

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 255**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12N 15/32** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2007 E 12158734 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2468902**

54 Título: **Evento de Maíz MIR162**

30 Prioridad:

**03.06.2006 US 810499 P**

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

**22.09.2015**

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)  
Schwarzwaldallee 215  
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 546 255 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Evento de Maíz MIR162

5 **Antecedentes**

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

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

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

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

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

Se han descrito varios métodos para la inserción dirigida de una secuencia de nucleótidos de interés en un sitio cromosómico específico dentro de una célula vegetal. Los sistemas de recombinación de sitio específico se han

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

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

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

## **SÍNTESIS**

La presente invención proporciona una semilla de maíz transgénica que comprende el genotipo MIR162 que se trata con un insecticida. Un ejemplo de semilla que comprende ácidos nucleicos únicos para MIR162 se depositó en la American Type Culture Collection (Colección de Cultivos del Tipo Estadounidense) con número de acceso PTA-8166.

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

### **DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN EL LISTADO DE SECUENCIAS**

SEC ID NO: 1 es la secuencia codificadora de Vip3Aa20 en MIR162.

SEC ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de Vip3Aa20.

SEC ID NO: 3 es la secuencia del plásmido pNOV1300.

SEC ID Nos.: 4-12 son cebadores y sondas útiles en un ensayo TAQMAN.

SEC ID NO: 13 es la secuencia de una sonda de vip3Aa20.

SEC ID NO: 14 es la secuencia de una sonda de pmi.

SEC ID Nos: 15-37 son cebadores útiles en la presente invención.

SEC ID No: 38 es la secuencia de un amplicón de vip3Aa20.  
 SEC ID Nos: 39-40 son cebadores útiles en la presente invención.  
 SEC ID No: 41 es la secuencia del amplicón de CJ134/179 5'.  
 SEC ID Nos: 42-43 son cebadores útiles en la presente invención.  
 5 SEC ID NO: 44 es un amplicón de vip3Aa20 3'.  
 SEC ID NO: 45 es la unión del inserto- genoma 5'.  
 SEC ID NO: 46 es una secuencia de genoma del maíz que flanquea al inserto en 5'.

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

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

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

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

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

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

50 Como se usa en la presente, el término "evento" transgénico se refiere a una planta recombinante producida por la transformación y regeneración de una célula o tejido vegetal con ADN heterólogo, por ejemplo, un casete de expresión que incluye un gen de interés. El término "evento" se refiere al transformante original y/o progenie del transformante que incluye al ADN heterólogo. El término "evento" se refiere también a la progenie producida por un cruce exogámico sexual entre el transformante y otra línea de maíz. Incluso luego de una retrocruza repetida a un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del progenitor transformado se encuentra presente en la progenie de la cruce en la misma ubicación cromosómica. El término "evento" se refiere también al ADN del transformante original que comprende al ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado del que se esperaría que se transfiriera a una progenie que recibe el ADN insertado que incluye al transgen de interés como el resultado de una cruce sexual de una línea pogenitora que incluye al ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultantes de la autopolinización ("selfing")) y una línea progenitora que no contiene al ADN insertado. Normalmente, la transformación del tejido vegetal produce

múltiples eventos, cada uno de los cuales representa la inserción de un constructo de ADN en una ubicación diferente en el genoma de una célula vegetal. En base a la expresión del transgen u otras características deseables, se selecciona un evento en particular. De esta manera, "evento MIR162", "MIR162" o "evento MIR162" se pueden usar intercambiamente.

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

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

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

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

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

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

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

65 "Operablemente unida" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico sobre un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de uno afecte la función del otro. Por ejemplo, un promotor está operablemente unido con una secuencia codificadora o ARN funcional cuando es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificadora o ARN funcional (es decir, la secuencia codificadora o ARN funcional está bajo el control

transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras en orientación sentido o antisentido se pueden unir operablemente a las secuencias reguladoras.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los siguientes son conjuntos ejemplares de condiciones de hibridación/lavado que se pueden utilizar para hibridar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias de nucleótidos de referencia de la presente invención: una secuencia de nucleótidos de referencia preferentemente se hibrida a la secuencia de nucleótidos de referencia en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 2X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, más deseablemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 1X de SSC, 0,1% de SDS a 50°C, más deseablemente aún en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 0,5X de SSC, 0,1% de SDS a 50°C, preferentemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 0,1X de SSC, 0,1% de SDS a 50°C, de mayor preferencia en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con un lavado en 0,1X de SSC, 0,1% de SDS a 65°C. Las secuencias de la presente invención se pueden detectar con el uso de todas las condiciones mencionadas precedentemente. A los efectos de definir la invención, se utilizan condiciones altamente rigurosas.

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

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

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

La clase "Vip3" de proteínas comprende, por ejemplo, Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ac, Vip3Ad, Vip3Ae, Vip3Af, Vip3Ag, Vip3Ba, y Vip3Bb, y sus homólogos. "Homólogo" significa que la proteína o polipéptido indicado porta una relación definida con otros miembros de la clase Vip3 de proteínas. "Vip3Aa20" es un homólogo de Vip3 único para el evento MIR162. Se generó mediante mutaciones espontáneas introducidas en el gen *vip3Aa19* optimizado del maíz, comprendido en pNOV1300 (SEC ID NO: 3) durante el proceso de transformación de la planta.

Se describe en la presente una línea genéticamente mejorada de maíz que produce una proteína de control de insectos, Vip3Aa20, y una enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) que permite a la planta utilizar manosa como fuente

de carbono. También se describe un evento de maíz transgénico denominado MIR162 que comprende un genotipo nuevo, así como también a composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos únicos para MIR162 en una muestra biológica. También se describe plantas de maíz que comprenden al genotipo de MIR162, la semilla transgénica de las plantas de maíz y métodos para producir una planta de maíz que comprende el genotipo MIR162 mediante el cruce de un endogámico de maíz que comprende el genotipo MIR162 consigo mismo o con otra línea de maíz. Las plantas de maíz que comprenden al genotipo de MIR162 de la invención son útiles para controlar las plagas de insectos lepidópteros, que incluyen, pero sin limitación, al gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano de las yemas del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), gusano perforador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), gusano saltarín perforador de los tallos de maíz (LCB, *Elasmopalpus lignosellus*), isoca del maíz (CEW, *Helicoverpa zea*), oruga de frijol occidental (WBCW, *Striacosta albicosta*). También se describe un método para proteger maíz transgénico del daño producido por la alimentación mediante el cual se apila el rasgo de resistencia a los insectos de MIR162 con un rasgo de resistencia a los insectos que sea diferente en la misma planta transgénica lo que da como resultado una planta de maíz que está protegida contra el daño producido por la alimentación en un grado mayor que con los rasgos de resistencia a los insectos solos.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es única para el evento MIR162.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que une una molécula de ADN heteróloga insertada en el genoma de MIR162 con el ADN genómico en MIR162 que comprende por lo menos 10 o más (por ejemplo, 15, 20, 25, 50 o más) nucleótidos contiguos de la molécula de ADN heteróloga y por lo menos 10 o más (por ejemplo, 15, 20, 25, 50 o más) nucleótidos contiguos del ADN genómico que flanquea el punto de inserción de la molécula de ADN heteróloga. También se incluyen secuencias de nucleótidos que comprenden 10 o más nucleótidos de la secuencia de inserción contigua del evento MIR162 y por lo menos un nucleótido del ADN flanqueante del evento MIR162 adyacente a la secuencia de inserción. Tales secuencias de nucleótidos son únicas del evento MIR162 y son diagnósticos de este. La amplificación o hibridación del ácido nucleico del ADN genómico de MIR162 produce un amplicón que comprende tales secuencias únicas y que es diagnóstico del evento MIR162. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.

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

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

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada se encuentra comprendida en una semilla de maíz depositada en la American Type Culture Collection con el número de acceso PTA-8166, o en plantas cultivadas a partir de la semilla.

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

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

También se describe un par de cebadores de polinucleótidos que comprenden un primer cebador de polinucleótido y un segundo cebador de polinucleótido que funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN de evento MIR162



en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento MIR162. Preferentemente, el primer cebador y/o el segundo cebador se eligen de la SEC ID NO: 1 o su complemento. El primer cebador y/o el segundo cebador se selecciona también del grupo que comprende las SEC ID NOs: 15-35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 42, y sus complementos. Además, el amplicón que es producido por el par de cebadores comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 44, o sus complementos.

También se describe un par de cebadores de polinucleótidos que comprende un primer cebador de polinucleótido y un segundo cebador de polinucleótido que funcionan juntos en presencia de una plantilla de ADN de evento MIR162 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento MIR162, en donde el primer cebador es, o es complementaria de, una secuencia del genoma de la planta de maíz que flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma del evento MIR162 y la secuencia del segundo cebador de polinucleótido es, o es complementaria de, la secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma del evento MIR162.

Preferentemente, el primer cebador comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende los nucleótidos 1-1088 de la SEC ID NO: 49, nucleótidos 9391-10579 de la SEC ID NO: 49, y sus complementos. También, el primer cebador se selecciona del grupo que comprende las SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 57, SEC ID NOs: 68-72, SEC ID NO: 79, SEC ID NO: 80, SEC ID números 97-105, y sus complementos. Además el segundo cebador de polinucleótido comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la posición 1089-9390 de la SEC ID NO: 49, o sus complementos. Además el segundo cebador de polinucleótido se selecciona del grupo que comprende las SEC ID números: 15-35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 40, SEC ID: 50-52, SEC ID: 54, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 73, SEC ID NO: 82, SEC ID NO: 96, y sus complementos.

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

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

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

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

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

el uso del conjunto anidado de cebadores que se han de utilizar para la amplificación de una secuencia flanqueante particular que contiene la unión entre la secuencia de ADN genómico y la secuencia de ADN heteróloga.

5 También se describe una proteína insecticida aislada que comprende la SEC ID NO: 2 y una molécula de ácido nucleico que codifica la SEC ID NO: 2. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 1. También se describe un gen quimérico que comprende un promotor heterólogo operablemente unido a la molécula de ácido nucleico, y vectores recombinantes y células huésped que comprenden al gen quimérico.

10 También se describe un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico que es única para el evento MIR162 en una muestra que comprende ácidos nucleicos de maíz, en donde el método comprende: (a) contactar la muestra con un par de cebadores de polinucleótidos que, al utilizarse con una reacción de amplificación de ácido nucleico con un ADN genómico del evento MIR162, produce un amplicón que es diagnóstico del evento MIR162; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, para producir así al amplicón; y (c) detectar el amplicón. Preferentemente, el amplicón comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.

20 También se describe un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico que es única para el evento MIR162 en una muestra que comprende ácidos nucleicos de maíz, en donde el método comprende: (a) contactar la muestra con una sonda que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con ADN genómico del evento MIR162 y no se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con ADN de una planta de maíz de control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación altamente rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN. La detección se puede realizar mediante cualquier medio bien conocido en la técnica, que incluye la técnica fluorescente, quimiluminiscente, radiológica, inmunológica, y similares. En el caso en el que la hibridación se pretende utilizar como medio para la amplificación de una secuencia en particular para producir un amplicón que es diagnóstico para el evento MIR162, la producción y detección por cualquier medio bien conocido en la técnica del amplicón tiene como objetivo la hibridación pretendida a la secuencia objetivo en donde se utiliza una sonda o un cebador, o secuencias en las que se utilizan dos o más sondas o cebadores. El término "muestra biológica" comprende una muestra que contiene o de la que se sospecha que contiene un ácido nucleico que comprende entre 25 30 cinco y diez nucleótidos en cualquiera de los lados del punto en el que uno o el otro de los dos extremos terminales de la secuencia de ADN heteróloga insertada se contacta con la secuencia de ADN genómica dentro del cromosoma en el que se insertó la secuencia de ADN heteróloga, conocidas aquí también como las secuencias de unión. Además, la secuencia de unión comprende tan solo dos nucleótidos: aquellos que constituyen el primer nucleótido dentro del ADN genómico flanqueante adyacente y unido covalentemente al primer nucleótido dentro de la 35 secuencia de ADN heteróloga insertada. Preferentemente, la sonda comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, y sus complementos.

40 También se describe un kit para la detección de ácidos nucleicos que son únicos para el evento MIR162 en una muestra biológica. El conjunto incluye por lo menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de polinucleótidos contiguos para funcionar como un cebador o una sonda en un método de detección de ácido nucleico, y que ante la amplificación de o hibridación a una secuencia objetivo de ácido nucleico en una muestra seguida de la detección del amplicón o la hibridación a la secuencia objetivo, sirve de diagnóstico para la presencia de secuencias de ácidos nucleicos únicas para el evento MIR162 en la muestra. El conjunto además incluye otros 45 materiales necesarios para posibilitar los métodos de amplificación o hibridación de ácidos nucleicos. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico contenida en el conjunto comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 49. También, la molécula de ácido nucleico es un cebador seleccionado del grupo que comprende las SEC ID NOs: 15-37, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 43, SEC ID NOs: 50-54, SEC ID NOs: 56-58, SEC ID NOs: 60-105, y sus complementos. Además, el amplicón comprende las 50 SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, o sus complementos. Se puede utilizar una diversidad de métodos de detección que incluyen, pero sin limitación, TAQMAN (Perkin Elmer), amplificación térmica, reacción en cadena de la ligasa, hibridación southern, métodos ELISA, y métodos de detección colorimétrico y fluorescente. En particular, la presente invención provee conjuntos para detectar la presencia de la secuencia objetivo, es decir, por lo menos la secuencia de *vip3Aa20* o una 55 secuencia de unión, en una muestra que contiene ácido nucleico genómico de MIR162. El conjunto comprende por lo menos un polinucleótido capaz de unirse al sitio objetivo o sustancialmente adyacente al sitio objetivo y por lo menos un medio para detectar la unión del polinucleótido al sitio objetivo. El medio de detección puede ser fluorescente, quimiluminiscente, colorimétrico, o isotópico y se puede acoplar por lo menos con métodos inmunológicos para detectar la unión. También se describe un conjunto que puede detectar la presencia del sitio 60 objetivo en una muestra, es decir, por lo menos la secuencia de *vip3Aa20* o una secuencia de unión de MIR162, aprovechando dos o más secuencias de polinucleótidos que juntas son capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos adyacentes o dentro de aproximadamente 100 pares de base, o dentro de aproximadamente 200 pares de base, o dentro de aproximadamente 500 pares de base o dentro de aproximadamente 1000 pares de base de la secuencia objetivo y que se pueden extender una hacia la otra para formar un amplicón que contiene por lo menos el 65 sitio objetivo.

También se describe un método para detectar la proteína Vip3Aa20 en una muestra biológica, en donde el método comprende: (a) extraer la proteína del tejido del evento MIR162; (b) evaluar la proteína extraída con el uso de un método inmunológico que comprende el anticuerpo específico para la proteína Vip3Aa20 producida por el evento MIR162; y (c) detectar la unión de dicho anticuerpo a la proteína Vip3Aa20.

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

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

25 También se describe una planta de maíz, o partes de ella y la semilla de una planta de maíz que comprende el genotipo del evento transgénico MIR162, en donde el genotipo comprende una secuencia de nucleótidos establecida en las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 59, o sus complementos. Un ejemplo de semilla de maíz que comprende las moléculas de ácido nucleico de la invención se depositó el 23 de enero de 2007 y recibió el número de Acceso PTA-8166 de la ATCC. , la planta de maíz es de las líneas de maíz endogámicas CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, 30 CG4NU15, CG00685, CG00526, CG00716, NP904, NP911, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151, NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316, BCTT609, AF031, NPH8431, 894, BUTT201, R327H, 2044BT, y 2070BT. Un experto en la técnica reconocerá, sin embargo, que el genotipo MIR162 se puede introgresar en cualquier variedad de planta que se pueda reproducir con maíz, incluso con especies de 35 maíz salvajes y, por ende, la lista de líneas endogámicas de esta realización no es limitativa.

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

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

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

60 También se describe una planta de maíz, en donde el genotipo de MIR162 confiere a la planta de maíz resistencia a los insectos o la capacidad de utilizar manosa como fuente de carbono, o tanto la resistencia a los insectos como la capacidad de utilizar manosa como fuente de carbono. Preferentemente, el genotipo transgénico que confiere resistencia a los insectos a la planta de maíz de la invención comprende un gen *vip3Aa20* y el genotipo transgénico que confiere la capacidad de utilizar manosa como fuente de carbono a la planta de maíz comprende un gen *pmi*.

65

También se describe un método para producir una planta de maíz resistente a las plagas de lepidópteros que comprende: (a) cruzar sexualmente una primera planta de maíz progenitora con una segunda planta de maíz progenitora, en donde dicha primera o segunda planta de maíz progenitora comprende ADN del evento MIR162, con lo cual produce una pluralidad de la primera generación de plantas de progenie; (b) seleccionar una primera generación de planta de progenie que sea resistente a una o más plagas de lepidópteros; (c) autopolinizar la primera generación de planta de progenie; y (d) seleccionar de las plantas de progenie de segunda generación una planta que sea resistente a una o más plagas de lepidópteros; en donde las plantas de progenie de la segunda generación comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 55, y SEC ID NO: 59.

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

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

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

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

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

La presente descripción describe en la presente un sitio específico en el cromosoma 5 en el genoma de maíz que es excelente para la inserción de ácidos nucleicos heterólogos. También, se describe un marcador molecular de 5' (opie2; nucleótidos 1680-3338 de la SEC ID NO: 106) y un marcador molecular de 3' (gag; nucleótidos 43,275-45,086 de la SEC ID NO: 106) útiles para identificar la ubicación de un sitio de dirección de objetivo en el cromosoma 5. Por lo tanto, también se describen métodos para introducir ácidos nucleicos heterólogos de interés en este sitio objetivo preestablecido o en la vecindad de este sitio objetivo. También se describe una semilla de maíz y/o una planta de maíz que comprende cualquier secuencia de nucleótidos heteróloga insertada en el sitio objetivo descrito o en la vecindad general de tal sitio. Una opción para lograr dicha integración establecida como objetivo consiste en sustituir un inserto diferente en lugar del casete de expresión de *vip3Aa20* ejemplificado en la presente. En este respecto general, la recombinación homóloga establecido como objetivo, por ejemplo sin limitación, se puede utilizar. "Recombinación homóloga" se refiere a una reacción entre cualquier par de secuencias de nucleótidos que poseen sitios correspondientes que contienen una secuencia de nucleótidos similar (es decir,

secuencias homólogas) a través de la cual las dos moléculas pueden interactuar (recombinar) para formar una nueva secuencia de ADN recombinante. Los sitios de secuencia de nucleótidos similar se mencionan cada uno en la presente como "secuencia de homología". Generalmente, la frecuencia de la recombinación homóloga aumenta a medida que aumenta la longitud de la secuencia de homología. De esta manera, mientras la recombinación homóloga se puede producir entre dos secuencias de nucleótidos que son menos que idénticas, la frecuencia de recombinación (o eficiencia) disminuye a medida que aumenta la divergencia entre las dos secuencias. La recombinación se puede lograr con el uso de una secuencia de homología sobre cada una de las moléculas donante y objetivo, con lo cual se genera un producto de recombinación de "cruce único". Como alternativa, dos secuencias de homología se pueden colocar sobre cada una de las secuencias de nucleótidos objetivo y donante. La recombinación entre dos secuencias de homología sobre el donante con dos secuencias de homología sobre el objetivo genera un producto de recombinación de "cruce doble". Si las secuencias de homología sobre la molécula donante flanquean una secuencia que se ha de manipular (por ejemplo, una secuencia de interés), la recombinación de doble cruce con la molécula objetivo resultará en un producto de recombinación en donde la secuencia de interés reemplaza una secuencia de ADN que estaba originalmente entre las secuencias de homología sobre la molécula objetivo. El intercambio de la secuencia de ADN entre la objetivo y la donante a través de un evento de recombinación de doble cruce se denomina "reemplazo de secuencias". Este tipo de tecnología es el tema de, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de Invención estadounidense No. 2006/0253918. Con el sitio objetivo descrito que se identifica ahora y con las secuencias que rodean al sitio objetivo identificado, el experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otros métodos para la integración establecida como objetivo de ácidos nucleicos heterólogos. Estos métodos, por ejemplo, sin limitación, se describen en la Publicación de Patente de Invención estadounidense No. 2007/0039074 y en la Publicación de la Solicitud de Patente de Invención estadounidense No. 2006/0130179.

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

También se describe un método para obtener una planta de maíz transgénica que comprende insertar un ácido nucleico heterólogo en una posición del cromosoma 5 ubicada entre un marcador molecular *opie2* establecido como nucleótidos 1680-3338 de la SEC ID NO: 106 y un marcador molecular *gag* establecido como nucleótidos 43.275-45.086 de la SEC ID NO: 106. Preferentemente, el ácido nucleico heterólogo se inserta en el cromosoma 5 entre los nucleótidos 25.454 y 25.513 de la SEC ID NO: 106. También, el ácido nucleico heterólogo insertado es 5' flanqueado por los nucleótidos 5.454 a 25.454 de la SEC ID NO: 106 y 3' flanqueado por los nucleótidos 25.513 a 45.513 de la SEC ID NO: 106.

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

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

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

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

Un método confiable para controlar la fertilidad masculina de las plantas ofrece la oportunidad de una propagación mejorada de las plantas. Ello es especialmente cierto para el desarrollo de híbridos de maíz, que reside en alguna clase de sistema de esterilidad masculina. Existen varias opciones para controlar la fertilidad masculina disponibles

para los cultivadores, tales como la emasculación manual o mecánica (o desespigamiento), esterilidad masculina citoplásmica, esterilidad masculina genética, gametocidas y similares.

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

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

El uso de endogámicos estériles machos es solo un factor en la producción de híbridos de maíz. Las técnicas de propagación de plantas conocidas en la técnica y utilizadas en un programa de propagación de plantas de maíz incluyen, pero sin limitación, la selección recurrente, retrocruza, propagación de pedigrí, selección aumentada del polimorfismo de longitud de restricción, selección y transformación aumentada por un marcador genético. El desarrollo de híbridos de maíz en un programa de propagación de plantas de maíz requiere, en general, el desarrollo de líneas de endogámicos homocigóticos, la cruce de estas líneas, y la evaluación de las cruces. Los métodos de propagación de pedigrí y propagación por selección recurrente se utilizan para desarrollar líneas de endogámicos de poblaciones de propagación. Los programas de propagación de plantas de maíz combinan los antecedentes genéticos de dos o más líneas endogámicas u otras diversas fuentes de germoplasma en conjuntos de propagación a partir de los cuales se desarrollan nuevas líneas endogámicas por autopolinización y selección de los fenotipos deseados. Los nuevos endogámicos se cruzan con otras líneas endogámicas y los híbridos de estas cruces se evalúan para determinar cuáles son las que tienen potencial comercial. La propagación de plantas y el desarrollo de híbridos, como se practican en un programa de propagación y mejoramiento de plantas de maíz, son procesos costosos y que llevan mucho tiempo.

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

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

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

Un único híbrido de maíz de cruce resulta de la cruce de dos líneas endogámicas, cada una de las cuales posee un genotipo que complementa al genotipo de la otra. La progenie híbrida de la primera generación se denomina  $F_1$ . En el desarrollo de híbridos comerciales en un programa de propagación de plantas de maíz, se buscan solamente las

plantas híbridas  $F_1$ . Los híbridos  $F_1$  preferidos son más vigorosos que sus progenitores endogámicos. Este vigor híbrido o heterosis, se puede manifestar en muchos rasgos poligénicos, que incluyen un aumento del crecimiento vegetativo y un mayor rendimiento.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### EJEMPLOS

##### Ejemplo 1. Transformación y Selección del Evento MIR162

55 El evento MIR604 se produjo por la transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea de maíz patentada (*Zea mays*). Los embriones inmaduros se transformaron esencialmente de acuerdo con lo descrito en Negrotto *et al.* (Plant Cell Reports 19: 798-803, 2000), con el uso de un fragmento de ADN del plásmido pNOV1300 (SEQ ID NO: 3). El pNOV1300 contiene una secuencia de nucleótidos que comprende casetes de expresión en tándem. El primer casete de expresión comprende una región de promotor ZmUbiint de un gen de poliubiquitina de *Zea mays*, que contiene el primer intrón (GenBank® Número de acceso S94464) unido operablemente a una secuencia codificadora de *vip3Aa19* unida además operablemente a un intrón PEPC #9 del gen fosfoenolpiruvato carboxilasa (GenBank® Número de acceso X15239) de *Zea mays* (Matsuoaka y Minami, 1989. European J. Of Biochem. 181:593-598) y una secuencia terminadora 35S del ARN 35S del genoma del virus mosaico del coliflor (Similar a GenBank®, Número de

acceso AF140604). Su función consiste en proveer una secuencia de poliadenilación (Franck *et al.*, 1980. Cell 21:285-294). El gen de *vip3Aa19* en pNOV1300 comprende una secuencia codificadora de *vip3Aa* sintética optimizada de maíz (Estruch, *et al.*, 1999.) que se sintetizó para alojar al uso del codón preferido para el maíz (Murray *et al.*, 1989). La secuencia codificadora de *vip3Aa19* sintética utilizada en las transformaciones de la planta codifica a la secuencia de aminoácido idéntica como la secuencia codificadora de *vip3Aa1* nativa hallada en la cepa de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* AB88 (Patente de Invención estadounidense 5.877.012), con la excepción de la diferencia de un solo aminoácido en la posición 284; la secuencia codificadora de *vip3Aa1* nativa codifica lisina, mientras que la secuencia codificadora de *vip3Aa19* sintética codifica glutamina en esta posición. La secuencia codificadora de *vip3Aa19* codifica una proteína de control de insectos, Vip3Aa19 que provee resistencia a los insectos lepidópteros. El segundo casete de expresión comprende un promotor de ZmUbiInt unido operablemente a una secuencia codificadora de *pmi* (también conocida como *E.coli manA*) que codifica fosfomanosa isomerasa (GenBank® Número de acceso M15380), que cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato (Negrotto *et al.*, 2000). La secuencia codificadora de *pmi* está también unida operablemente a una secuencia de poliadenilación y terminación de transcripción de extremo 3' de nopalina sintasa.

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

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

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

El pedigrí de propagación del evento MIR162 fue de la siguiente manera: T<sub>0</sub> planta de MIR162 (x NPH8431)→→ NPH8431 (MIR162) F<sub>1</sub> (x NP2161)→NP2161(MIR162) F<sub>1</sub> (x NP2161)→NP2161 (MIR162) BC1F<sub>1</sub> (x B9620)→F<sub>1</sub> (x B9620)→BC1F<sub>1</sub> (x B9620)→BC2F<sub>1</sub> (x B9620)→BC3F<sub>1</sub> (x B9620)→BC4F<sub>1</sub> (x B9620). El material vegetal de la generación BC4 se utilizó para el análisis Southern, la determinación del número de copias y el secuenciamiento del ADN de inserción. Los controles negativos para los experimentos consistieron en 10 vegetales segregantes negativos de la generación BC4.

#### Ejemplo 2. Detección de MIR162 por PCR TAQMAN

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

Las reacciones de PCR TAQMAN se realizaron en placas de 96 pocillos. Para el control de genes de maíz endógenos, se diseñaron cebadores y sondas específicos para la secuencia codificadora de alcohol deshidrogenasa de *Zea mays* (*adh1*) (Genbank Número de acceso AF044295). El experto en la técnica reconocerá que se pueden usar otros genes de maíz como controles endógenos. Las reacciones se multiplexaron para amplificar simultáneamente la *vip3Aa* y *adh1* o *pmi* y *adh1*. Para cada muestra, una mezcla maestra combinando 20 µL de ADN genómico extraído se generó con 35 µL 2x de mezcla maestra de PCR TAQMAN Universal (Applied Biosystems) complementado con cebadores hasta una concentración final de 900 nM cada uno, sondas hasta una concentración final de 100 nM cada una, y agua hasta un volumen final de 70 µL. Esta mezcla se distribuyó en tres réplicas de 20 µL cada una en placas de amplificación de 96 pocillos y se sellaron con una película de sellado térmico ópticamente



transparente (Marsh Bio Products). La PCR se llevó a cabo en el instrumento ABI Prism 7700 con los siguientes parámetros de amplificación: 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

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

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

Tabla 1. Cebadores usados en el ensayo TAQMAN.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Secuencia No:
Vip3Aa-hacia adelante	5'CACCTTCAGCAACCCGAAGTA3'	SEQ ID NO: 4
Vip3Aa –inversa	5'GCTTAGCCTCCACGATCATCTT3'	SEQ ID NO: 5
Vip3Aa –sonda	5'GTCCTCGTGCCTGCCCTTCACCT3' (etiqueta 5' = FAM, etiqueta 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 6
PMI-hacia adelante	5'CCGGGTGAATCAGCGTTT3'	SEQ ID NO: 7
PMI-inversa	5'GCCGTGGCCTTTGACAGT3'	SEQ ID NO: 8
PMI-sonda	5'TGCCGCCAACGAATCACCGG3' (etiqueta 5' = FAM, etiqueta 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 9
ZmADH-267 hacia adelante	5'GAACGTGTGTTGGGTTTGCAT3'	SEQ ID NO: 10
ZmADH-337 inversa	5'TCCAGCAATCCTTGCACCTT3'	SEQ ID NO: 11
ZmADH-316 sonda	5'TGCAGCCTAACCATGCGCAGGTA3' (etiqueta 5' = TET, etiqueta 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 12

10

### Ejemplo 3. Detección de MIR162 por Southern Blot

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

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

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

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

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

20 Ejemplo 4. Secuenciamiento del inserto de ADN heterólogo

Se determinó que la secuencia de nucleótidos de las secuencias codificadoras de *vip3Aa* y *pmi* en la molécula de ADN heteróloga insertada en MIR162 demuestra una integridad total del inserto, contigüidad de los elementos funcionales y la detección de cualquier cambio en el par de bases individual. Las secuencias codificadoras se amplificaron a partir del ADN derivado de la generación BC4. La amplificación por PCR se realizó con el sistema de PCR de Expansión de Alta Fidelidad (Expand High Fidelity PCR system, Roche, Cat. No. 1732650) o polimerasa de ADN de alta fidelidad de comienzo caliente *PfuUltra*<sup>TM</sup> (Hotstart High-Fidelity DNA polymerase) (Stratagene, Cat. No. 600390). Cada producto de la PCR se clonó individualmente en cualquiera de los vectores pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO (Invitrogen, Cat. No. K4700-20) o pCR<sup>®</sup>-BluntII-TOPO (Invitrogen, Cat. No. K2800-20) y se identificaron tres clones separados para cada producto de PCR y se secuenciaron. El secuenciamiento se realizó con el analizador ABI3730XL con ABI BigDye<sup>®</sup> 1,1 o con la química de Big Dye 3.1 dGTP (para las plantillas ricas en GC). El análisis de las secuencias se realizó con el paquete Phred, Phrap, y Consed de la Universidad de Washington y se realizó hasta una velocidad de error inferior a 1 en 10.000 bases (Ewing & Green, 1998. Genome Research 8:186-194). La secuencia de consenso final para cada gen se determinó combinando los datos de la secuencia de los tres clones individuales para generar una secuencia de consenso para cada gen. La alineación de secuencias se realizó con el programa ClustalW con los siguientes parámetros: matriz de clasificación blosum55, falla de apertura de espacio 15, falla de extensión de espacio 6,66 (Thompson *et al*, 1994. Nucleic Acids Research 22:4673-4680).

40 La secuencia codificadora completa de *vip3Aa20* se amplificó mediante PCR con los cebadores MOV3Aa-01-5': 5'ATGAACAAGAACAACACCAA3' (SEC ID NO: 15) y MOV3Aa-01-3': 5'CTACTTGATGCTCACGTCGTAG3' (SEC ID NO: 16) y la enzima *PfuUltra* Hotstart generando un producto 2370bp. El amplicón de la PCR se secuenció con los cebadores mostrados en la Tabla 2.

45 Tabla 2.

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

b00203e	TCTACGACGTGAGCATCAAG	SEC ID NO: 33
b00203f	GTAGAAGTGCACGATCGGG	SEC ID NO: 34
b00203g	CGGTGCTGGTCCAGTTG	SEC ID NO: 35

Otras dos reacciones de PCR se superpusieron con la secuencia codificadora completa de *vip3Aa20*. El extremo 5' de *vip3Aa20* se cubrió con una amplificación de PCR con los cebadores 162INSERT-F2: 5'ACACCAATGATGCAAATAGGC3' (SEC ID NO: 36) y VIP\_R4 5'GAAGGTGTTTCAGGTAGAACTCGAAG3' (SEC ID NO: 37) y con la enzima de expansión de alta fidelidad. La segunda reacción cubrió el extremo 3' de *vip3Aa20*; el producto se amplificó con los cebadores VIP-F3: 5'GGTGCTGTTTCGAGAAGAGGT3' (SEC ID NO: 42) y PMI\_REV1: 5'CGATTTATCACTCTCAATCACAT3' (SEC ID NO: 43) y la enzima de expansión de alta fidelidad. Los amplicones generados por estas reacciones comprendieron una secuencia de nucleótidos de 2946 bp (SEC ID NO: 38) y una secuencia de nucleótidos de 2577 bp (SEC ID NO: 44), respectivamente.

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

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

Nombre	Alineación de Secuencias
<i>Vip3Aa20</i>	(1) MNKNNTKLSTRALPSFDYFNIGYGFATGIKDIMNMIFKTDGDDLTLDE
<i>Vip3Aa19</i>	(1) MNKNNTKLSTRALPSFDYFNIGYGFATGIKDIMNMIFKTDGDDLTLDE
<i>Vip3Aa20</i>	(51) ILKNQQLNDISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQNQVL
<i>Vip3Aa19</i>	(51) ILKNQQLNDISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQNQVL
<i>Vip3Aa20</i>	(101) NDVNNKLD AINTMLRVYLPKITSMLS DV <b>V</b> IKQNYALSLQIEYLSKQLQEIS
<i>Vip3Aa19</i>	(101) NDVNNKLD AINTMLRVYLPKITSMLS DV <b>V</b> IKQNYALSLQIEYLSKQLQEIS
<i>Vip3Aa20</i>	(151) DKLDIINVNLINLSTL TEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETSSKVKKDG
<i>Vip3Aa19</i>	(151) DKLDIINVNLINLSTL TEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETSSKVKKDG
<i>Vip3Aa20</i>	(201) SPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTFHDVMVGNNLFGRSALK
<i>Vip3Aa19</i>	(201) SPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTFHDVMVGNNLFGRSALK
<i>Vip3Aa20</i>	(251) TASELITKENVKTS GSEVGNVYNFLIVLTALQAQAFLLTTCKRLLGLAD
<i>Vip3Aa19</i>	(251) TASELITKENVKTS GSEVGNVYNFLIVLTALQAQAFLLTTCKRLLGLAD
<i>Vip3Aa20</i>	(301) IDYTSIMNEHLNKEKEEF RVNIP LPTLSNTFSNP NYAKVKGSD EDAKMIVE
<i>Vip3Aa19</i>	(301) IDYTSIMNEHLNKEKEEF RVNIP LPTLSNTFSNP NYAKVKGSD EDAKMIVE
<i>Vip3Aa20</i>	(351) AKPGHALIGFEISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLL
<i>Vip3Aa19</i>	(351) AKPGHALIGFEISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLL
<i>Vip3Aa20</i>	(401) CPDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKKMKTLRYEVTANFYDSSTGEI
<i>Vip3Aa19</i>	(401) CPDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKKMKTLRYEVTANFYDSSTGEI
<i>Vip3Aa20</i>	(451) DLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVYMP LGVISETFLTPINGFGLQADENS
<i>Vip3Aa19</i>	(451) DLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVYMP LGVISETFLTPINGFGLQADENS
<i>Vip3Aa20</i>	(501) RLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLE
<i>Vip3Aa19</i>	(501) RLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLE
<i>Vip3Aa20</i>	(551) PWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKPKEYYIQYT
<i>Vip3Aa19</i>	(551) PWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKPKEYYIQYT
<i>Vip3Aa20</i>	(601) VKGKPSIHLKIDENTGYIHEDTNNNLEDYQTINKRFTTGTDLKGVYLILK

	Vip3Aa19	(601) VKGKPSIHLKIDENTGYIHEDTNNNLEDYQTINKRFTTGTDLKGVYLILK
	Vip3Aa20	(651) SQNGDEAWGDNFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTY
5	Vip3Aa19	(651) SQNGDEAWGDNFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTY
	Vip3Aa20	(701) QGGRGILKQNLQLDSFSTYRVYFVSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAK
	Vip3Aa19	(701) QGGRGILKQNLQLDSFSTYRVYFVSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAK
	Vip3Aa20	(751) DVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNLYGGPIVHFYDVSİK
10	Vip3Aa19	(751) DVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNLYGGPIVHFYDVSİK

El casillero sombreado indica el cambio de aminoácidos.

Ejemplo 5. Análisis de la secuencia de ADN flanqueante

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

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

30 La secuencia flanqueante de 5' y la secuencia de unión se confirmaron con el uso de procedimientos de PCR convencionales. Los siguientes pares de cebadores, o sus complementos, se utilizaron para confirmar la secuencia: 162INSERT-F2: 5'ACACCAATGATGCAAATAGGC3' (SEC ID NO: 36)/ VIP\_R4: 5'GAAGGTGTTTCAGGTAGAACTCGAAG3' (SEC ID NO: 37) y CJB179: 5'ATGCAAATAGGCTGGGAATAGTC3' (SEC ID NO: 39)/ CJB134 5'GTACCAGCTTGCTGAGTGGCT3' (SEC ID NO: 40). El amplicón resultante tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO: 41 y comprende la secuencia de unión 5' de SEC ID NO: 45. Se reconocerá que las otras secuencias de cebador se pueden usar para confirmar las secuencias de unión y flanqueantes. Con este método, se descubrió que el inserto de MIR162 era 5' flanqueado por los nucleótidos 1040-1088 de la secuencia genómica de maíz que se muestra en la SEC ID NO: 46.

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

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

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

60 Una tercera reacción de PCR se realizó independientemente en cuatro tubos individuales con el cebador FE1004: 5'GATTGTCGTTTCCCGCCTT3' (SEC ID NO: 52) con el cebador Universal provisto por el fabricante. Se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo de PCR sobre hielo: 2 µl de producto de PCR purificado, 1 µl de cebador Universal 10 µM, 1 µl de FE1004 10 µM, 6 µl de agua destilada, y 10 µl de 2X mezcla maestra SeeAmp™ ACPTM Master Mix II. Los tubos se colocaron en un ciclador térmico precalentado (94°C). La PCR se completó con

el siguiente programa: un ciclo a 94°C durante cinco minutos, 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C durante 40 segundos, y 72°C durante 90 segundos, y un ciclo a 72°C durante siete minutos.

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

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

Tabla 4. Secuencias de Cebadores

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Secuencia No.
b00201h	TTCACGGGAGACTTTATCTG	SEC ID NO: 60
b00605a	CCGATTCATTAATGCAG	SEC ID NO: 61
b00701b	ACGTAAAACGGCTTGTC	SEC ID NO: 62
b00702b	GTTTAAACTGAAGGCGG	SEC ID NO: 63
b00704h	AATAATATCACTCTGTACATCC	SEC ID NO: 64
b01106f	GTTGTAACGACGG	SEC ID NO: 65
b01709f	TAGGCACCCAGGCTTTA	SEC ID NO: 66
b03504a	AATTGAATTTAGCGGCCG	SEC ID NO: 67
b05102f	GGTCCCTACAACATAAATAG	SEC ID NO: 68
b05102g	TTCGTCCCTACTATCAACGC	SEC ID NO: 69
b05102h	CTTTAGGCATCAGCGGT	SEC ID NO: 70
b05103a	AGCATCTGCGTAAGCACA	SEC ID NO: 71
b05103b	CTGATGACACCAATGATGC	SEC ID NO: 72
b05103c	GATCAGATTGTCGTTTCCC	SEC ID NO: 73
b05103d	GCATCATTGGTGTCATCAG	SEC ID NO: 74
b05103e	TGTGCTTACGCAGATGCT	SEC ID NO: 75
b05103f	ACCCGCTGATGCCTAAAG	SEC ID NO: 76
b05103g	GCGTTGATAGTAGGGACGAA	SEC ID NO: 77
b05103h	CTATTTATGTTGTAGGGACC	SEC ID NO: 78
b05210a	CTAGACTGGAAGCGGAG	SEC ID NO: 79
b05210b	CCACTTTCATCCCTAGTTG	SEC ID NO: 80

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

35 En primer lugar, se construyeron conjuntos de fragmentos de ADN genómico ligados a adaptadores, no clonados, conocidos como "colecciones" de GenomeWalker. Cada colección se construyó mediante la digestión del ADN genómico de MIR162 con una enzima de restricción (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*, y *XmnI*) de la siguiente manera: Por ejemplo, 25 µl de ADN genómico de MIR162 (0,1 µg/µl), 8 µl de la enzima de restricción (10 unidades/µl), 10 µl del tampón de la enzima de restricción (10X), y 57 µl de H<sub>2</sub>O destilada se mezclaron en un tubo y se incubaron a 37°C durante la noche.

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

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

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

25 Una segunda reacción de PCR se realizó independientemente con el cebador AP2, provisto por el fabricante con diferentes cebadores diseñados dentro de la secuencia de ADN del inserto heteróloga (Ronda 2 “cebadores específicos del gen” o “GSP2”). Los siguientes reactivos se mezclaron en un tubo de PCR sobre hielo: 1 µl del producto de PCR primario diluido adecuado, 1 µl de AP2 10 µM, 1 µl de GSP2 10 µM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 5 µl de 10X Tampón de PCR Advantage 2, 1 µl de Polimerasa de BD Advantage 2, y 40 µl de agua destilada. La PCR se completó con el siguiente programa: cinco ciclos a 94°C durante 25 segundos y 72°C durante cuatro minutos, 20 ciclos a 94°C durante 25 segundos y 67°C durante cuatro minutos, y un ciclo a 67°C durante cuatro minutos. Las reacciones que funcionaron fueron: (1) las colecciones de *Dral* y *Xmnl* con el cebador de GSP2 162GW3F2: 5'AAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCG3' (SEC ID NO: 57) y el cebador AP2.

35 Diez µl de los productos de la PCR se analizaron sobre 1% de gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. La banda adecuada se extrajo del gel de agarosa y se purificó con un conjunto de extracción de gel Qiagen Qiaquick de acuerdo con las instrucciones del cliente. El ADN extraído se clonó en un vector de clonación TOPO-XL de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este clon se transformó en *E. coli*, y el ADN del plásmido se extrajo de las células luego de un cultivo durante la noche con un conjunto Qiagen Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este plásmido se secuenció con el uso del secuenciamiento del análisis final.

40 Un nuevo cebador se diseño dentro de la nueva secuencia, previamente desconocida, para utilizarse con un cebador en el ADN del inserto a fin de amplificar aproximadamente 1 kb de la secuencia flanqueante 3' hacia afuera del ADN genómico. El cebador del ADN del inserto 162GW3F1: 5'TCTCTTGCTAAGCTGGGAGCTCGATCCG3' (SEC ID NO: 56) y un cebador de la secuencia flanqueante 3' 1623'GWR1: 5CTGGTGAACCGATTTTACGGAGG3' (SEC ID NO: 58) se utilizaron para amplificar una molécula de ácido nucleico que comprendía la secuencia flanqueante 3' para la confirmación. La secuencia del amplicón resultante se encuentra establecida en la SEC ID NO: 59. Este amplicón de 45 3' comprende la secuencia de unión 3' establecida en la SEC ID NO: 47. Diez µl del amplicón de la PCR se analizaron sobre 1% de gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. La banda adecuada se extrajo del gel de agarosa y se purificó con un conjunto de extracción de gel Qiagen Qiaquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se clonó en un vector de clonación TOPO-XL de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este clon se transformó en *E. coli*. El ADN del plásmido se extrajo de las células luego de un cultivo durante la noche en un medio con un conjunto Qiagen Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron completamente tres plásmidos con los cebadores que se muestran en la Tabla 5. Las secuencias del plásmido se alinearon para generar la secuencia flanqueante 3' completa confirmada (SEC ID NO: 48).

55 Tabla 5. Secuencias del Cebador

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Secuencia No.
b00106a	GATTGAATCCTGTTGCC	SEC ID NO: 81
b00106b	TTCATAAATAACGTCATGC	SEC ID NO: 82
b00108a	TCTGTGGATAACCGTATTAC	SEC ID NO: 83
b00201h	TTCACGGGAGACTTTATCTG	SEC ID NO: 60
b00605a	CCGATTCATTAATGCAG	SEC ID NO: 61
b00704h	AATAATATCACTCTGTACATCC	SEC ID NO: 64
b00712e	AGTAACATAGATGACACCGC	SEC ID NO: 84
b01106a	CCAGTGTGCTGGAATTCG	SEC ID NO: 85

b01106f	GTTGTA AACGACGG	SEC ID NO: 65
b01107h	CCAGTGTGATGGATATCTGC	SEC ID NO: 86
b01108e	CCAGTGTGCTGGAATTCG	SEC ID NO: 87
b01111f	CCAGTGTGATGGATATCTGC	SEC ID NO: 88
b01709f	TAGGCACCCAGGCTTTA	SEC ID NO: 66
b02701a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 89
b02701e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 90
b02702a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 91
b02702e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 92
b02703a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 93
b02703e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 94
b02704a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEC ID NO: 95
b02811a	GGTCTTGCGATGATTATC	SEC ID NO: 96
b05104c	GAGAGGAATGGCAGCAGA	SEC ID NO: 97
b05104d	CATGACGGGTTTGAGATT	SEC ID NO: 98
b05104e	AATCTCAAACCCGTCATG	SEC ID NO: 99
b05104f	TCTGCTGCCATTCTCTC	SEC ID NO: 100
b05104g	GATCAACCCGGAGAGGAAT	SEC ID NO: 101
b05104h	CCATGACGGGTTTGAGAT	SEC ID NO: 102
b05105c	CAACCGACCTGACAAAGTGAC	SEC ID NO: 103
b05105e	ATCTCAAACCCGTCATGG	SEC ID NO: 104
b05105f	ATTCCTCTCCGGGTTGATC	SEC ID NO: 105

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

5 Los extractos se prepararon a partir de hojas, raíces, piel, granos, seda, polen, y plantas enteras de MIR 162. Los extractos se analizaron cuantitativamente para determinar la Vip3Aa20 mediante ELISA con el uso de los anticuerpos policlonales anti-Vip3A de cabra purificado por inmunoafinidad y anti-Vip3A de conejo purificado con la Proteína A con los procedimientos ELISA reconocidos en la técnica. La Vip3Aa20 se detectó en todos los tejidos analizados en todas las etapas de crecimiento. El nivel medio de proteína Vip3Aa20 detectado en toda la planta en la antesis y madurez de la semilla fue de 10 µg/g en peso fresco y 16 µg/g en peso fresco, respectivamente. El nivel medio de proteína Vip3Aa20 en las hojas en la antesis fue de 22 µg/g en peso fresco.

Ejemplo 7. Eficacia del MIR162 en el Campo

15 El evento MIR162 se sometió a prueba en el campo para determinar la eficacia contra el gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano del fruto del maíz (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), y la oruga perforadora del maíz europea (ECB, *Ostrinia nubilalis*). El desempeño del evento MIR162 se comparó con aquel de Warrior® (Syngenta, Inc.), un insecticida convencional estándar aplicado a una velocidad de 20 11,2 g a.i./acre, el evento Bt11 del maíz transgénico, que comprende un gen *cry1Ab*, y un híbrido de Bt11 X MIR162, producido mediante el cruce de una línea endogámica de Bt11 con una línea endogámica de MIR162.

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

30 Las infestaciones de plagas naturales se utilizaron en pruebas en las que las poblaciones fueron lo suficientemente elevadas; en donde no se realizaron infestaciones artificiales. La infestación artificial con dos larvas de 2<sup>a</sup>- a 3<sup>a</sup>-instar en V1-V2 se utilizó en las pruebas de BCW. Los lotes se clasificaron a los 3, 7, y 14 días luego de la infestación. El daño producido por BCW se registró como plantas dañadas parcialmente y plantas cortadas completamente. Los lotes de FAW se clasificaron a los 7 y 14 días luego de la infestación o luego de observarse la tercera larva instar en las plantas de control. La siguiente escala se utilizó para evaluar el daño producido en las 35 hojas por FAW y CEW:

- 0.01 – Daño no visible a la hoja
- 1 – Daño en forma de orificios pequeños tipo alfiler en unas pocas hojas

- 2 – Pequeña cantidad de daño en forma de orificios más grandes del tipo bala en unas pocas hojas  
 3 – Daño en forma de orificios tipo bala sobre varias hojas  
 4 – Daño en forma de orificios tipo bala y lesiones en unas pocas hojas  
 5 – Lesiones en varias hojas  
 6 – Grandes lesiones sobre varias hojas  
 7 – Grandes lesiones y porciones comidas en unas pocas hojas  
 8 – Grandes lesiones y porciones comidas en varias hojas  
 9 – Grandes lesiones y porciones comidas en la mayoría de las hojas
- El daño a las plantas se evaluó para ambas ECB de generaciones primera y segunda. La siguiente escala se utilizó para clasificar el daño de la primera generación, generalmente cuando las larvas se encontraban en la tercera y cuarta instar:
- 1 – Ningún daño visible a la hoja  
 2 – Pequeña cantidad de lesiones en forma de orificios tipo bala sobre unas pocas hojas  
 3 - Lesiones en forma de orificios tipo bala comunes en varias hojas  
 4 – Varias hojas con orificios tipo bala y lesiones alargadas  
 5 - Varias hojas con lesiones alargadas  
 6 – Varias hojas con lesiones alargadas de aproximadamente 2,5 cm  
 7 – Lesiones largas comunes en aproximadamente la mitad de las hojas.  
 8 – Lesiones largas comunes en aproximadamente dos tercios de las hojas  
 9 – La mayoría de las hojas con lesiones largas

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

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

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

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

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

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

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

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



Control Negativo 3,78

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

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

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

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

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

Tratamiento	Longitud media del túnel (cm)
MIR162	5,46
Bt11	0,37
Bt11 X MIR162	0,48
Insecticida Warrior	5,06
Control Negativo	5,04

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tratamiento	Número de experimento						
	1	2	3	4	5	6	7
Bt11	75(25)	75(25)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)
MIR162	25(25)	0(0)	0(0)	50(29)	50(29)	50(29)	0(0)
MIR604					100(0)	100(0)	100(0)
MIR162xBt11	25(25)	25(25)	0(0)	0(0)	25(25)	25(25)	25(25)
MIR162xMIR604					0(0)	25(25)	50(29)
MIR604xBt11							75(25)
Fuerza					100(0)	100(0)	100(0)
Control Neg. #1	100(0)	75(25)	100(0)	100(0)	75(25)	100(0)	100(0)
Control Neg. #2	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)

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

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

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

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

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

Las secuencias genómicas que flanquean al sitio de inserción del MIR162 se pueden usar también para estabilizar la expresión de otros genes de interés cuando se insertan como un transgen en otras ubicaciones genómicas en el maíz y otros cultivos. Específicamente, hasta 20 Kb de la secuencia genómica que flanquea a 5' hasta el sitio de inserción (nucleótidos 5.454 a 25.454 de SEC ID NO: 106) y hasta 20 Kb de la secuencia genómica que flanquea a 3' hasta el sitio de inserción (nucleótidos 25.513 a 45.513 de SEC ID NO: 106) se utilizan para flanquear el gen o los genes de interés que se han de insertar en el genoma de las plantas. Estas secuencias se pueden flanquear también por repeticiones de bordes de T-ADN, como por ejemplo secuencias de repetición del borde izquierdo (LB) y del borde derecho (RB) y otras secuencias estimulantes para aumentar la eficiencia en la administración de T-ADN. El gen o los genes de interés se pueden colocar exactamente en el sitio de inserción del MIR162 o bien se pueden colocar en cualquier lugar dentro de las regiones 20 Kb alrededor de los sitios de inserción de MIR162 para conferir un nivel uniforme de expresión transgénica. Los vectores de ADN que contienen al gen o a los genes de interés y la secuencia flanqueante del sitio de inserción del MIR162 se pueden administrar en las células vegetales mediante uno de los varios métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la transformación de protoplastos, bombardeo balístico, y la transformación mediada por *Agrobacterium*. El ADN administrado se puede integrar aleatoriamente en un genoma de una planta o puede hallarse como parte de las unidades genéticas segregantes independientemente, como por ejemplo, un cromosoma artificial o minicromosoma. Los vectores de ADN que contienen al gen o a los genes de interés y las secuencias flanqueantes del sitio de inserción de MIR162 se pueden administrar en células vegetales. De esta manera, al rodear un gen o genes de interés con la secuencia genómica que flanquea al sitio de inserción de MIR162, la expresión de esos genes se estabiliza en una planta huésped transgénica, como por ejemplo una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea, como el maíz.

#### DEPÓSITO

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

65

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> Syngenta Participations AG  
Long, NyKoll  
Pulliam, Derrick  
Hart, Hope  
Bottoms, Jeff  
10 <120> Evento de maíz MIR162  
Meghji, Moez  
Que, Qiudeng  
<130> 71133\_EP\_ETD1  
<160> 107  
15 <170> PatentIn versión 3.3  
<210> 1  
<211> 2370  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
20 <220>  
<223> Secuencia codificadora de vip3Aa20

# ES 2 546 255 T3

```

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

```

ES 2 546 255 T3

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

5 <210> 2  
<211> 789  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Toxina Vip3Aa

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(789)  
<223> Proteína Vip3Aa20 producida por MIR162

<400> 2  
Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe  
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu  
35 40 45

15

ES 2 546 255 T3

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys  
 50 55 60  
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln  
 85 90 95  
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
 100 105 110  
 Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
 115 120 125  
 Ile Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
 130 135 140  
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val  
 145 150 155 160  
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
 165 170 175  
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
 180 185 190  
 Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu  
 195 200 205  
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
 210 215 220  
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly  
 225 230 235  
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile  
 245 250 255  
 Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
 260 265 270  
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr  
 275 280 285  
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr  
 290 295 300  
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
 305 310 315 320

ES 2 546 255 T3

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



ES 2 546 255 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Val Ser Ile Lys  
 785

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

5

<220>  
 <223> Plásmido pNOV1300

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

10

ES 2 546 255 T3

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

ES 2 546 255 T3

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

ES 2 546 255 T3

acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat 4380  
 atgctctaac cttgagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg 4440  
 atcttgatat acttggatga tggcatatgc agcagctata tgtggatttt tttagccctg 4500  
 ccttcatacg ctatttattt gcttggact gtttcttttg tcgatgctca ccctgttggt 4560  
 tgggtgttact tctgcagga tccccgatca tgcaaaaact cattaactca gtgcaaaaact 4620  
 atgcctgggg cagcaaaaacg gcgttgactg aactttatgg tatggaaaat ccgtccagcc 4680  
 agccgatggc cgagctgtgg atgggcgcac atccgaaaag cagttcacga gtgcagaatg 4740  
 ccgccggaga tatcgtttca ctgcgtgatg tgattgagag tgataaatcg actctgctcg 4800  
 gagaggccgt tgccaaacgc tttggcgaac tgctttcct gttcaaagta ttatgcgag 4860  
 cacagccact ctccattcag gttcatccaa acaaacacaa ttctgaaatc ggttttgcca 4920  
 aagaaaatgc cgaggtatc ccgatggatg ccgccgagcg taactataaa gatcctaacc 4980  
 acaagccgga gctgggtttt gcgctgacgc ctttccttgc gatgaacgcg tttcgtgaat 5040  
 tttccgagat tgtctcccta ctccagccgg tcgcaggtgc acatccggcg attgctcact 5100  
 ttttacaaca gcctgatgcc gaacgtttaa gcgaactgtt cgccagcctg ttgaatatgc 5160  
 aggggtgaaga aaaatcccgc gcgctggcga ttttaaaatc ggccctcgat agccagcagg 5220  
 gtgaaccgtg gcaaacgatt cgtttaattt ctgaatttta cccggaagac agcggctctgt 5280  
 tctccccgct attgctgaat gtggtgaaat tgaaccctgg cgaagcgatg ttctgttcg 5340  
 ctgaaacacc gcacgcttac ctgcaaggcg tggcgctgga agtgatggca aactccgata 5400  
 acgtgctgcg tgcgggtctg acgcctaaat acattgatat tccggaactg gttgccaatg 5460  
 tgaattcga agccaaaccg gctaaccagt tgttgacca gccggtgaaa caaggtgcag 5520  
 aactggactt cccgattcca gtggatgatt ttgccttctc gctgcatgac cttagtata 5580  
 aagaaaccac cattagccag cagagtgccg ccattttggt ctgcgtcga ggcgatgcaa 5640  
 cgttggtgaa aggttctcag cagttacagc ttaaaccggg tgaatcagcg tttattgccg 5700  
 ccaacgaatc accggtgact gtcaaaggcc acggccggtt agcgcgtgtt tacaacaagc 5760  
 tgtaagagct tactgaaaaa attaacatct cttgctaagc tgggagctcg atccgctgac 5820  
 ctgcagatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaaatcct gttgccggtc 5880  
 ttgcgatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacatgt 5940  
 aatgcatgac gttatttatg agatgggttt ttatgattag agtcccgcaa ttatacattt 6000  
 aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg cgcgcggtgt 6060  
 catctatggt actagatccc cgggtctaga caattcagta cattaanaac gtccgcaatg 6120  
 tgttattaag ttgtctaagc gtcaatttgt ttacaccaca atatatcctg ccaccagcca 6180  
 gccaacagct ccccgaccgg cagctcggca caaatcacc actcgataca ggcagcccat 6240  
 cagtccggga cggcgtcagc gggagagccg ttgtaaggcg gcagactttg ctcatgttac 6300  
 cgatgctatt cggaagaacg gcaactaagc tgccgggttt gaaacacgga tgatctcgcg 6360

ES 2 546 255 T3

gagggtagca tgttgattgt aacgatgaca gagcgttgct gcctgtgatc aaatatcatc 6420  
tccctcgcag agatccgaat tatcagcctt cttattcatt tctcgcctaa ccgtgacagg 6480  
ctgtcgatct tgagaactat gccgacataa taggaaatcg ctggataaag ccgtgagga 6540  
agctgagtgg cgctatttct ttagaagtga acgttgacga tcgtcgaccg taccctgatg 6600  
aattaattcg gacgtacggt ctgaacacag ctggataactt acttgggcca ttgtcataca 6660  
tgacatcaac aatgtaccgg tttgtgtaac cgtctcttgg aggttcgtat gacactagtg 6720  
gttccccca gcttgcgact agatggttag gcctaacatt ttattagaga gcaggctagt 6780  
tgcttagata catgatcttc aggccgttat ctgtcagggc aagcgaaaat tggccattta 6840  
tgacgaccaa tgccccgcag aagctcccat ctttgcggcc atagacgccg cccccctt 6900  
ttggggtgta gaacatcctt ttgccagatg tggaaaagaa gttcgttgtc ccattgttgg 6960  
caatgacgta gtagccggcg aaagtgcgag acccatttgc gctatatata agcctacgat 7020  
ttccggttgcg actattgtcg taattggatg aactattatc gtagttgttc tcagagttgt 7080  
cgtaatttga tggactattg tcgtaattgc ttatggagtt gtcgtagttg cttggagaaa 7140  
tgctgtagtt ggatggggag tagtcatagg gaagacgagc ttcactccact aaaacaattg 7200  
gcaggtcagc aagtgcctgc cccgatgcc a tcgcaagtac gaggcttaga accaccttca 7260  
acagatcgcg catagtcttc cccagctctc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc 7320  
ggcgtcggct tgaacgaatt gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt 7380  
tcacgtagtg aacaaattct tccaactgat ctgcgcgca ggccaagcga tcttcttctc 7440  
caagataagc ctgcctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggccggc aggcgctcca 7500  
ttgccagtc ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgcc ggttactgcg ctgtacaaa 7560  
tgcgggacaa cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc 7620  
atagcgttaa ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga 7680  
gttccctccg cgtggacct accaaggcaa cgctatgttc tcttgccttt gtcagcaaga 7740  
tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct 7800  
gccattctcc aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg atgtcgtcgt 7860  
gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgt ctctccaggg gaagccgaag 7920  
tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttgtttc atcaagcctt acggtcaccg 7980  
taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg gagccgtaca 8040  
aatgtacggc cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact acctctgata 8100  
gttgagtga tacttcggcg atcaccgctt ccctcatgat gtttaactcc tgaattaagc 8160  
cgcgccgcga agcgggtgct gcttgaatga attgtaggc gtcactctgt gctcccgaga 8220  
accagtacca gtacatcgct gtttcgctc agacttgagg tctagtttta tacgtgaaca 8280  
ggtcaatgcc gccgagagta aagccacatt ttgcgtacaa attgcaggca ggtacattgt 8340  
tcgtttgtgt ctctaactgt atgccaagga gctgtctgct tagtgcccac ttttgcgaa 8400

ES 2 546 255 T3

attcgatgag actgtgCGCG actcctttgc CTCGGTGCgt gtgcGacaca acaatgtgTt 8460  
 cgatagaggc tagatcgTtc catgttgagt tgagttcaat cttcccGaca agctcttggt 8520  
 cgatgaatgc gccatagcaa gcagagtctt catcagagtc atcatccgag atgtaatcct 8580  
 tccggtaggg gctcacactt ctggtagata gttcaaagcc ttggtcggat aggtgcacat 8640  
 cgaacacttc acgaacaatg aatggTtct cagcatcaa tgtttccgcc acctgctcag 8700  
 ggatcaccga aatcttcata tgacgcctaa cgcttgGcac agcggatcgc aaacctggcg 8760  
 cggcttttgg cacaaaaggc gtgacaggTt tgCGaatccg ttgctgcccac ttgttaacc 8820  
 ttttgccaga tttgtaact ataatttatg ttagaggcga agtcttggtt aaaaactggc 8880  
 ctaaaattgc tggggatttc aggaaagtaa acatcacctt ccggctcgat gtctattgta 8940  
 gatatatgta gtgtatctac ttgatcgggg gatctgctgc CTCGCGgtt tcggtgatga 9000  
 cggtgaaaac ctctgacaca tgCagctccc ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcGga 9060  
 tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc 9120  
 agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgCggcatca 9180  
 gagcagattg tactgagagt gcacCATatg cggTgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 9240  
 agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc 9300  
 gttcggctgc ggcgagcggT atcagctcac tcaaagcgg taatacggTt atccacagaa 9360  
 tcaggggata acgCaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggc agcaaaaaggc caggaaccgt 9420  
 aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaAAA 9480  
 aatcgacgct caagtCagag gtggcgaaaC ccgacaggac tataaagata ccaggcgTtt 9540  
 cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc tgccgcttac cggatacctg 9600  
 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 9660  
 agttcggTgt aggtcgTtcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 9720  
 gaccgctgcg cttatccgg taactatcgt cttgagTcca acccggtaaG acacgactta 9780  
 tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggTatgt aggcggTgct 9840  
 acagagTtct tgaagtggTg gcctaactac ggctacacta gaaggacagT atttggtatc 9900  
 tgcgctctgc tgaagccagT taccttcgga aaaagagTtg gtagctcttg atccggcaaa 9960  
 caaaccaccg ctggtagcgg tggTttttt gtttgcaagc agcagattac gcgCagaaaa 10020  
 aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 10080  
 aactcacgTt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 10140  
 ttaaattaaa aatgaagTtt taaatcaatc taaagtatat atgagTaaac ttggtctgac 10200  
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc 10260  
 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 10320  
 cccagtgctg caatgatacc gcgagaccCa cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 10380  
 aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggTcctg caactttatc cgctccatc 10440

ES 2 546 255 T3

cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 10500  
 aacgttggtg ccattgctgc aggggggggg gggggggggt tccattgttc attccacgga 10560  
 caaaaacaga gaaaggaaac gacagaggcc aaaaagctcg ctttcagcac ctgtcgtttc 10620  
 ctttcttttc agaggggtatt ttaaataaaa acattaagtt atgacgaaga agaacggaaa 10680  
 cgccttaaac cggaaaatth tcataaatag cgaaaaccg cgaggtcgcc gccccgtaac 10740  
 ctgtcggatc accggaaagg acccgtaaag tgataatgat tatcatctac atatcacaac 10800  
 gtgcgtggag gccatcaaac cacgtcaaat aatcaattat gacgcaggta tcgtattaat 10860  
 tgatctgcat caacttaacg taaaaacaac ttcagacaat acaaatcagc gacactgaat 10920  
 acggggcaac ctcatgtccc ccccccccc cccctgcag gcatcgtggt gtcacgctcg 10980  
 tcgtttggtg tggcttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 11040  
 cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag 11100  
 ttggcccgag tgtatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 11160  
 ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 11220  
 tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaacac gggataatac cgcgccacat 11280  
 agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 11340  
 atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca 11400  
 gcatctttta cttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 11460  
 aaaaagggaa taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat 11520  
 tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 11580  
 aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa 11640  
 gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 11700  
 cttcaagaat tggtcgacga tcttgctgcy ttcggatatt ttcgtggagt tcccgcaca 11760  
 gacccggatt gaaggcgaga tccagcaact cgcgccagat catcctgtga cggaacttg 11820  
 gcgcgtgatg actggccagg acgtcggccg aaagagcgac aagcagatca cgcttttcga 11880  
 cagcgtcggg tttgcatcg aggatthttc ggcgtgcyg tacgtccgcy accgcgttga 11940  
 gggatcaagc cacagcagcc cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct 12000  
 ttttggaaat ctgctccgct gtcaggctth ccgacgtttg ggtggttga cagaagtcat 12060  
 tatcgcacgg aatgccaagc actcccagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa 12120  
 tggacgaacg gataaacctt ttcacgccct tttaaatata cgattattct aataaacgct 12180  
 ctttctctt aggtttacce gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaactgaag 12240  
 gcgggaaacg acaatctgat catgagcggg gaattaaggg agtcacgtta tgacccccgc 12300  
 cgatgacgcy ggacaagccg ttttacgtth ggaactgaca gaaccgcaac gttgaaggag 12360  
 ccactcagca agctggtaca agcttgcag cctgcagtgc agcgtgacct ggtcgtgccc 12420  
 ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa aaattaccac atattthttt 12480

ES 2 546 255 T3

tgtcacactt gtttgaagtg cagtttatct atctttatac atatatttaa actttactct 12540  
 acgaataata taatctatag tactacaata atatcagtggt tttagagaat catataaatg 12600  
 aacagttaga catggtctaa aggacaattg agtattttga caacaggact ctacagtttt 12660  
 atcttttttag tgtgcatgtg ttctcctttt tttttgcaaa tagcttcacc tatataatac 12720  
 ttcatccatt ttattagtac atccatttag ggtttagggt taatggtttt tatagactaa 12780  
 ttttttttagt acatctattt tattctattt tagcctctaa attaagaaaa ctaaaactct 12840  
 attttagttt ttttatttta taatttagat ataaaataga ataaaataaa gtgactaaaa 12900  
 attaacaaa taccctttta gaaattaaaa aaactaagga aacatttttc ttgtttcgag 12960  
 tagataatgc cagcctgtta aacgccgtcg acgagtgctaa cggacaccaa ccagcgaacc 13020  
 agcagcgtcg cgtcgggcca agcgaagcag acggcacggc atctctgtcg ctgcctctgg 13080  
 acccctctcg agagtccgc tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt 13140  
 gcgtggcggga gcggcagacg tgagccggca cggcaggcgg cctcctcctc ctctcacggc 13200  
 accggcagct acgggggatt ctttcccac cgtcctctcg ctttcccttc ctgcgccgcc 13260  
 gtaataaata gacacccctt ccacaccctc tttccccaac ctctgtgtgt tcggagcgca 13320  
 cacacacaca accagatctc ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtaacg 13380  
 cgctcgtcct ccccccccc cctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt 13440  
 tagggcccgg tagttctact tctgttcatg tttgtgttag atccgtggtt gtgttagatc 13500  
 cgtgctgcta gcgttcgtac acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa 13560  
 cttgccagtg tttctctttg gggaaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat 13620  
 cgatttcatg atttttttt tttcgttgca tagggtttg tttgccctt tcctttattt 13680  
 caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt catcttttca tgcttttttt tgtcttggtt 13740  
 gtgatgatgt ggtctgggtg ggcggtcggt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact 13800  
 acctggtgga tttattaatt ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg 13860  
 aattgaagat gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatggtg atgcgggttt 13920  
 tactgatgca tatacagaga tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg 13980  
 ggcggtcggt cattcgttct agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt 14040  
 tattaatttt ggaactgtat gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag ttttaagatgg 14100  
 atggaaatat cgatctagga taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac 14160  
 atgatggcat atgcagcatc tattcatatg ctctaactt gagtacctat ctattataat 14220  
 aaacaagtat gttttataat tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc 14280  
 agctatatgt ggattttttt agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tggtagctgt 14340  
 tcttttgctg atgctcacc tgttgtttgg tgttacttct gcaggctgac tctagaggat 14400  
 ccacc 14405

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

5

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

<400> 4  
 cacctcagc aaccgaact a 21



ES 2 546 255 T3

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

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

<400> 5  
gcttagcctc cacgatcatc tt 22

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

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

15 <400> 6  
gtcctcgtcg ctgccctca cct 23

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

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

<400> 7  
ccgggtgaat cagcgttt 18

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

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

<400> 8  
gccgtggcct ttgacagt 18

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

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

<400> 9  
40 tgccgccaac gaatcaccgg 20

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

## ES 2 546 255 T3

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

<400> 10  
 gaacgtgtgt tgggttgca t 21

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

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

<400> 11  
 tccagcaatc cttgcacctt 20

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

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

20 <400> 12  
 tgcagcctaa ccatgcgag ggta 24

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

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

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

ES 2 546 255 T3

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

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

<220>  
 <223> Sonda pmi químicamente sintetizada

5

ES 2 546 255 T3

<400> 14  
atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact 60  
gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120  
catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgcccggag atatcgtttc actgcgtgat 180  
gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaacg ctttgcgcaa 240  
ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300  
aacaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg cgcaggtat cccgatggat 360  
gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg 420  
cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg 480  
gtcgcagggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540  
agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg 600  
attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tctgtttaatt 660  
tctgaatfff acccgaaga cagcggctctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa 720  
ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc 780  
gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840  
tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag 900  
ttgttgaccc agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat 960  
tttgccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020  
gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttgtgga aaggttctca gcagttacag 1080  
cttaaacggg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc 1140  
cacggccgtt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa 1176

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

5

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

<400> 15  
atgaacaaga acaacaccaa 20

10

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

15

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

<400> 16  
ctactgatg ctcacgtcgt ag 22

20

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

<220>  
<223> Químicamente sintetizado

<400> 17  
 acgagcagaa ccaggtgc 18

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

10  
 <400> 18  
 ggtgaagaag gacggcag 18

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

15  
 <220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 19  
 acctgtcgca agctgctggg 20

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

25  
 <400> 20  
 tggacaagct gctgtgtc 18

<210> 21  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 21  
 tgcaggccga cgagaacag 19

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

<220>  
 40 <223> Químicamente sintetizado

<400> 22  
 tgatccagta caccgtgaa 19

<210> 23  
 <211> 18

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

5           <400> 23  
             accctgacc tgtaccag           18

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

10

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 24  
 ggtgtgccgc tgatgtg           18

15

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

20

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 25  
 cgtactcggc ctccgct           18

25

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

30

<400> 26  
 ctgcaggcca aagccgtt           18

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

35

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 27  
 tcgccgtaga tcacctcg           18

40

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 28  
 gcttgcgaca ggtggtca 18

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

10  
 <400> 29  
 ttgctgctgg tctcgtgg 19

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

15  
 <220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 30  
 cgttgccgat cctaaggat 19

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

25  
 <400> 31  
 gcaagccatc gattcac 17

<210> 32  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 32  
 gcaacaccct gaccctg 17

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

40  
 <400> 33  
 tctacgacgt gagcatcaag 20

<210> 34  
 <211> 19

ES 2 546 255 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Químicamente sintetizado

5 <400> 34  
gtagaagtgc acgatcggg 19

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

<220>  
<223> Químicamente sintetizado

<400> 35  
cggtgctggt ccagttg 17

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

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

<400> 36  
acaccaatga tgcaaatagg c 21

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

<220>  
<223> Cebador VIP\_R4 químicamente sintetizado

<400> 37  
30 gaaggtgttc aggtagaact cgaag 25

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

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

<400> 38  
acaccaatga tgcaaatagg ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg aatcatgtca 60  
ctgatagtgtt aaactgaagg cgggaaacga caatctgatc atgagcggag aattaagggga 120  
gtcacgttat gacccccgcc gatgacgcgg gacaagccgt tttacgtttg gaactgacag 180  
aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gctggtacaa gcttgcagtc ctgcagtgca 240  
gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcagtgcta agttataaaa 300  
aattaccaca tttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta tctttataca 360



ES 2 546 255 T3

tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa tatkagtggt 420  
 ttagagaatc atataaatga acagtttagac atggctctaaa ggacaattga gtattttgac 480  
 aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt ttttgcaaat 540  
 agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg gtttagggtt 600  
 aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt agcctctaaa 660  
 ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata taaaatagaa 720  
 taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa aactaaggaa 780  
 acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga cgagtctaac 840  
 ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcca gcgaagcaga cggcacggca 900  
 tctctgtcgc tgccctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttg gactgtctccg 960  
 ctgtcggcat ccgaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac ggaggcggc 1020  
 ctctctctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggatc ctttcccacc gctccttgc 1080  
 tttcccttcc tcgcccgcg taataaatag acacccccct cacaccctct tcccccaacc 1140  
 tcgtgttggt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca cccgtcggca 1200  
 cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtcctc ccccccccc cctctctacc ttctctagat 1260  
 cggcgttccg gtccatgggt agggcccgggt agttctactt ctgttcatgt ttgtgttaga 1320  
 tccgtgtttg tgtagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac ctgtacgtca 1380  
 gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg gatggctcta 1440  
 gccgttccgc agacgggatc gatttcatga ttttttttgt ttcgttgcac agggtttgg 1500  
 ttgccctttt cttttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc atcttttcat 1560  
 gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctgggttg gcggtcgttc tagatcggag 1620  
 tagaattctg tttcaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta tgtgtgtgcc 1680  
 atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atatcgatct aggataggta 1740  
 tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttggt cgcttggttg 1800  
 tgatgatgtg gtgtgggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta gaatactggt 1860  
 tcaaactacc tgggttattt attaattttg gaactgtatg tgtgtgtcat acatcttcat 1920  
 agttacgagt ttaagatgga tggaaatc gatctaggat aggtatacat gttgatgtgg 1980  
 gttttactga tgcataatac tgatggcata tgcagcatct attcatatgc tctaaccctg 2040  
 agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct tgatatactt 2100  
 ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt catacgtat 2160  
 ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgctcaccct gttgtttggt gttacttctg 2220  
 caggctgact ctgagggatc caccatgaac aagaacaaca ccaagctgag cccccgcgc 2280  
 ctgccgagct tcatcgacta cttcaacggc atctacggct tcgccaccgg catcaaggac 2340  
 atcatgaaca tgatcttcaa gaccgacacc ggccggcacc tgaccctgga cgagatcctg 2400

ES 2 546 255 T3

	aagaaccagc agctgctgaa cgacatcagc ggcaagctgg acggcgtgaa cggcagcctg	2460
	aacgacctga tcgcccaggg caacctgaac accgagctga gcaaggagat ccttaagatc	2520
	gccaacgagc agaaccaggt gctgaacgac gtgaacaaca agctggacgc catcaacacc	2580
	atgctgcgcg tgtacctgcc gaagatcacc agcatgctga gcgacgtgat taagcagaac	2640
	tacgccctga gcctgcagat cgagtacctg agcaagcagc tgcaggagat cagcgacaag	2700
	ctggacatca tcaacgtgaa cgtcctgac aacagcacc tgaccgagat caccctcgcc	2760
	taccagcgca tcaagtacgt gaacgagaag ttcgaagagc tgaccttcgc caccgagacc	2820
	agcagcaagg tgaagaagga cggcagccc gccgacatcc tggacgagct gaccgagctg	2880
	accgagctgg cgaagagcgt gaccaagaac gacgtggacg gcttcgagtt ctacctgaac	2940
	accttc	2946
5	<210> 39 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador CJB179 químicamente sintetizado	
10	<400> 39 atgcaaatag gctggaata gtc 23	
	<210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Cebador inverso CTRB3116 químicamente sintetizado	
	<400> 40 gtaccagctt gctgagtggc t 21	
20	<210> 41 <211> 209 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Amplicón CJB134/179 5' químicamente sintetizado	
25	<400> 41 atgcaaatag gctggaata gtctgtctaa tagtttgagt gaatcatgtc actgatagtt 60 taaactgaag gcgggaaacg acaatctgat catgagcggga gaattaagg agtcacgtta 120 tgacccccgc cgatgacgcg ggacaagccg ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac 180 gttgaaggag ccaactcagca agctggtac 209	
30	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

ES 2 546 255 T3

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

<400> 42  
 ggtgctgttc gagaagaggt 20

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

10 <220>  
 <223> Cebador PMI\_REV1 químicamente sintetizado

<400> 43  
 cgatttatca ctctcaatca cat 23

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

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

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

ES 2 546 255 T3

```

cccttcccac cgctccttcg ctttcccttc ctcgcccgcc gtaataaata gacaccccct 1260
ccacaccctc tttccccaac ctctgtttgt tcggagcgca cacacacaca accagatctc 1320
ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtacgc cgctcgtcct ccccccccc 1380
ccctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt tagggcccgg tagttctact 1440
tctgttcatg tttgtgtag atccgtgttt gtgtagatc cgtgctgcta gcgttcgtac 1500
acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg 1560
gggaatcctg ggaatggctc agccgttccg cagacgggat cgatttcatg atttttttt 1620
tttctgtgca tagggtttg tttgcccttt tcttttattt caatatatgc cgtgcacttg 1680
tttctcgggt catcttttca tgcctttttt tgccttggtt gtgatgatgt ggtctggtg 1740
ggcggtcggt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga tttattaatt 1800
ttgatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga 1860
aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcggggtt tactgatgca tatacagaga 1920
tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcggt cattcgttct 1980
agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat 2040
gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag ttttaagatgg atggaaatat cgatctagga 2100
taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc 2160
tattcatatg ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat 2220
tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt 2280
agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tggactgtt tcttttgctg atgctcacc 2340
tgtttgttg tgttacttct gcagggatcc ccgatcatgc aaaaactcat taactcagtg 2400
caaaactatg cctggggcag caaaacggcg ttgactgaac tttatggtat ggaaaatccg 2460
tccagccagc cgatggccga gctgtggatg ggcgcacatc cgaaaagcag ttcacgagtg 2520
cagaatgccg ccggagatat cgtttcactg cgtgatgtga ttgagagtga taaatcg 2577

```

5 <210> 45  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

10 <400> 45  
 tgaatcatgt cactgatgt 20

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

15 <220>  
 <223> Secuencia flanqueante 5'

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(236)  
 <223> Secuencia flanqueante 5'

ES 2 546 255 T3

<400> 46  
 tcctgtgttg ttggaacaga cttctgtctc ttctggtgat cataaatatt taaatgaacc 60  
 agttgtgttg gaaaatgttg ttttcttttg tctctagact ggaaagcggg gttctcgtca 120  
 acacggttct ttcaactagg gatgaaagtg gtaatccgaa ttgtagtac aaatttaata 180  
 ttttaaaata gatatgtata aaattttatg ttgatctttt ttatgttatac aagcacatta 240  
 gtataaatta gtataaatat gaataaaata ttacataaaa tgttttatgt attatttggt 300  
 ccctacaaca taaatagttg aaaaaattac taaatttggt ttcgaatcta tatcgaagtt 360  
 tataatctatt atttaagaaa aatataggat gaaaagggtt atcttttatg aatctttaca 420  
 agctggatct tataaacaag aaaataaatt tatattgtag attttatatc ctattttatc 480  
 gcaatcaaag aaaagcgact aaaaaactga ttaccgagta aatactgttt ccaaccgttt 540  
 tcgtccctac tatcaacgcc ttctcccaac cgcagtcgat ctgtccgtct gtatcaggcg 600  
 cagcggcacc cctgctgttc gactatctag accatagaat attttaggta tacaataatt 660  
 ttagtccac gctagaacat tttagttaga ataataacaa gatttgctat tgatgtagga 720  
 ctgcccgtc actgtctaaa aaagcattct gtcggtctta ttcttttaggc atcagcgggt 780  
 gtactatctc atttttccta tcatattcct cagtactctg ttaagtataa atggcttatt 840  
 ttacatgatg aactaataaa actaattaag gatcctaact ttttgtgaag gtaatttgga 900  
 tcattatgca ttaccatcct acgtatacct gctgcagcag catctgcgta agcacagcct 960  
 agatatatgc ttctgtgtgg actgaaagga gactttgttt atcaattagt atactcccaa 1020  
 aaaactgatg acaccaatga tgcaaatagg ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg 1080  
 aatcatgt 1088

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

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

10 <400> 47  
 aaacgtccgc catggtctga 20

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

15 <220>  
 <223> Secuencia flanqueante 3'

ES 2 546 255 T3

<400> 48  
 catggtcga aggcaacaga taaggcatac tgggcctgt gtagtgtt tactgggcc 60  
 tttttgatg atctataaaa ttcactggga tcaaccgga gaggaatggc agcagatgca 120  
 gtccccaggg tcctccgctg ccgcctgagc acccggcacc cgcgctgaac cggagagggg 180  
 cgcgcgagc ccgctgacgt ggtgctgagg gggctgtggc agatgaggat gagacgcgta 240  
 cgtggctggg aaggccagca ggccaccggg tcttcgtcca gcccggcgag agtggacagg 300  
 actagagatg gcaacgggta caaacccgct gggttttacc gtcccaaacc cgtaccctg 360  
 aaaaatatct atgccatta aaaaaccgt acccatgacg ggtttgagat tttgccaaa 420  
 cccgtacca tcgggtaac gggtagccat gggtagccg cgggtttcat ctccaatata 480  
 cctgttcttc tcataatcaa taagtatcgt aatgattaat gatatcatga tccaaaatct 540  
 atgtaatgaa caacgagttc atgatttggg ataaaaatta ttagtagaga gaatgaaata 600  
 caaataataa gttgtataat taagtacct tgcactaagt tatccatcca tcacatatat 660  
 aacgctagta aaaactataa tatcaagcaa gcaacactct caccgactac tgatacatc 720  
 accaattgat aaaaaatag aagtaataa ggaataacaa gtttgttgtt cgtttataaa 780  
 ataaaatgac aatatgact aggtttggc gggtttaaaa aaccacggg ttcacgggtt 840  
 tgggtactat aggaacaaac ccgtaccat aaaccattg ggtacagatt tatgccctt 900  
 aacaaacca tgggtatgaa aattgacca aacctatacc ctaatggggg aaaaaccat 960  
 cgggtttcgg atttcgggta ccattgcca tctctagaca ggacaacctc ggccggtcct 1020  
 gtatgtaggc caccagcatc ggccagttgg tacatccagc cggggtcagg tcacttttac 1080  
 tcgtctcaat cagacaatca ccgtccacca acgaacgcca acgttgtcac ttgtcaggtc 1140  
 ggttgagact tgtatttttt tttgtcctcc gtaaaaatcg gttcaccag 1189

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

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

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

15 <400> 49  
 tcctgtgttg ttggaacaga cttctgtctc ttctggtgat cataaatatt taaatgaacc 60  
 agttgtgttg gaaaatgttg tttcttttg tctctagact ggaaagcggg gttctctgca 120  
 acacggttct ttcaactagg gatgaaagtg gtaatccgaa ttgttagtac aaatttaata 180  
 ttttaaaata gatatgtata aaattttatg ttgatctttt ttatgttatt aagcacatta 240  
 gtataaatta gtataaatat gaataaaata ttacataaaa tgttttatgt attatttggg 300  
 ccctacaaca taaatagttg aaaaattac taaatttggg ttcgaatcta tatcgaagtt 360  
 tatatctatt atttaagaaa aatataggat gaaaaggttt atcttttatg aatctttaca 420

ES 2 546 255 T3

agctggatct tataaacaag aaaataaatt tatattgtag attttatatc ctatttattc 480  
 gcaatcaaag aaaagcgact aaaaaactga ttaccgagta aatactgttt ccaaccgttt 540  
 tcgtccctac tatcaacgcc ttctcccaac cgcagtcgat ctgtccgtct gtatcaggcg 600  
 cagcggcacc cctgtgtttc gactatctag accatagaat attttaggta tacaataatt 660  
 ttagttccac gctagaacat tttagttaga ataataacaa gatttgctat tgatgtagga 720  
 ctgccccgtc actgtctaaa aaagcattct gtcggtctta ttctttaggc atcagcgggt 780  
 gtactatctc atttttccta tcatattcct cagtactctg ttaagtataa atggctatt 840  
 ttacatgatg aactaataaa actaattaag gatcctaact ttttgtgaag gtaatttggg 900  
 tcattatgca ttaccatcct acgtatacct gctgcagcag catctgcgta agcacagcct 960  
 agatatatgc ttctgtgtgg actgaaagga gactttgttt atcaattagt atactcccaa 1020  
 aaaactgatg acaccaatga tgcaaatagg ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg 1080  
 aatcatgtca ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgatc atgagcggag 1140  
 aattaagggg gtcacgttat gacccccgcc gatgacgcgg gacaagccgt tttacgtttg 1200  
 gaactgacag aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gctggtacaa gcttgcattg 1260  
 ctgcagtgca gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcatgtcta 1320  
 agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 1380  
 tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 1440  
 tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagttagac atgggtctaaa ggacaattga 1500  
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tctttttagt gtgcatgtgt tctccttttt 1560  
 ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 1620  
 gtttaggggt aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 1680  
 agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaata aatttagata 1740  
 taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaaat accctttaag aaattaaaaa 1800  
 aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 1860  
 cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcaa gcgaagcaga 1920  
 cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 1980  
 acttgcctcc ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 2040  
 ggcaggcggc ctctctctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggatcc ctttcccacc 2100  
 gctccttcgc tttcccttcc tcgcccgcg taataaatag acacccccct cacaccctct 2160  
 ttcccaacc tcgtgttgtt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc ccaaatcca 2220  
 cccgtcggca cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtcctc ccccccccc cctctctacc 2280  
 ttctctagat cggcgttccg gtccatgggt agggcccggg agttctactt ctgttcatgt 2340  
 ttgtgttaga tccgtgtttg tgtagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac 2400  
 ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg 2460

ES 2 546 255 T3

gatggctcta gccgttccgc agacgggatc gatttcatga ttttttttgt ttcgttgcac 2520  
agggtttggg ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc 2580  
atcctttcat gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctggttgg gcggtcgttc 2640  
tagatcggag tagaattctg tttcaaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta 2700  
tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atacgatctt 2760  
aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttggt 2820  
cgcttggttg tgatgatgtg gtgtgggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 2880  
gaatactgtt tcaaactacc tgggtgattt attaattttg gaactgtatg tgtgtgtcat 2940  
acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatc gatctaggat aggtatacat 3000  
gttgatgtgg gttttactga tgcataatac tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 3060  
tctaaccctg agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct 3120  
tgatatactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 3180  
catacgetat ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgctcaccct gttgtttggt 3240  
gttacttctg caggtcgact ctagaggatc caccatgaac aagaacaaca ccaagctgag 3300  
caccgcgcc ctgccgagct tcatcgacta cttcaacggc atctacggct tcgccaccgg 3360  
catcaaggac atcatgaaca tgatcttcaa gaccgacacc ggcggcgacc tgaccctgga 3420  
cgagatcctg aagaaccagc agctgctgaa cgacatcagc ggcaagctgg acggcgtgaa 3480  
cggcagcctg aacgacctga tcgcccaggg caacctgaac accgagctga gcaaggagat 3540  
ccttaagatc gccaacgagc agaaccaggt gctgaacgac gtgaacaaca agctggacgc 3600  
catcaacacc atgctgcgcg tgtacctgcc gaagatcacc agcatgctga gcgacgtgat 3660  
gaagcagaac tacgcccctg gcctgcagat cgagtacctg agcaagcagc tgcaggagat 3720  
cagcgacaag ctggacatca tcaacgtgaa cgctctgatc aacagcacc tgaccgagat 3780  
caccctggcc taccagcga tcaagtacgt gaacgagaag ttcgaagagc tgaccttcgc 3840  
caccgagacc agcagcaagg tgaagaagga cggcagccc gccgacatcc tggacgagct 3900  
gaccgagctg accgagctgg cgaagagcgt gaccaagaac gacgtggacg gcttcgagtt 3960  
ctacctgaac acctccacg acgtgatggt gggcaacaac ctgttcggcc gcagcgcctt 4020  
gaagaccgcc agcagctga tcaccaagga gaacgtgaag accagcggca gcgaggtggg 4080  
caacgtgtac aacttctga tcgtgctgac cgccctgcag gccagggcct tctgaccctt 4140  
gaccacctgt cgcaagctgc tgggcctggc cgacatcgac tacaccagca tcatgaacga 4200  
gcacttgaac aaggagaagg aggagtccg cgtgaacatc ctgccgacc tgagcaacac 4260  
cttcagcaac ccgaactacg ccaaggtgaa gggcagcgac gaggacgcca agatgatcgt 4320  
ggaggctaag ccgggccacg cgttgatcgg cttcgagatc agcaacgaca gcatcaccgt 4380  
gctgaaggty tacgaggcca agctgaagca gaactaccag gtggacaagg acagcttgag 4440  
cgaggtgatc tacggcgaca tggacaagct gr\*gtgtccg gaccagagcg agcaaatcta 4500



ES 2 546 255 T3

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

ES 2 546 255 T3

cctctggacc cctctcgaga gttccgctcc accgttggac ttgctccgct gtcggcatcc 6600  
 agaaattgcg tggcggagcg gcagacgtga gccggcacgg caggcggcct cctcctcctc 6660  
 tcacggcacc ggcagctacg ggggattcct tccccaccgc tccttcgctt tcccttcctc 6720  
 gcccgccgta ataaatagac accccctcca caccctcttt ccccaacctc gtgttgttcg 6780  
 gagcgcacac acacacaacc agatctcccc caaatccacc cgtcggcacc tccgcttcaa 6840  
 ggtacgccgc tcgtcctccc ccccccccc tctctacctt ctctagatcg gcgttccggt 6900  
 ccattggttag ggccccgtag ttctacttct gttcatgttt gtgtagatc cgtgtttgtg 6960  
 ttagatccgt gctgctagcg ttcgtacacg gatgcgacct gtacgtcaga cacgttctga 7020  
 ttgctaactt gccagtgttt ctctttgggg aatcctggga tggctctagc cgttccgcag 7080  
 acgggatcga tttcatgatt ttttttgttt cgttgcatag ggtttggttt gcccttttcc 7140  
 tttatttcaa tatatgccgt gcacttgttt gtcgggtcat cttttcatgc tttttttgt 7200  
 cttggttggt atgatgtggt ctggttgggc ggtcgttcta gatcggagta gaattctggt 7260  
 tcaaactacc tgggtgattt attaattttg gatctgtatg tgtgtgccat acatattcat 7320  
 agttacgaat tgaagatgat ggatggaaat atcgatctag gataggtata catgttgatg 7380  
 cgggttttac tgatgcatat acagagatgc tttttgttcg cttggttggt atgatgtggt 7440  
 gtggttgggc ggtcgttcat tcgttctaga tcggagtaga atactgtttc aaactacctg 7500  
 gtgtatttat taattttgga actgtatgtg tgtgtcatac atcttcatag ttacgagttt 7560  
 aagatggatg gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgtgggt tttactgatg 7620  
 catatacatg atggcatatg cagcatctat tcatatgctc taacctgag tacctatcta 7680  
 ttataataaa caagtatggt ttataattat tttgatcttg atatacttgg atgatggcat 7740  
 atgcagcagc tatatgtgga tttttttagc cctgccttca tacgctattt atttgcttgg 7800  
 tactgtttct tttgtcgatg ctcaccctgt tgtttggtgt tacttctgca gggatccccg 7860  
 atcatgcaa aactcattaa ctcagtgcaa aactatgcct ggggcagcaa aacggcgttg 7920  
 actgaacttt atggtatgga aaatccgtcc agccagccga tggccgagct gtggatgggc 7980  
 gcacatccga aaagcagttc acgagtgcag aatgccgccg gagatatcgt ttcactgcgt 8040  
 gatgtgattg agagtgataa atcgactctg ctcggagagg ccgttgcaa acgctttggc 8100  
 gaactgcctt tcctgttcaa agtattatgc gcagcacagc cactctccat tcaggttcat 8160  
 ccaaacaac acaattctga aatcggtttt gccaaagaaa atgccgcagg tatcccgatg 8220  
 gatgccgccg agcgtacta taaagatcct aaccacaagc cggagctggt tttgcgctg 8280  
 acgcctttcc ttgcgatgaa cgcgtttcgt gaattttccg agattgtctc cctactccag 8340  
 ccggtcgcag gtgcacatcc ggcgattgct cactttttac aacagcctga tgccgaacgt 8400  
 ttaagcgaac tgttcgccag cctgttgaa atgcagggtg aagaaaaatc ccgcgcgctg 8460  
 gcgattttaa aatcggccct cgatagccag cagggtgaac cgtggcaaac gattcgttta 8520  
 atttctgaat tttaccgga agacagcgggt ctgttctccc cgctattgct gaatgtggtg 8580

ES 2 546 255 T3

aaattgaacc ctggcgaagc gatgttcctg ttcgctgaaa caccgcacgc ttacctgcaa 8640  
 ggcgtggcgc tggaaagtgat ggcaaaactcc gataacgtgc tgcgtgcggg tctgacgcct 8700  
 aaatacattg atattccgga actggttgcc aatgtgaaat tcgaagccaa accgggctaac 8760  
 cagttgttga cccagccggt gaaacaaggt gcagaactgg acttcccgat tccagtggat 8820  
 gattttgcct tctcgtgca tgaccttagt gataaagaaa ccaccattag ccagcagagt 8880  
 gccgccattt tgttctgctg cgaaggcgat gcaacgttgt ggaaaggttc tcagcagtta 8940  
 cagcttaaac cgggtgaatc agcgtttatt gccgccaacg aatcaccggt gactgtcaaa 9000  
 ggccacggcc gtttagcgcg tgtttacaac aagctgtaag agcttactga aaaaattaac 9060  
 atctcttgct aagctgggag ctcgatccgt cgacctgcag atcgttcaaa catttgcaa 9120  
 taaagtttct taagattgaa tctgttgcc ggtcttgca tgattatcat ataatttctg 9180  
 ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg 9240  
 gtttttatga ttgagatccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag 9300  
 cgcgcaaac aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tccccgggtc 9360  
 tagacaattc agtacattaa aaacgtccgc catggtctga aggcaacaga taaggcatac 9420  
 tgggccttgt ggtagttggt tttactggcc tttttgatg atctataaaa ttcactggga 9480  
 tcaaccgga gaggaatggc agcagatgca gtccccaggg tcctccgtcg ccgcctgagc 9540  
 accggcacc cgcgctgaac cggagagggg cgcgcggacg ccgtgcagct ggtgcggagg 9600  
 gggctgtggc agatgaggat gagacgcgta cgtggctggg aaggccagca ggccaccggg 9660  
 tcttcgtcca gcccggcgcg agtggacagg actagagatg gcaacgggta caaacccgct 9720  
 gggttttacc gtcccaaacc cgtaccctg aaaaatatct atgccatta aaaaaccgct 9780  
 acccatgacg ggtttgagat tttgccaaa cccgtacca tcgggttaac gggtaacct 9840  
 gggttaccg cgggtttcat ctccaatata cctgttcttc tcataatcaa taagtatcgt 9900  
 aatgattaat gatatcatga tccaaaatct atgtaatgaa caacgagttc atgatttgg 9960  
 ataaaaatta ttagtagaga gaatgaaata caaataataa gttgtataat taagtacct 10020  
 tgcactaagt tatccatcca tcacatatat aacgctagta aaaactataa tatcaagcaa 10080  
 gcaacactct caccgactac tgatacattc accaattgat aaaaaatag aagtaataa 10140  
 ggaataacaa gtttgttgtt cgtttataaa ataaaatgac aatatgact aggtttggc 10200  
 gggtttaaaa aaccacggg ttcacgggtt tgggtactat aggaacaaac ccgtacct 10260  
 aaaccattg ggtacagatt tatgcccgtt aacaaacca tgggtatgaa aattgacca 10320  
 aacctatacc ctaatggggt aaaaacctat cgggtttcgg atttcgggta cccattgcca 10380  
 tctctagaca ggacaacctc ggccggtcct gtatgtaggc caccagcatc ggccagttgg 10440  
 tacatccagc cggggtcagg tcacttttac tcgtctcaat cagacaatca ccgtccacca 10500  
 acgaacgcca acgttgcac ttgtcaggtc ggttgagact tgtattttt tttgtcctcc 10560  
 gtaaaaatcg gttcaccag 10579

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

5

<220>  
 <223> Cebador FE1002 químicamente sintetizado

## ES 2 546 255 T3

<400> 50  
cgtgactccc ttaattctcc gct 23

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

<220>  
<223> Cebador FE1003 químicamente sintetizado

10  
<400> 51  
gatcagattg tcggttcccg cctt 24

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

15  
<220>  
<223> Cebador FE1004 químicamente sintetizado

<400> 52  
gattgtcgtt tccgccttc agtt 24

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

<220>  
<223> Cebador 162\_DW\_Conf3 Químicamente sintetizado

25  
<400> 53  
cctgtgtgtg tggaacagac ttctgtc 27

30  
<210> 54  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador FE0900 químicamente sintetizado

<400> 54  
ggctccttca acgttgcggt tctgtc 26

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

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

ES 2 546 255 T3

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

5 <210> 56  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador 162\_GW\_3\_F1 químicamente sintetizado

10 <400> 56  
tctcttgcta agctgggagc tcgatccg 28

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

15 <220>  
<223> Cebador 162\_GW\_3\_F2 químicamente sintetizado

<400> 57  
aagattgaat cctgttgccg gtcttgcg 28

20 <210> 58  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

ES 2 546 255 T3

<220>  
 <223> Cebador 162\_3'GW\_R1 químicamente sintetizado

<400> 58  
 ctggtgaacc gattttacg gagg 24

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

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

<400> 59  
 tctcttgcta agctgggagc tcgatccgtc gacctgcaga tcgttcaaac atttggaat 60  
 aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat gattatcata taatttctgt 120  
 tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg 180  
 tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatcgc gatagaaaac aaaatatagc 240  
 gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcggtgtcatctat gttactagat ccccggtct 300  
 agacaattca gtacattaaa aacgtccgcc atggtctgaa ggcaacagat aaggcact 360  
 gggccttggtg gtagttggtt tactgggctt ttttgatga tctataaaat tctactgggat 420  
 caaccgggag aggaatggca gcagatgcag tccccagggt cctccgtcgc cgcctgagca 480  
 cccggcacc cgcgtgaacc ggagagggac gcgcgacgc cgtgcagctg gtgcggaggg 540  
 ggctgtggca gatgaggatg agacgcgtac gtggctggga aggccagcag gccaccgggt 600  
 cttcgtccag cccggcgcga gtggacagga ctagagatgg caacggttac aaaccgctg 660  
 ggttttaccg tcccaaacc gtaccctga aaaatatcta tgcccattaa aaaaccgta 720  
 cccatgacgg gttgagatt ttgcccacc cgtaccat cgggttaacg ggtaccatg 780  
 ggttaccgc ggtttcctc tccaatatac ctgttcttct cataatcaat aagtatcgta 840  
 atgattaatg atatcatgat ccaaaatcta tgtaatgaac aacgagttca tgatttggtg 900  
 taaaaattat tagtagagag aatgaaatac aaataataag ttgtataatt aagtgcctt 960  
 gcactaagtt atccatccat cacatatata acgctagtaa aaactataat atcaagcaag 1020  
 caaactctc accgactact gatacattca ccaattgata aaaaatata agtaataag 1080  
 gaataacaag tttgtgttc gtttataaaa taaaatgaca atatgacta ggtttggtc 1140  
 ggtttaaaaa acccaggggt tcacggggtt gggtactata ggaacaaacc cgtaccata 1200  
 aaccattgg gtacagatt atgcccgtta acaaacccat gggatgaaa attgaccaa 1260  
 acctataccc taatgggta aaaaccatc gggtttcgga tttcgggtac ccattgccat 1320  
 ctctagacag gacaacctc gccggtcctg tatgtaggcc accagcatc gccagttggt 1380  
 acatccagcc ggggtcaggt cacttttact cgtctcaatc agacaatcac cgtccacaa 1440  
 cgaacgcaa cgttgtcact tgtcaggctc gttgagactt gtattttttt ttgtcctccg 1500  
 taaaaatcgg ttcaccag 1518

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 <400> 60  
 ttcacgggag actttatctg        20  
  
 5        <210> 61  
          <211> 17  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 10       <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
          <400> 61  
          ccgattcatt aatgcag        17  
  
 15       <210> 62  
          <211> 17  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
 20       <400> 62  
          acgtaaacg gcttgtc        17  
  
          <210> 63  
          <211> 17  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 25       <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
          <400> 63  
          gtttaaactg aaggcgg        17  
  
 30       <210> 64  
          <211> 22  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
 35       <400> 64  
          aataatatca ctctgtacat cc    22  
  
          <210> 65  
          <211> 15  
          <212> ADN  
 40       <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
          <400> 65  
          gttgtaaac gacgg        15

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

5

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 66  
 taggcacccc aggttta            18

10

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

15

<400> 67  
 aattgaattt agcggccg            18

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

20

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 68  
 ggtccctaca acataaatag            20

25

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

30

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 69  
 ttcgtcccta ctatcaacgc            20

35

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

40

<400> 70  
 ctttaggcat cagcgggt            18

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



<220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 <400> 71  
 agcatctgcg taagcaca 18  
  
 5 <210> 72  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 <400> 72  
 ctgatgacac caatgatgc 19  
  
 15 <210> 73  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 20 <400> 73  
 gatcagattg tcgttccc 19  
  
 <210> 74  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 <400> 74  
 gcatcattgg tgatcatcag 19  
  
 30 <210> 75  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 35 <400> 75  
 tgtgcttacg cagatgct 18  
  
 <210> 76  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 <400> 76  
 acccgctgat gcctaaag 18

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

5

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 77  
 gcgttgatag tagggacgaa 20

10

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

15

<400> 78  
 ctatttatgt tgtagggacc 20

20

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 79  
 ctagactgga aagcggag 18

25

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

30

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 80  
 ccactttcat ccctagtg 19

35

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

40

<400> 81  
 gattgaaatcc tgtgccc 17

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado  
  
 <400> 82  
 ttcataaat aacgtcatgc        20  
  
 5        <210> 83  
          <211> 20  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 10       <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
          <400> 83  
          tctgtgata accgtattac        20  
  
 15       <210> 84  
          <211> 20  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
 20       <400> 84  
          agtaacatag atgacaccgc        20  
  
          <210> 85  
          <211> 18  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 25       <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
          <400> 85  
          ccagtgct ggaattcg        18  
  
 30       <210> 86  
          <211> 20  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
 35       <400> 86  
          ccagtgat ggatatctgc        20  
  
          <210> 87  
          <211> 18  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 40       <220>  
          <223> Químicamente sintetizado  
  
          <400> 87  
          ccagtgct ggaattcg        18

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

5

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 88  
 ccagtgtgat ggatatctgc 20

10

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

15

<400> 89  
 gtgtgctgga attgccctt 20

20

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 90  
 tatctgcaga attgccctt 20

25

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

30

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 91  
 gtgtgctgga attgccctt 20

35

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

40

<400> 92  
 tatctgcaga attgccctt 20

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

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 93  
 gtgtgctgga attgccctt      20

5      <210> 94  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10      <220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 94  
 tatctgcaga attgccctt      20

15      <210> 95  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

20      <400> 95  
 gtgtgctgga attgccctt      20

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

25      <220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 96  
 ggtcttgca tgattatc      18

30      <210> 97  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Químicamente sintetizado

35      <400> 97  
 gagaggaatg gcagcaga      18

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

40      <220>  
 <223> Químicamente sintetizado

<400> 98  
 catgacgggt ttgagatt      18

ES 2 546 255 T3

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

5 <220>  
<223> Químicamente sintetizado

<400> 99  
aatctcaaac ccgtcatg 18

10 <210> 100  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Químicamente sintetizado

15 <400> 100  
tctgctgcca ttcctctc 18

<210> 101  
<211> 19  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Químicamente sintetizado

<400> 101  
gatcaaccgc gagaggaat 19

25 <210> 102  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Cebador de secuenciamiento b05104h químicamente sintetizado

<400> 102  
ccatgacggg ttgagat 18

35 <210> 103  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

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

40 <400> 103  
caaccgacct gacaagtgac 20

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

ES 2 546 255 T3

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

<400> 104  
 atctcaaacc cgatcatg 18

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

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

<400> 105  
 attcctctcc ggggtgatc 19

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

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1680)..(3338)  
 <223> Marcador opie2

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

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43275)..(45086)  
 <223> marcador gag

<400> 106  
 agatctagag attcgtcatt tgtagaaagg atagaaaggt gattgctagg aagttagggg 60  
 caaaatgcaa ggggtataaa acttgcattt ggatccctaa ggaaattgtg actaaccttg 120  
 taggacccaa caagagttgg gtacctaatg cccaagccta aatttgcctt gcaggtttat 180  
 gcatccgggg gttcaagctg gattattgat agcggatgca caaacatat gacgggggag 240  
 aagaagatgt tcacctccta tgtcaagaat aaggattccc aagattcaat tatattcggg 300  
 gatgggaatc aaggcaaggt aaaaggggta ggtaaaattg caatttctaa tgagcactcc 360  
 atatctaagtg tgtttttagt agagtctctc agatataatt tgctatctgt tagtcaatta 420  
 tgcaacatgg ggtataactg tctatttacc aatgtagatg tgtctgtctt tagaagaagt 480  
 gatggttcac tagcttttaa ggggtgatta gacggcaaac tttatttagt tgattttgca 540  
 aaagaagagg ccggtctaga tgcattgctta atagctaaga ctagcatggg ctggctgtgg 600  
 catcgccgct tagcacatgt ggggatgaag aaccttcaca agcttctaaa gggagaacac 660  
 gtgataggtt tgactaatgt gcaattcgaa aaagatagac cttgtgcagc ttgtcaagca 720  
 gggaaacagg tgggaagcgc tcatcacacc aaaaatgtga tgacaacatc aagaccctg 780  
 gagctgctac atatggacct cttcggacct gtcgcctatc tgagcatagg aggaagtaag 840  
 30 tatggtctag ttatcgttga tgacttttcc cgcttcactt ggggtgtctt tttgcaggat 900

ES 2 546 255 T3

aaatctgaaa cccaagggac cctcaagcgc ttcctcagga gatctcaaaa tgagtttgag 960  
 ctcaaggtga agaagataag gagcgacaac ggggccgagt tcaagaacct tcaagtggag 1020  
 gagttccttg aggaggaagg gatcaagcac gagttctccg ctccctacac accacagcaa 1080  
 aatggtgtgg tagagaggaa gaacatgacg ctaatcgata tggcgagaac gatgcttgga 1140  
 gaattcaaga cccccgagtg tttctggtcg gaagccgtga acacggcttg ccacgccatc 1200  
 aacagggctt accttcaccg cctcctcaag aagacgtcgt atgagcttct aaccggtaac 1260  
 aaaccaatg tatcttactt tcgtgtatth gggagcaaat gctacattct agtgaagaag 1320  
 ggtagaaatt ctaagtttgc tcccaaagct gtagaagggt ttttgttagg ttatgactca 1380  
 aatacaaagg cgtatagagt cttcaacaaa tcatcgggtt tggttgaaat ctctagcgac 1440  
 gttgtatthg atgagactaa tggctctcca agagagcaag ttgttgattg tgatgatgta 1500  
 gatgaagaag atgttccaac ggctgtata cgaaccatgg cgattggaga agtgcggcca 1560  
 caggaacaag atgaacgaga tcaaccttct tctcaacaa cgggtgatcc cccaactcaa 1620  
 gacgatgaac aggttcatca acaggaggca tgtgatcaag gggagcacia gatgatcatg 1680  
 tgatggagga agaagcgcaa ccggcacctc caaccaagt tcgagcgatg attcaaagga 1740  
 atcatcccg tcatcaaatt ctgggtgata ttagcaaggg agtaactact cgatctcgat 1800  
 tagttaatth ttgtgagcat tactcctthg tctcttctat tgagcctthc agggtagaag 1860  
 aggccttgct agatccggac tgggtgthg ccatgcagga ggaactcaac aacttcaagc 1920  
 gcaatgaagt ttggacactg gtgcctcgtc ccaagcaaaa tgttgtggga accaagtggg 1980  
 tgttccgcaa caaacaggac gagcacgggg tggtgacgag gaacaaggct cgacttgtgg 2040  
 caaaaggtha tgcccaagtc gcaggthtg actthttagga gacgthtgc cctgtggcta 2100  
 ggctagagtc aattcgcac tthgctagcat atgccgctca ccaactthc aggttgtacc 2160  
 aatggatgt gaagagcgct ttcctcaacg ggccgatcaa ggaagaggtg tacgtggagc 2220  
 aacccccctg cttcgaggat gaacggtacc ccgaccacgt gtgtaagctc tctaaggcgc 2280  
 tctatggact taagcaagcc ccaagagcat ggtatgaatg ccttagagac thtttacttg 2340  
 ctaatgctth caaggthggg aaagccgatc caactctgtt cactaagaca tthgatggtg 2400  
 atthgtthg gtgcaaat thtgctgacg acataatth tggthctact aaccaaagth 2460  
 cthgtgaaga gthtagcagg gthaatggcg agaaatthga gatthcaatg atgggcgagth 2520  
 tgaactactt cthtgggttc caagthgaag aactcaagga tggcaccttc atthcccaaa 2580  
 cgaagtacac gcaagattha cthaaagcgt thgggatgaa ggacgccaag cccgcaagaa 2640  
 ctccgatggg gaccgacgga cacaccgacc tcaacaaaag aggthagtcc gthgatcaaa 2700  
 aagcataccg thcaatgata gthtctthac thtactthg thgctagtaga ccgatatta 2760  
 thcttagcgt atgcatgthg gctagatthc aatccgatcc thaggagthg cacttagthg 2820  
 cggthgaagc aattathaga ththtggthg ctacgcctth cthcgggctc thgtatccaa 2880  
 agggthctac cthtgacctg gthggatact cagatthcca ctatgthgga thtaaggthc 2940



ES 2 546 255 T3

ataggaagag tacatcgggg acgtgccaat tcttaggaag gtccctggtg tcgtggaact 3000  
 ctaagaaaca aacctccggt gccctatcca ccgctgaggc cgagtatggt gccgcaggac 3060  
 agtggttgcg cgaactactt tggatgaggc aaacctccg ggactttggc tacaatctga 3120  
 gcaaagtccc actcctatgt gacaatgaga gtgctatccg catggcggaa aatcctggtg 3180  
 aacacagccg cacaagcac atagacatcc ggcatacact tttgagagac caccagcaaa 3240  
 agggagatat cgaagtgttt catggttagca ccgagaacca gctagctgat atcgaagtgt 3300  
 ttcattgtag caccgagaac cttttgcagg ctgcgtagta agctaaatgt cttagattcg 3360  
 cggaacttgg attgaattgt agcatacatg tgtttatgcc tttgatcatg ttcattctgc 3420  
 attttgttgc ttattgtggt gctcaagttg tacaacact ccctggatct cacaagtccg 3480  
 ttgcaaagtg atgctgagag cacctagagg gggggtgaat aggtgatcct gtaaaaactt 3540  
 aacttatagc cacaaaaact tgtaaaggt tagcacaata attgccaagt ggctaaagag 3600  
 gagatcttgc acaatacgat tatcacagag aattcaacac agaggagaca tagtgattta 3660  
 tcccgtggtt cggccaagta caaaacttgc ctacttccac gttgtggcgt cccaacggac 3720  
 gagggttgca atcaaccctt ctcaagcggg ccaaagacc acttgaatac cacggtgttt 3780  
 ttgccttgc tctctttatc ccacttacga ggaatctcca cagattggag tctctcggcc 3840  
 ttacacttaa gattcacaaa gaagcacgga gtaaggagg gaagcaacac acacaaatcc 3900  
 acagcgaat gcgcacacac acggccaaga atcgagctca aagactatct cacagtttct 3960  
 cacaagaaca gagctcgaat cacttagaat cacaaacgga tgcgcaaaga ctgagtgtg 4020  
 atgatcaaga atgctcaaag gttgcttggg gtctccctcc atgctctag gggcccttt 4080  
 tatagcccca aggcagctag gagccgttga gaacaaatct ggaaggccat cttgccttc 4140  
 tgtcgtcggg cgcaccggac agtccggtgc ccgattcctt tccttaattg gcgaagccga 4200  
 ccggtgcaga tgcgggagcc gttggcgcac cggacatgtc cggtgcacac cggacagtcc 4260  
 ggtgccccct tccgaccgtt ggctcggcca cgtgtcccgc gcagatcgcg cggtcgaccg 4320  
 ttggctcagc cgaccgttgg ctcaccggac agtccggtgc acaccggaca gtccggtgca 4380  
 caccggacag tccggtgaat tttagccgta cgccgtcagc aaattcccga gagcggcctc 4440  
 ttcggccaag gcagcctggc gcaccggaca ctgtccggtg caccaccgga cagtccggtg 4500  
 ccccagaccg aaacagcctc ttggctgtac acagccaagt cttctcttct cttcttcttt 4560  
 ctgtttctaa cacttagaca aatatattag tacacaaaac caatgtacta aggccttagaa 4620  
 acataccttt gctctagatt ttcactttgt tcatccatgg gcattgattc acatttaagc 4680  
 acttgtgttg aactcaatc accaaaatac ttagaaatgg cccaagggca cattccctt 4740  
 tcagatgcac agtttgaggg ggagatgtgt tacaacttga ccctttgaga ctaaccgtat 4800  
 gcttgagttt gcttgtttta gtctcaaagg agaattaaaa gggaaaagggt ggacttgagc 4860  
 catgaaagac ttccactgca ctccgatgag agggtagctt attccaagtt catctcatgt 4920  
 actcttattg cctttgtatt cttattgaag attttgggtga ggcaatgggg ttcttgggcc 4980

ES 2 546 255 T3

aagattgatc ctgttttggg gcttgatgcc aaagggggag aaaataaggg ccaaagcaat 5040  
aatggatca gctaccactt gagaaatfff gaaaacagta gaatagagct tttggtttgt 5100  
caaatctctt ttgttgctc ttttgcaaa agttggcctc ttgtggggag aagtgttgat 5160  
tatgggaaaa agggggagtt tttgaaatct ttcctttgga atgactctcc ttatgcttca 5220  
acatgtgtgt ttgacttaga gatagagatt tgagtttgat ttgcaaaaac aaaccaagtg 5280  
gtggcaaaag atgatccata tatgccaaat tgaatcaaaa taaatttgag tttttatttg 5340  
aagtaatatt gcacttgctc tagttgcttt atgtagtggt ggcataaatc accaaaaagg 5400  
gggagattga aagggaaatg tgcccttggg ccatttctaa gtattttggg gattgagtg 5460  
caacacaagt gcttaaatgt gaattcatgt ttatggatga ataaagtga aatcaagagc 5520  
aaaggatgt ttctaagtct tagtacattg gttttgtgta ctaataact tgtctaagta 5580  
ttggaacag gaagaaaag aaaagaaaag agttggctgt gtacagccaa gaggctgttt 5640  
cggctctggg caccggactg tccgggtggg caccggacag tgcctgggtg tgcaccggac 5700  
agtgtccggg gcgccaggct gcctcggccg aagtagccgc tctcgggaat tcgctgacgg 5760  
cgtacgacta taattcaccg gactgtccgg tgtgcaccgg actgtccggg gtgcaccgga 5820  
ctgtccggg agccaacggg cgccggggcc aacggtcggc cgcgcgatct gcgctgaca 5880  
cgtggccgag ccaacggcta gaagggggca ccggactgtc cgggtgtcac cggacatgtc 5940  
cgggtgccca acggctctct ggccgggcaac gggcggctgc gccattttag gaaggaaatc 6000  
gggcaccgga cagtgtccgg tgtgcaccgg actgtccggg gcgcccgcg acagaaggca 6060  
aggatggcct tccagattg ttctcaacgg ctcttagctg tcttggggct ataaaagga 6120  
cccctaggcg catggaggag tacaccaagc attcctaca cttcctaag caccaagaca 6180  
tcgatctcac gcattcgttt cattgtgata gcatctagag ctcttgttga gttgcgaact 6240  
ctttgagttg tgttcgagc tcttgttgcg acttgtgtgc gtgttgttgc tctgatcttt 6300  
tgaagtcttg tgtcgcttg tcattcccc tttgctctgt gttctttgtg aacttcaatt 6360  
gtaagggcga gaggctccaa gttgtggaga ttctcgcga acgggattga gaaaaaagc 6420  
aagcaaaaca ccgtgttatt caagtgggtc tttggaccgc ttgagagggg ttgattgcaa 6480  
ccctcgtccg ttgggacgcc acaacatgga gtaggcaagc gttgtcttg gccgaaccac 6540  
gggataaacc actgtgtcgt ctctgtgatt gatctcttgt ggtattgtgt tttgttgaga 6600  
ctcctttcta gccacttggc atttattgtg ctaacactta acaagtttt gtggctataa 6660  
gtttaagttt tacaggatca cctattcacc cccccccct ctagggtgtc tcacctatgc 6720  
accgtagct aggcttgagt caattcgc atatttgcc tatgctactt accatggctt 6780  
taagctttat caaatggacg tgaaaagtgc ctctcctaac ggaccaatca aggaagaggt 6840  
ctatgttgag caacctccc gctttgaaga cagtgagtat cctaaccatg tttataggct 6900  
ctctaaggcg ctttatgggc tcaagcaagc cccaagagca tggatgaat gccttagaga 6960  
tttccttacc gctaattggc tcaaagtcgg caaggccgat cctactctat ccaactaaaac 7020

ES 2 546 255 T3

tcttgacaat gatttgtttg tatgccaaat ttatgttgat gatatcatat ttgggtctac 7080  
 taacgaatct acttgtgagg aatttagtag gatcatgaca cagaaattcg agatgtctat 7140  
 gatgggggag ttgaaatatt tcttaggatt tcaagtgaag caactccaag agggcacctt 7200  
 cattagccaa acgaagtaca ctcaagacat tctaaacaag tttggaatga aggatgccaa 7260  
 gccatcaaaa acacccatgg gaacaaatgg gcatctcggc ctcgacacgg gaggtaagtc 7320  
 cgtggatcaa aaggataacc ggtc gatgat tggttcattg ctttatttat gtgcatctcg 7380  
 accggacatt atgctttccg tatgcatgtg tgcaagattc caatccgacc ctaaggaatc 7440  
 ccaccttacg gccgtaaaac gaatcttgag atatttggct tatactccta agtttgggct 7500  
 ttggtaccct cggggatcca cttttgattt aattggttat tccgatgctg attgggcggg 7560  
 gtgtaagatt aataggaaga gcacatcggg gacttgccag ttcttgggaa gatccttggg 7620  
 gtcttgggct tcaaagaagc aaaattcggg tgctctttcc accgccgaag ccgagtacat 7680  
 tgccgcaggc cattgttgcg cgcaattgct ttggatgagg caaacctgc gggactatgg 7740  
 ttacaaatta accaaagtcc ctttgctatg tgataatgag agtgcaatca aaatggccga 7800  
 caatcccgtc gagcatagcc gactaagca catagccatt cggatcatt ttcttaggga 7860  
 tcaccaaaa aagggagata tcgagatttc ttatattaac actaaagatc aattagccga 7920  
 tatctttacc aagcctcttg atgaacaaac ttttacaaa cttaggcatg agtcaatat 7980  
 tcttgattcg cgcaattttt ttgctagat tgcacacgta gtcatttat ataccttga 8040  
 tcatatctct tcatatgct atgactaatg tgtttttcaa gtccatttca caccaagtca 8100  
 taggtatatt gaaaggaat tggagtttcc ggccaagaca aaggctcca ctccgtaact 8160  
 catccttgc catcgtcca agaaaaggac cttgtcttgg ggggagagag taaaagcca 8220  
 aagcaaaagg actggacttc gtctttggta taatctaac tcatttactt atgaccaaag 8280  
 gggagatag tacttctatg ggctctaattg attccgtttt tggcgattca tgccaaaggg 8340  
 ggagaaagta tgagccaaa gcaaaaggac cgcaccacca ccaatttcaa aaacttagtg 8400  
 ctttctaaga gtatttatca attggtatcc tattgtgttc aaaaggagga gaaaattagt 8460  
 tttttcaaaa atgtatatca aaacctctt gaacactaag aggtggatct ctttagggg 8520  
 gaatttttg ttaagtcaa ggaaaagcat ttgaaacagg gggagaaaat ttcaaatctt 8580  
 gaaaatgctt tgcaaacctt tattcattta ctttgacta tttgcaaaag atcttttgaa 8640  
 atggatttac aaaaagaatt tgcaaaaaca aaacatgtgg tgcaaacgtg gtccaaaatg 8700  
 ttaaataaga aagaacaat ccatgcatat cttgtaagta gttatattgg ctcaattcca 8760  
 agcaaccttt acacttacat tatgcaaact agttcaatta tgcacttcta tatttgcttt 8820  
 ggtttgtggt ggcatcaatc accaaaaagg gggagattga aagggaatta ggcttacacc 8880  
 tagttcctaa ataattttgg tggttgaatt gaccaacaca aataattgga ctaactagtt 8940  
 tgcccaagtg tatagattat acagggtgtaa aaggttcaca ctcagccaat aaaaagacca 9000  
 agttttggat tcaacaaagg agcaaagggg caaccgaagg cacccctggt ctggcgcacc 9060

ES 2 546 255 T3

ggactgtccg gtgtgccacc ggacatgtcc ggtgcaccag ggggactcag actcaaactc 9120  
 gccaccttcg ggaatttcca gaggcgactc ggctataatt caccggactg tccggtgtac 9180  
 accggacatg tccggtgctc caaggaaggt cggcctcagg aactcgccag cctcgggttt 9240  
 tctccctcgc cgctccgcta taattcaccg gactgtccgg tgtgcaccgg actgtccggt 9300  
 gcaacctcgg agcaacggct acttcgcgcc aacggctacc tgcaacggca ttaaatgcmc 9360  
 gcgcagcacg cgcaggagtc agaatcgccc atgctggcac accggacagc aacagatca 9420  
 tgtccggtgt gcaccggaca cccaggtggg cccacaagtc agaagctcca acggtcagaa 9480  
 tccaacggca gtgatgacgt ggcagggggc accggactgt ccggtgtgca ccggactgtc 9540  
 cgggtgcgcca tcgaacagac agcctcccaa cggccacttt tgggtggttg ggctataaat 9600  
 accccaacca cccaccatt cattgcatcc aagtttcca cttctcaacc acttacaaga 9660  
 gctaggcatt caattctaga cacacccaaa gtgatcaaat cctctccaat tcaacacaaa 9720  
 gccctagtga ctagtgagag tgatttgccg tgttcatttg agctcttgcg cttggattgc 9780  
 tttctctctt tcattctttc ttgtgttcaa tactcacttg taaccaaggc aagagacacc 9840  
 aattgtgtgg tggccttgc ggggaggttt ttctcccggg tgatttgaga agagaaagct 9900  
 cactcggtcg gagggaccgt ttgagagagg gaaagggttg aaaaagaccg gccctttgtg 9960  
 gcctcctcaa cggggagtag gtttgagaga accgaacctc ggtaaaacaa atcctcgtgt 10020  
 ctacttcat tatttgcttg cgatttgttt tcacgcctc tctcggactc gattatattt 10080  
 ctaacgctaa cccggcttgt agttgtgttt atatttgha atttcagttt cgcctattc 10140  
 accccccccc ctctaggcga ctatcaccag gcggtagtcc gcgagccaca gttccggtct 10200  
 cgtttcccc gaatacttcg tgatagtagt cgggggtcgg aaccgggtcg ggaacgacgc 10260  
 ccgtcggatg gcccgactga aggcttgccg accgggtggg tcgggcgagg gactccgatc 10320  
 cctccccact gtcgtagcgc cccccacgc ctgggggtgg agcctcggcg caccctttcg 10380  
 tcgaggtggg cccgacggtc gcgtcgatgg tgctcgttgc cgaggtggcc cggggccgca 10440  
 ggcgcggtgt tgcgcgtgcg tccggtatag accgaggctt cccgcataaa ttgggaagtc 10500  
 gcggcgtgag gttccgaggg gtatccccgc ctccgggagg cagtgtctc ggcccgtcgg 10560  
 gccgcagcgc cttccaggag attcttgagc tctccctgga ttcgccgacc ctcggtggtt 10620  
 gatggctccg gcatcgtgcg gaggagcatc gctgcggctg ccaggttctg accaaccctg 10680  
 ctggatgagg gcggcgccct gagcctgaca tcgttggcga cgcggtgctg gagaccttg 10740  
 ggcaggtgac gtatttctcc ggccgagggg tggccccccc atacctgccc gacgtcccgg 10800  
 cggatcgtct caagcgcctc tgttccctcg tcgagcctgg cctgcgcccc gcggacttgc 10860  
 tcgagctgtg ggtcgtgacc ccccgccgga acggggacca cagctagctc ccgcgggatg 10920  
 tcggcgcgag ggcaccggcc taggaaaatc accgtcctcc ggcatgcaa gatggttgcc 10980  
 ttcggagggg tccccagct cgacgtggaa acattcgcgg cttgggcccgc agtcctcgtc 11040  
 gtcaaggctg cggcttccgt cggaacagtc ggagaggcag tagtcacatg cggtcatgaa 11100

ES 2 546 255 T3

gtccccatg gcaactgggt tgccaagtcc agagaaaccc caacagatgc tgggatcgtc 11160  
 atcttcctcg gacccagagg gcccgtaggt cgagacgtcc gtcaatcggg cccaaggcga 11220  
 ccgcatacga aaccccagtg gggttgcaact cgctcaatg agagcgcccg ccaaagcgag 11280  
 gtcgcttggc gggtcgaggc cgagtcgaaa tgacgtaaga tgggagttag ttagtacctt 11340  
 ttggtcgacg cggagcgacg tagtcacatc ggggactggt tgcaccgtca tctcaggtac 11400  
 gagggcgacg tcctgcaggc tttccgcgag cgtgctggcg tcttcttctt gctcgggatc 11460  
 agcgtgtcgc ggggggacgg cgcttgctt cgctcgaac gcgaggtcga cgcccgcggt 11520  
 gccctccgtg ggggcgctgg ggacgtcgat tcgctcgaca gccgacgaag cgcgccctcc 11580  
 cacttggcct tggttgcctt gcctcctcct ccggtggcgg gggagaggac ggggcgagct 11640  
 cgaatgtgtt tttccaccg cgcggggaag atgtcgtcgg ttccgccgcc gacgggcggg 11700  
 atgtcggccg ccattgtcgt tgtcgcgcgg cgggtggaagg agtatcatgt cgtagctgcc 11760  
 gtcgaaggac atgaactcaa gactcccga acggagcacc gtcccgggcc ggagaggttg 11820  
 ctggagactg cccatctgga gcttgacggg aagctgttcg tcagcacgca gcagggcctt 11880  
 acctggcgca ccaactgtcg gcgtttcgag accggggggt ccccgagccg acgagtgagt 11940  
 gtgcccgctg cccagccca gatgggtcga gcgcgtgggc gagcgcgaag gggggagagg 12000  
 cgaggtgtcc ggagacgggc gtgagagagg tggagatccc gcggccttcg tgttcgtccc 12060  
 gcgccagggt cgggtgcgct tgacagtagg gggttacaag cgtccacgcg ggtgagggaa 12120  
 gcgagcggcc ccaagagagc gcctgtctcg tcctcgtccc cgcgcgcca accttctcta 12180  
 agaaggcctt ggtccttctt tttataggcg taaggagagg atccaggtgt acaatggggg 12240  
 tgtagcagag tgctactgtt ctacggagg gagagctagc gccctaagta catgccaatg 12300  
 tggcagccgg agagatcttg gcaccctact ggcgtgatgt cgtggctgtc ggaggagcaa 12360  
 cggagcctgg cggagggaca gctgtcggag cggtcgagtc cttgctgacg tccccttgct 12420  
 tccgtaagag agctgagagc cgccgtcgtc acagagcttg tggggcgcca tcattgcca 12480  
 tctggtggag ctaccagag gggacaccgg tcttgttctt cgtgaccga gtcggctcgg 12540  
 ggtaggatga tgatggcgtt tcccgttgac gtggcgggcc tgtgccctag gtcgggcgac 12600  
 gtgggggctc ctccgaagcc gaggtcgaat ctgtcttccg tggccgaggc cgagcccag 12660  
 cccctgggtc gggcgaggcg gaggtcgttc ggtagaggcc agggcgaggt ccgagccctg 12720  
 gggtcggggc aagcggagtt tgtcgtcttc cgggtctcag cccgagtcg agctttgggg 12780  
 tcgggtggag cggagttcgt cgtcttccgg gtcttagccc gagtccgagc cctggggctg 12840  
 ggcggagcgg agttcgcctt cttccgggtc ttagcccag tccgagccct ggggtcgggc 12900  
 ggagcggagt tcgtcgtctt ccgaggctga gcccgagtcc gagccctggg tcgggcggag 12960  
 cggagcttcc tatggcgcct ttggcaaggc ctgactgcct gtcagactca ctttgcgag 13020  
 tggcactgca gtcggagtg gcgagggcg gctgtccttc tgtcagaccg gtcagtggtg 13080  
 cggcggagtg acggcggta cttcggctct gccggggggc gcgcgtcagg ataaatgtgt 13140

ES 2 546 255 T3

caggccacct ttgcgttaaa tgctcctgca actcggtcag tcggtgcggc gatttagtca 13200  
 gggttgcttc ttagcgaagc caaggcctcg ggcgagccgg agatgcgtcc gccgttaaaa 13260  
 ggggggcctc gggcgagaca gaagtccctc gaggtcggct gcccttggcc gaggctaggc 13320  
 tcgggcgaag cgtgatcgag tcaactcgat ggactgatcc ctgacttaat cgcacccatc 13380  
 aggcctctgc agctttatgc tgatgggggt taccagctga gaattaggcg tcttgagggt 13440  
 acccctaatt atggtccccg acaactataa accccaaagg gttgttttag aagtctagggt 13500  
 agcttttttg tctattagag agagagtata ttagaaattht attttagtgt gtgatttctc 13560  
 gcaattgaga tatgttttta aagtagataa taataataaa ataaacatct atgatggagt 13620  
 tttgttgctc atttggattht tgaatctcaa cttcaaaaact gtattagaat ttgaaacttg 13680  
 aaaataaaaa ctgaaataaa aagataagga aaaaacaaaa ccaactgtcgg gccactatct 13740  
 cccctagtcc tagccatgcc ccctcttcca tcagtcgagt gggtcagttg gccggcccaa 13800  
 caccgacca gcatgatagc atctcgcacc cgcctggttg gtttcacagg cgaccatgcy 13860  
 ggaccacgt tcagcctctc cgcgctcgtg cctatggacg gtagtcggca gacaccaatc 13920  
 aatggggctc gcgcgaccgc gcttcagtht ctcgctcgtc tacgcatggg tcaactgttag 13980  
 caccacggaa cacagaagac agcaaggaa agaggaaggc caacttggag cagaagaaga 14040  
 agaatagggt acgcaacgtg gcggatgtht tttgttattt cgttcataat ctcagcagcc 14100  
 tagcacatag tctatatatg tcaactcctga actggactgc cacaatacgg cttacacgggt 14160  
 ccactgcggc ccaaccacat ttaagtttg cttcctggtht ctcagcacgc gaggctgcat 14220  
 catctcctga tgtgttgccg ctgtctccag gtcttgattht ccacttgcgt ccagcttctt 14280  
 cttgtcttcc gacgacgctt tgctgacatt cccctgtcct cgagcgcag cttggtccca 14340  
 gatcaacgct tttgaaacc gagcacgcag tgcctcaacg tcctcccagg tagccagatc 14400  
 ctcagtcatg cctgaccaga ccaccttgac ctgcygcgatt aactcaccac cacggtcaat 14460  
 gaagcggcat tgtagaatac atgtaggcac ctggataggg ccaacatctt ggggcagctg 14520  
 aggtgaggcc cgttgatcac gcccgatgac ccgthtgagc tgtgacacat gaaaaattgg 14580  
 gtgaatagag ctggaggccg gtaaagctag acggttaagc acggaacca gacgatcgt 14640  
 atctgaaaag gaccaaagaa tttgaaggac aacttgtgat tggagcgtgt agcaaccgaa 14700  
 gattggatat aaggttghta cttcaagtha acccaatcac ccaccaaaaa cacgcttca 14760  
 ctgcyctgct tgtcagcttg ccgtttcata cggthcttgag ctcgatgcag atgcaattta 14820  
 atgactthtg tcataagctc tcgttcttcc aaccaagtht cgagctctgg ctgtggcacc 14880  
 acaatatcaa ccaaaattcc aaaatatcgc ggagtgthgc catataacac ttcaaagggt 14940  
 gtacgcccc aaggtgaaatg tactgtggha ttgtaccagt attcagcaac tgacagccaa 15000  
 gctgaccaac gtgaaggaca agtgtgcaca tagcaacgaa gaaaagtht caagcattga 15060  
 ttcaagcgt ctgtthgtcc atcggatthg ggatgghaag aagaggacat ggacagatthg 15120  
 gtaccctgta tctgaaatag thgttgccag aatgagctag taaaaattct gtcgcatct 15180

ES 2 546 255 T3

gaaatgatgt tgacaggtaa cccgtgtagc ttgtacacat tgtcaagaaa aacacgagcc 15240  
 acttttagcag ctgtgaaggg atggagtaaa ggtaagaagt gtccataactt cgaaaattta 15300  
 tccacaacca ccaagatgca gttatagtga gctgaacggg gcaaaccctc aataaaatcc 15360  
 aatgaaactg tatgccacgc ttgtggtgga acttccaaag gctgcaatag gccaggatat 15420  
 ttagcacgat cyggcttgga ttgctggcat accgtacaag attgaacgta ctgtagcaca 15480  
 tcagcacaca tacctggcca atagaacatt tgtttcactt tgtgatatgt tgctggggct 15540  
 ccagaatgac ctccgaccgc cgtatcatgc atagcttcta atacctctg ttgcagctgc 15600  
 aaattgccgc ccaccagat tctatTTTTTg tgctgaatga ttccttgatg caaggaaaaa 15660  
 ggagctttgt ctgcagaatt caaaattaat tgagccagca actgtttact agtaggatcc 15720  
 ttgtcatagc ctccactcc ctccctgcagc caagtaggca cactgtgaga aatagcacia 15780  
 cagtgactat ctccctggac ttttcgagac agtgcatctg cagctccatt atccaccct 15840  
 tttctgtaga caatcttata ttgcaagcca gccaatctcg tatacatttt ctgttgccag 15900  
 atagtatgta aacgctgctc attcagttgt gctaaactcc tgtgatctgt atagataatg 15960  
 aactcagcca actgaagata ggacctccat tgagcaatgg ctaaaataat ggccatgtat 16020  
 tccttttcat aggtcgagag tccttgatTTT ttcggtccaa gagccttgct cagaaacgct 16080  
 aaaggatgtc cactttgcat aagcaccgca cccacaccat aataggaagc ataagtatga 16140  
 atataaaatg gctgggaaaa tcaggcagag ctaacactgg tgcaagtacc aatgcttggt 16200  
 tcaaaacttc aaaagcttta aaatgatcca ctgtccacac aaataaagtg tgtttcttca 16260  
 agagatcaaa taaaggtcta ctgataattc caaagtgctt gacaaaattt ctgtaaaaaac 16320  
 cggctagacc caggaaacat cgcagttcct tagcattggt tggactgcc caagaggata 16380  
 tggcttgaat ttactagga tctgtggata ccccttgctc actgatgata tggcccaagt 16440  
 aagcaatatt tgtttgagca aattcacact tagataattt gactttccaa ttatcagaca 16500  
 acaataattg caaaaccttc tgcagatgca gtgatgctc ttcaaatgac ttactgtaaa 16560  
 ccaagatgtc atcaaaaaaa ccagagcaca ttttctcaat actggtttca gggtttcatt 16620  
 cgttgcactt aagaatgtgt taggagcacc tgtcaagtca aaagccatca ctctaaactc 16680  
 atagtggccc acatgagttt gaaatgctgt tttatattct tcgccagatt tcaaaagaat 16740  
 ttggtgatat ccagctctga gatccagttt actaaacat ttagagtggg cgagctcatc 16800  
 aatcaattgg tcaaacacag gaactgggta tttgctcttg agagtgaggg cattcaata 16860  
 cctatagtcc acacaaaatc gccatgtcat gtctttttc ttgaccaaca ccatagggga 16920  
 agcaaaagaa ctattgcttt tctgaataac accttgatga aacatctctt gaacttgttt 16980  
 ttcaatttca tccttcaggg ctggaggata cctgtaaggt ctgacagaca ctggctgagc 17040  
 acctccacc aaaggaatag catggtcaca atccctgctt gggggcaaac cctgaggttc 17100  
 gtcaaaagact gagctgaact gttgtagcaa tgcttgaatt gcaggatggc tgtcaggaga 17160  
 agagcctacg gaactgacag attccatgaa caacaactct atcatagtat cagcaggtag 17220

ES 2 546 255 T3

ccctgggggTg ttgccctgca gcagcacaga agagccttga tatggataa ttagccactt 17280  
 ttgagcccaa tccactctca tgggactaaa ggatttaagc caatccatgc ctaccacat 17340  
 gtcgtagtag ggaaggggca ggaatgaaac gtccgaagta aaactgcagt tctgaatctg 17400  
 ccattgtgcc tgcaacaatt tgtaatgaca agtcaccata gccccattgg ccacttgca 17460  
 ttgcagagta gatgccatag atgtcacccc ttgcaagtgt ggtctaagtt gatcattcaa 17520  
 aaaggtgtgt gagctgccac tatctatcag aataagtaag ggatgattct gaatgctccc 17580  
 atttaatttc agagtttgtc gaccagtcga ccccgccat gcagatttg aaatagtcac 17640  
 gaacaactgt tctagagcag gttcaggtgg agataagtca gattcgggta cttcttcac 17700  
 caccaataat gaccaaact cctccatagc atgaagttga gcagtggcaa cacatttgtg 17760  
 accgggattc cacttttctg cacacttgtc acaaagacc tttgctcgac gaaaacgtcg 17820  
 caacgattcc agcttatcag aatgagatgc agattgagtt gaatccttgt ttgaagtcca 17880  
 tttagtgtgaa gcagacaact gcacaccagt cttggggcca gcatgacttg aatattggtc 17940  
 agaacggcgc caacgtctcg ccgttgtggc ctctctctgc accaacgca gagaacaggc 18000  
 agtgtccaaa ttcgacgggc gttgcacat aataacagct ttaatcat cacgcaaacc 18060  
 atctatgaac cgcattgtgt aatacaatgg gtcagcattt gcttcatatg cagacaagtg 18120  
 atcaacaagt attgaaaatt gttctacata ctgagctacg ataccggact gatgtatgtg 18180  
 gaaaagtga cgaattaagg atctatgctg ctctctacca aatctatcat gaagctggcg 18240  
 acaaaattca gaccagaca acatacgcac cctctgacca acagactgta accatgatgc 18300  
 agcacgcca ataaaatgca tagtagctac acgaatccac atatatggtt ccacgtcata 18360  
 catatcaaag taattttcac aaagcgtctt ccacaactga ggattgtccc cgtcaaagtg 18420  
 agggaaatta accctcggtg ggttaccgtg cccacagcga aaccctcgt gaccgccatt 18480  
 cagttcagtg tgacgaacag aatcatcaaa tggatcaata cgaggtgaat cgtggtacgt 18540  
 acccttgacc gggacatggg tttgagcatg accatgcca aaccacgcg cccggtgaca 18600  
 tggttcagcg tggtgccaa atggcccgtc agcgggttgt ttcccggcag atggatgctc 18660  
 ggacgccaac ccggaaggag tgaagagacc tggcttggtc tgatcagcgg cgtcgtctc 18720  
 acgctccatg aacttgggtg cacgcttgtc ctgaggaag aggttctcca gacgctctc 18780  
 cacttctggg cgccaagtat ccacctcgga atgccccatc ttgagtgaga tgaagcgtgc 18840  
 ctccgcttgt tgcgccatcg cgtcgatccg ttgctcaatc gcgccgcagc gattctccag 18900  
 cgtcgcagcc atgcgtctt ccactctgca caaggcctct agaaccttct gcatcgcgga 18960  
 atccataccg gcgaccgcag tggatcgagg gcgccgaccg ggtatgggat ccagattctc 19020  
 taggatgaac tagtctgata ccacctgtta gcaccacgga acacagaaga cagtaaggga 19080  
 aggaggaagg gcaacttggg gcagaagaag aagaataggg tacgcaacgt ggcggctgtt 19140  
 cttgttatt tcgttcatat cctcagcagc ctgacacata gtctatata gtcactctg 19200  
 aactggactg ccacaatagc gcttacacgg cccactgcgg cccaaccaca ttaagtgtt 19260



ES 2 546 255 T3

gcttcctggc cctcagcacg cgagggttgc tcgtctctg atgtgttgct gctatctcca 19320  
ggtcttgatt cccacttgct gccagcttct tcttgtcttc cgacgacgct ctgctgacag 19380  
tcaccgcccg acagacttgt gggcccgcct cgccagaacc ttcgtctccc tcccgtaacg 19440  
aactagggca caacacaaac ttgtacttgt gtagccgggg tgtgtttact ggccgaccgc 19500  
acccgccttg gactcgtcca ctgcccctat ataaacggtc gcccccgcc ctcgatcaat 19560  
cagagttag gagccccgc tacctgttgt cgtgtggcgc cgtcgcaatg agctcgacgc 19620  
cgcacgccat cgtaattcag ccacacctac gcttttgctc tgctttcggg aggaggtttg 19680  
agggtttcgc cgtcgtacgt gggagctgct ggatgtttcg ttaggtgagg gaatctactg 19740  
gaggcaggca ctgctgccc aggatcaccg ttgcatcca agccaccgtt cgacgtccc 19800  
gactctccc ctcaatttag ttaccgacga ggacccttg actgtttcgt ttgcttctca 19860  
ctcgtacctt ggacagagta gcgctttaga tcggttttgg ggactcggga ttgctcggc 19920  
gtgttcagag attaccacag agtcacgctg tgctgagcgc gaggctcgac gctgcatgat 19980  
cattgatcag acctgttccg tgttgtcttc attgaccaca gcttcgcata ccaccatttg 20040  
gattggagaa atagagcgca aggtcgtcgg ttcgctgtg ctacgagct gtcagggcgg 20100  
agctctattt ctgccacat gacgcgttgg tagagaaagg agcggcatca gttgatcagg 20160  
attaaatccc gcgtaccctt tcagcacatt aaatcaaagc cgtcagatct aatctagacg 20220  
tttgtgattc gataatagcg tgtcggttta gtatttaaat ctggaccgtt gatctctaga 20280  
tgatgcctt aggtcgtgta ccagttagt tagttgggtg aactttatta aagagccct 20340  
ataaaattha ggaattaacc tgcaatcacg tgatatttag aaagtcatgt agctaggtca 20400  
tgttctaac atattagacc cgatggattt tagaatcggg agtacacatt aaaggtatga 20460  
ttctatactt agtacattag tttttgtgta ctaacacatt tgtctaagtg ctagaatgag 20520  
aaaaagaca aaaggaaaa gagttggctg tgtacagcca actgctgttc agtctgggtg 20580  
caccggactg tccggtgagc ctacagtcgg ccgcgcaatc tgcgctgac gcgtggccgg 20640  
gccaacggtc tgatgggggc accggagtgt ccggtgtgca ccagacagtg tccggtgccc 20700  
caacggctcc aaatcttcaa cggtcggctg cgccaaaata ggaaagcaat cagcaccggg 20760  
cagtgtccgg tgggtcaccg gactgtccgg tgcaccacc gacagaaggc aaggataacc 20820  
ttcctggatt gctctcaatg gctcctagct gccttggggc tataaaaggg acccctaggc 20880  
gcatagagga gtacaccaag catactataa gcattcttga tcattcacac tccgtctctg 20940  
ctcactcgat tgactttctt agtgatttga gctccgttct tgtggcgaat cttgtgctat 21000  
tcatttgagc tcaagtcttg gctgtgtgtg cgtattgctg tggatttgtg tgtgttgcct 21060  
ccctccccta ctctagtgtt ttcactttga tccttattgt aagagcgaga gactccaagt 21120  
tgtggagtaa atgaaactga accctaaacc ctaaaccctc taaaaatgac taaaatgcaa 21180  
aatagacggc gcatacataa ctaggagtaa aatgtccgaa aaaaaatcgg ctcgagtctc 21240  
gagactcgag tgcctctctt gcctataaat cgaaccctaa cccttttctg tacctgtttg 21300

ES 2 546 255 T3

tgtccttagg gtttagggtt ctctgctcat tcgttcgcca cctcgcccca agacgtctcg 21360  
 ctagggtttc gccacagccg ccgccatgcc tcgccgcaag cttaggtaac cttctcctct 21420  
 ggcgcctcct aggggttttgt ttcgagattc ggttgttcct tgcgttgacg ggccggggct 21480  
 ggctcctcct ggatctgggg ctcaggcgcg taggcttggg cgttagtaga tttgattcag 21540  
 tcggtatgat gtcgtaaatc gtttgtttta gtatgtgcaa atgatactgg gtttggggg 21600  
 ataggattgc gcatgtttgc catgtttagt tgcagaaata tccggatctg tttcttgcgt 21660  
 tcaatgggct gggctccttc ctgttttagat aattgtaaga aatggacggg tgttcataat 21720  
 cgacagagat ccgattgctt ctcgaataac cgattgcaga tactatctgt tcgcaggcgg 21780  
 ttcagacagg ggcatagaac aaatctgaat cccacgagg gaaggtttat ttccattaat 21840  
 ctttctcgt taggattcgt atagatttac atatatacta caggttgtct tatgaggtgt 21900  
 ttggtatatt ctgaaagtt aattcaccag ggtagtggac tgaatcttat gaatgttga 21960  
 tgtgtgtagc tgtattgtat tgtccgttta taatgcctct ttgagtagcc attacagtcc 22020  
 ctgagtactg tcttggttta gttagggggc gcaaagcaact ggacatctga tgtccactca 22080  
 ggccttttga ggggtacct cacctgtctt accaagaagt gcccccaag cagccttaga 22140  
 catacatcta cataatctct gtttgtaagt gcctctttga gtagcatta cagtccctgg 22200  
 gtactgtctt ggtttagtta gggggcacia agcaatgggc atctgatgtc cactcacctt 22260  
 ttgaggggca cttatctgt cttacaaaga agtgcccctc aagcagccct agacatatat 22320  
 ctacattatc actgtttgat ctgtcctcaa tgccacgtct tttcacttag tttttggcac 22380  
 tcatatttgc tttattgagt tgccactgta gttgtatata caatcttggg ttagttagga 22440  
 ggcacatgtg atcttgaaaa aaactgacat tgtagtgtta tcatctttcc tgttgaatgg 22500  
 tagacatgta atgcaaaaca ttcaaaagat tgcttgtgta cttgattagt atcaaggttt 22560  
 cagggagcga tgacatttct taatatatth ggaggactca acttagttac taactggact 22620  
 acaagtaaca aataatgtgc ctcttgtcct tattcatccc ttcttagatt gattcctaca 22680  
 gttactgtct attttcatca tttttgctgg tggaagatgt ggttgagctt gctttacagt 22740  
 attttggtt tgttagcttg tgttgcactc ctctctctac atttattatg tgttgatttt 22800  
 tgagttaaaa ctttgtttat gataaacat gttgctttct ttggttaatt tttttgctt 22860  
 aatgcttatt cccccactgt actgtcagga aggtccgcgg ctcacgcccg gctccacatg 22920  
 ctgctccagt gaggaaccca ccacagcctg gtaaagtgat tcacgcagac aataagtatc 22980  
 tttagaactg acattggcat ggtaatcatg cctcttttga ctctgcagta ttctattgtg 23040  
 gacatgtgtt tcaattatgt aacttttagt atatttttgt ataactgttt gctcagttgt 23100  
 tgagaatgtg ttcggtttgt tactataaca atgttgatga cataaatata ctgttaagtt 23160  
 tatattggaa tttgtggtag aagtctgaag ttgttgattg tgtttgaagc agagtcaatg 23220  
 gcatttcggg ttatatagag aattacagtt ccttgttttt tggtagaact ggaacctgtt 23280  
 tcagttctgt tcctaagtct tacacatggg tttgtgctac aagtatagta ttagtattac 23340

ES 2 546 255 T3

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

ES 2 546 255 T3

tccccaaaaa ctgatgacac caatgatgca aataggctgg gaatagtctg tctaataggt 25440  
 tgagtgaatc atgtcactgt gcgtcctctg caggcagttg ttgacatgag cgcacatgca 25500  
 ctgctgaatc gccatggtct gaaggcaaca gataaggcat actgggcctt gtggtagttg 25560  
 ttttactggg cctttttgta tgatctataa aattcactgg gatcaaccg gagaggaatg 25620  
 gcagcagatg cagtccccag ggtcctccgt cgccgcctga gcaccggca cccgcgctga 25680  
 accggagagg gacgcgcgga cgccgtgcag ctggtgcgga gggggctgtg gcagatgagg 25740  
 atgagacgcg tacgtggctg ggaaggccag caggccaccg ggtcttcgtc cagcccggcg 25800  
 cgagtggaca ggactagaga tggcaacggt taaaaaccg ctgggtttta ccgtcccaa 25860  
 cccgtaccg tgaaaaatat ctatgccat taaaaacc gtaccatga cgggtttgag 25920  
 attttgcca aaccgtacc catcgggtta acgggtacc atgggttacc cgcgggttc 25980  
 atctccaata tacctgttct tctcataatc aataagatc gtaatgatta atgatatcat 26040  
 gatccaaaat ctatgtaatg aacaacgagt tcatgattg gtataaaaat tattagtaga 26100  
 gagaatgaaa tacaataat aagttgtata attaagtac cttgcactaa gttatccatc 26160  
 catcacatat ataacgctag taaaaactat aatatcaagc aagcaacact ctcaccgact 26220  
 actgatacat tcaccaattg ataaaaata tgaagtaat aaggaataac aagtttgttg 26280  
 ttcgtttata aaataaaatg acaatatgca ctaggtttg tcgggttta aaaaccacg 26340  
 ggttcacggg tttgggtact ataggaacaa acccgtacc ataaaccat tgggtacaga 26400  
 tttatgccg ttaacaaacc catgggtatg aaaattgacc caaacctata ccctaattggg 26460  
 gtaaaaacc atcgggttc ggatttcggg taccattgc catctctaga caggacaacc 26520  
 tcggccggtc ctgtatgtag gccaccagca tcggccagtt ggtacatcca gccggggtca 26580  
 ggtcactttt actcgtctca atcagacaat caccgtccac caacgaacgc caacgttgc 26640  
 acttgcagg tcggttgaga cttgtatfff tttttgcct ccgtaaaaat cagttccaac 26700  
 gacagatacc ccgacggtaa gcggacagcg ctgtcgtagt cgttttgtt gagtccacaa 26760  
 atgagccgaa gatgcaagca gcatatgcaa cgtgtgttac aaagaaaaga agtggatgca 26820  
 aaggcactac gagaatgaac tggtgccag gaaagatgga accaaaccaa cgaactattt 26880  
 tttccctcct ttttttatt aatgcttcgg acgacgatag cagtttctgt acaactcttg 26940  
 atatataaaa acaaaacaat atgacggatt aacctaggca tccaatgcc cccaatttc 27000  
 ctctgctat agcggcacac cttgctgctg cgacgactgg agccttcct tgaggaagcc 27060  
 cctgcacacc ttgctccaca gtccttgtc cggctgccgc acgtcgaagc tcgtcttggc 27120  
 cacttcacc tggcagtcct gccacaaca acaaaaaca ggacagatat tttttttgt 27180  
 cctccgtaaa aatcagctcc aacgacagat accccgacgg taagcggaca gcgctgtcgt 27240  
 agtcgtttag tttgagtcca caaatgagcc gaagatgaaa gcagcatatg caagggtgtg 27300  
 taaaaagaaa agaagtggat gcaaaggcac tacgagaatg aactgggtcc acggaaagat 27360  
 ggaaccaaac caacgaacaa ttttttcct cttttttt tattaatgct tcggacgaag 27420

ES 2 546 255 T3

atagcagttt ctgtacaact cttgagttct gaagcacata taataaaaa caacaatat 27480  
 gacggattaa cctaggcatc caatgcccc caatttcctc ctgctatagc gccacacctt 27540  
 gctgctgcga cgactggagc cttcccttga ggaagcccct gcacaccttg ctccacagct 27600  
 ccttgctccg ctgccgcacg tcgaagctcg tcttgccac ttccacctgg cagtccctgcc 27660  
 aacaacaaac aaaacaagga cagatatttt ttttccatgt cacagacaga cagacagaca 27720  
 gacagacaga gagacaaacg aacactcggc acgctgtcgt tactattatg attaattacc 27780  
 agtatgtggt tgtggcggag gaggcggctg gcgatgctca tgaggacgtc cttgctgtac 27840  
 tccgggtggc cctggacgcc catggcgcgg ccgccgaggc ggaacatctc gacgcgggtc 27900  
 ttgtcggacc gcgccagcgc ctcggcgcgg gggggcagct cccacacctc gtccctggtg 27960  
 aactcgatca ccggcatgtg cacgggcagc ttcagcggcg cgaacagccg cggcccgcc 28020  
 gccgtcgggt ggatgcagct caccctgatg tcccagccct tggccgaccg ccccgctgcg 28080  
 ccgccagcg ccggcacag gatctgcgtg ccgcaatcaa acagcttcag gagttaagac 28140  
 ggaagtgtag tagccacagg agtttagagg tacgtgtcgc taacgtggac gcgtgcaagt 28200  
 ctgcctggca tcggcgcctc accaccgaca gggccgatgg acgcaactaa aacgttttct 28260  
 tcgggaacac gccaaagtaat tgattcatgt gcacacagac tgtccccctt ctgtttgtag 28320  
 tacgatattg ggaacctcct aggattccac tgctaaacaa ttggtgtctc ctgttctctc 28380  
 gtacgagtac gacgacggaa gacttcgcgg ccacaagagc aatccaaatc caaggctctg 28440  
 gctctcggac cacagggaca gcgacagtgt aagagctctt tgaagttgcg agtgttatta 28500  
 acatagaacc aagtaataat taggagaaga ggtcagtagc tcctcacgcg tcgaggcacg 28560  
 tctctgacaa aagcgtggtt cgcgcggggc attgcgtcgc cttgggcttg ggcgctacct 28620  
 gcacgccctt gggcgtgatc tgatcccctg agctgctggg ttggtacgct agtagcatcg 28680  
 tcatcccaaa agcaatctcg ctcggcaggc gagatgcgtc acgccatttg cgttcttcgt 28740  
 cctcctctc cttcccggg gatttgattt taaaatttgc aggcgcggtt tacgcgccac 28800  
 tttgaggcaa acaaacgggc gaaccggaat aggggaaccg ctcgctcctc taagccaggg 28860  
 caggggcgca gggctctgtg actgtgagcc aaacgtccgg ccacagacgc agcgggcccgt 28920  
 aggagatcct gcagaacaga taccactcct acttgtctgt gtgccaacaa caacagcaac 28980  
 ccagctgcca cggccacgtc acaccacgct aatcagcgat gtcagcctcg agccttaacc 29040  
 ctttgtttga gagatgctgc cgtgtcttaa acctagatta gcgtggagtt thtagtcaact 29100  
 aatccatcca atcagtcccg tgtccgtctg tttgcttcga cccgaatcaa accagggggc 29160  
 tctgcttcta tgaactgaac tggcatggac tgaacaaaa cagcgtcatg gcagaagcaa 29220  
 gagctctata ttgtgcgctc taaatggaga ttggtaaaac tcgtagaatt gggggttcgt 29280  
 ttcttccgtc aaactctaac tgtgggcttg atgctagcac tgagtcacct ttgtcattct 29340  
 ctggggaaaa aaaataaggc atctttccgt cccattgct actgctcacc aattaagcag 29400  
 ccagtaccgt ttgtactagt caaaatgcat caagaacgac cacgggtcgc cgtaaaaaaa 29460

ES 2 546 255 T3

aagaaagaaa ataatagaaa agaaaaggtg cgccgggtgg acgggaaggc gctaggctag 29520  
aagagcggca gccccaccag gtggtgcccc cagcgtcccg cgggtcccgtg attcaccagc 29580  
gacgacggag aaaccagct acgcgcggaa gggactagac gagaaccaac cgcaccgcac 29640  
ctaaaccaa ccaaacagca agtcgaacca aacatggacg gatgggatgg gcacctggtg 29700  
gccgaagcag acgccgagga cgcgcttgcc ggcggcgtgg acgcggcggg tgaggtcgac 29760  
gagcgcgagg atccagggtc cgctcgcctg cgcgtcggcg cagctcccgg agatgacgaa 29820  
cccgtcgaac ccggtgcct cggcgtcggc ggggagctcc ccgcggacgg cgtgtacac 29880  
ccgccacctc tcgccgtcct cctccagcag cgcgcggaag acggcgaagt agccgccgta 29940  
cttctgccgc acgtactccg agtcctcgcg gcactgcagc accgcgtacg agcccggccg 30000  
cgagggggcg gcggcggcgg cggcggcggc ctccagcgcg gccgacgcgg cgtgtcggag 30060  
cggccccatt cccatggctg gcggcgtcgc ggccaggcag gcgcgtctcc ggcccgggaa 30120  
tggaggcggg ggttgggctg cgcttggtt ggctgactcg cttgcggggg gtgagaggtg 30180  
gcggggagga tggggggaga acggcgaggc gaggcgaggg cgatatata agtaagcagc 30240  
agcggttttc cctcggattt tttttatttt ttcgtcgtg gttttccatt ttgctattat 30300  
agtactgttt ctgtttttt ttactggtac tggggctggc cgctaccggc ctaccgctaa 30360  
catttggtat ggacgtatgg catggcaacg gccagcaggc gcgggacggg ggctaccggc 30420  
gagcggcggg tttgctcggg tccccttcac tgctcgggtc tttggccggg tcctagtaat 30480  
gggtacccaa aatcgggtat ccgatagata aaaatcctat tagagcatgg atgtagcga 30540  
ttttaatatc tatggatatt ttattaggtc atttatataa tttcactcgc tcatgcatac 30600  
aatatactta acaagcaaag aagacaaacg tggaccctt aatctcacct ttaaacaata 30660  
tattgataaa agagtTTTTT tttctagacc gatcttgtca aatactgtat ctacctgcct 30720  
gataaaagat tcaaacagga agagcaaaag cgtatatcaa attaattgac acgggagtc 30780  
atctctgtgc tcagagtaag cgagccctac aattgcaaaa aaaagggggg gggggggggg 30840  
atgcatatgt aatatctgat gtcatttata tatagtgcaa cgattctctt tcgtaccaag 30900  
ttgcaagtcc tcatatcgaa tcgtaagtta ttctgttttc ctgtgtacat atgaacatat 30960  
ctatctttta atacaacag cattttttat agttttttct aagtacatat gaacatatat 31020  
ctatcttcta atacaacaa catatttttt gtatagtttt tgttatgac atatgttttc 31080  
ccatgctacc gtttgtatta aaacacggaa actaaactac actaatttat tttattcata 31140  
tttctttctt taaaaaatg ttttttatcg ttccatctc tctatttcaa accgtaagct 31200  
gttctggctt ttttttcta aatgcgtatt ttagttatat ttctagatat aattagagtg 31260  
tacataaaca cataaaaacc cacttactaa aatcacaaca acttacagca atttaaaacc 31320  
gtgagattgc cgagcagggc gagaaccgac tgtagacat gctcacatgc atgtctgggg 31380  
cattgtttga ttttatttgc ccgagaaatt gctctgtttt cattcgtaga atttgacta 31440  
gtattttctt accgaggctg gctgggcata cgtgcacgcg cgcgatcgtg cagcgacatg 31500

ES 2 546 255 T3

cacatgcaat gcaatcaccg cgtgacggag taccgaggcg aggtcgtcga ccacgtgccg 31560  
tatgggccgc tggcacgtga caccaccgat tcggatcctt atttattcat tcatttgtca 31620  
gtccccacgc attgtattta aaaattcaga aacgtaagcc cacttttacg caaaaacaac 31680  
tttactgtcc gaaacgcctt gtgcaactag ctaggctagg aggctaactc attagtaaaa 31740  
tgttgtgttt tccacccttc ctttgtacta attttataga ctattagccc ggacgagctg 31800  
gctaggccag acagggaaat tatattttac tttgacgcct catctggatc attggaattg 31860  
aattccattc taacaatatt aatttaggta tatatcaatt aagctaattc ggttttatgc 31920  
aaaatatatt tatatactat tattagcaag atgtcggaga tatttatgtg ctacattttt 31980  
actataaagg agtgaaacga agagtgtcat gtaaattaca gactagaaac gaattctact 32040  
aatgcataaa atcatttcac acactccacc ccatgaattt gagatagcct tatatctgaa 32100  
ctttggaaag tgggtggaat tcaaattcca aactaaataa gttattttat tgagtgaatt 32160  
ccaattcctc taaaatgaag ggatccaaat gccccgtgac tgggaatttg agacgaagcg 32220  
cgcgcagaat attcgggtca aatagaatca gctacatact atgtgcatta gggctcacat 32280  
aaataatcca tatcttgagg agtatcaaga gagtaagtgt aaaaaaata caagagacat 32340  
atcttgatga agagatgtat ctagctcagt tctctaagtc tagatacagt ttcgtccata 32400  
caaccacat aatgagtta tatcatgaga gattctagtg aataagatat atgattatat 32460  
acaaaaatag tttcttatat gttttttgt attttgaaaa ccgaactgga gtcttaaggt 32520  
tgcacatgcc ctggatgtat ctagtgttg taaaacctgt ttgtaaaacc gcaacaaagt 32580  
ttctacattg tacatgccct tagggatgtt accaattttg gtagtgaaac gcaataatga 32640  
attaagcaat aattcaagcg gatcagaatt aatgagacg tgggtgtag actgtagaga 32700  
gtactctacg atatgtagtg ggatacttg agcagtaatt attactaac atgagggtga 32760  
gtaaacattg acgggataac gctgcacatt aaatactagt atcagtaaac gatgcaatat 32820  
gcacgatcat ggtccgagag aatattcgga tcaacacatc tatctcctgc gtttatatat 32880  
tattaaaact gaacgttacc gttttttgtt agtagtgata aagatcgatt aaggtaactc 32940  
cagcaacggt ggatgtgtat aacactgttt tgtattgtag atgtactctt tttatataag 33000  
gagaagtta aatagaaat tacgataacg taaagtgggt tttaccggc taaattgaa 33060  
cgttttccct ttccttcctt ggtcctgtac ttgcagtatt gcactgtcgc ctgctcggtc 33120  
atcgatcga acgacgacgt cgctcgcgc ggcactatgg gcactagtac ttggtggca 33180  
gtggcacacg ttcgtagtgt gtgtcacttt ggtgtctgga gcctgctgga gcaagacagc 33240  
aagtcaggct gaggccggct actcagctgg gcgagtgggt gttgctgca gctttggcgg 33300  
atatcagggg atgcatatat ggcaacggct ccaaaaacgc gctgctgca ctgcatgcc 33360  
ctgcagcatt gcaatggctg gccggccggt gcgctgtgct tggaaagaaag atgctgtccg 33420  
gtcggcgaac cagcctcgat cagccatgcy gttgtgatgc atgcgcatgc ttaacagctc 33480  
ggaccctaac acgggctggg tgaagctgaa gaggacctaa tttttgtag tttgtttga 33540

ES 2 546 255 T3

ctgaattatt ggtagttaag ctagattagt cctacttttg ggccggggct ggctttctgg 33600  
 cctagctcaa cacataattg ttttttttc tccatacggg cggcgtacat gcgttcaaat 33660  
 tttaaacctt gaccttttac ttttattcac gtacgggtga ctgaacccgc cgtagtccgg 33720  
 tagaaaaaag tttaaaaatg agagacacga cctcatgtta accgtcaccg gtgcatcatc 33780  
 gatggacgta cgttgacagc atcacaacga ctacaaaaat atcaataat gcatgttaat 33840  
 ctgattctta gtatagcctt tcggtgtcgg caaattgcaa tgccgtgtgc cactatgttc 33900  
 atttcaaaa aaactgacca attgacgccg gactaatgct ggatcaacaa cgaccgcaca 33960  
 agtcgtgata gtaacggtct agctagtttt cacttttcag agattaattt agagacagct 34020  
 agctagctca ttagttagtt agcaaattag ctagtatttt gttagttagc taatttctact 34080  
 aatatttttt agccaactaa ctatatatat cttcagtgca ttcaaacagt ccctatataa 34140  
 tctagattaa tttagttgta gctatttggc atcctagatt aatggaactc agattttcat 34200  
 cattagacaa cactgtccac ggtcgtattt cttcattatt tatgatactg tagcagtttg 34260  
 taggtacata aaaacgttga acatgttcaa acacattaaa aataaatatt tcatacacat 34320  
 tttgtgcccc taccatacta catttgaaat taaattacat tcttctcgca aataatacat 34380  
 tgacaatttt atctagaaaa gtattcgcgg ttccctctc atctccaat ccggtatcgt 34440  
 gatgacttga tggattttaa tcgttgtcgt cttcatcaca tcaatcaaat agttcttccc 34500  
 gtatatgtta ctacctcaa tgaaaaaatt attccttcaa cattggataa cttggtaagt 34560  
 ccaataaaat tatgaatttc atcttcgaga cagcgaaga ttgctcaata tgataagtgc 34620  
 aattggttga atacatctca tcatcacatg tcagtcaatt aattagtcga tcaacgatga 34680  
 aaattaagcc ctgaggttca ccgtgctaca aaacgacatg attgtgtgta cagttttcgt 34740  
 actatttaag ttttacctc ttcttatatg aaacataaatt cctcaacgat tgtttgcttc 34800  
 ggattaaagc ggactattta gattggtgta ggtgtaattc ataaaaacaa aagtactata 34860  
 gaaccagtag aaaccggtat agattaaagt caagggaaag actgaaagtc cacaaagcta 34920  
 ctggattcca tgagcttctg tagataacaa gcccgacatg gcgacgtcca catgggccgg 34980  
 gtctgaaaat tcccttccca gcaataaag agaaactagc aaattgttca tatatgctac 35040  
 ggttctattt atacttatgt atagaatata aaatataaag atatgagtgt attgttagtt 35100  
 atgtggatat gaatgtgagt ttagagctaa taatcatagt tcgaatctct atttgtatat 35160  
 aattttagca tttttataat ttaaatgtga ggtatacgat gaaaatcata aaactaggaa 35220  
 aattagtggt ttaatatagt acagatatta ttctctgaac caaagacaca caccagaata 35280  
 caactcacat atgcattgca cgtgtgaagc tccgacacac agggcgcaac aactcagctg 35340  
 ctttctttac gtgatcagat tgctagagta cttcaciaag ggacgccgag agagtatcgt 35400  
 tcaccaacct ggcagtgcca gttgccgat tgtactagtg tacaaaagcc cagctgaacg 35460  
 gtgatcagtg gccctccaat gccattctgt gtaggcgatc acagatctat caacaccacc 35520  
 aaaccaagc cagcacactg caaacacca aaaggattga agcaagctgc caaatggcac 35580



ES 2 546 255 T3

gcggttcagg aacaccgacc ctgcctgatt cagagtcaga aatgcaatta tagacgagtc 35640  
 tatgggcatt gtcactgaca gaatgacagg gcaaagatac cacagtttca cgcgaaaaca 35700  
 tggccgtggc acgttggccg ctcgaggcaa caacttctat attggcatag ccagaatgat 35760  
 aatattgttg tacaactcag ttagagatcg agtcgcacga tcatgctcgc actctctgat 35820  
 tagggacgta acaatctggt ggtaataag ttctcctttc ataccacata ataaatagtc 35880  
 aaagaaccga tacgcaacc aacattcata ccgagattcg atctaataatc taccggccat 35940  
 ctttctgact ccccgaaaca tagccggagt ggccatgggc atttctccgc ccttgatcag 36000  
 catggcatct cctccaatt ctggaggtag aaatctatgt tctatgattt ctaatggcta 36060  
 ggattacgag tcgaggctct aaaatctaata agtggatca aagccatggt tttaggctcg 36120  
 ggctctaact ataaatgaca gtttctcta agttttatga caaaatccga gaaaaacacc 36180  
 tcttaactct ttgtattcgt gttcctactc acgtagaaca agcaaaaggg gagaaagaaa 36240  
 ctctaacca acatttccac ctttccaaa ctctaactc aaggcagtcc ataactctgag 36300  
 cacccaagca cacaaagaaa gggaaagcag acgttaggaa agcagccatg tgctatatat 36360  
 tcgaagacct agcctacaca cacatctgtg aaactgtatt aaattgttaa atatttttag 36420  
 tttgttaaat atttttaaata tacgttaact cgtcttttct agttattact tatagcttca 36480  
 aatctagttt catttacgat aaagttaact aatcattatc cttctcttga ttactatttt 36540  
 catttggtat gaatcatgat cggttgtttt tctctaaatg tttgggtgag taatcttttag 36600  
 gcttgacaaa cgaggatggt gaattcattt tttacgcatc tcatattatt taaagtgcag 36660  
 cacttgatac cgagcacaaa ctcgatggca tgtaagtgat tttagggtgt gattgacaca 36720  
 caaaataggc tattgggagt gacaaacaac tcctcaagtc taaggactaa ataagaatat 36780  
 ttagaaaatt agtatatttg gatattctcat ttaaaaacc attgaagctt gatttttgggt 36840  
 taataacatc ctacattatt tttaggccct gttttgggaa cttagagatgt tctaagggtc 36900  
 accactcaat tggataccta attagttggt gactaatcct gattagttgg atgacagaaa 36960  
 atagaatgga actaggtaac taagggggtg ttggattaca cttagagataa tagtttagctg 37020  
 ctaaatttag ctgaagacat ccaaacactt tagctaatag ttaaactatt agctattttt 37080  
 agcaaattag ctaatactcc ctccgatttt tttatttgac gtttgtagt gaaaatctga 37140  
 actattgagt gtcaataaaa taaaatgga ggtagtagtt aggtagacat ttgttaggta 37200  
 gctaattaca ctaacaatgt ttagccaact aactattagt tctagtgcag taaaacatcc 37260  
 tctgaggtag tgacctgcat gtggtatgac ttaagtcact tggcctcatt agcctaattt 37320  
 gcaactctac atgcagccat cgtcctagag ttaattggtc actagttagt tgctaactgg 37380  
 tcatagttag ttgtccgtgt gtgctagggt ttctttatac catatagata ggctttatcg 37440  
 aaaaaagata tttattttaa cacgatctaa actcatagat tctcatatcg cacaattata 37500  
 tttttttatt tttaaattat ttgtatatat atttacaata tcaattctta ggacaaaatg 37560  
 aacatgtggt aactgtgta gagactcttt gttttgtctc tcaactgagt agcaggattt 37620

ES 2 546 255 T3

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

ES 2 546 255 T3

accagtgcac catgcttacc atgagaccca ctgaacggat atgcataact acatttgctt 39720  
 caaacaaaa cagcatgcat agattgaatt atgccttgca ttctactccg tccgttcttt 39780  
 tttatttgtc acggtttatt agtttagttc aaaaatgaac tagcgggcca caaatattcg 39840  
 agaatggata tagtattatt taaggatgac agcaatcatc tctctgcaca atggtgccct 39900  
 tgatgggtac tgcatatcct cacctgaatc ccatcaagga ctagaatcct ctttgacaa 39960  
 ctgaacaacc catcaagagc atcccacctc catggctcct gaggtcgcgg aatgggttag 40020  
 gcatgtgcat gacagcaatc gcctcggtag aatcagccga ttgcatcccg gacaccttct 40080  
 tcatcaccgc gtcgctgcaa tacacgacat taaaggactc gcgcagcacc tccgggacct 40140  
 aggataagca agtaatcgat gacaaggggt agaagcacag gtttaggaag agaagaaacc 40200  
 tcgcaggaca tgtaaatatg acaagggcct ggagttgcag aggagtacag gatgggcacg 40260  
 aggccgacaa aatttgacca tcacatttgg tatgtttggt taactttcgc atcatatagg 40320  
 ataggagtat aggactagga tccatttcaa attatcgtgc atttcataat ggtttctgaa 40380  
 gctttggcca ccaagtattc ctatttctcg gctggaattt caggtttgcg ctgagaggga 40440  
 gtgtttcgtc ttcgactctt cgttcagaca gaccccgccg ggactggagc caagccgctg 40500  
 ctacctgccg cagctgccca ctgtcaggtc cgctcggcac atagcgacac agcgagcgca 40560  
 aacatttcgt tcgactggt ttagcaaccg aaacgctcct ctatctaac tcttatatca 40620  
 tcccctattt catacttacc tctacaaaca gtgttatata tagttccacg tcatatattt 40680  
 tccactctac tagaaacatg tttgattcgc ccctgactgt gccacaattt acaatttacc 40740  
 taagggttagt aaaaaaagt tagataaagt atgataagat ggcgaactaa atatacccta 40800  
 gcgacacaac agcttgaac aacttcaacc agccctagtt agccactcgt agcttcatgg 40860  
 taaagatttt ggataatttt ttacaagttt acacacttca tcacgacaaa gattgtgaat 40920  
 gctggatggt tttggatttt gacaccttta cacacttcat aacgtgtgcc atctattaga 40980  
 ggagaaacga gaactgcacg cagcaacgca ccaggctaata aagtgacaac cgaacaagga 41040  
 aaggcgggaa gggggcaacc tggaaaatag agagcagagc agaactttat tctcctctc 41100  
 aggaagtgtc cttgtcactc taaacgctaa cagccgaagg aaagaaggct gagagtgaga 41160  
 tttggagcca caaaaagata accggcatac tcagaactac atgggtccaa atttgagatg 41220  
 gtattcaaat tttagatggc aaggctctctt aggcacagct cattcgtctc ccattgcaag 41280  
 ttctagcgcg taatcatctc tttcctgaaa aacaaggagt ccattttatc tcagtgaagt 41340  
 gtctaataac ctataatcac actttgcaga tcagaaagta ttgttactca ccaactggccc 41400  
 tcgtgcaaag tatctcccga attggagcca atatacctgc aaattgacaa acaacatgct 41460  
 ttgaagagcg aatttctac tacatataga gctagatatt aattaatttc aaaagggtgtt 41520  
 ttagactacg tgcttgccctc atcttcatct tgagtctcga cttcaacatc gccagatggg 41580  
 aaaccaacac acaacaagc atagccctga aaaggaaacc atacaataga actctaaaat 41640  
 ccttaagtac catacttgat aggcaacatc ggacaatgct cctttccact ttagctatga 41700

ES 2 546 255 T3

atttggattt atccgaattt atagctaagt gtctactatt ttaggacgaa gatagtactt 41760  
 tataattggt agctaatttg tattgatgaa catttctatg ttgcttggcc aagaataact 41820  
 gatcaataaa aaaatctatt gtcatatctg taacacaaaa aatacaaaaat aaattgtggg 41880  
 tcacattgca atcataatcc ttcttataaa gtcgacataa tagttatgca tcaaactcta 41940  
 gcaattgccc aggaacattc aggaaattgt acaactagg taactgacta aactggagga 42000  
 caggttaaga gtgaaataca acctctcatt tccagacat gtacacaggg aacaataata 42060  
 tgtcatgggc acaatactcc aatcgtgctt caactagtgg aagaaaaaat ggatgtacct 42120  
 tatcttttag ttctgcagat atcccaagt cttcaggctg ctttatctgt cctgatttta 42180  
 ttcggactgc acagcttgtg cagcaacctg attaccaaaa tgagttttca attgttatat 42240  
 agaccacacg gaacaatcaa ataagagatg ctatccaatc aaaaggattt catagttaaa 42300  
 taatatatca aaagccaatg gcatgggtag tttttttttt aatttatagt tgctataagt 42360  
 atttgacaaa tagaaagagt cccaaatgag tccaacatgg ttctgactac atattccaaa 42420  
 atcaaaaacca acatcacact cccacacgat actatctata tcaacataaa ggaggatgag 42480  
 aaatagccaa cattcagttt gcacatattg gagcagctag tggaggagct tggccataaa 42540  
 aagaggacgg accattatga tatgaagtgt aaagagaagg gagacagatt agtatttcat 42600  
 cagttccgcc actcaagaca gggcttcac aggctctatt tgtaacaaat gaagacggtt 42660  
 caagctgaag ggtgacattc atgcttagca cttagttag ctgctactaa ctaggcatgc 42720  
 ataatgagtc gcccaatagc ttactgtcat gtacggccgc acttacaggc gccgtcgtga 42780  
 cgccaggagg gctgcagatc gcgcagccaa ggcaggcgc acaatcagtg gctaagttta 42840  
 gaaagataag gattagtttc cctcttgcat gccttaatca taggagggat tggttacgat 42900  
 tagtttcctt ttcatatgcc ttaataatag gagagattgg ttaagattag tttccttttc 42960  
 atatgcctta atcatagga aggttgggtt aaccagaggc tatatatatg ccgtgtaata 43020  
 ggctgggaaa taatcaagca agatcaatta tccaaaactg ctcttctcct ttgcctctct 43080  
 caagccaccg gtgaggaatc cctcacggtg aaggctaga gcgcgactac gaactgcgta 43140  
 gccgcggtcc agcgcggtt ggcgtcgagg cgcttgaca cctggtatca gcgtcacgtc 43200  
 gatcctcacc caccgcctct tgccctccac catcccctc cacgccacc acctccaccg 43260  
 accactccat caccatggct gagcccacca tcaaggacct catggagctg atgcagtctt 43320  
 tccaaaccga gttggctgcc gtgaaagcca ccatgaagga caagtcgtcc tcgtcgtcca 43380  
 ccgacggcgg cggcgagcgc gaggatcccc ctctgttggg tcggcccccc aggttcaga 43440  
 agctcgactt tccccggtc gatggacca ccgaccgat gctcttcac aacaaatgtg 43500  
 aatcctattt tcgccaacag cgcacatgg cggaggaacg cgtgtggatg gcctcttata 43560  
 atctggagga cgtcgcgag ctgtggttca tccagctgca ggacgacgag ggacacacat 43620  
 cctggggcgg gttcaaggac ctctcaatc ttcgcttcgg gccaccactc tgctcagcgc 43680  
 ccctgttcga gttggcggag tgtcgcgcga ccgggaccgt ggaggaatac tccaaccggt 43740

ES 2 546 255 T3

tccaggccct gctgccgcgc gcgggtcgcc tcacggaggg ccagcgtgtc caactctaca 43800  
 caggcggctt ccttccccca ttgagccacg ttgttcgcat ccacaaccg gagacacttg 43860  
 atggggccat gagtctcgcc cgtcaagccg agcagctgga gttggcacgg ggaccgccac 43920  
 cggccgccag gggagcccc tgcctctctt ccccagcgcc ggcgccaag cagccgctgc 43980  
 tcgccctccc tgcaccaccc gcgggcgcgc cccagccgcg accagagggg ccgcccttga 44040  
 agcggctatc accggaggaa caggcggaac ggcgccgcct cggcctctgc ttcaactgca 44100  
 atgagccgta caaccgccc cacaaccgtg tctgccgccc catcttctac ctccatggcg 44160  
 tcgagctcac ggccgctgcc gaggaactcg taggggacga cccgcaggac ggcgccccg 44220  
 tcttctccct cagggcagtc actggcatgc ccatctgcaa ttccatgcag gtgcgggcca 44280  
 ccctaggcgc caccaccctc ctgcgctccc tggacaccgg ctccacgcag aacttcattg 44340  
 gggaggatgc cgcgcgccgc accggcctgc cgatccagcc gcacctcacg gccactgtgg 44400  
 ccaacggtga acgtgtcacc tgcccaggag tcattcgccc cgcccaggtc atcatcgagg 44460  
 gcgagccatt cttcatgcac ctcttcgtca tgccgctcgc agggtagcac ctctgcttag 44520  
 ggactcaatg gatggtcacc cttggtcgca tgggtgagg cttcgtcgac cgctccgtct 44580  
 ccttctgca ccaaggtcgc caggtctcct ggtcggacgt cgccgaccgt cagcatcccc 44640  
 tgctcgcgc taccacgaca ccgagcgccc tccttgagga gctcttgac tccttcgacg 44700  
 ggggtgttgc tgagccggcg ggtctgcccc cacagcgagc tcgggaccac gccatcgctc 44760  
 tcaagccagg ctctacacct gtggcggtcc ggcctaccg ctaccgggtg gcgcacaagg 44820  
 atgagttgga gcggcaatgt gccgccatgt tgacccaagg catcgtacac cgcagtgact 44880  
 cggcgttctc ctaccgggtt ctgctggtca agaagcacga cggggcttgg cggttttgcg 44940  
 tggactaccg cgcccttaat gccctcaccg tcaaagacgc cttccccatc cccatcgctg 45000  
 acgagctcct tgacgagctg catggtgcgc agttcttcac gaagctggac cttcgtctccg 45060  
 gtgatagctg cctagagggg ggggtgaatg ggcgaaactg aaatttaca atataaacac 45120  
 aactacaaga cggggttagc gttaggaata agaaacgagt ccgcaagaga gggcgcaaaa 45180  
 caaatccaa gcgaataagc aagtgcgaca cggagatttg ttttaccgag gttcggttct 45240  
 ctcaaaccta ctccccgttg aggaggccac aaaggcctgg tctcttcaa cccttccctc 45300  
 tctcaaacga tccacggatc gagtgagctt tctcttctca atcacttggg acacaaagtt 45360  
 cccacaagga ccaccacaag attggtgttt cttgccttaa ttacaagtga gtttgattgc 45420  
 aaagaaggat caagaaagaa gaaagcaatc caagcgcaag agctcgaaag aacacgagta 45480  
 aatcactctc tctagtcact atggcggtgt gtggaatttg gagaggattt gatctctttg 45540  
 gcgtgtctag aattgaatgc tagagctctt gtagtagttg ggaagtggaa aacttggatg 45600  
 caatgaatgg tgggtgggtt ggggtattta tagcctcaac caccaaaagt ggccgttggg 45660  
 aggctgtctg ttcgatggcg caccggacag tccggtgcac accggacagt ccggtgcccc 45720  
 ctgccacgtc atcactgctg ttggattctg accggtggag cttctgactt gtgggccccg 45780

ES 2 546 255 T3

ctgggtgtcc ggtgcacacc ggacaggtac tgtttctgt ccggtgtgcc agcatgggcy 45840  
tttctgactc ctgcgcgcy agagcgcga ttaatgcy ggcagagagc cgttggcgcy 45900  
gagaagaccg ttgtccgga gacgcaccgg acagtccggt gaattatagt ggactagccy 45960  
ttggggtttc ccgaagctgg cgagttcctg aggccgacct cctttggcgc accggacact 46020  
gtccggtgta caccggacag tccggtgaat tatagcgcga gtgcctctgg aaattcccga 46080  
aggtggcgcg tttgagtctg agtccccctg gtgcaccgga cagtccggtg cgcagacca 46140  
ggggtgcctt cggttgcctt tttgtcttt tgttgaatcc aaaactgggt ctttttattg 46200  
gctgagtgtg aaccttttac acctgtgtaa tctatacact tgggcaaact agttagtcca 46260  
attatttgtg ttgggcaatt caaccaccaa aattaattag ggactagggt taagcctaatt 46320  
tcccttcaa tctccccctt tttggtgatt gatgccaaca caaaccaag caaatataga 46380  
agtgcataat tgaactagtt tgcataatgt aagagtaaag gttgcttga attgagccaa 46440  
tgtaataact tacaagatat gcagggattg tttctttctt atatattatt ttggaccacg 46500  
cttgaccac atgttttgtt tttgcaaatt cttttttaa atccatttca aagatctttt 46560  
gcaaatggtc aaaggtaaat gaataagagt ttgcaaagca ttttcaagat ttgaaatttt 46620  
ctccccctgt tcaaatgct tttctttga ctaacaaaa ctccccctaa aagagatcct 46680  
cctcttagtg tcaagaggg tttgatata tcatttttga aatactactt tctccccctt 46740  
ttgaacacaa taggatacca attgataaat actcttggaa aacactaagt ttttgaaatt 46800  
ggttgtggg cyggtccttt tgctttgggc tcatactttc tcccccttg gcatgaatcy 46860  
ccaaaaacgg aatcattaga gcctatcgaa gtactatcgt cccctttggt cataagtaaa 46920  
tgagttaaga ttataccaaa gacgaaatcc ggtcttttag ctttgggtt tctctctc 46980  
cccaaagaca aggtccttta ttggagcgt ggcgaaggat gagttaccga gtggaagcct 47040  
ttgtcttca ccgaagactc caattcctt tcaatatacc tatgacttgg tttgaaatag 47100  
acttgaaaac acattagtca tagcatatat gattaaagt ataatgagc tatgtgtgca 47160  
atctagcaaa agaagttgcy tgaatcaaga atattgagct catgcctaag ttttgtaaaa 47220  
gttgttcat caagaggctt ggtaaagata tcggctaatt gatctttagt gttaatgtaa 47280  
gaaatctcga tatccccctt ttgttggta tccctaagaa aatgataccg aatggctatg 47340  
tgcttagtgc ggctatgctc gacgggattg tcggctattt tgattgcaact ctattatca 47400  
catagcaaa ggactttggt taattttaa ccgtagtccc gcagggttg cctcatcaa 47460  
agcaattgcy cgcaacaatg acctgcygca atgtactcag cttcggcggg gaaaagagcy 47520  
accgaatttt gcttcttga agcccaagac accaaagatc tcccaagaa ctggcaagtc 47580  
cctgatgtgc tcttctatt aattttgcac cccgccaat cggcatccga ataaccaatc 47640  
aaatcaaatg tggatccccg aggtaccaa agtccaaact taggagtata agccaaatat 47700  
ctcaagattc gttttacggc cgtaagggtg gattccttag ggtcggattg gaatcttga 47760  
cacatgcata cggaaagcat aatgtccggt cgagaagcac ataatagag taaagaacct 47820

ES 2 546 255 T3

atcatcgacc ggtatacctt ttgatccacg gacttacctc ccgtgtcgag gtcgagatgc 47880  
 ccattgggtc ccatgggtgt cttgatgggc ttggcatcct tcattccaaa cttgcttaga 47940  
 atatcttgag tatactttgt ttggctaagg aagggtccct cttggagttg tttgacttgg 48000  
 aatcctagaa aatacttcaa ctccccatc atagacatct cgaatttctg tgtcatgatc 48060  
 ctactaaact cttcacatgt agactcgta gtagaccaa atataatata atcaacataa 48120  
 atttggcata caaacaagtc attttcaaga gttttagtaa agagtgtagg atcggccttg 48180  
 ccgactttga agtcattagc aataaggaaa tctctaaggc attcatacca tgctcttggg 48240  
 ggcttgcttg agcccataaa gcgcctttga gagcctatag acatggttag ggtactcact 48300  
 atcttcaaag ccgggaggtt gctcaacata gacctcttc ttgattggtc cgttgaggaa 48360  
 ggcacttttc acgtccattt gataaagctt aaagccatgg taagtagcat aggctaataa 48420  
 tattcgtatt gactcaagcc tagctacggg tgcataggtt tcaccgaaat ccaaaccctc 48480  
 gacttgggag tatcccttgg ccacaagtcg tgctttgttc cttgtcacca caccatgctc 48540  
 atcttgcttg ttgcggaaga cccatttggc ccctacaaca ttttgggtta ggacgtggaa 48600  
 ccaaagcca tacctcattc ctctgtaaat tgttgagctc ctcttgcatc gccaccacc 48660  
 caatccgaat ctgaagtgtt tcctctatcc tatgtggctc aatagaggaa acaaagagt 48720  
 aatgctcaca aaaatgggca acacgagatc gagtagttac cccctatga atgtcgccga 48780  
 ggatggtgct gacggggtga tctcgttga ttgcttggg gactcttggg tgggcggtc 48840  
 ttggttcttc ctcatgctcc ttctcttgat catttgcatc tccccctga tcattgtcat 48900  
 tatcttgagg tggctcatct tcttgatttt gcccttcac aacttgagcc tcacctcat 48960  
 tttgagttg tggagatgct tgcgtggtg aggatgattg atcttgca cttggaggct 49020  
 cttcggattc cttaggacac acatcccaa tggacatgtt ccttagcgt atgcatggag 49080  
 cctcttcatt acctatctca tcaagatcaa cttgctgtac ttgagagccg ttagtctcat 49140  
 caaacacaac gtcacatgag acttcaacta gtccagtgga cttgttaaag accctatatg 49200  
 cccttggtt tgagtcataa ccaagtaaaa agccttctac agtttttagga gcaaatttag 49260  
 attttctacc tcttttaaca agaataaagc atttgctacc aaaaactcta aagtatgaaa 49320  
 tgttgggctt ttaccgggtt aggagttcat atgatgtctt cttgaggatt cggatgaagat 49380  
 ataaccggtt gatggcgtag caggcggtgt tgaccgctgc ggcccaaac cggcccggtg 49440  
 tcttgactc atcaagcatg gttcttgcca tgcctaatag agttcgattc ttctctcca 49500  
 ctacaccatt ttgttgaggg gtgtagggag aagagaactc atgcttgatg ccctctcct 49560  
 caagaagcc ttcaatttgt gagttcttga actccgtccc gttgtcgtt cttattttct 49620  
 tgatcctaa gccgaactca ttttgagccc gtctcaagaa tccctcaag gtctcttggg 49680  
 tttgagattt ttctgtaaa aagaataccc aagtgaagcg agaataatca tccacaataa 49740  
 ctagacagta ctactccc cggatgctta tgtaagcaat cgggccgaat agatccatgt 49800  
 gtaggagctc cagtggcctg tcggctgca tgatgttctt gtgtggatga tgagctcaa 49860

ES 2 546 255 T3

cttgcttccc cgctgacat gcgctacaaa tcctgtcttt ctcaaatga acatttgta 49920  
 atcctaaaaat gtgttctccc tttagaagct tatgaagatt cttcatccca acatgggcta 49980  
 gtcggcggtg ccagagccaa cccatgtag tcttagcaat taagcatgtg tcgagttcag 50040  
 ctctatcaaa atctactaag tatagctgac cctctaacac acccttaaat gctattgaat 50100  
 cattacttct tctaaagaca gtgacaccta catcagtaaa aagacagttg tagcctatct 50160  
 gacataattg agaaaacagaa agcaagttgt aatctaaaga atcaacaaga aaacattgga 50220  
 aatagaatgg tcaggagata tagcaatctt accaagtcct ttgaccaaac cttgatttcc 50280  
 atccccgaat gtgatagctc gttggggatc ttgggttttc tcatatgagg agaacattct 50340  
 tttctcccca gtcatatggt ttgtgcaccc gctgtcagat atccaacttg agccccgga 50400  
 tgcataaac taaaaacaa atttagttct tgactttagg taccctaaact gttttgggtc 50460  
 ctttgccatt agaaacaaga actttgggta cccaaacaca agtcttgga cccttggtt 50520  
 tgcccccaac aaacttgga actactttgc cggattttgt agtcaaaaca taggatgcat 50580  
 caaaagtttt aatgaaata gcatgatcat ttgaagcatt aggagttttc tttctaggca 50640  
 acttagcacg ggttggttgc ctagaactag atgtctcacc cttatacata aaagcatggt 50700  
 tagggccaga gtgagacttc ctagaatgag ttctcctaata tttgctctca ggataaccgg 50760  
 cagggtacaa aatgtaacct tcgttatcct gaggcattggg agccttgccc ttaacaaagt 50820  
 tggacaagtt cttaggaggg gcattaagtt tgacattgtc tccccttgga aagccaatgt 50880  
 catcctaat gccggggcgt ctcccattat aaagcatgct acgagcaaat ttaaatttct 50940  
 cattctctaa gttgtgctcg gcaatcttag catctagttt tgttatatga tcatcttggt 51000  
 gtttaattaa agccatatga tcatgaatag catcaatctc aacattttta catctagtgc 51060  
 aaatagtac atgctcaatg gtggatgtag atggtttgca agaattaagt tcaacaatct 51120  
 tagcacgaag tatatcattc ttatctctaa gatcagaaat tgtaattttg caaacatcaa 51180  
 aatcttagc cttagcaatt aaatcttcat tttctaatct aaggctagca agagatacat 51240  
 tcaattcatc aatcttaaca agcaaatcaa cattatcatc tctaagattg ggaattgaaa 51300  
 catcaccaaa tatgtgaatc aaccttaa 51328

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

5

<400> 107  
 cactgtgcgt cctctgcagg cagttgtga catgagcgca tgcactgc tgaatgc 58

10



**REIVINDICACIONES**

5

1. Una semilla transgénica del evento de maíz MIR162 tratada con un insecticida, donde dicha semilla de maíz transgénica comprende la molécula de ácido nucleico constituida por la SEC ID NO: 49 y su complemento.
2. La semilla de maíz transgénica de la reivindicación 1, donde dicha semilla transgénica del evento de maíz MIR162 es la semilla de maíz depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso PTA-8166.