta cgagtgtcag gacgtgggga ggtgacgtgt tgcaaccgtg 16440
aggaattaac aagagatfff gagggcaatc atcatacggt gatccgttct agaatacatc 16500
aatatgacag cgagtctgct tttgaggaat tcaacaactc tgattgcgta gtgaagtttt 16560
tcctagagac tggtagtgct ttttggtttt tccttcgaag tgaaaccaa ggtagagcgg 16620
tgcgacatff gcgcaccttc ttcgaagcta acaatttctt ctttgatcg cattgcggta 16680
ccatggagta ttgtttgaag caggtactaa ctgaaactga atctataatc gattcttttt 16740
gcgaagaaag aaatcggtta gatgaggggt atagtgtctc cttatgaagc tgaagacatt 16800
ctgaaaagat cgactgacat gttacgaaac atagacagtg gggctctgag cactaaagaa 16860
tgtatcaagg cattctcgac gataacgcga gacctacatt gtgcgaaggc ttcctaccag 16920
tggggtgttg aactggggtt atatcagcgt aattgcgctg aaaaacgttt aattgacag 16980
gtggagtcaa acatacgggt ggctcaacct ctcgctgcgtg aaaaagtggtt ggttcatttt 17040
tgtaaggatg aacaaaaaga gctagtagca ttcacacgc gaaagtacgt ggaactcacg 17100
ggcgtgggag tgagagaagc ggtgaagagg gaaatgcgct ctcttaccaa aacagtttta 17160
aataaaatgt ctttggaat ggcggtttac atgtcaccac gagcgtggaa aaacgctgaa 17220
tggttagaac taaaattttc acctgtgaaa atcttttagag atctgctatt agacgtggaa 17280
acgctcaacg aattgtgcgc cgaagatgat gttcacgtcg acaaagtaaa tgagaatggg 17340
gacgaaaatc acgacctga actccaagac gaatgttaaa cattgggtta gtttaacgaa 17400
aatgattagt aaataataaa tcgaacgtgg gtgtatctac ctgacgtatc aacttaagct 17460
gttactgagt aattaaacca acaagtgttg gtgtaatgtg tatgttgatg tagagaaaaa 17520
tccgtttgta gaacggtgtt tttctcttct ttatttttaa aaaaaataa aaaaaaaaaa 17580
aaagaagc 17588

```

<210>8
 <211> 1276
 <212> ADN
 <213> *V. vinifera*
 <400> 8

atttttttta attaataaaa tattttcttc catthaatttg atattataaa tatataacta 60
 attttcatat ggacaattca tttaaatttt aaaaaaatta ttcaatttta aaattttttat 120
 accagttata attttcttaa acaaagtatg actttatggt agttggatga agttcacatt 180
 tgtggaaaca taaaaaacag ttaagaaaac acacaaaaaa ggaaaagaca acatgaaaaa 240
 taatctatta tttgaatagt gaaaaaaaaat aatgaaaaca cattttttatt gttctaaaaa 300
 aagtgatattt tgaaaacaca aaaaatacaa aaaaaaaaaa aatcatactt cctttctcaa 360
 acaagtatttt tgtattttttt attttttcaa gaacagaaaa cattgaaaac accaccaaac 420
 aaccctttgt ttcttaagag aagggttaata tggtaaactt gaaacgtag gacggttggg 480
 ggggtatcta taattgaagt aaacgtcctg aagtgcagtt caccacaaat aaatacatcc 540
 tgtattatta tttatatata tatatatata aaaacctgaa ttatgtataa ataattaata 600
 gcaaaaatttt tgaaccgaca aaaataaaat gatgctccat tgtctcgtat tctttttctt 660
 gcttctttat aaacacgcat atgtaatat tctttttattg aaaaaaaccc ccttagggag 720
 agcgtgtctg tactttttgtt tatttacccta tttataaaact gtgtggtatt aaaaggatta 780
 accattagta ttttgtacta atagagggtt aataattttg taattgtaaa aatatatact 840
 tattttatta aaaatatagc tatcatcaca tgaattaata atttaagatt aggggtccca 900
 tttttgaaga aaaataaatg gtgagagtac aacagaacag aagtttgaat aataataata 960
 agaaaaaata aaatgcgtgg aaaggagtca acgaggcaga gtaaaagcgg tctaaaaatg 1020
 ggaaatggga tttattacaa ttgggaacgt gtcgaaatga tgagttgaac ttgcacaagt 1080
 gtaaggcagc gtccaaattg cggataaggc cgatcctccc aacttcactc tataaagacc 1140
 cccattttgc attcatctcc ccgcagactc actcctcact cttccttctt ctttctcaca 1200
 aacaacacag aggagaaaat ccatttagat ttagtggaag aagaggcata cagtaaaaaa 1260
 aaataattag cctatg 1276

<210>9
 <211> 2908
 <212> ADN
 <213> *V. vinifera*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (728)..(739)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 9

catggaatgt aaagtaattt ttatttttaa taaatataaa aaaattgaaa aataatattt 60
 catttttata ttattttaca aattaaattt aagcatcaca taaaatgtct tattagatat 120

ES 2 478 041 T3

ataataggaa aacataatgg aaaataatTT gTTTTgagta aatatcatcg tcatagaaga	180
cattaaatgg aaagcatttc ttttttatct tcacacattt tcgaggcatg cttggcggat	240
gggaaaattt gaggtggttt tccatgttca aaacgttgag aaactctagg aacaccaaac	300
tatataaaag gcaaaagggt agaaaatgga ttgaaattcg attcggaaaa aatcaagggg	360
gatttttcta gttttccttg tgataggccc tccaatcaag gaaaatttgt ctagattaag	420
gagaattcat ggaagatgag aaaattatgg tgtttggcta tacgattagc ccacaactta	480
gcctatgttt gtttcttaaa atacttgaaa gaaattacaa aataaaaaata aaaaaagact	540
taaaattaat aaaattatTT tttttcaaa ttcattttac ttttttttat ataaaaaatt	600
aataatttaa aatacataat ttttaattata tttacctttt tttttatata ttttttcata	660
ataaaccaaa tatataaaaa caaaatcagt ttttgaacaa tttttttact taaaaaatg	720
ataaaaannn nnnnnnnna gaagtgttta gtatttttac ttaaaataaa tttattttat	780
ttttaaatc atgtattata acttatcaca ttttaaaaaa tgatttttta tttgtatagt	840
atatagtaaa gataatttaa aattgctctt tctttaaaaa ataaaaaaaaa taaaaaata	900
aaaaataaaa acaataaaaa ttaatgatgc attacaacta actactcaa aaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaa aagtaaagaa taaaagttc aagcttggtt ccatccatgc tttcgtgcat	1020
gcaccactct ttaacaagg cgccaccgtt aattcatacc aatttttaaa tccaaaaaaa	1080
aataataata ataaataaat aaagaaggtc aacatgttca ttatttattc gatTTataat	1140
agttagagag agagatggcc gattgcatta gtgtttctgg ggcggaggac cacgcctcta	1200
ttattgaaca aaaacaatca cttttaggct gtcaggtaag aaactttact tatttatTTa	1260
tttaattttt cattattggt gggTcccacc taaaatttaa agtcaatcat tttttaataa	1320
aaaattttat taataattaa agaggtgtgt attttttagc tttttttatc ccttgacccc	1380
ccacttttca atctgcccct ttttctcctc tctttctttt tttttttttt aaaaatatta	1440
ttttcttttt tttttttttt atttttttta aaaatctttt tatacattca aaatttttaa	1500
aaaatatttt aaaaactatt ctcaaaaaag atttttataa tatttcaaaa gtttgtttaa	1560
aattaaaatt ttttttaatt tttttttata tttaaatatt tttttatttg tttatatttt	1620
tgtttttaaa aaagaaagtt catttatgaa aatcttaagt agtttttata ctaaactt	1680
cttttaaadc tatgctcttt aaacctctat atatatatat atatatatat atatatatat	1740
aatatatata ttttttttat catattttta taaaaatac tttattcttt ttacaataaa	1800
actaataatt tcttttaaat cataaatata aatgttgaaa taattaaaat atttatgtca	1860
aaaataaatt atttttcaag taaaaatatg aaaaagtTTa aattcataat tacgaggatt	1920

ES 2 478 041 T3

atctcgtctt ttttaagtata cgtggaaagt tcattgtcac gtgacataaa cattatcatt	1980
tatcatataa ttgtaaaaca aaacctcatc ttcaggcggt aaacttgacg tccatggcaa	2040
gccgttatat tttgcaacgg tccaagacgc gacacgtttg ggacggcgtg aaggtaacag	2100
caaacacaaa ttaaaatttc ctttcacatt gacgtgccgt acccattatt tcttgaattt	2160
tcacataatt aattttcacc gtcaatttag taatttcctt tttatcttct tttcattttc	2220
taaaaaaaaa aaaatcatta gtatataaaa acttttatgc aataatccgc tatcttcaact	2280
cgaatttaaa gtttagtata taataatatt aaattataaa attttcaaaa gctcattaat	2340
tggtaaattt atgattaaaa gtgggtatta attttcaaaa acacttttaa tctaaaaaat	2400
tagtttagaa aaaagtcaaa tgtttgataa attttaggaa cgcttttcaa acaaataatt	2460
atgattttac aatttttcta aaaatactag aaaaaataac atttttacta aaaacattaa	2520
tgggcgcagt ctaataaata ttatgacacc tacactaact tttttaaatt ttgttattaa	2580
tttatggtat tcaaaagaaa attgataagt tgggtgtggaa atagtgattt cctaaaaatga	2640
atgatgaagg ggtggagatt ataactggag tgaagaacat ccggcggaat atggagccca	2700
caggggaggg cgggattgga acggtataaa tgaaggcatt gagggagagg gagagacgcc	2760
ttcctcattg tcgaccttga ttttcttggg agactcaata ctcatacatt gaatgagtgt	2820
ctccactatt ctctgattct tttctggttc ttctttcatc tcttcatctc cttcattggt	2880
gtactgcgtc cctctgctgc cagatatg	2908

<210> 10
 <211> 2107
 <212> ADN
 <213> *V. vinifera*

<400> 10

aataaattta ttttaattta tattttttta aaataaattt atttaattta atatttaaaa	60
aaatatttta atttaaatatt tttttaaata ctttaattta atttaaatatt tttgaaaact	120
acttttattt aatttagtat ttttgaaaaa aaaaatatta aaaaaaatt atttaactta	180
attttataaa atattttata tgtgttctta aatggtatat ttgtcaatta ctatttcattg	240
tccttcaact caatttgaag agttatatgg atcttttgtt aatttgggac cgtctaacct	300
taaaagataa ttctcccgat ttttattagg tatattaaga ttttatcaga aaatgtattt	360
gggaatcggg tggaggaggc acacgtgggg tggctataac cgtacgaggg gttcaaggac	420
taagggcgcg aaaacccatc acctttccac gcaatagaaa gatgcgtcaa agacaatggg	480
agccgtagaa aaaaaccagg gcgacaatgg tttcagagga gtaaaccat caaatagtaa	540
ttgaaaaaac aaatgggtcat tacaagaaaa aggaattttg gaacaaaaag gaattttgga	600

ES 2 478 041 T3

```

agaaaaagga agaggagacg gtggatacag gaggagaaaa gatgaataaa attataatgg      660
gggttgggta tagagaaagc ggtgatgggtg aaaagcgggtt ttgtgaaagg tacagtgaaa      720
ccatgggaag atgcggatgt gtgagccatt atgacatttt cgcggaaca gaggcccat      780
tctcaaatca aaggacgact aatgaggatt gtgaaggctt tctactggta tataaagggt      840
tccaaggctt tcttttacca ccacccatt tgcgtttgct tctccatttg atctcttcgt      900
tcgttccttc tttcattttg atttctctcc ctgtctggc attcttcttc ttcttcttct      960
tcttggttct cccctccac cgcacccat ttcatttttc tagctttgcc tttcaaaggt      1020
atgtgttgtt tctgttactt ttctgcatag catttctgta atacaaatgc gtttttgtcc      1080
aatgcgtca gccgttgaat gtgatcccg gaaagacagt acctaaaaag tcttgcttgt      1140
tataatgcc accagcaaag gagaaggccc acctttgcct gtacctgcta aattttccaa      1200
atctccacc accgcctaag ctttcattct tccatttttc tcttccaaa cgctctacc      1260
tttcttgggt ttacggcta tgtatgggtt ttcttaagggt ctacggcctg tccatgcatg      1320
ggttagccta gaattttctt ttatggaaaa gtatttttta tttattttac ttctgtcttg      1380
gcatgttatt ttggtgcagg ggattttgtc tgtaattaga aaaatcacct ccataagct      1440
ttgatccttt attttgtgcg aggataaggg gaacatatat tcaacttgat ttctccacc      1500
aaccctgtgt tgcttacatc caccattctg gtctttctat aaatttccca cgtttcttcc      1560
attctctat ctctttcat ttttcattct ctagttgatt gtgatcaact cacctcttct      1620
ctaggtaact ctccccctct ctgtttctg aagatctcag tctgatcttc tcttcttctt      1680
ctcttcctcc tctctctct cttcttcttc tcttcttctt tcttcttctt cctttttatg      1740
tttgttttca gtgtttcagc ttctgtttca ggtgatattg ctctaaattt tttcatctcc      1800
cagttttggg ttggttagct gtaggtttcc gttgtcaaac agaattagat cttatgatag      1860
cttaatagtc ttgcatat ttattagagt tgattttagt tcaacaacat actagatttt      1920
atattattat tgataagtgt gaggtgtcca attttgaaat ttaaaccttt ctagatgggt      1980
gaatgctggg tggcttgac tttcttctca ataagaagct ttggatgatt ttgatctgtt      2040
agttacagtt gtttctctta cgttgaagggt tgtctgaaat taggtaagaa ccagagagg      2100
agacatg                                         2107

```

<210> 11

<211>9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Marcador de epitopo de hemaglutinina

<400> 11

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un vector de transferencia génica de plantas para silenciamiento génico inducido por virus, comprendiendo el vector un ácido nucleico que codifica:

- a) genes virales de virus asociado con el enrollamiento de la vid 2 (LR-2) que comprenden metiltransferasa, ARN helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN;
- b) un supresor de ARNi;
- c) proteasas líder L1 y/o L2; y
- d) un polinucleótido heterólogo unido operativamente a un promotor, en el que el polinucleótido heterólogo se expresa en una célula vegetal,

en donde el vector de transferencia génica de plantas es competente para replicación y capaz de replicar de forma infecciosa en la célula vegetal, y el ácido nucleico codifica las proteasas líder L1 y L2, o

en donde el vector de transferencia génica de plantas replica de forma condicionada y en donde al menos una proteasa líder seleccionada de L1 y L2 está inactivada de modo que el vector no pueda replicarse de forma infecciosa independientemente.

2. El vector de la reivindicación 1, que comprende además genes virales del virus asociado con el enrollamiento de la vid 2 (LR-2) que están implicados en el ensamblaje de viriones y/o el transporte dentro de plantas.

3. El vector de la reivindicación 2, en el que los genes virales se seleccionan del grupo que consiste en p6, Hsp70h, p63, CPm, CP y p19 del virus asociado con el enrollamiento de la vid 2 (LR-2).

4. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polinucleótido heterólogo codifica uno o más de una molécula indicadora, un marcador seleccionable o un gen terapéutico.

5. El vector de la reivindicación 4, en el que el gen terapéutico es antifúngico, antibacteriano, antiviral o un modificador del sabor.

6. El vector de la reivindicación 5, en el que el gen terapéutico es para el tratamiento de la enfermedad de Pierce o del oídio.

7. El vector de la reivindicación 6, en el que el gen terapéutico es un polinucleótido que desencadena el silenciamiento génico inducido por virus, un polinucleótido *Run1*, o codifica un polipéptido de lisozima.

8. El vector de la reivindicación 1, en el que las proteasas L1 y L2 son de LR-2.

9. El vector de la reivindicación 1, en el que el vector de transferencia génica de plantas es competente para replicación y capaz de replicar de forma infecciosa en la célula vegetal y el ácido nucleico codifica las proteasas líder L1 y L2, y en donde la proteasa L1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 4.

10. El vector de la reivindicación 1, en el que el vector de transferencia génica de plantas es competente para replicación y capaz de replicar de forma infecciosa en la célula vegetal y el ácido nucleico codifica las proteasas líder L1 y L2, y en donde la proteasa L2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6.

11. El vector de la reivindicación 1, en el que el vector de transferencia génica de plantas replica de forma condicionada y en donde al menos una proteasa líder seleccionada de L1 y L2 está inactivada de modo que el vector no puede replicar de forma infecciosa independientemente, en donde la proteasa líder inactivada se selecciona de L1, L2 o tanto L1 como L2.

12. El vector de la reivindicación 1, en el que el supresor de supresor de ARNi es LR-2 p24.

13. El vector de la reivindicación 1, en el que el supresor de ARNi es virus del amarilleo de la remolacha p21.

14. Una célula vegetal que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

15. Una planta que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

16. Un método para expresar un gen heterólogo en una célula vegetal que comprende introducir en la célula vegetal el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

17. El método de la reivindicación 16, en el que introducir el vector en la célula vegetal comprende agroinoculación.

18. El método de la reivindicación 17, que comprende además injertar una parte de una planta que comprende la célula vegetal que comprende el vector en una parte de una planta que no comprende el vector.

FIG. 1A

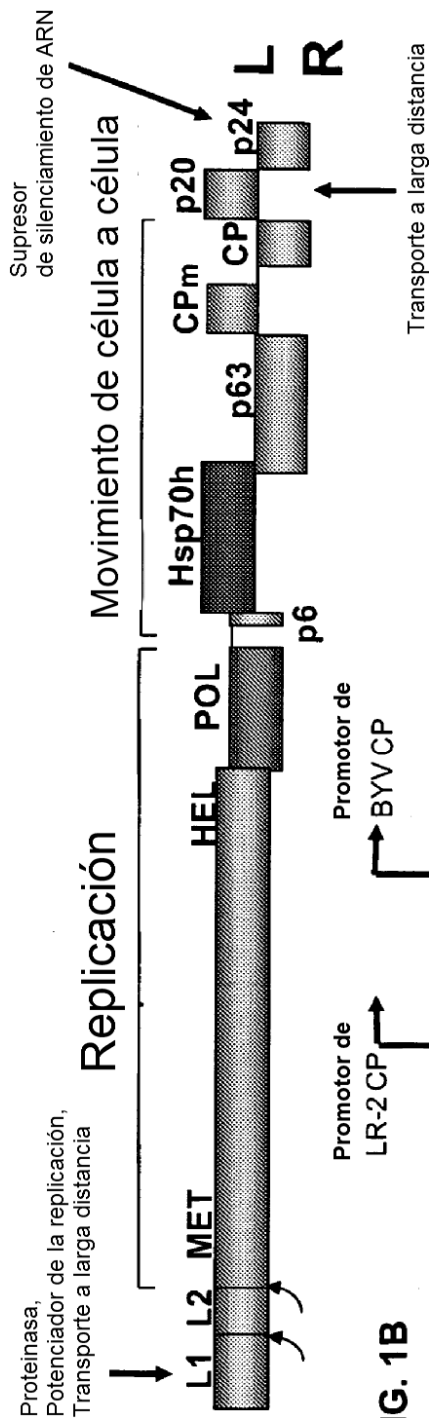


FIG. 1B

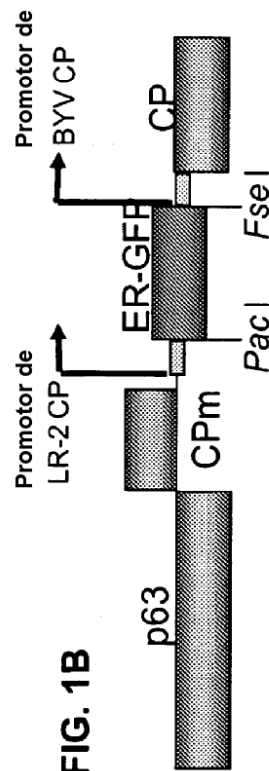
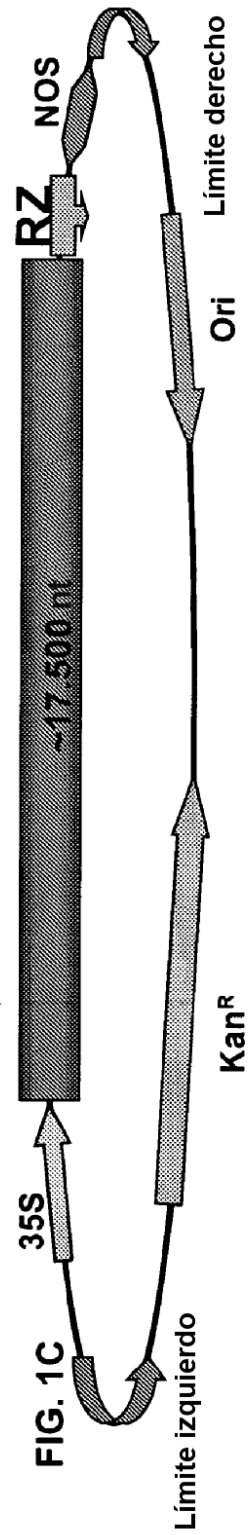


FIG. 1C



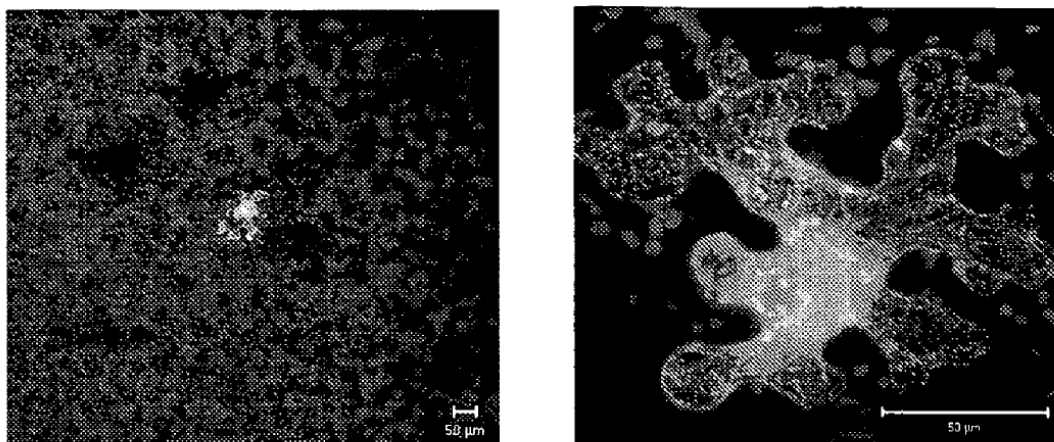


FIG. 2

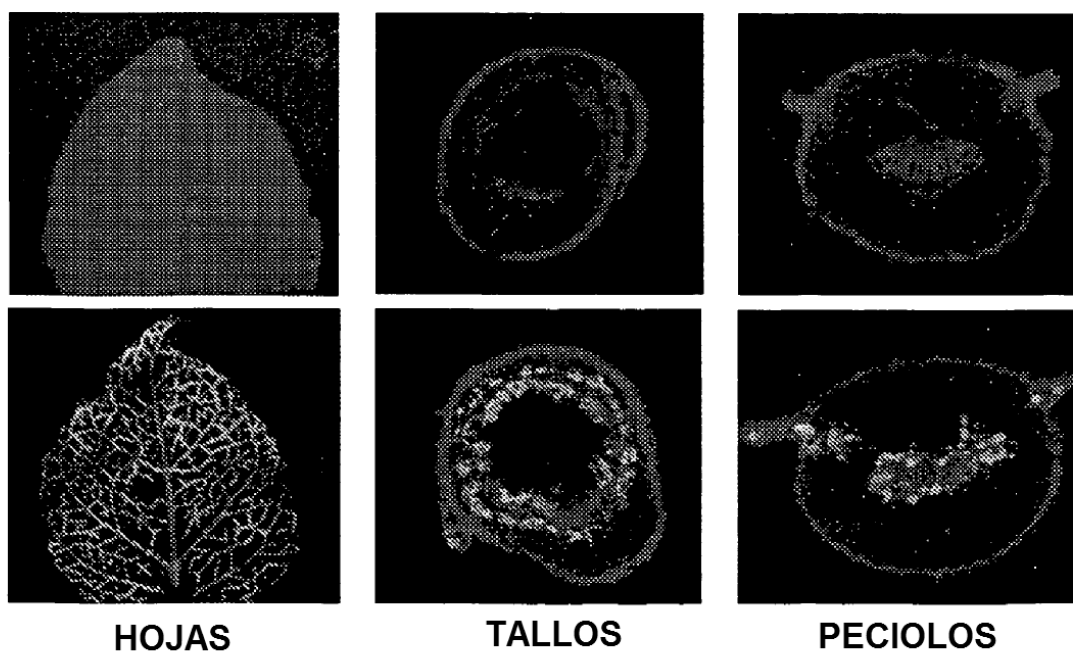


FIG. 3

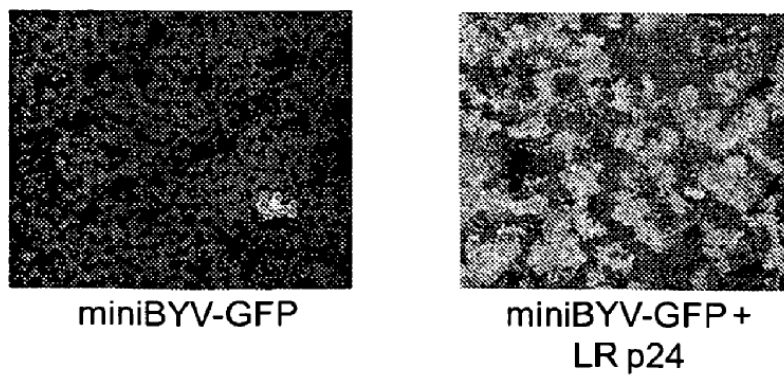
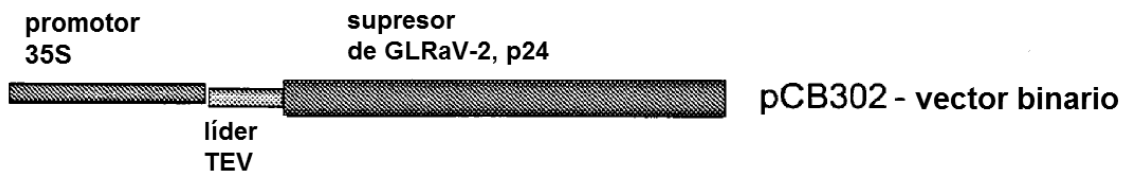
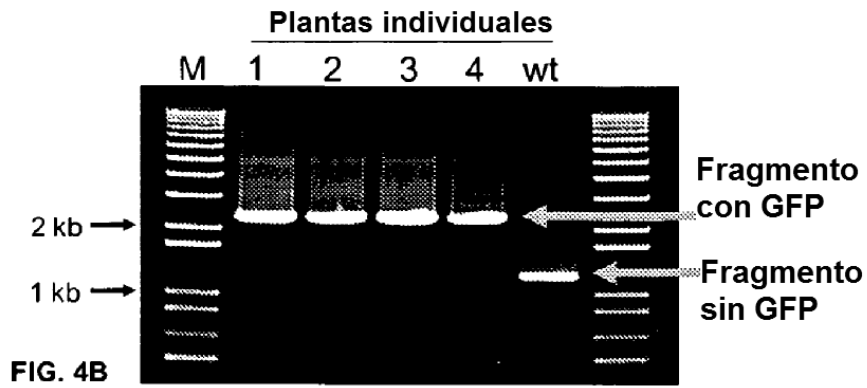


FIG. 5

Plantas de *N. benthamiana* 16c transgénicas para GFP

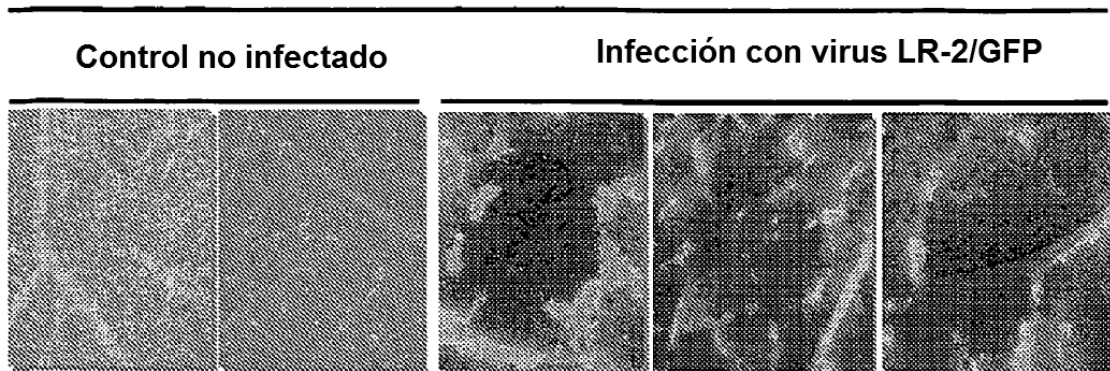


FIG. 6

FIG. 7A



FIG. 7B

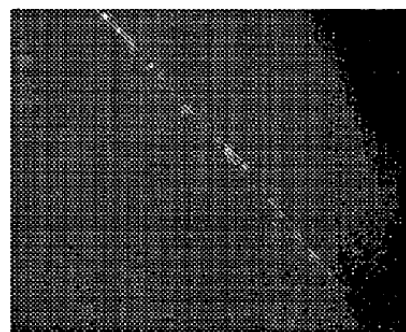


FIG. 7C

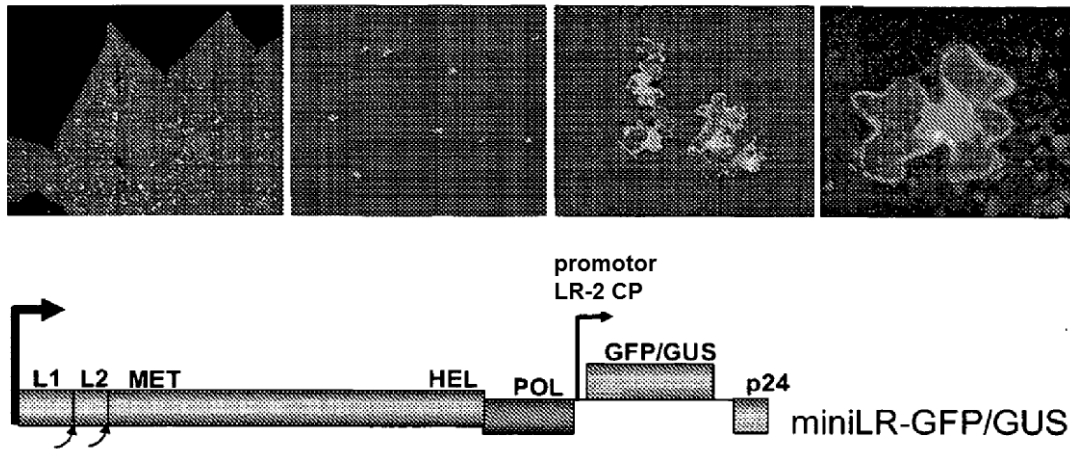


FIG. 8

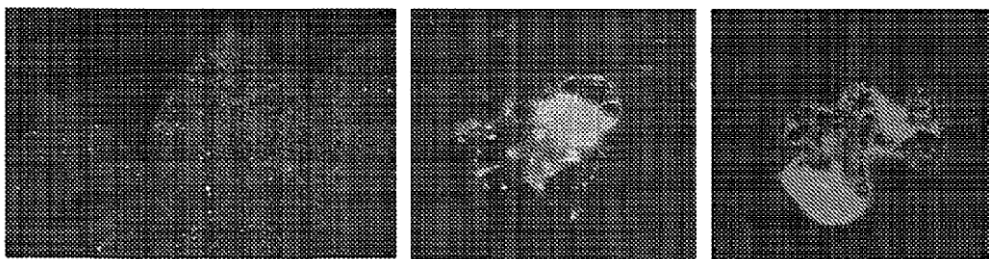


FIG. 9

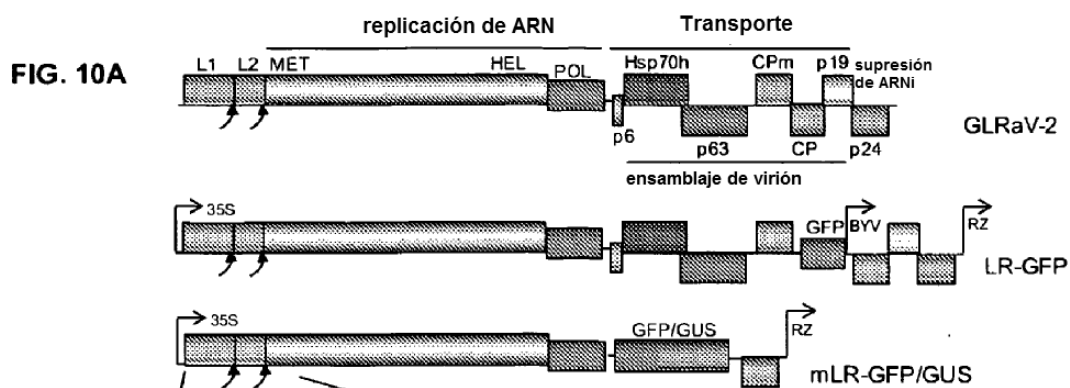


FIG. 10B

	L1		L2 _{HA}		Procesamiento		GUS	Infección
	L1	L2	L2 _{HA}	HA	L1	L2	%WT	sistémica
L2 _{HA}	NTD1	Pro1	NTD2	Pro2	+	+	100	24/26
M1	NTD1	Pro1	NTD2	Pro2	-	+	187	8/12
M2	NTD1	Pro1	NTD2	Pro2	+	-	0,44	N/D
ΔL1			NTD2	Pro2	-	+	22	0/8
ΔL2	NTD1	Pro1			+	-	126	8/8
ΔL1/2					-	-	1,04	N/D
ΔNT1			Pro1	NTD2	+	+	32	0/8
ΔPro1	NTD1			NTD2	-	+	128	8/8

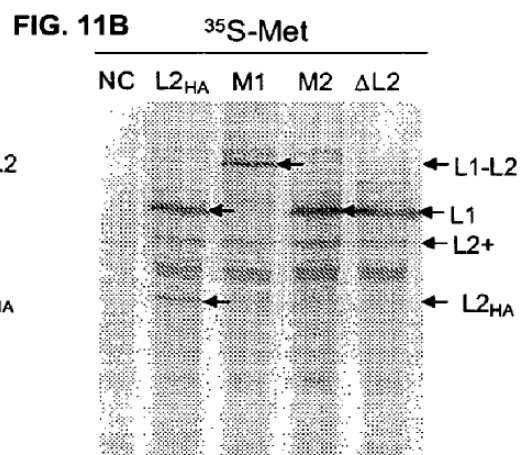
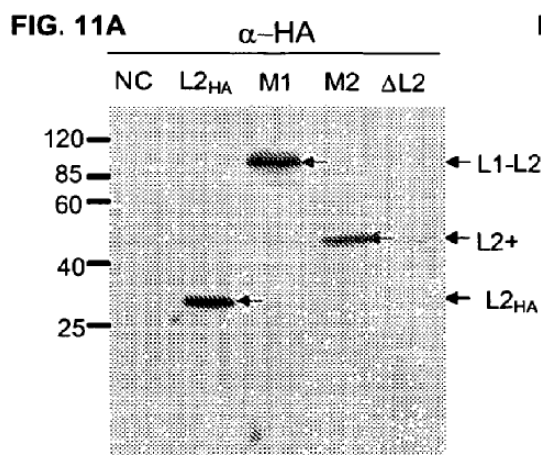


FIG. 12A

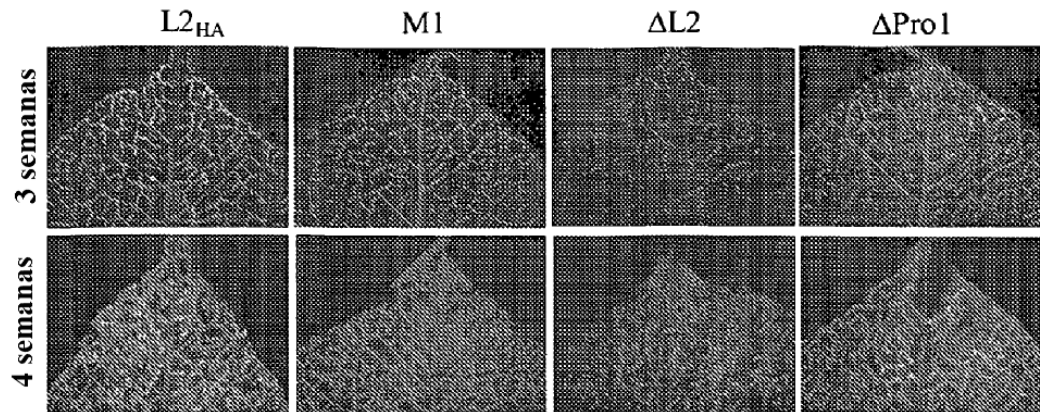


FIG. 12B

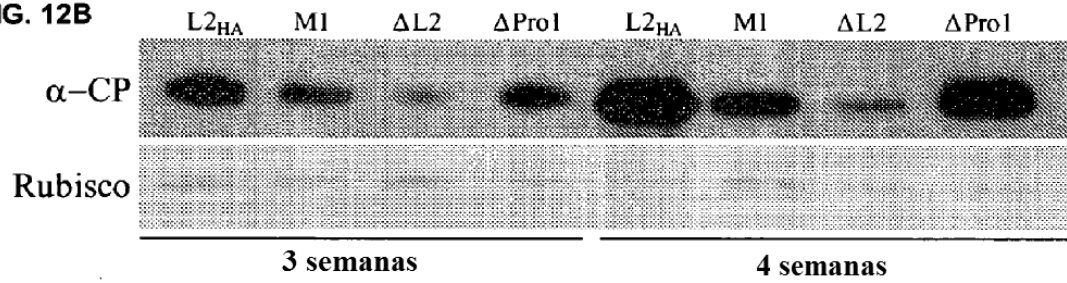


FIG. 12C

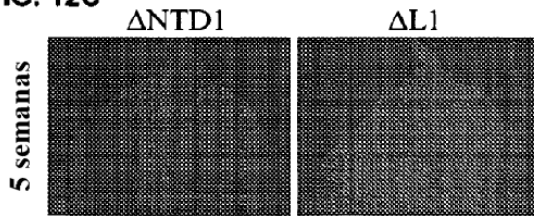


FIG. 12D

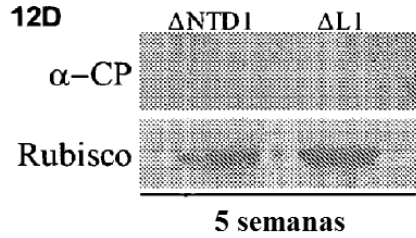
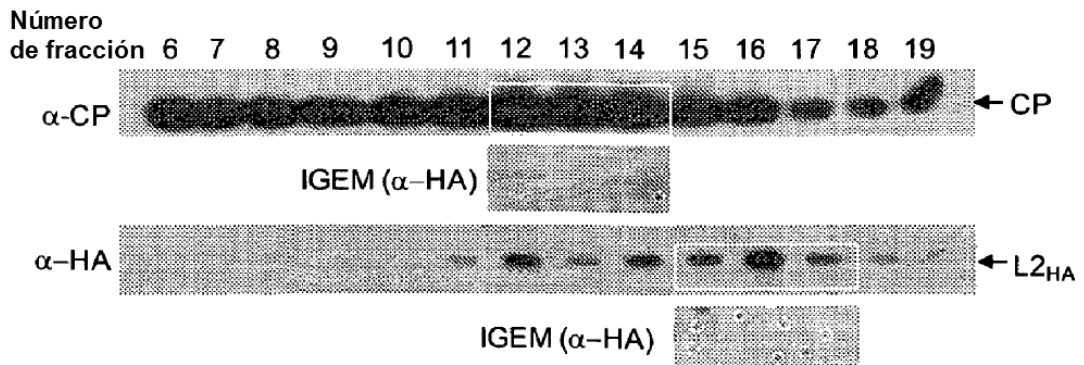


FIG. 13



NB	ATATTCTGTTGGCTTTTCATCTGTGCTTGTGCTTCGGTTCAATCACACTCTGAAAGTTTCA
VV	ATATTCTGTTGGCTTTTCATCTGTGCTTGTGCTTCGGTTCAATCACACTCTGAAAGTTTCA
NB	GTTCCCGGAATTTTCGGTTTTCTTCATAAGCCTTATTCCTACAGGATGTCTAGCCTTGCT
VV	GTTCCCGGAATTTTCGGTTTTCTTCATAAGCCTTATTCCTACAGGATGTCTAGCCTTGCT
NB	ATCTCTGCCCTTCCCTGTTTCAGTCGCTCAACTGAGCGTTGGTCAGCCTGTTGCCACGGTT
VV	ATCTCTGCCCTTCCCTGTTTCAGTCGCTCAACTGAGCGTTGGTCAGCCTGTTGCCACGGTT
NB	GCCAGGTCATTTTTGATGACTTCCCTTCCGTCCCTTCAGACTTACCCATCTTCGTCTGAG
VV	GCCAGGTCATTTTTGATGACTTCCCTTCCGTCCCTTCAGACTTACCCATCTTCGTCTGAG
NB	TTGACTTCCTTTTTATTTTGTGTTTGGTGCTTTCCAAAAATAAAAAATGTTTTATCTTTC
VV	TTGACTTCCTTTTTATTTTGTGTTTGGTGCTTTCCAAAAATAAAAAATGTTTTATCTTTC
NB	CTACGTTCCGGTGACGTCCTTTGCGCCTTTTTCTGAAATTTCCACGATTGGTTCATGCTAT
VV	CTACGTTCCGGTGACGTCCTTTGCGCCTTTTTCTGAAATTTCCACGATTGGTTCATGCTAT
NB	GAATTCATTCGGTTGGGAGGTGGTGCTTACCCTCTCTTTTTCTGTTCCCTTCCAATGCGGA
VV	GAATTCATTCGGTTGGGAGGTGGTGCTTACCCTCTCTTTTTCTGTTCCCTTCCAATGCGGA
NB	CCTTTGTCCGTTTCTTTGGGTTTGTGTTAACGGCGTTTTTGCTGTTTTAAACATGTCATTT
VV	CCTTTGTCCGTTTCTTTGGGTTTGTGTTAACGGCGTTTTTGCTGTTTTAAACATGTCATTT
NB	CCTTTCTTAAGCAACGCATCTCTTTTGACGGGCGTCGGAAAAAATGTTGTTCAAGAGAAA
VV	CCTTTCTTAAGCAACGCATCTCTTTTGACGGGCGTCGGAAAAAATGTTGTTCAAGAGAAA
NB	ATAAAAAATTTCCAAATTTGAGAAGAAACAGAAGAAGCGCGTTTTTTTCGATAGCTCGCGCT
VV	ATAAAAAATTTCCAAATTTGAGAAGAAACAGAAGAAGCGCGTTTTTTTCGATAGCTCGCGCT
NB	ACCGCGCGTCATGTGCCTTCCCGTCGCAATCCTAAGGAGAAGCGTGTTGTCCATGTACAG
VV	ACCGCGCGTCATGTGCCTTCCCGTCGCAATCCTAAGGAGAAGCGTGTTGTCCATGTACAG
NB	CATCTCCCTAGTGGTTCTTTACGCTTTTCCCAAACAAAAACAAAACAGAACTGCTCATC
VV	CATCTCCCTAGTGGTTCTTTACGCTTTTCCCAAACAAAAACAAAACAGAACTGCTCATC
NB	TTAAAAGAGGAAGTCGGAATTGTGCGCGCGGTTAAGTGTTTCGGCAAGCGTCGTGCGCCGT
VV	TTAAAAGAGGAAGTCGGAATTGTGCGCGCGGTTAAGTGTTTCGGCAAGCGTCGTGCGCCGT
NB	CGCGTTTGTGGCGGTGTGGTTAAGTGCAAACCCCTAATAGCCGTTTCTCCCTCTGGCGTG
VV	CGCGTTTGTGGCGGTGTGGTTAAGTGCAAACCCCTAATAGCCGTTTCTCCCTCTGGCGTG
NB	AAATTCGGTTGTTTCGCGCCGCTCTTGACGACAGTCCGCTTGTTTAAAGCTCAAAATCATG
VV	AAATTCGGTTGTTTCGCGCCGCTCTTGACGACAGTCCGCTTGTTTAAAGCTCAAAATCATG
NB	CGCCGTGTTGCCGTCGGTGACTGCCGAGGTGAGAAGATAATCGCGGCACGACGTGCGGCG
VV	CGCCGTGTTGCCGTCGGTGACTGCCGAGGTGAGAAGATAATCGCGGCACGACGTGCGGCG
NB	CTGCAGAAGCAGGCTTTCAACAGCCGCACACCGAAGAAAGTGCGAGAGAACCCCATTAGC
VV	CTGCAGAAGCAGGCTTTCAACAGCCGCACACCGAAGAAAGTGCGAGAGAACCCCATTAGC
NB	GTCTCCGGGGTGAACCTTGGGAAGGTCTGCCGCCGCTCAGGTTATTTATTTTCGGCAGTTTC
VV	GTCTCCGGGGTGAACCTTGGGAAGGTCTGCCGCCGCTCAGGTTATTTATTTTCGGCAGTTTC
NB	ACGCAGCCCTTCGCGTTGTATCCGCGCCAAGAGAGCGCGATCGTAAAAACGCAACCTCCA
VV	ACGCAGCCCTTCGCGTTGTATCCGCGCCAAGAGAGCGCGATCGTAAAAACGCAACCTCCA
NB	CCGGTCAGTGTAGTGAAGGTGGAGTGCGTAGCTGCGGAGGTAGCTCCCCACAGGGGCGTG
VV	CCGGTCAGTGTAGTGAAGGTGGAGTGCGTAGCTGCGGAGGTAGCTCCCCACAGGGGCGTG

Figura 14

NB	GTCGACAAGAAACCTACGTCTGTTGGCGTTCCCCCGCAGCGCGGTGTGCTTTCTTTTCCG
VV	GTCGACAAGAAACCTACGTCTGTTGGCGTTCCCCCGCAGCGCGGTGTGCTTTCTTTTCCG
NB	ACGGTGGTTCGGAACCGCGGCGACGTGATAATCACAGGGGTGGTGCATGAAGCCCTGAAG
VV	ACGGTGGTTCGGAACCGCGGCGACGTGATAATCGCAGGGGTGGTGCATGAAGCCCTGAAG
NB	AAAATTAAAGACGGGCTCTTACGCTTCCGCGTAGGCGGTGACATGCGTTTTTCGAGATTT
VV	AAAATTAAAGACGGGCTCTTACGCTTCCGCGTAGGCGGTGACATGCGTTTTTCGAGATTT
NB	TTCTCATCGAACTACGGCTGCAGATTTCGTCGCGAGCGTGCCTACGAACACTACAGTTTGG
VV	TTCTCATCGAACTACGGCTGCAGATTTCGTCGCGAGCGTGCCTACGAACACTACAGTTTGG
NB	CTAAATTGCACGAAAGCGAGTGGTGAGAAATTCTCACTCGCCGCCGCGTGCACGGCGGAT
VV	CTAAATTGCACGAAAGCGAGTGGTGAGAAATTCTCACTCGCCGCCGCGTGCACGGCGGAT
NB	TACGTGGCGATGCTGCGTTATGTGTGTGGCGGGAAATTCCTCTCGTCCTCATGAGTAGA
VV	TACGTGGCGATGCTGCGTTATGTATGTGTGGCGGGAAATTCCTCTCGTCCTCATGAGTAGA
NB	GTTATTTACCCGGATGGGCGCTGTTACTTGGCCCATATGAGGTATTTGTGCGCCTTTTAC
VV	GTTATTTACCCGGAAAGGGCGCTGTTACTTGGCCCATATGAGGTATTTGTGCGCCTTTTAC
NB	TGTCGCCCCGTTTAGAGAGTCGGATTATGCCCTCGGAATGTGGCCTACGGTGGCGCGTCTC
VV	TGTCGCCCCGTTTAGAGAGTCGGATTATGCCCTCGGAATGTGGCCTACGGTGGCGCGTCTC
NB	AGGGCATGCGTTGAGAAGAACTTCGGTGTGGAAGCTTGTGGCATAGCTCTTCGTGGCTAT
VV	AGGGCATGCGTTGAGAAGAACTTCGGTGTGGAAGCTTGTGGCATAGCTCTTCGTGGCTAT
NB	TACACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAATATTTTAGA
VV	TACACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAATATTTTAGA
NB	AACCTTTCCGGCCGCATTGGCGGTGGTTCGTTTCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA
VV	AACCTTTCCGGCCGCATTGGCGGTGGTTCGTTTCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA
NB	ACGGTGAAGATTAGCGGTCTTCCAGGTGGTCTTCCTAAAAATATAGCGTTTGGTGCCCTTC
VV	ACGGTGAAGATTAGCGGTCTTCCAGGTGGTCTTCCTAAAAATATAGCGTTTGGTGCCCTTC
NB	CTGTGCGATATACGTTACGTGCAACCGGTAGACTCGGGCGGCATTCAATCGAGCGTTAAG
VV	CTGTGCGATATACGTTACGTGCAACCGGTAGACTCGGGCGGCATTCAATCGAGCGTTAAG
NB	ACGAAACGTGAAGATGCGCACCGAACCGTAGAGGAACGGGCGGCCGGGATCCGTCGAG
VV	ACGAAACGTGAAGATGCGCACCGAACCGTAGAGGAACGGGCGGCCGGGATCCGTCGAG
NB	CAACCGCGACAAAAGAGGATAGATGAGAAAGGTTGCGGCAGAGTTCCTAGTGGAGGTTTT
VV	CAACCGCGACAAAAGAGGATAGATGAGAAAGGTTGCGGCAGAGTTCCTAGTGGAGGTTTT
NB	TCGCATCTCCTGGTGGCAGCCTTAACGAAGTTAGGAGGAAGGTAGCTGCCGGACTTCTA
VV	CCGCATCTCCTGGTGGCAGCCTTAACGAAGTTAGGAGGAAGGTAGCTGCCGGACTTCTA
NB	CGCTTTTCGCGTTGGCGGTGATATGGATTTTCATCGCTCGTCTCCACCCAAGCGGGCCAC
VV	CGCTTTTCGCGTTGGCGGTGATATGGATTTTCATCGCTCGTCTCCACCCAAGCGGGCCAC
NB	CGCTTGCTGGTGTGGCGCCGCTCGAGCCGGAGCGTGTGCCTTGAACCTTTACTCACCATCT
VV	CGCTTGCTGGTGTGGCGCCGCTCGAGCCGGAGCGTGTGCCTTGAACCTTTACTCACCATCT
NB	AAAAACTTTTTCGTTACGATGTCTTGCCCTTGTTCTGGAGACTATGCAGCGATGTTTTCT
VV	AAAAACTTTTTCGTTGCGATGTCTTGCCCTTGTTCTGGAGACTATGCAGCGATGTTTTCT
NB	TTGCGGGCGGGCGGCCGTTTCCCTTTAGTTTTGATGACTAGAATTAGATACCCGAACGGG
VV	TTGCGGGCGGGCGGCCGTTTCCCTTTAGTTTTGATGACTAGAATTAGATACCCGAACGGG

Figura 14

NB	TTTTGTTACTTGGCTCACTGCCGGTACGCGTGCGCGTTTCTCTTAAGGGGTTTTGATCCG
VV	TTTTGTTACTTGGCTCACTGCCGGTACGCGTGCGCGTTTCTCTTAAGGGGTTTTGATCCG
NB	AAGCGTTTCGACATCGGTGCTTTCCCCACCGCAGCCAAGCTCAGAAACCGTATGGTTTCG
VV	AAGCGTTTCGACATCGGTGCTTTCCCCACCGCGGCCAAGCTCAGAAACCGTATGGTTTCG
NB	GAGCTTGGTGAAAGAAGTTTAGGTTTGAACCTGTACGGCGCATATACGTCACGCGGCGTC
VV	GAGCTTGGTGAAAGAAGTTTAGGTTTGAACCTGTACGGCGCATATACGTCACGCGGCGTC
NB	TTTCACTGCGATTATGACGCTAAGTTTATAAAGGATTTGCGTCTTATGTCAGCAGTTATA
VV	TTTCACTGCGATTATGACGCTAAGTTTATAAAGGATTTGCGTCTTATGTCAGCAGTTATA
NB	GCTGGAAAGGACGGAGTGGAAGAGGTGGTACCTTCTGACATAACTCCTGCCATGAAGCAG
VV	GCTGGAAAGGACGGGGTGGAAGAGGTGGTACCTTCTGACATAACTCCTGCCATGAAGCAG
NB	AAAACGATCGAAGCCGTGTATGATAGATTATATGGCGGCACTGACTCGTTGCTGAAACTG
VV	AAAACGATCGAAGCCGTGTATGATAGATTATATGGCGGCACTGACTCGTTGCTGAAACTG
NB	AGCATCGAGAAAGACTTAATCGATTTCAAAAATGACGTGCAGAGTTTGAAGAAAGATCGG
VV	AGCATCGAGAAAGACTTAATCGATTTCAAAAATGACGTGCAGAGTTTGAAGAAAGATCGG
NB	CCGATTGTCAAAGTGCCCTTTTATATGTGCGGAAGCAACACAGAATTCGCTGACGCGTTTC
VV	CCGATTGTCAAAGTGCCCTTTTATATGTGCGGAAGCAACACAGAATTCGCTGACGCGTTTC
NB	TACCCTCAGTTCGAACTTAAGTTTTCGCACTCCTCGCATTCAGATCATCCCGCCGCCGCC
VV	TACCCTCAGTTCGAACTTAAGTTTTCGCACTCCTCGCATTCAGATCATCCCGCCGCCGCC
NB	GCTTCTAGACTGCTGGAATAAGAAAGTGTAGTGCGCTTATGTGGTAATAGCGTTTCAGAT
VV	GCTTCTAGACTGCTGGAATAAGAAAGTGTAGTGCGCTTATGTGGTAATAGCGTTTCAGAT
NB	ATTGGAGGTTGTCTCTTTTCCATTTCGATTCCAAGACGCAAAGACGGGTTACAGTATGT
VV	ATTGGAGGTTGTCTCTTTTCCATTTCGATTCCAAGACGCAAAGACGGGTTACAGTATGT
NB	AGGCCTGTGTTGGATGGCAAGGATGCGCAGCGTCGCGTGGTGCGTGATTGTCAGTATTCC
VV	AGGCCTGTGTTGGATGGCAAGGATGCGCAGCGTCGCGTGGTGCGTGATTGTCAGTATTCC
NB	AACGTGCGTTGGGGAGACGATGATAAAATTTTGGAAAGGGCCACGCAATATCGACATTTGC
VV	AACGTGCGTTGGGGAGACGATGATAAAATTTTGGAAAGGGCCACGCAATATCGACATTTGC
NB	CACTATCCTCTGGGCGCGTGTGACCACGAAAGTAGTGCTATGATGATGGTGCAGGTGTAT
VV	CACTATCCTCTGGGCGCGTGTGACCACGAAAGTAGTGCTATGATGATGGTGCAGGTGTAT
NB	GACGCGTCCCTTTATGAGATATGTGGCGCCATGATCAAGAAGAAAAGCCGCATAACGTAC
VV	GACGCGTCCCTTTATGAGATATGTGGCGCCATGATCAAGAAGAAAAGCCGCATAACGTAC
NB	TTAACCATGGTCACGCCCGGCGAGTTTCTTGACGGACGCGAATGCGTCTATATGGAGTCG
VV	TTAACCATGGTCACGCCCGGCGAGTTTCTTGACGGACGCGAATGCGTCTATATGGAGTCG
NB	TTAGACTGTGAGATTGAGGTTGATGTGCACGCGGACGTCGTAATGTACAAATTCGGTAGT
VV	TTAGACTGTGAGATTGAGGTTGATGTGCACGCGGACGTCGTAATGTACAAATTCGGTAGT
NB	TCTTGCTATTTCGCACAAGCTTTCAATCATCAAGGACATCATGACCACTCCGTACTTGACA
VV	TCTTGCTATTTCGCACAAGCTTTCAATCATCAAGGACATCATGACCACTCCGTACTTGACA
NB	CTAGGTGGTTTTCTATTACGCGTGGAGATGTATGAGGTGCGTATGGGCGTGAATTACTTC
VV	CTAGGTGGTTTTCTATTACGCGTGGAGATGTATGAGGTGCGTATGGGCGTGAATTACTTC
NB	AAGATTACGAAGTCCGAAGTATCGCCTAGCATTAGCTGCACCAAGCTCCTGAGATACCGA
VV	AAGATTACGAAGTCCGAAGTATCGCCTAGCATTAGCTGCACCAAGCTCCTGAGATACCGA

Figura 14

NB	AGAGCTAATAGTGACGTGGTTAAAGTTAAACTTCCACGTTTCGATAAAGAAACGTCGCATG
VV	AGAGCTAATAGCGACGTGGTTAAAGTTAAACTTCCACGTTTCGATAAAGAAACGTCGCATG
NB	TGTCTGCCTGGGTATGACACCATATACCTAGATTCTGAAGTTTGTGAGTCGCGTTTTTCGAT
VV	TGTCTGCCTGGGTATGACACCATATACCTAGATTCTGAAGTTTGTGAGTCGCGTTTTTCGAT
NB	TATGTCGTGTGTAATTGCTCTGCCGTGAACCTCAAAAACCTTTCGAGTGGGTGTGGAGTTTC
VV	TATGTCGTGTGTAATTGCTCTGCCGTGAACCTCAAAAACCTTTCGAGTGGGTGTGGAGTTTC
NB	ATTAAGTCTAGTAAGTCGAGGGTGATTATTAGCGGTAAAATAATTCACAAGGATGTGAAT
VV	ATTAAGTCTAGCAAGTCGAGGGTGATTATTAGCGGTAAAATAATTCACAAGGATGTGAAT
NB	TTGGACCTTAAGTACGTCGAGAGTTTCGCCCGCGGTTATGTTGGCCTCTGGCGTGCGCAGC
VV	TTGGACCTCAAGTACGTCGAGAGTTTCGCCCGCGGTTATGTTGGCCTCTGGCGTGCGCAGC
NB	AGACTAGCGTCCGAGTACCTTGCTAAGAACCTTAGTCATTTTTTCGGGAGATTGCTCCTTT
VV	AGACTAGCGTCCGAGTACCTTGCTAAGAACCTTAGTCATTTTTTCGGGAGATTGCTCCTTT
NB	ATTGAAGCCACGTCTTTCGTGTTGCGTGAGAAAATCAGAAACATGACTCTGAATTTTAAC
VV	ATTGAAGCCACGTCTTTCGTGTTGCGTGAGAAAATCAGAAACATGACTCTGAATTTTAAC
NB	GAAAGACTTTTACAGTTAGTGAAGCGCGTTGCCCTTTGCGACCTTGACGCTGAGTTTTCTA
VV	GAAAGACTTTTACAGTTAGTGAAGCGCGTTGCCCTTTGCGACCTTGACGCTGAGTTTTCTA
NB	GATTTAGATTCAACTCTTGAATCAATAACTGATTTTGCCGAGTGTAAGGTAGCGATTGAA
VV	GATTTAGATTCAACTCTTGAATCAATAACTGATTTTGCCGAGTGTAAGGTAGCGATTGAA
NB	CTCGACGAGTTGGGTTGCTTGAGAGCGGAGGCCGAGAATGAAAAATCAGGAATCTGGCG
VV	CTCGACGAGTTGGGTTGCTTGAGAGCGGAGGCCGAGAATGAAAAATCAGGAATCTAGCG
NB	GGAGATTGCGATTGCGGCTAAACTCGCGAGCGAGATAGTGGTCGATATTGACTCTAAGCCT
VV	GGAGATTGCGATTGCGGCTAAACTCGCGAGCGAGATAGTGGTCGATATTGACTCTAAGCCT
NB	TCACCGAAGCAGGTGGGTAATTCGTTCATCCGAAAACGCCGATAAGCGGGAAGTTCAGAGG
VV	TCACCGAAGCAGGTGGGTAATTCGTTCATCCGAAAACGCCGATAAGCGGGAAGTTCAGAGG
NB	CCCGGTTTGCCTGGTGGTTCTAGAAACGGGGTTGTTGGGGAGTTCCTTCACTTCGTCGTG
VV	CCCGGTTTGCCTGGTGGTTCTAGGAACGGGGTTGTTGGGGAGTTCCTTCACTTCGTCGTG
NB	GATTCTGCCTTGCGTCTTTTCAAAATACGCGACGGATCAACAACGGATCAAGTCTTACGTG
VV	GATTCTGCCTTGCGTCTTTTCAATACGCGACGGATCAACAACGGATCAAGTCTTACGTG
NB	CGTTTCTTGGACTCGGCGGTCTCATTCTTGGATTACAACCTACGATAATCTATCGTTTATA
VV	CGTTTCTTGGACTCGGCGGTCTCATTCTTGGATTACAACCTACGATAATCTATCGTTTATA
NB	CTGCGAGTGCTTTTCGGAAGGTTATTCGTGTATGTTGCGGTTTTTGGCGAATCGCGGCGAC
VV	CTGCGAGTGCTTTTCGGAAGGTTATTCGTGTATGTTGCGGTTTTTGGCGAATCGCGGCGAC
NB	TTATCTAGTCGTGTCCGTAGCGCGGTGCGTGCTGTGAAAGAAGTTGCTACCTCATGCGCG
VV	TTATCTAGTCGTGTCCGTAGCGCGGTGCGTGCTGTGAAAGAAGTTGCTACCTCATGCGCG
NB	AACGCGAGCGTTTCTAAAGCCAAGGTTATGATTACCTTCGCAGCGGCCGTGTGTGCTATG
VV	AACGCGAGCGTTTCTAAAGCCAAGGTTATGATTACCTTCGCAGCGGCCGTGTGTGCTATG
NB	ATGTTTAATAGCTGCGGTTTTTTCAGGCGACGGTCGGGAGTATAAATCGTATATACATCGT
VV	ATGTTTAATAGCTGCGGTTTTTTCAGGCGACGGTCGGGAGTATAAATCGTATATACATCGT
NB	TACACGCAAGTATTGTTTGACACTATCTTTTTTGGAGACAGCAGTTACCTACCCATAGAA
VV	TACACGCAAGTATTGTTTGACACTATCTTTTTTGGAGACAGCAGTTACCTACCCATAGAA

Figura 14

NB	GTTCTGAGTTCGGCGATATGCGGTGCTATCGTCACACTTTTCTCCTCGGGCTCGTCCATA
VV	GTTCTGAGTTCGGCGATATGCGGTGCTATCGTCACACTTTTCTCCTCGGGCTCGTCCATA
NB	AGTTTAAACGCCTTCTTACTTCAAATTACCAAAGGATTCTCCCTAGAGGTTGTCGTCCGG
VV	AGTTTAAACGCCTTCTTACTTCAAATTACCAAAGGATTCTCCCTAGAGGTTGTCGTCCGG
NB	AATGTTGTGCGAGTCACGCATGGTTTGAGCACCACAGCGACCGACGGCGTCATACGTGGG
VV	AATGTTGTGCGAGTCACGCATGGTTTGAGCACCACAGCGACCGACGGCGTCATACGTGGG
NB	GTTTTCTCCCAAATTGTGTCTCACTTACTTGTGAAATACCGGTAATGTGGCTTACCAG
VV	GTTTTCTCCCAAATTGTGTCTCACTTACTTGTGAAATACCGGTAATGTGGCTTACCAG
NB	TCAGCTTTCATTGCCGGGGTGGTGCCTCTTTTAGTTAAAAAGTGTGTGAGCTTAATCTTC
VV	TCAGCTTTCATTGCCGGGGTGGTGCCTCTTTTAGTTAAAAAGTGTGTGAGCTTAATCTTC
NB	ATCTTGCGTGAAGATACTTATTCGGTTTTTATTAAGCACGGAATCAGTGAATTCTCTTTC
VV	ATCTTGCGTGAAGATACTTATTCGGTTTTTATTAAGCACGGAATCAGTGAATTCTCTTTC
NB	CTTAGTAGTATTCTGAAGTTCTTGAAGGGTAAGCTTGTGGACGAGTTGAAATCGATTATT
VV	CTTAGTAGTATTCTGAAGTTCTTGAAGGGTAAGCTTGTGGACGAGTTGAAATCGATTATT
NB	CAAGGGGTTTTTGATTCCAACAAGCACGTGTTTAAAGAAGCTACTCAGGAAGCGATTTCGT
VV	CAAGGGGTTTTTGATTCCAACAAGCACGTGTTTAAAGAAGCTACTCAGGAAGCGATTTCGT
NB	ACGACGGTCATGCAAGTGCCTGTCGCTGTAGTGGATGCCCTTAAGAGCGCCGCGGAAAA
VV	ACGACGGTCATGCAAGTGCCTGTCGCTGTAGTGGATGCCCTTAAGAGCGCCGCGGAAAA
NB	ATTTATAACAATTTTACTAGTCGACGTACCTTTGGTAAGGATGAAGGCTCCTCTAGCGAC
VV	ATTTATAACAATTTTACTAGTCGACGTACCTTTGGTAAGGATGAAGGCTCCTCTAGCGAC
NB	GGCGCATGTGAAGAGTATTTCTCATGCGACGAAGGTGAAGGTCCGGGTCTGAAAGGGGGT
VV	GGCGCATGTGAAGAGTATTTCTCATGCGACGAAGGTGAAGGTCCGGGTCTGAAAGGGGGT
NB	TCCAGCTATGGCTTCTCAATTTTAGCGTTCTTTTCACGCATTATGTGGGGAGCTCGTCGG
VV	TCCAGCTATGGCTTCTCAATTTTAGCGTTCTTTTCACGCATTATGTGGGGAGCTCGTCGG
NB	CTTATTGTTAAAGTGAAGCATGAGTGTGTTGGGAAACTTTTTGAATTTCTATCGCTCAAG
VV	CTTATTGTTAAAGTGAAGCATGAGTGTGTTGGGAAACTTTTTGAATTTCTATCGCTCAAG
NB	CTTCACGAATTCAGGACTCGCGTTTTTGGGATGAATAGAACGGACGTGGGAGTTTACGAT
VV	CTTCACGAATTCAGGACTCGCGTTTTTGGGAAGAATGAACGGACGTGGGAGTTTACGAT
NB	TTTTTGCCACGGACATCGTGGAACGCTCTCATCGATAGAAGAGTGCGACCAAATTGAA
VV	TTTTTGCCACGGACATCGTGGAACGCTCTCATCGATAGAAGAGTGCGACCAAATTGAA
NB	GAACTTCTCGGCGACGACCTGAAAGGTGACAAGGATGCTTCGTTGACCGATATGAATTAC
VV	GAACTTCTCGGCGACGACCTGAAAGGTGACAAGGATGCTTCGTTGACCGATATGAATTAC
NB	TTTGAGTTCTCAGAAGACTTCTTAGCCTCTGTGCGAGGAGCCGCCTTTCGCTGGATTGCGA
VV	TTTGAGTTCTCAGAAGACTTCTTAGCCTCTGTGCGAGGAGCCGCCTTTCGCTGGATTGCGA
NB	GGAGGTAGCAAGAACGTCGCGATTTTGGCGATTTTGGGAATACGCGCATAATTTGTTTCGC
VV	GGAGGTAGCAAGAACGTCGCGATTTTGGCGATTTTGGGAATACGCGCATAATTTGTTTCGC
NB	ATTGTCGCAAGCAAGTGTTTCAAACGACCTTTATTTCTTGCTTTTCGCCGAACCTCTCAAGC
VV	ATTGTCGCAAGCAAGTGTTTCAAACGACCTTTATTTCTTGCTTTTCGCCGAACCTCTCAAGC
NB	GCCCTTATCGAGAAATTTAAGGAGGTTTTCCCTCGTAAGAGCCAGCTCGTCGCTATCGTG
VV	GCCCTTATCGAGAAATTTAAGGAGGTTTTCCCTCGTAAGAGCCAGCTCGTCGCTATCGTG

Figura 14

NB	CGCGAGTATACTCAGAGATTCTCCGAAGTCGCATGCGTGCGTTGGGTTTGAATAACGAG
VV	CGCGAGTATACTCAGAGATTCTCCGAAGTCGCATGCGTGCGTTGGGTTTGAATAACGAG
NB	TTCGTGGTAAAATCTTTCGCCGATTGCTACCCGCATTAATGAAGCGGAAGGTTTCAGGT
VV	TTCGTGGTAAAATCTTTCGCCGATTGCTACCCGCATTAATGAAGCGGAAGGTTTCAGGT
NB	TCGTTCTTAGCTAGTGTATATCGCCCACTTAGAGGTTTCTCATATATGTGTGTTTCAGCG
VV	TCGTTCTTAGCTAGTGTATATCGCCCACTTAGAGGTTTCTCATATATGTGTGTTTCAGCG
NB	GAGCGACGTGAAAAGTTTTTGTCTCTCGTGTGTTAATCGGGTTAAGTCTCCCTTTCTTC
VV	GAGCGACGTGAAAAGTTTTTGTCTCTCGTGTGTTAATCGGGTTAAGTCTCCCTTTCTTC
NB	GTGCGCATCGTAGGAGCGAAAGCGTGCAGAACTCGTGTCTCAGCGCGTCGCTTTTAT
VV	GTGCGCATCGTAGGAGCGAAAGCGTGCAGAACTCGTGTCTCAGCGCGTCGCTTTTAT
NB	GAGCGTATTAAAATTTTTCTCAGGCAGAAGTATGTCTCTCTTTCTAATTTCTTTTGTAC
VV	GAGCGTATTAAAATTTTTCTCAGGCAGAAGTATGTCTCTCTTTCTAATTTCTTTTGTAC
NB	TTGTTTAGCTCTGACGTTGATGACAGTTCGCGATCAGCAGGGTTGAAAGGTGGTGCCTCG
VV	TTGTTTAGCTCTGACGTTGATGACAGTTCGCGATCAGCAGGGTTGAAAGGTGGTGCCTCG
NB	CGAATGACGCTCTTCCACCTTCTGGTTCGCCTTGCTAGTGCCCTCCTATCGTTAGGGTGG
VV	CGAATGACGCTCTTCCACCTTCTGGTTCGCCTTGCTAGTGCCCTCCTATCGTTAGGGTGG
NB	GAAGGGTTAAAGCTACTCTTATCGCACCACAACCTGTTATTTTTGTGTTTTGCATTGGTT
VV	GAAGGGTTAAAGCTACTCTTATCGCACCACAACCTGTTATTTTTGTGTTTTGCATTGGTT
NB	GACGATGTGAACGTCCTTATCAAAGTTCTTGGGGGTCTTTCTTTCTTTGTGCAACCAATC
VV	GACGATGTGAACGTCCTTATCAAAGTTCTTGGGGGTCTTTCTTTCTTTGTGCAACCAATC
NB	TTTTCTTGTGTTGCGGCGATGCTTTTACAACCGGACAGGTTTGTGGGGTATTCCGAGAAA
VV	TTTTCTTGTGTTGCGGCGATGCTTTTACAACCGGACAGGTTTGTGGGGTATTCCGAGAAA
NB	CTTGTTACAGCGTTTGAATTTTTCTTAAATGTTTCGCCTCGCGCGCTGCACTACTCAA
VV	CTTGTTACAGCGTTTGAATTTTTCTTAAATGTTTCGCCTCGCGCGCTGCACTACTCAA
NB	GGGTTTTTTGAGTGCGTGGCGAACAGCACTGTGTCAAAAACCGTTCAAGACTTCTTCGC
VV	GGGTTTTTTGAGTGCGTGGCGAACAGCACTGTGTCAAAAACCGTTCAAGACTTCTTCG
NB	TATTTCTGTGAGGATGCTCAAACCTCGAAAAGGGCGAGGGTTGCGTGCGGATGGTAGGGGT
VV	TATTTCTGTGAGGATGCTCAAACCTCGAAAAGGGCGAGGGTTGCGTGCGGATGGTAGGGGT
NB	CTCCATCGGCAGAAAGCCGTACCCGTCATACCTTCTAATCGGGTCGTGACCGACGGGGTT
VV	CTCCATCGGCAGAAAGCCGTACCCGTCATACCTTCTAATCGGGTCGTGACCGACGGGGTT
NB	GAAAGACTTTTCGGTAAAGATGCAAGGAGTTGAAGCGTTGCGTACCGAATTGAGAATCTTA
VV	GAAAGACTTTTCGGTAAAGATGCAAGGAGTTGAAGCGTTGCGTACCGAATTGAGAATCTTA
NB	GAAGATTTAGATTCTGCCGTGATCGAAAACTCAATAGACGCAGAAATCGTGACACTAAT
VV	GAAGATTTAGATTCTGCCGTGATCGAAAACTCAATAGACGCAGAAATCGTGACACTAAT
NB	GACGACGAATTTACGCGCCCTGCTCATGAGCAGATGCAAGAAGTCAACCACTTTCTGTTCG
VV	GACGACGAATTTACGCGCCCTGCTCATGAGCAGATGCAAGAAGTCAACCACTTTCTGTTCG
NB	AAAGCCAACCTCTGCTGGTTTGGCCCTGGAAAGGGCAGTGCTTGTGGAAGACGCTATAAAG
VV	AAAGCCAACCTCTGCTGGTTTGGCCCTGGAAAGGGCAGTGCTTGTGGAAGACGCTATAAAG
NB	TCGGAGAACTTTCTAAGACGGTTAATGAGATGGTGAGGAAAGGGAGTACCACCAGCGAA
VV	TCGGAGAACTTTCTAAGACGGTTAATGAGATGGTGAGGAAAGGGAGTACCACCAGCGAA

Figura 14

NB	GAAGTGGCCGTCGCTTTGTGCGACGATGAAGCCGTGGAAGAAATCTCTGTTGCTGACGAG
VV	GAAGTGGCCGTCGCTTTGTGCGACGATGAAGCCGTGGAAGAAATCTCTGTTGCTGACGAG
NB	CGAGACGATTTCGCCTAAGACAGTCAGGATAAGCGAATACCTAAATAGGTTAAACTCAAGC
VV	CGAGACGATTTCGCCTAAGACAGTCAGGATAAGCGAATACCTAAATAGGTTAAACTCAAGC
NB	TTCGAATTCCCGAAGCCTATTGTTGTGGACGACAACAAGGATACCGGGGTCTAACGAAC
VV	TTCGAATTCCCGAAGCCTATTGTTGTGGACGACAACAAGGATACCGGGGTCTAACGAAC
NB	GCCGTGAGGGAGTTTTATTATATGCAAGAACTTGCTCTTTTCGAAATCCACAGCAAACCTG
VV	GCCGTGAGGGAGTTTTATTATATGCAAGAACTTGCTCTTTTCGAAATCCACAGCAAACCTG
NB	TGCGCCTACTACGATCAACTGCGCATAGTCAACTTCGATCGTTCCGTAGCACCATGCAGC
VV	TGCGCCTACTACGATCAACTGCGCATAGTCAACTTCGATCGTTCCGTAGCACCATGCAGC
NB	GAAGATGCTCAGCTGTACGTACGGAAGAGCGGCTCAACGATAGTGCAGGGTAAAGAGGTA
VV	GAAGATGCTCAGCTGTACGTACGGAAGAGCGGCTCAACGATAGTGCAGGGTAAAGAGGTA
NB	CGTTTGACACATTAAGGATTTCACGATCAGGATTTCCTGTTTGACGGGAAAATTTCTATT
VV	CGTTTGACACATTAAGGATTTCACGATCAGGATTTCCTGTTTGACGGGAAAATTTCTATT
NB	AACAAGCGGCGGCGAGGCGGAAACGTTTTATATCACGACAACCTCGCGTTCTTGCGGAGT
VV	AACAAGCGGCGGCGAGGCGGAAACGTTTTATATCACGACAACCTCGCGTTCTTGCGGAGT
NB	AATTTGTTCTTAGCCGGCTACCCCTTTTCAAGGAGCTTCGTCTTCACGAATTCGTGCGTC
VV	AATTTGTTCTTAGCCGGCTACCCCTTTTCAAGGAGCTTCGTCTTCACGAATTCGTGCGTC
NB	GATATTCTCCTCTACGAAGCTCCACCCGGAGGTGGTAAGACGACGACGCTGATTGACTCG
VV	GATATTCTCCTCTACGAAGCTCCACCCGGAGGTGGTAAGACGACGACGCTGATTGACTCG
NB	TTCTTGAAGGTCTTCAAGAAAGGTGAGGTTTCCACCATGATCTTAACCGCCAACAAAAGT
VV	TTCTTGAAGGTCTTCAAGAAAGGTGAGGTTTCCACCATGATCTTAACCGCCAACAAAAGT
NB	TCGCAGGTTGAGATCCTAAAGAAAGTGAGGAGGAAGTGTCTAACATTGAATGCCAGAAA
VV	TCGCAGGTTGAGATCCTAAAGAAAGTGAGGAGGAAGTGTCTAACATTGAATGCCAGAAA
NB	CGTAAAGACAAGAGATCTCCGAAAAAGAGCATTACACCATCGACGCTTATTTAATGCAT
VV	CGTAAAGACAAGAGATCTCCGAAAAAGAGCATTACACCATCGACGCTTATTTAATGCAT
NB	CACCGTGGTTGTGATGCAGACGTTCTTTTCATCGATGAGTGTTCATGGTTCATGCGGGT
VV	CACCGTGGTTGTGATGCAGACGTTCTTTTCATCGATGAGTGTTCATGGTTCATGCGGGT
NB	AGCGTACTAGCTTGCAATTGAGTTCACGAGGTGTCATAAAGTAATGATCTTCGGGGATAGC
VV	AGCGTACTAGCTTGCAATTGAGTTCACGAGGTGTCATAAAGTAATGATCTTCGGGGATAGC
NB	CGGCAGATTCACCTACATTGAAAGGAACGAATTGGACAAGTGTTTGTATGGGGATCTCGAT
VV	CGGCAGATTCACCTACATTGAAAGGAACGAATTGGACAAGTGTTTGTATGGGGATCTCGAT
NB	AGGTTTCGTGGACCTGCAGTGTGCGGTTTATGGTAATATTTTCGTACCGTTGTCCATGGGAT
VV	AGGTTTCGTGGACCTGCAGTGTGCGGTTTATGGTAATATTTTCGTACCGTTGTCCATGGGAT
NB	GTGTGCGCTTGTTAAGCACAGTGTATGGCAACCTAATCGCCACCGTGAAGGGTGAAAGC
VV	GTGTGCGCTTGTTAAGCACAGTGTATGGCAACCTAATCGCCACCGTGAAGGGTGAAAGC
NB	GAAGGTAAGAGCAGCATGCGCATTAAACGAAATTAATTCAGTCGACGATTTAGTCCCCGAC
VV	GAAGGTAAGAGCAGCATGCGCATTAAACGAAATTAATTCAGTCGACGATTTAGTCCCCGAC
NB	GTGGGTTCCACGTTTCTGTGTATGCTTCAGTCGGAGAAGTTGGAAATCAGCAAGCACTTT
VV	GTGGGTTCCACGTTTCTGTGTATGCTTCAGTCGGAGAAGTTGGAAATCAGCAAGCACTTT

Figura 14

NB	ATTCGCAAGGGTTTGCCTAAACCTTAACGTTCTAACTGTGCATGAGGCGCAAGGTGAGACG
VV	ATTCGCAAGGGTTTGA <u>CT</u> AAATTTAACGTTCTAA <u>C</u> GGTGCATGAGGCGCAAGGTGAGACG
NB	TATGCGCGTGTGAACCTTGTGCGACTTAAGTTTCAGGAGGATGAACCCTTTAAATCTATC
VV	TATGCGCGTGTGAACCTTGTGCGACTTAAGTTTCAGGAGGATGAACCCTTTAAATCTATC
NB	AGGCACATAACCGTCGCTCTTTCTCGTCACACCGACAGCTTAACCTATAACGTCTTAGCT
VV	AGGCACATAACCGTCGCTCTTTCTCGTCACACCGACAGCTTAACCTATAACGTCTTAGCT
NB	GCTCGTCGAGGTGACGCCACTTGCGATGCCATCCAGAAGGCTGCGGAATTGGTGAACAAG
VV	GCTCGTCGAGGTGACGCCACTTGCGATGCCATCCAGAAGGCTGCGGAATTGGTGAACAAG
NB	TTTCGCGTTTTTCTACATCTTTTGGTGGTAGTGTTATCAATCTCAACGTGAAAAGGAC
VV	TTTCGCGTTTTTCTACATCTTTTGGTGGTAGTGTTATCAATCTCAACGTGAAGAGGAC
NB	GTGGAAGATAACAGTAGGTGCAAGGCTTCGTCGGCACCATTGAGCGTAATCAACGACTTT
VV	GTGGAAGATAACAGTAGGTGCAAGGCTTCGTCGGCACCATTGAGCGTAATCAACGACTTT
NB	TTGAACGAAGTTAATCCCGGTACTGCGGTGATTGATTTTGGTGATTGTCCGCGGACTTC
VV	TTGAACGAAGTTAATCCCGGTACTGCGGTGATTGATTTTGGTGATTGTCCGCGGACTTC
NB	AGTACTGGGCCTTTTGAGTGCGGTGCCAGCGGTATTGTGGTGCGGGACAACATCTCCTCC
VV	AGTACTGGGCCTTTTGAGTGCGGTGCCAGCGGTATTGTGGTGCGGGACAACATCTCCTCC
NB	AGCAACATCACTGATCACGATAAGCAGCGTGTTCAGCGTAGTTCGGTCGCAAGCGATTCC
VV	AGCAACATCACTGATCACGATAAGCAGCGTGTTCAGCGTAGTTCGGTCGCAAGCGATTCC
NB	GCGTAGAAAACCTTCTCTACAAGAAAATTTGTATTTCGTTTGAAGCGCGGAATTATAACTT
VV	GCGTAGAAAACCTTCTCTACAAGAAAATTTGTATTTCGTTTGAAGCGCGGAATTATAACTT
NB	CTCGACTTGCGACCGTTACACATCTGCTTCAATGTTTCGGAGAGGCTATGGCGATGAAGTG
VV	CTCGACTTGCGACCGTTACACATCTGCTTCAATGTTTCGGAGAGGCTATGGCGATGAAGTG
NB	TCTTCGTCGTTGCTTCGACCTAGATGCCTTTTCGTCCCTGCGTAATGATGTGATTAGTAT
VV	TCTTCGTCGTTGCTTCGACCTAGATGCCTTTTCGTCCCTGCGTAATGATGTGATTAGTAT
NB	CACACGTTTCAGGCATCGAACAATGGCTGGAGAAACGTAATCCTAGTCAGATTAAAGCATT
VV	CACACGTTTCAGGCATCGAACAATGGCTGGAGAAACGTAATCCTAGTCAGATTAAAGCATT
NB	AATGAAGGATGTTGAATCGCCTTTGGAAATTGACGATGAAATTTGTCGTTTTAAGTTGAT
VV	AATGAAGGATGTTGAATCGCCTTTGGAAATTGACGATGAAATTTGTCGTTTTAAGTTGAT
NB	GGTGAAGCGTGACGCTAAGGTGAAGTTAGACTCTTCTTGTTTAACTAAACACAGCGCCGC
VV	GGTGAAGCGTGACGCTAAGGTGAAGTTAGACTCTTCTTGTTTAACTAAACACAGCGCCGC
NB	TCAAAATATCATGTTTCATCGCAAGAGCATTAAATGCTATCTTCTCTCCTATCTTTAACGA
VV	TCAAAATATCATGTTTCATCGCAAGAGCATTAAATGCTATCTTCTCTCCTATCTTTAATGA
NB	GGTGAAAAACCGAATAATGTGCTGTCTTAAGCCTAACATAAAGTTTTTTACGGAGATGAC
VV	GGTGAAAAACCGAATAATGTGCTGTCTTAAGCCTAACATAAAGTTTTTTACGGAGATGAC
NB	TAACAGGGATTTTGCTTCTGTTGTGTCAGCAACATGCTTGGTGACGACGATGTGTACCATAT
VV	TAACAGGGATTTTGCTTCTGTTGTGTCAGCAACATGCTTGGTGACGACGATGTGTACCATAT
NB	AGGTGAAGTTGATTTCTCAAAGTACGACAAGTCTCAAGATGCTTTTCGTGAAGGCTTTTGA
VV	AGGTGAAGTTGATTTCTCAAAGTACGACAAGTCTCAAGATGCTTTTCGTGAAGGCTTTTGA
NB	AGAAGTGATGTATAAGGAACTCGGTGTTGATGAAGAGTTGCTGGCTATCTGGATGTGCGG
VV	AGAAGTGATGTATAAGGAACTCGGTGTTGATGAAGAGTTGCTGGCTATCTGGATGTGCGG

Figura 14

NB CGAGCGGTTATCGATAGCTAACACTCTCGATGGTCAGTTGTCCTTCACGATCGAGAATCA
 VV CGAGCGGTTATCGATAGCTAACACTCTCGATGGTCAGTTGTCCTTCACGATCGAGAATCA

NB AAGGAAGTCGGGAGCTTCGAACACTTGGATTGGTAACTCTCTCGTCACTTTGGGTATTTT
 VV AAGGAAGTCGGGAGCTTCGAACACTTGGATTGGTAACTCTCTCGTCACTTTGGGTATTTT

NB AAGTCTTTACTACGACGTTAGAAATTTTCGAGGCGTTGTACATCTCGGGCGATGATTCTTT
 VV AAGTCTTTACTACGACGTTAGAAATTTTCGAGGCGTTGTACATCTCGGGCGATGATTCTTT

NB AATTTTTCTCGCAGCGAGATTTTCAATTATGCCGACGACATATGCACTGACATGGGTTT
 VV AATTTTTCTCGCAGCGAGATTTTCAATTATGCCGACGACATATGCACTGACATGGGTTT

NB TGAGACAAAATTTATGTCCCCAAGTGTCCCGTACTTTTGTCTAAATTTGTTGTTATGTG
 VV TGAGACAAAATTTATGTCCCCAAGTGTCCCGTACTTTTGTCTAAATTTGTTGTTATGTG

NB TGGTCATAAGACGTTTTTTTGTCCCGACCCGTACAAGCTTTTTGTCAAGTTGGGAGCAGT
 VV TGGTCATAAGACGTTTTTTTGTCCCGACCCGTACAAGCTTTTTGTCAAGTTGGGAGCAGT

NB CAAAGAGGATGTTTCAATGGATTTCTTTTTCGAACTTTTACCTCCTTTAAAGACTTAAC
 VV CAAAGAGGATGTTTCAATGGATTTCTTTTTCGAACTTTTACCTCCTTTAAAGACTTAAC

NB CTCCGATTTTAAACGACGAGCGCTTAATTCAAAAGCTCGCTGAACTTGTGGCTTTAAAATA
 VV CTCCGATTTTAAACGACGAGCGCTTAATTCAAAAGCTCGCTGAACTTGTGGCTTTAAAATA

NB TGAGGTTCAAACCGGCAACACCACCTTGGCGTTAAGTGTGATACATTGTTTGCCTTCGAA
 VV TGAGGTTCAAACCGGCAATACCACCTTGGCGTTAAGTGTGATACATTGTTTGCCTTCGAA

NB TTTCTCTCGTTTTAGCAAGTTGTATCCTCGCGTGAAGGGATGGCAGGTTTTTACACGTC
 VV TTTCTCTCGTTTTAGCAAGTTGTATCCTCGCGTGAAGGGATGGCAGGTTTTTACACGTC

NB GGTTAAGAAAGCGCTTCTCAAGAGTGGGTGTTCTCTCTTCGACAGTTTCATGACCCCTTT
 VV GGTTAAGAAAGCGCTTCTCAAGAGTGGGTGTTCTCTCTTCGACAGTTTCATGACCCCTTT

NB TGGTCAGGCTGTTCATGGTTTGGGATGATGAGTAGCGCTAACTTGTGCGCAGTTTCTTTGT
 VV TGGTCAGGCTGTTCATGGTTTGGGATGATGAGTAGCGCTAACTTGTGCGCAGTTTCTTTGT

NB TCGTGACATACACCTTGTGTGTACCCGTGCGTTTATAATGAATCAGGTTTTGCAGTTTGA
 VV TCGTGACATACACCTTGTGTGTACCCGTGCGTTTATAATGAATCAGGTTTTGCAGTTTGA

NB ATGTTTATTTCTGCTGAATCTCGCGGTTTTTGTGTGACTTTTCATTTTCATTCTTCTGGT
 VV ATGTTTATTTCTGCTGAATCTCGCGGTTTTTGTGTGACTTTTCATTTTCATTCTTCTGGT

NB CTTCCGCGTGATTAAGTCTTTTCGCCAGAAGGGTCACGAAGCGCCTGTTCCCGTTGTTTCG
 VV CTTCCGCGTGATTAAGTCTTTTCGCCAGAAGGGTCACGAAGCGCCTGTTCCCGTTGTTTCG

NB TGGCGGGGGTTTTTCAACCGTAGTGTAGTCAAAAGACGCGCATATGGTAGTTTTTCGGTTT
 VV TGGCGGGGGTTTTTCAACCGTAGTGTAGTCAAAAGACGCGCATATGGTAGTTTTTCGGTTT

NB GGACTTTGGCACCACATTCTCTACGGTGTGTGTGTACAAGGATGGACGAGTTTTTTCATT
 VV GGACTTTGGCACCACATTCTCTACGGTGTGTGTGTGTACAAGGATGGACGAGTTTTTTCATT

NB CAAGCAGAATAATTCGGCGTACATCCCCACTTACCTCTATCTCTCTCCGATTCTAACCA
 VV CAAGCAGAATAATTCGGCGTACATCCCCACTTACCTCTATCTCTCTCCGATTCTAACCA

NB CATGACTTTTGGTTACGAGGCCGAATCACTGATGAGTAATCTGAAAGTTAAAGGTTTCGTT
 VV CATGACTTTTGGTTACGAGGCCGAATCACTGATGAGTAATCTGAAAGTTAAAGGTTTCGTT

NB TTATAGAGATTTAAACGTTGGGTGGGTTGCGATTGAGTAACCTCGACGCGTACCTTGA
 VV TTATAGAGATTTAAACGTTGGGTGGGTTGCGATTGAGTAACCTCGACGCGTACCTTGA

Figura 14

NB	CCGTTTAAAACCTCATTACTCGGTCCGCTTGGTTAAGATCGGCTCTGGCTTGAACGAAAC
VV	CCGTTTAAAACCTCATTACTCGGTCCGCTTGGTTAAGATCGGCTCTGGCTTGAACGAAAC
NB	TGTTTCAATTGGAACCTTGGGGGCACTGTTAAGTCTGAGGCTCATCTGCCAGGGTTGAT
VV	TGTTTCAATTGGAACCTTGGGGGCACTGTTAAGTCTGAGGCTCATCTGCCAGGGTTGAT
NB	AGCTCTCTTTATTAAGGCTGTCATTAGTTGCGCGGAGGGCGCGTTTGGCTGCACTTGCAC
VV	AGCTCTCTTTATTAAGGCTGTCATTAGTTGCGCGGAGGGCGCGTTTGGCTGCACTTGCAC
NB	CGGGGTTATTTGTTTCACTACCTGCCAATTATGATAGCGTTCAAAGGAATTTCACTGATCA
VV	CGGGGTTATTTGTTTCACTACCTGCCAATTATGATAGCGTTCAAAGGAATTTCACTGATCA
NB	GTGTGTTTCACTCAGCGGTTATCAATGCGTATATATGATCAATGAACCTTCAGCGGCTGC
VV	GTGTGTTTCACTCAGCGGTTATCAATGCGTATATATGATCAATGAACCTTCAGCGGCTGC
NB	GCTATCTGCGTGTAAATTCGGTTGGAAAGAAGTCCGCAAATTTGGCTGTTTACGATTTCCG
VV	GCTATCTGCGTGTAAATTCGGTTGGAAAGAAGTCCGCAAATTTGGCTGTTTACGATTTCCG
NB	TGGTGGGACCTTCGACGTGTCTATCATTTTCATACCGCAACAATACTTTTGTGTGCGAGC
VV	TGGTGGGACCTTCGACGTGTCTATCATTTTCATACCGCAACAATACTTTTGTGTGCGAGC
NB	TTCTGGAGGCGATCTAAATCTCGGTGGAAGGGATGTTGATCGTGCCTTTCTCAGCACCT
VV	TTCTGGAGGCGATCTAAATCTCGGTGGAAGGGATGTTGATCGTGCCTTTCTCAGCACCT
NB	CTTCTCTTTAACATCGCTGGAACCTGACCTCACTTTGGATATCTCGAATCTGAAAGAATC
VV	CTTCTCTTTAACATCGCTGGAACCTGACCTCACTTTGGATATCTCGAATCTGAAAGAATC
NB	TTTATCAAAAACGACGCAGAGATAGTTTACACTTTGAGAGGTGTCGATGGAAGAAAAGA
VV	TTTATCAAAAACGACGCAGAGATAGTTTACACTTTGAGAGGTGTCGATGGAAGAAAAGA
NB	AGACGTTAGAGTAAACAAAAACATTCTTACGTGGTGATGCTCCCCCTACGTGAACAGAAC
VV	AGACGTTAGAGTAAACAAAAACATTCTTACGTGGTGATGCTCCCCCTACGTGAACAGAAC
NB	GCTTAAGATATTAGAGTCAACCTTAAAAACGTATGCTAAGAGTATGAATGAGAGTGC
VV	GCTTAAGATATTAGAGTCAACCTTAAAAACGTATGCTAAGAGTATGAATGAGAGTGC
NB	AGTTAAGTGCGATTTAGTGCTGATAGGAGGATCTTCATATCTTCTGGCCTGGCAGACGT
VV	AGTTAAGTGCGATTTAGTGCTGATAGGAGGATCTTCATATCTTCTGGCCTGGCAGACGT
NB	ACTAACGAAGCATCAGAGCGTTGATCGTATCTTAAGAGTTTCGGATCCTCGGGCTGCCGT
VV	ACTAACGAAGCATCAGAGCGTTGATCGTATCTTAAGAGTTTCGGATCCTCGGGCTGCCGT
NB	GGCCGTCGGTTGCGCACTATATTCTTCATGCCTCTCAGGATCTGGGGGGTTGCTACTGAT
VV	GGCCGTCGGTTGCGCACTATATTCTTCATGCCTCTCAGGATCTGGGGGGTTGCTACTGAT
NB	CGACTGTGCAGCTCACACTGTGCTATAGCGGACAGAAGTTGTGACGAAATCATTTCGCG
VV	CGACTGTGCAGCTCACACTGTGCTATAGCGGACAGAAGTTGTGACGAAATCATTTCGCG
NB	TCCAGCGGGGGCACCAGATCCCCCTTTTCAGGAAGCATGCCTTTGTACTTAGCCAGGGTCAA
VV	TCCAGCGGGGGCACCAGATCCCCCTTTTCAGGAAGCATGCCTTTGTACTTAGCCAGGGTCAA
NB	CAAGAACTCGCAGCGTGAAATCGCCGTGTTTGAAGGGGAGTACGTTAAGTGCCCTAAGAA
VV	CAAGAACTCGCAGCGTGAAATCGCCGTGTTTGAAGGGGAGTACGTTAAGTGCCCTAAGAA
NB	CAGAAAGATCTGTGGAGCAAATATAAGATTTTTTGGATATAGGAGTGACGGGTGATTCGTA
VV	CAGAAAGATCTGTGGAGCAAATATAAGATTTTTTGGATATAGGAGTGACGGGTGATTCGTA
NB	CGCACCCTTACCTTCTATATGGATTTCTCCATTTCAAGCGTAGGAGCCGTTTCATTTCGT
VV	CGCACCCTTACCTTCTATATGGATTTCTCCATTTCAAGCGTAGGAGCCGTTTCATTTCGT

Figura 14

NB	GGTGAGAGGTCCTGAGGGTAAGCAAGTGTCACTCACTGGAACCTCCAGCGTATAACTTTTC
VV	GGTGAGAGGTCCTGAGGGTAAGCAAGTGTCACTCACTGGAACCTCCAGCGTATAACTTTTC
NB	GTCTGTGGCTCTCGGATCACGCAGTGTCCGAGAATTGCATATTAGTTTAAATAATAAAGT
VV	GTCTGTGGCTCTCGGATCACGCAGTGTCCGAGAATTGCATATTAGTTTAAATAATAAAGT
NB	TTTTCTCGGTTTGCTTCTACATAGAAAGGCGGATCGACGAATACTTTTCACTAAGGATGA
VV	TTTTCTCGGTTTGCTTCTACATAGAAAGGCGGATCGACGAATACTTTTCACTAAGGATGA
NB	AGCGATTCGATACGCCGATTCAATTGATATCGCGGATGTGCTAAAGGAATATAAAAGTTA
VV	AGCGATTCGATACGCCGATTCAATTGATATCGCGGATGTGCTAAAGGAATATAAAAGTTA
NB	CGCGGCCAGTGCCTTACCACCAGACGAGGATGTCGAATTACTCCTGGGAAAGTCTGTTCA
VV	CGCGGCCAGTGCCTTACCACCAGACGAGGATGTCGAATTACTCCTGGGAAAGTCTGTTCA
NB	AAAAGTTTACGGGGAAGCAGACTGGAAGAAATACCTCTCTAGGAGCATAGCAGCACACT
VV	AAAAGTTTACGGGGAAGCAGACTGGAAGAAATACCTCTCTAGGAGCATAGCAGCACACT
NB	CAAGTGAAATTAAACTCTACCAGACATTCGATTGTACGGCGGTAGGGTTGTAAAGAAGT
VV	CAAGTGAAATTAAACTCTACCAGACATTCGATTGTACGGCGGTAGGGTTGTAAAGAAGT
NB	CCGATTTGGAATCAGCACTTCCTAATTCTTTTGAACAGGAATTAGGACTGTTCACTACTGA
VV	CCGATTTGGAATCAGCACTTCCTAATTCTTTTGAACAGGAATTAGGACTGTTCACTACTGA
NB	GCGAACGGGAAGTGGGATGGAGCAAATTATGCGGAATAACGGTGGAAGAAGCAGCATACG
VV	GCGAACGGGAAGTGGGATGGAGCAAATTATGCGGAATAACGGTGGAAGAAGCAGCATACG
NB	ATCTTACGAATCCCAAGGCTTATAAATTCCTGCGGAGACATGTAGCCCGGATGTAAAG
VV	ATCTTACGAATCCCAAGGCTTATAAATTCCTGCGGAGACATGTAGCCCGGATGTAAAG
NB	GTGAAGGACAAAAATACTCTATGGAAGACGTGATGAATTCATGCGTTTATCAAATCTGG
VV	GTGAAGGACAAAAATACTCTATGGAAGACGTGATGAATTCATGCGTTTATCAAATCTGG
NB	ATGTTAACGACAAGATGCTGGCGGAACAGTGTGGTTCGCTGTCCAATTCATGCGGTGAAT
VV	ATGTTAACGACAAGATGCTGGCGGAACAGTGTGGTTCGCTGTCCAATTCATGCGGTGAAT
NB	TGATCAACCCAGACGACAAAGGGCGATTTCGTGGCTCTCACCTTTAAGGACAGAGACACAG
VV	TGATCAACCCAGACGACAAAGGGCGATTTCGTGGCTCTCACCTTTAAGGACAGAGACACAG
NB	CTGATGACACGGGTGCCGCCAACGTGGAATGTCGCGTGGGCGACTATCTAGTTTACGCTA
VV	CTGATGACACGGGTGCCGCCAACGTGGAATGTCGCGTGGGCGACTATCTAGTTTACGCTA
NB	TGTCCTGTGTTGAGCAGAGGACCCAAAAATCGCAGTCTGGCAACATCTCTCTGTACGAAA
VV	TGTCCTGTGTTGAGCAGAGGACCCAAAAATCGCAGTCTGGCAACATCTCTCTGTACGAAA
NB	AGTACTGCGAATATCATCAGGACCTACTTAGGGAGTACAGACCTGTTTTTACAGCGCCGG
VV	AGTACTGCGAATATCATCAGGACCTACTTAGGGAGTACAGACCTGTTTTTACAGCGCCGG
NB	ACAGGATTCCGTTACTTACGGGCATCCTATACGATTTTGTAAAGGAATACAACATTTTCT
VV	ACAGGATTCCGTTACTTACGGGCATCCTATACGATTTTGTAAAGGAATACAACATTTTCT
NB	ACTCGTCATATAAGAGAAACGTCGATAATTTTCAAGATTCTTCTTGGCGAATTATATGCCTT
VV	ACTCGTCATATAAGAGAAACGTCGATAATTTTCAAGATTCTTCTTGGCGAATTATATGCCTT
NB	TGATATCTGACGTCTTTGTCTTCCAGTGGGTAAAACCCGCGCCGGATGTTTCGGCTGCTTT
VV	TGATATCTGACGTCTTTGTCTTCCAGTGGGTAAAACCCGCGCCGGATGTTTCGGCTGCTTT
NB	TTGAGTTAAGTGCAGCGGAACAAACGCTGGAGGTTCCACACTGAGTTTGATAGATTCTC
VV	TTGAGTTAAGTGCAGCGGAACAAACGCTGGAGGTTCCACACTGAGTTTGATAGATTCTC

Figura 14

NB	AAGTTGTGGTAGGTCATATCTTAAGATACGTAGAATCCTACACATCAGATCCAGCCATCG
VV	AAGTTGTGGTAGG <u>C</u> CATATCTTAAGATACGTAGAATCCTACACATCAGATCCAGCCATCG
NB	ACGCGTTAGAAGACAAACTGGAAGCGATACTGAAAAGTAGCAATCCCCGTCTATCGACAG
VV	ACGCGTTAGAAGACAAACTGGAAGCGATACTGAAAAGTAGCAATCCCCGTCTATCGACAG
NB	CGCAACTATGGGTTGGTTTCTTTTGTACTATGGTGAGTTTCGTACGGCTCAAAGTAGAG
VV	CGCAACTATGGGTTGGTTTCTTTTGTACTATGGTGAGTTTCGTACGGCTCAAAGTAGAG
NB	TAGTGCAAAGACCAGGCGTATACAAAACACCTGACTCAGTGGGTGGATTTGAAATAAACA
VV	TAGTGCAAAGACCAGGCGTATACAAAACACCTGACTCAGTGGGTGGATTTGAAATAAACA
NB	TGAAAGATGTTGAGAAATTCTTCGATAAACTTCAGAGAGAATTGCCTAATGTATCTTTGC
VV	TGAAAGATGTTGAGAAATTCTTCGATAAACTTCAGAGAGAATTGCCTAATGTATCTTTGC
NB	GGCGTCAGTTTAACGGAGCTAGAGCGCATGAGGCTTTCAAATATTTAAAAACGGAAATA
VV	GGCGTCAGTTTAACGGAGCTAGAGCGCATGAGGCTTTCAAATATTTAAAAACGGAAATA
NB	TAAGTTTCAAACCTATATCGCGTTTAAACGTGCCTAGAGAGTTCTGGTATCTGAACATAG
VV	TAAGTTTCA <u>G</u> ACCTATATCGCGTTTAAACGTGCC <u>C</u> AGAGAGTTCTGGTATCTGAACATAG
NB	ACTACTTCAGGCACGCGAATAGGTCCGGGTAAACCGAAGAAGAAATACTCATCCTAAACA
VV	ACTACTTCAGGCACGCGAATAGGTCCGGGTAAACCGAAGAAGAAATACTCATCCTAAACA
NB	ACATAAGCGTTGATGTTAGGAAGTTATGCGCTGAGAGAGCGTGCAATACCCTACCTAGCG
VV	ACATAAGCGTTGATGTTAGGAAGTTATGCGCTGAGAGAGCGTGCAATACCCTACCTAGCG
NB	CGAAGCGCTTTAGTAAAAATCATAAGAGTAATATACAATCATCACGCCAAGAGCGGAGGA
VV	CGAAGCGCTTTAGTAAAAATCATAAGAGTAATATACAATCATCACGCCAAGAGCGGAGGA
NB	TTAAAGACCCATTGGTAGTCCTGAAAGACACTTTATATGAGTTCCAACGCAAGCGTGCCG
VV	TTAAAGACCCATTGGTAGTCCTGAAAGACACTTTATATGAGTTCCAAC <u>A</u> CAAGCGTGCCG
NB	GTTGGGGGTCTCGAAGCACTCGAGACCTCGGGAGTCGTGCTGACCACGCGAAAGGAAGCG
VV	GTTGGGGGTCTCGAAGCACTCGAGACCTCGGGAGTCGTGCTGACCACGCGAAAGGAAGCG
NB	GTTGATAAGTTTTTTTAATGAACATAAAAAACGAAAATTACTCATCAGTTGACAGCAGCCGA
VV	GTTGATAAGTTTTTT <u>C</u> AATGAACATAAAAAACGAAAATTACTCATCAGTTGACAGCAGCCGA
NB	TTAAGCGATTTCGGAAGTAAAGAAGTGTTAGAGAAAAGTAAAGAAAGTTTCAAAGCGAA
VV	TTAAGCGATTTCGGAAGTAAAGAAGTGTTAGAGAAAAGTAAAGAAAGTTTCAAAGCGAA
NB	CTGGCCTCCACTGACGAGCACTTCGTCTACCACATTATATTTTTCTTAATCCGATGTGCT
VV	CTGGCCTCCACTGACGAGCACTTCGTCTACCACATTATATTTTTCTTAATCCGATGTGCT
NB	AAGATATCGACGAGTGAAAAAGTGAAGTACGTTGGTAGTCATACGTACGTGGTCGACGGA
VV	AAGATATCGACGAGTGAAAA <u>A</u> GGTGAAGTACGTTGGTAGTCATACGTACGTGGTCGACGGA
NB	AAAACGTACACCGTTCTTGACGCTTGGGTATTCAACATGATGAAAAGTCTCACGAAGAAG
VV	AAAACGTACACCGTTCTTGACGCTTGGGTATTCAACATGATGAAAAGTCTCACGAAGAAG
NB	TACAAACGAGTGAATGGTCTGCGTGCGTTCTGTTGCGCGTGCGAAGATCTATATCTAACC
VV	TACAAACGAGTGAATGGTCTGCGTGCGTTCTGTTGCGCGTGCGAAGATCTATATCTAACC
NB	GTCGCACCAATAATGTCAGAACGCTTTAAGACTAAAGCCGTAGGGATGAAAGGTTTGCCCT
VV	GTCGCACCAATAATGTCAGAACGCTTTAAGACTAAAGCCGTAGGGATGAAAGGTTTGCCCT
NB	GTTGGAAAGGAATACTTAGGCGCCGACTTTCTTTTCGGGAAC TAGCAAACCTGATGAGCGAT
VV	GTTGGAAAGGAATACTTAGGCGCCGACTTTCTTTTCGGGAAC TAGCAAACCTGATGAGCGAT

Figura 14

NB	CACGACAGGGCGGTCTCCATCGTTGCAGCGAAAAACGCTGTCGATCGTAGCGCTTTCACG
VV	CACGACAGGGCGGTCTCCATCGTTGCAGCGAAAAACGCTGTCGATCGTAGCGCTTTCACG
NB	GGTGGGAGAGAAAGATAGTTAGTTTGTATGATCTAGGGAGGTTACTAAGCACGGTGTGCT
VV	GGTGGGAGAGAAAGATAGTTAGTTTGTATGATCTAGGGAGGTTACTAAGCACGGTGTGCT
NB	ATAGTGCCTGCTATAATAATAAACACTAGTGCTTAAGTCGCGCAGAAGAAAACGCTTAAT
VV	ATAGTGCCTGCTATAATAATAAACACTAGTGCTTAAGTCGCGCAGAAGAAAACGCTTAAT
NB	TAACAATGAAGACTAATCTTTTTCTCTTCTCATCTTTTCACTTCTCCTATCATTATCCT
VV	TAACAATGAAGACTAATCTTTTTCTCTTCTCATCTTTTCACTTCTCCTATCATTATCCT
NB	CGGCCGAATTCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAAT
VV	CGGCCGAATTCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAAT
NB	TAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAA
VV	TAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAA
NB	CATACGGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGC
VV	CATACGGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGC
NB	CAACACTTGTCACACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATA
VV	CAACACTTGTCACACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATA
NB	TGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCA
VV	TGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCA
NB	TCTTCTTCAAGGACGACGGGAACACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACA
VV	TCTTCTTCAAGGACGACGGGAACACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACA
NB	CCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCG
VV	CCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCG
NB	GCCACAAGTTGGAATACAACACTACAACCTCCACACAGTATACATCATGGCCGACAAGCAAA
VV	GCCACAAGTTGGAATACAACACTACAACCTCCACACAGTATACATCATGGCCGACAAGCAAA
NB	AGAACGGCATCAAAGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGCAAC
VV	AGAACGGCATCAAAGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGCAAC
NB	TCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACA
VV	TCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACA
NB	ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACA
VV	ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACA
NB	TGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACA
VV	TGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACA
NB	AACATGATGAGCTTTAGGCCGGCCTAAACTGTTCTGAATAGAACCATTTGGCAAACGTGG
VV	AACATGATGAGCTTTAGGCCGGCCTAAACTGTTCTGAATAGAACCATTTGGCAAACGTGG
NB	GATCCCGTCAGGGTATGAGTTCTCGGGGCGAGATTTTCTAACTGCGACCAGCGTGTGTTT
VV	GATCCCGTCAGGGTATGAGTTCTCGGGGCGAGATTTTCTAACTGCGACCAGCGTGTGTTT
NB	GAACGATCACGAAAAAGCTATCGTACTACAGGCCTCAAGAGCTGCCATTGATAGAGCAGT
VV	GAACGATCACGAAAAAGCTATCGTACTACAGGCCTCAAGAGCTGCCATTGATAGAGCAGT
NB	CTCTTCGTCGGTCGACGGGAAGATCGTCAGTCTTTTCGACCTCGGTCGTCTTAGTTAACA
VV	CTCTTCGTCGGTCGACGGGAAGATCGTCAGTCTTTTCGACCTCGGTCGTCTTAGTTAACA

Figura 14

NB	CAGTTACTAAGGTTCCATTTTATTATTGCATTGTTTTTCATTTAGTGTAATCGTACTTGA
VV	CAGTTACTAAGGTTCCATTTTATTATTGCATTGTTTTTCATTTAGTGTAATCGTACTTGA
NB	GTTCTAATCCTGCAGGCTATGGAGTTGATGTCCGACAGCAACCTTAGCAACCTGGTGATA
VV	GTTCTAATCCTGCAGGCTATGGAGTTGATGTCCGACAGCAACCTTAGCAACCTGGTGATA
NB	ACCGACGCCCTCTAGTCTAAATGGTGTGCGACAAGAAGCTTTTATCTGCTGAAGTTGTAAAA
VV	ACCGACGCCCTCTAGTCTAAATGGTGTGCGACAAGAAGCTTTTATCTGCTGAAGTTGTAAAA
NB	ATGCTGGTGCAGAAAGGGGCTCCTAACGAGGGTATAGAAGTGGTGTTCGGTCTACTCCTT
VV	ATGCTGGTGCAGAAAGGGGCTCCTAACGAGGGTATAGAAGTGGTGTTCGGTCTACTCCTT
NB	TACGCACTCGCGGCAAGAACCACGTCTCCTAAGGTTTCAGCGCGCAGATTACAGACGTTATA
VV	TACGCACTCGCGGCAAGAACCACGTCTCCTAAGGTTTCAGCGCGCAGATTACAGACGTTATA
NB	TTTTCAAATAGTTTCGGAGAGAGGAATGTGGTAGTAACAGAGGGTGACCTTAAGAAGGTA
VV	TTTTCAAATAGTTTCGGAGAGAGGAATGTGGTAGTAACAGAGGGTGACCTTAAGAAGGTA
NB	CTCGACGGGTGTGCGCCTCTCACTAGGTTCACTAATAAACTTAGAACGTTTCGGTCTACT
VV	CTCGACGGGTGTGCGCCTCTCACTAGGTTCACTAATAAACTTAGAACGTTTCGGTCTACT
NB	TTCCTGAGGCTTACGTTGACTTTGTATCGCGTATAAGCACAAATTACCCCAACTCAAC
VV	TTCCTGAGGCTTACGTTGACTTTGTATCGCGTATAAGCACAAATTACCCCAACTCAAC
NB	GCCGCGGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTACTTAGCTGCAGATTTTCTGGGT
VV	GCCGCGGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTACTTAGCTGCAGATTTTCTGGGT
NB	ACTTGCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGATGTTTCGCGAGTATGTACGCT
VV	ACTTGCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGATGTTTCGCGAGTATGTACGCT
NB	CTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGTGAGCAATCTGCGTCAGCTAGGTAGA
VV	CTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGTGAGCAATCTGCGTCAGCTAGGTAGA
NB	AGGGAAGTTATGTAATGGAAGATTACGAAGAAAAATCCGAATCGCTCATACTGCTACGCA
VV	AGGGAAGTTATGTAATGGAAGATTACGAAGAAAAATCCGAATCGCTCATACTGCTACGCA
NB	CGAATCTGAACACTATGCTTTTGTAGTGGTCAAGTCCGATGCTAGTGTAGAGCTGCCTAAAC
VV	CGAATCTGAACACTATGCTTTTGTAGTGGTCAAGTCCGATGCTAGTGTAGAGCTGCCTAAAC
NB	TACTAATTTGCGGTTACTTACGAGTGTGAGGACGTGGGGAGGTGACGTGTTGCAACCGTG
VV	TACTAATTTGCGGTTACTTACGAGTGTGAGGACGTGGGGAGGTGACGTGTTGCAACCGTG
NB	AGGAATTAACAAGAGATTTTGTAGGGCAATCATCATACGGTGATCCGTTCTAGAAATCATAC
VV	AGGAATTAACAAGAGATTTTGTAGGGCAATCATCATACGGTGATCCGTTCTAGAAATCATAC
NB	AATATGACAGCGAGTCTGCTTTTGTAGGAATTCAACAACCTCTGATTGCGTAGTGAAGTTT
VV	AATATGACAGCGAGTCTGCTTTTGTAGGAATTCAACAACCTCTGATTGCGTAGTGAAGTTT
NB	TCCTAGAGACTGGTAGTGTCTTTTGGTTTTTCTTCGAAGTGAAACCAAAGGTAGAGCGG
VV	TCCTAGAGACTGGTAGTGTCTTTTGGTTTTTCTTCGAAGTGAAACCAAAGGTAGAGCGG
NB	TGCGACATTTGCGCACCTTCTTCGAAGCTAACAATTTCTTCTTTGGATCGCATTGCGGTA
VV	TGCGACATTTGCGCACCTTCTTCGAAGCTAACAATTTCTTCTTTGGATCGCATTGCGGTA
NB	CCATGGAGTATTGTTTGAAGCAGGTACTATCTGAACTGAATCTATAATCGATTCTTTTT
VV	CCATGGAGTATTGTTTGAAGCAGGTACTATCTGAACTGAATCTATAATCGATTCTTTTT
NB	GCGAAGAAAGAAATCGTTAAGATGAGGGTTATAGTGTCTCCTTATGAAGCTGAAGACATT
VV	GCGAAGAAAGAAATCGTTAAGATGAGGGTTATAGTGTCTCCTTATGAAGCTGAAGACATT

Figura 14

NB	CTGAAAAGATCGACTGACATGTTACGAAACATAGACAGTGGGGTCTTGAGCACTAAAGAA
VV	CTGAAAAGATCGACTGACATGTTACGAAACATAGACAGTGGGGTCTTGAGCACTAAAGAA
NB	TGTATCAAGGCATTCTCGACGATAACGCGAGACCTACATTGTGCGAAGGCTTCCTACCAG
VV	TGTATCAAGGCATTCTCGACGATAACGCGAGACCTACATTGTGCGAAGGCTTCCTACCAG
NB	TGGGGTGTGACACTGGGTTATATCAGCGTAATTGCGCTGAAAAACATTTAATTGACACG
VV	TGGGGTGTGACACTGGGTTATATCAGCGTAATTGCGCTGAAAAAC <u>CTTT</u> AATTGACACG
NB	GTGGAGTCAAACATACGGTTGGCTCAACCTCTCGTGCGTGAAAAAGTGGCGGTTTCATTTT
VV	GTGGAGTCAAACATACGGTTGGCTCAACCTCTCGTGCGTGAAAAAGTGGCGGTTTCATTTT
NB	TGTAAGGATGAACCAAAAGAGCTAGTAGCATTTCATCACGCGAAAGTACGTGGAACCTCACG
VV	TGTAAGGATGAACCAAAAGAGCTAGTAGCATTTCATCACGCGAAAGTACGTGGAACCTCACG
NB	GGCGTGGGAGTGAGAGAAGCGGTGAAGAGGGAAATGCGCTCTCTTACCAAAACAGTTTTTA
VV	GGCGTGGGAGTGAGAGAAGCGGTGAAGAGGGAAATGCGCTCTCTTACCAAAACAGTTTTTA
NB	AATAAAATGTCTTTGGAAATGGCGTTTTACATGTACCACGAGCGTGGAAAAACGCTGAA
VV	AATAAAATGTCTTTGGAAATGGCGTTTTACATGTACCACGAGCGTGGAAAAACGCTGAA
NB	TGGTTAGAACTAAAATTTTCACCTGTGAAAATCTTTAGAGATCTTTTATTAGACGTGGAA
VV	TGGTTAGAACTAAAATTTTCACCTGTGAAAATCTTTAGAGATCT <u>GCT</u> TATTAGACGTGGAA
NB	ACGCTCAACGAATTGTGCGCCGAAGATGATGTTACGTCGACAAAGTAAATGAGAATGGG
VV	ACGCTCAACGAATTGTGCGCCGAAGATGATGTTACGTCGACAAAGTAAATGAGAATGGG
NB	GACGAAAAATCACGACCTCGAACTCCAAGACGAATGTAAACATTGGTTAAGTTTAACGAA
VV	GACGAAAAATCACGACCTCGAACTCCAAGACGAATGTAAACATTGGTTAAGTTTAACGAA
NB	AATGATTAGTAAATAATAAATCGAACGTGGGTGTATCTACCTGACGTATCAACTTAAGCT
VV	AATGATTAGTAAATAATAAATCGAACGTGGGTGTATCTACCTGACGTATCAACTTAAGCT
NB	GTTACTGAGTAATTAAACCAACAAGTGTGGTGTAAATGTGTATGTTGATGTAGAGAAAAA
VV	GTTACTGAGTAATTAAACCAACAAGTGTGGTGTAAATGTGTATGTTGATGTAGAGAAAAA
NB	TCCGTTTGTAGAACGGTGTTTTCTCTCTTTATTTTTAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
VV	TCCGTTTGTAGAACGGTGTTTTCTCTCTTTATTTTTAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
NB	AAAGAAGC
VV	AAAGAAGC

Figura 14