

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 635**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 5/08 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2016 PCT/EP2016/071179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2016 E 16766886 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3346825**

54 Título: **Marcador para crecimiento compacto en pepino**

30 Prioridad:

08.09.2015 NL 2015408

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

07.10.2020

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.
(100.0%)**

**Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL**

72 Inventor/es:

VAN DER LINDE, LILIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 785 635 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

Marcador para crecimiento compacto en pepino

La presente invención se refiere a un marcador para identificar una planta adecuada para el cultivo con alambre alto, y al uso de los marcadores.

5 En el cultivo de pepino con alambre alto, se utilizan densidades de plantación más altas para obtener rendimientos más altos por m². Además, el cultivo con alambres altos permite un período de cultivo más largo durante el cual la planta produce frutos de pepino. Sin embargo, no todas las variedades son aptas para este tipo de cultivo. El objetivo de la presente invención es proporcionar un medio para identificar tales plantas.

10 En el documento WO2009/059777 se describen las plantas de pepino que son adecuadas para el cultivo con alambre alto. Las plantas de pepino descritas expresan, en comparación con el tipo habitual de entrenudos más cortos de pepino largo, brotes laterales más cortos, hojas más pequeñas y más oscuras que permanecen verdes durante más tiempo, hojas menos irregulares, flores más pequeñas, una orientación más horizontal de las hojas, frutos más cortos, y, sobre todo, una velocidad de crecimiento más lenta. Estas características son causadas por un determinante genético desconocido que se conoce como el "gen compacto". Se describió que el locus genético del gen compacto puede demostrarse y monitorizarse con la ayuda de marcadores AFLP flanqueantes en descendientes obtenidos hibridando una planta de pepino que comprende este locus genético con un tipo de pepino corto o una planta de tipo pepinillo que no contiene este locus genético y el locus genético en cuestión pueden introducirse, por hibridación, en cada planta que pueda hibridarse con una planta de pepino según la presente invención.

20 Sin embargo, los marcadores AFLP que se describen en la solicitud no son polimórficos en los tipos de pepino largo, por lo tanto, seleccionar un tipo de pepino largo que comprenda el gen compacto implica cruzar primero dicha planta con un pepino o pepinillo corto (ambos carecen del gen compacto) y analizar la progenie de dicho cruce (por ejemplo, la generación F1 y/o F2) con uno o más de los marcadores AFLP descritos vinculados al locus compacto.

25 Los marcadores AFLP descritos en el documento WO2009/059777 no son por lo tanto muy convenientes para trabajar con ellos y el método descrito allí es muy laborioso e ineficiente. Además, el uso de marcadores AFLP como herramienta de identificación y monitorización se ha quedado obsoleto, porque las herramientas de secuenciación se están volviendo más sofisticadas y menos costosas en esta última década. Esto hace que sea difícil, si no imposible, encontrar compañías de servicios u organizaciones que puedan realizar análisis AFLP.

30 Teniendo en cuenta los obstáculos y problemas que se describen aquí, existe la necesidad de un método conveniente y eficiente para monitorizar el determinante genético que subyace en el fenotipo del gen compacto, un fenotipo adecuado para el cultivo con alambre alto.

35 En la investigación que condujo a la presente invención, se descubrió que el fenotipo compacto, o el fenotipo adecuado para el cultivo con alambre alto, es causado por una mutación en el gen *Cullin1*. Una planta que tiene el gen mutante es particularmente adecuada para el cultivo con alambre alto. Dicha planta muestra una longitud de entrenudo más corta y/o un área foliar más pequeña y también puede mostrar las otras características descritas en la presente memoria como el fenotipo de crecimiento compacto. Se descubrió que la mutación en el gen *Cullin1* del pepino es una sustitución específica en la posición 147 de la SEQ ID NO: 1, es decir, aguas abajo del codón de inicio ATG de la secuencia de codificación (CDS) y comprende un cambio de adenina a guanina.

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del pepino de tipo salvaje *Cullin1* SEQ ID NO: 1. La figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos del pepino mutante *Cullin1* SEQ ID NO:2

40 La mutación es un llamado polimorfismo de nucleótido único (SNP). Este SNP es un nucleótido único en la secuencia genómica que difiere (A/G) entre las plantas de pepino que muestran el fenotipo normal y tienen una adenina (A) en la posición 147 de la SEQ ID NO: 1 y las plantas de pepino que comprenden el fenotipo de crecimiento compacto y tiene una guanina (G) en la posición 147 como en la SEQ ID NO: 2.

45 Por lo tanto, la invención se refiere a un marcador para identificar una planta de pepino que muestra un fenotipo de crecimiento compacto, que comprende un SNP en la posición 147 de la secuencia de SEQ ID NO: 1, en donde el SNP comprende un cambio de adenina a guanina.

En una realización, el marcador comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una parte de la misma, que comprende el SNP.

50 En una realización, el fenotipo de crecimiento compacto comprende una longitud de entrenudo más corta y/o un área foliar más pequeña.

Los términos "longitud de entrenudo más corta" y "área foliar más pequeña" como se usan en la presente memoria, se definen como sigue.

El término "área foliar más pequeña" como se usa en la presente memoria es el área foliar que muestra una reducción en el área foliar individual de, en orden de preferencia incrementada, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el

30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% como resultado de la presencia homocigótica del gen modificado de la invención. Para investigar la influencia del gen de la invención en el área foliar más pequeña, un experto en la técnica tendría que comparar las plantas que tienen el gen de la invención de forma homocigótica con las plantas que son isogénicas a las plantas mencionadas por primera vez pero que no tienen el gen de la invención.

El término "entrenados más cortos" o "longitud de entrenados más corta", como se usa en este documento, es la longitud de entrenados que tiene una reducción en la longitud individual de, en orden de preferencia aumentada, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% como resultado de la presencia homocigótica del gen de la invención. Para investigar la influencia del gen de la invención en la longitud interna más corta, una persona experta tendría que comparar las plantas que tienen el gen de la invención de forma homocigótica con las plantas que son isogénicas a las plantas mencionadas por primera vez pero sin el gen de la invención.

Además, la invención se refiere al uso de la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una parte de la misma como un marcador para identificar una planta de pepino que muestra un fenotipo de crecimiento compacto, en donde la parte de la misma comprende el SNP.

Un marcador es una secuencia de ADN que es polimorfa entre individuos y se puede usar para distinguir a un individuo del otro. Un marcador puede ser una secuencia larga como un microsatélite o una secuencia de ADN muy corta, como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). En la presente invención, la variación es un SNP en el gen *Cullin1*. Varios métodos analíticos están disponibles para detectar SNP en el genoma. Estos incluyen secuenciación de ADN, electroforesis capilar, espectrometría de masas, polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP), extensión de base única, análisis electroquímico, HPLC desnaturalizante y electroforesis en gel, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, análisis de hibridación. El objetivo de estos métodos es determinar qué alelo del SNP (tipo salvaje o mutación) está presente en el genoma a analizar. El SNP en el genoma es el marcador real. Cuando se usa la secuenciación de ADN para la detección del SNP, se determina la secuencia del gen que comprende el SNP y después se evalúa qué nucleótido está presente en la posición 147. Para otros métodos analíticos, se pueden usar diversos derivados de la secuencia de ADN real que comprende el SNP. Estos derivados comprenden, por ejemplo, una molécula de ADN que tiene la secuencia génica completa de SEQ ID NO: 1 o solo una parte de la misma. En cualquier caso, un derivado debe comprender la posición del SNP. Estos derivados también están comprendidos en el término "marcador".

El término "tipo salvaje", como se usa en la presente memoria, se refiere en general a la forma de un organismo, gen, proteína o rasgo tal como ocurriría en la naturaleza, en oposición a una forma mutada o modificada. En esta solicitud, el tipo salvaje se refiere específicamente a la forma natural del gen *Cullin1*, la forma natural de la secuencia de nucleótidos de *Cullin1*. En particular, "tipo salvaje" como se usa en la presente memoria se refiere a la secuencia de nucleótidos genómica *Cullin1* del pepino de tipo salvaje de SEQ ID NO: 1.

Los términos "mutante", "mutación", "modificación", "modificado" y "gen *Cullin1* mutado" como se usa en la presente memoria son intercambiables y se refieren a cambios de nucleótidos en el gen *Cullin1* de tipo salvaje que conduce a una versión modificada del gen de tipo salvaje. En particular, "mutante" como se usa en la presente memoria se refiere a la secuencia de nucleótidos genómica *Cullin1* del pepino mutante de SEQ ID NO: 2.

En general, para identificar una planta de pepino con el fenotipo de crecimiento compacto, es decir, que muestra una longitud de entrenado más corta y/o un área foliar más pequeña, se determina en la SEQ ID NO: 1 si hay una A o una G en la posición 147. La SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de la versión mutada del gen *Cullin1*, que comprende una G en la posición 147.

La invención se refiere además al uso del SNP de la invención como un marcador para identificar plantas de pepino que muestran el fenotipo de crecimiento compacto, es decir, una longitud de entrenado más corta y/o un área foliar más pequeña.

En esta solicitud, el término "A/G" significa que el primer nucleótido mencionado; la adenina (A) está mutada en el nucleótido mencionado en último lugar; guanina (G).

La invención se refiere además a un método para seleccionar una planta de pepino capaz de mostrar un fenotipo de crecimiento compacto de una población de plantas de pepino, que comprende detectar la presencia o ausencia de una guanina en la posición 147 de la SEQ ID NO: 1 en el genoma de una planta de una población de plantas de pepino, y seleccionar una planta de pepino que comprende una guanina en la posición 147 de la SEQ ID NO: 1. En una realización particular del método, se usa el marcador como se define en la presente memoria.

Figuras

Figura 1: secuencia de codificación de tipo salvaje *Cullin1* de pepino, SEQ ID NO: 1. El nucleótido entre paréntesis indica la posición del SNP en 147 bp desde el principio. La forma de tipo salvaje es "A" (adenina), como se muestra aquí.

- 5 Figura 2: secuencia de codificación mutante "compacta" *Cullin1* de pepino, SEQ ID NO: 2. El nucleótido entre paréntesis indica la posición del SNP 147 bp desde el principio. La forma de tipo salvaje es "A" (adenina), la variante mutante que se muestra aquí es "G" (guanina).

Ejemplos

Ejemplo 1

- 10 Identificación de la mutación del gen *Cullin1* en *Cucumis sativus*

Para crear un nuevo mapa genético se utilizó una población de cruce F2 hecha de una variedad de pepino con "alambre alto" disponible comercialmente, "Hola Lisa". En total, se utilizan 375 marcadores y 398 líneas F2. Un análisis de QTL realizado en estas poblaciones cruzadas reveló un QTL importante en el cromosoma 6 en el que uno de los alelos es responsable de un fenotipo de crecimiento compacto caracterizado por una longitud de planta más pequeña, longitud de entrenudo más corta y superficie de hoja más pequeña. La secuenciación del marcador de pico del QTL reveló un SNP presente en la secuencia del marcador. La secuencia particular fue polimórfica en la población cruzada. La secuencia de nucleótidos del QTL principal en el cromosoma 6 se identificó por medio de BLAST. Los mejores éxitos de BLAST para la secuencia se parecían a la secuencia del gen *Cullin1*. La secuencia de nucleótidos de pepino de tipo salvaje se muestra en Figura 1.

- 20 Ejemplo 2

Validación del efecto de SNP en el gen *Cullin1* sobre la longitud del entrenudo y el área foliar de la planta

Se analizaron fenotípica y genéticamente diferentes poblaciones de plantas *Cucumis sativus*, cada una hecha con diferentes variedades de "alambres altos" disponibles comercialmente, que tienen el fenotipo de crecimiento compacto de entrenudos más cortos y hojas más pequeñas. Véase la tabla 1 para los datos fenotípicos y genéticos.

- 25 Las plantas se midieron 3 semanas después de la siembra. Para estimar el área foliar, a partir de la segunda hoja (no los cotiledones) se midieron todas las hojas presentes, y el ancho y el largo de una hoja se midieron y multiplicaron entre sí para obtener una puntuación para el área foliar. En la tercera columna de la tabla 2, se dan los diferentes haplotipos para el SNP del gen *Cullin1*. El puntaje A significa que el marcador SNP obtuvo un puntaje homocigoto para el gen *Cullin1* de tipo salvaje, B significa homocigoto para el gen *Cullin1* modificado.

- 30 En la primera población, las plantas que son homocigotas para el gen *Cullin1* modificado (B), muestran una longitud de entrenudo que es en promedio el 79% de la longitud de las plantas que son homocigotas para el gen *Cullin1* de tipo salvaje (A). Las plantas B además muestran un área foliar que es en promedio el 40% del área foliar de las plantas A.

- 35 En la segunda población, las plantas B muestran una longitud de entrenudo que es el 65% de la longitud del entrenudo de las plantas A y un área foliar que es en promedio el 47% del área foliar de las plantas A.

Tabla 2

5 Resultados de los análisis genotípicos y fenotípicos de plantas individuales de 2 líneas de pepino diferentes derivadas de variedades con alambre alto disponibles comercialmente (Nun 02944, Hi-Tona). La longitud del entrenudo se define como la longitud del tallo principal dividido por el número de entrenudos. El área foliar se estima midiendo el largo y el ancho de todas las hojas presentes en una planta, empezando con la segunda hoja (no los cotiledones), multiplicando el largo y el ancho de hoja, y computando el promedio por planta. Para los puntajes de SNP de *Cullin1*, el puntaje A significa que el marcador puntuó A homocigoto (tipo salvaje), B significa homocigoto (modificado)

Material de planta	Halotipo	Longitud de	Área foliar (J x K)
	<i>Cullin1</i>	entrenudos (H/I)	
Nun 02944 pl1	B	4.3	208
Nun 02944 pl15	B	5.7	285
Nun 02944 pl7	B	5.8	238
Nun 02944 pl9	B	6.1	216
Nun 02944 pl8	B	6.4	285
Nun 02944 pl17	B	6.6	238
Nun 02944 pl6	A	6.7	550
Nun 02944 pl3	A	6.8	616
Nun 02944 pl10	A	6.8	567
Nun 02944 pl13	A	7.2	675
Nun 02944 pl5	A	8	690
Nun 02944 pl8	A	8.6	546
Hi-Tona pl4	B	3.9	156
Hi-Tona pl8	B	4.1	195
Hi-Tona pl6	B	4.3	238
Hi-Tona pl2	B	4.4	195
Hi-Tona pl11	B	4.8	208
Hi-Tona pl5	B	4.9	224
Hi-Tona pl9	A	5.1	336
Hi-Tona pl10	A	7	480
Hi-Tona pl14	A	7.3	437
Hi-Tona pl12	A	7.4	483

REIVINDICACIONES

1. Marcador para identificar una planta de pepino que muestra un fenotipo de crecimiento compacto, comprendiendo un SNP en la posición 147 de la secuencia de SEQ ID NO: 1, en donde el SNP comprende un cambio de adenina a guanina.
- 5 2. Marcador según la reivindicación 1, comprendiendo la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una parte de las mismas, que comprende el SNP como se define en la reivindicación 1.
3. Marcador según la reivindicación 1 o 2, en donde el fenotipo de crecimiento compacto comprende la planta de pepino que tiene una longitud de entrenudo más corta y/o un área foliar más pequeña.
- 10 4. Marcador según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde una longitud de entrenudo más corta comprende una reducción de al menos el 10% como resultado de la presencia homocigótica del gen modificado de la invención.
- 5 15 5. Marcador según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde un área foliar más pequeña comprende una reducción en el área de al menos el 10% como resultado de la presencia homocigótica del gen modificado de la invención.
6. Uso de un marcador como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para identificar una planta de pepino que muestra una longitud de entrenudo más corta y/o un área foliar más pequeña.
- 20 7. Método para seleccionar una planta de pepino capaz de mostrar un fenotipo de crecimiento compacto de una población de plantas de pepino, comprendiendo detectar la presencia o ausencia de una guanina en la posición 147 de la SEQ ID NO: 1 en el genoma de una planta de una población de plantas de pepino, y seleccionar una planta de pepino que comprende una guanina en la posición 147 de la SEC ID NO: 1, en donde el marcador como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5 se usa para la detección.

Fig. 1

ATGACAATGGGCGAGCGGAAGACTATTGACTTGGAGCAGGGATGGGAGTTTATGCAGAAGGGTATCACAAAGT
 TGAAGAACATTCTCGAGGGCTTGCCCTGAGCCTCAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTTTACACTACCAT
[A] TATAACATGTGCACCCAAAAGCCGCCGCATGATTACTCCCAGCAGCTGTATGATAAAATATCGTGAATCTT
 TTGAAGAGTACATCACTTCTATGGTCTTACCATCCTTGAGGGAGAAGCACGATGAGTTCATGTTGAGAGAACT
 AGTAAAAGGTGGACAAACCATAAAGTCATGGTGGAGTGGCTTTCTCGCTTCTCCACTATCTTGATCGGTAC
 TTCATCGCTCGAAGGTCACCTCCACCTCTAAATGAAGTTGGCCTCACATGCTCCGCGAATTGGTGTACAAAG
 AGCTAAATAGTAAAGTGAGGGATGCAGTAATTTCAATTGATTGATCAAGAACGTGAAGGAGAACAGATTGACAG
 AGCTCTACTGAAGAATGTACTAGATATATTTGTGGAAATTGGTATGGGGCAAATGGATTACTATGAAAATGAC
 TTTGAAGCTGCCATGCTTAAAGATACTGCTGCTTATTACTCTAGGAAGGCTTCCAATTGGATCCTAGAAGATT
 CTTGTCCCGATTATATGCTTAAAGCAGAGGAGTGCCTTGAACGAGAAAAGGATAGGGTTTCCCACTATTTGCA
 CTCTAGTAGCGAGCCAAAGTTGTTGGAGAAAAGTTCAACATGAACTATTATCTGTTTATGCTACTCAACTGCTG
 GAAAAAGAGCATTTCAGGATGCCATGCATTGCTTAGAGATGACAAGGTGGAAGATTTGTC AAGGATGTTCCGTC
 TATTCTCCAAAATACCGAAGGGACTGGATCCAGTTTCCAACATATTTAAGCAGCATGTAAGTCTGTAAGGAAC
 AGCACTGGTCAAACAGGCAGAAGATGCTGCAAGTAACAAGAAGGCTGAGAAAAAGGACATAGTTGGTCTGCAG
 GAACAGGTTTTTGTAAAGAAAAGTGATTGAGCTTCACGACAAGTACTTGGCTTATGTGAATGATTGTTTCCAAA
 ACCACACACTTTTCCATAAGGCTCTCAAGGAAGCTTTTGAAGTATTTTGAATAAGGGTGTGCTGGAAGTTC
 TAGTGCAGAATTGCTTGCTACCTTTTGTGATAACATCCTTAAGAAAAGGTGGGAGTGAGAAGTTGAGTGATGAA
 GCAATCGAGGAGACACTTGAGAAGGTTGTGAAGTTGTTGGCATAACATTTGCGACAAAAGATCTGTTTGCTGAAT
 TCTATAGAAAAAACTTGCCCGAAGGCTTCTCTTTGACAAGAGCGCAACGATGACCACGAGAGAAGTATATT
 GACCAAATTTGAAGCAACAATGTGGTGGTCAGTTCACTTCTAAGATGGAGGGAATGGTTACTGATTTGACTTTG
 GCAAGGGAGAACCAAAGTACTGTTTGGAGGATATCTGAGCAATAATCCACAAGCGAGTCCGTCATCGACCTGA
 CTGTTACTGTTTTAACTACTGGATTTTGGCCAAGCTACAAGTCTTTTGACCTCAACCTGCCGGCAGAGATGGT
 AAAGTGTGTTGAAGTTTTTCAGAGAGTTTTATCAAACAAAACCAAGCATCGAAAACCTTACATGGATTTACTCA
 TTGGGTACTTGTAAACATCAGTGGAAAATTTGAACCGAAAACGATGGAGCTGATTGTGACAACTTATCAGGCTT
 CTGCCCTGTTGCTATTCAATTTCTCGGATAGACTAAGTTACTCGGAAATCATGACACAATTAATTTGAGTGA
 CGATGATGATGTTAGACTACTCCACTCGTTGTGTCATGTCGAAGTATAAAATCTTAATAAGGAACCAAATACG
 AAAACCATCTCTCCGAACGATCATTTTGTAGTTCAATGCAAAATTTCTCCGACAAAATGAGGAGAATAAAGATCC
 CTCTCCGCCTGTGGATGAGAAAAAGAAAGTCATTGAAGATGTTGACAAGGATCGAAGGTATGCTATTGACGC
 CTCAATCGTGCATCATGAAGAGTCGGAAAAGTTCTTGGTTCATCAGCAACTAGTGATGGAGTGCCTCGAGCAA
 TTGGGCCGTATGTTCAAGCCCGATTTCAGGCGATAAAGAAGAGAATTGAAGACCTGATCACTCGGGATTATC
 TAGAGAGAGACAAAGACAACCCCACTTGTTTAGGTACTTGGCTTGA

Fig. 2

ATGACAATGGGCGAGCGGAAGACTATTGACTTGGAGCAGGGATGGGAGTTTATGCAGAAGGGTATCACAAAGT
 TGAAGAACATTCTCGAGGGCTTGCCCTGAGCCTCAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTTTACACTACCAT
[G] TATAACATGTGCACCCAAAAGCCGCCGCATGATTACTCCCAGCAGCTGTATGATAAAATATCGTGAATCTT
 TTGAAGAGTACATCACTTCTATGGTCTTACCATCCTTGAGGGAGAAGCACGATGAGTTCATGTTGAGAGAACT
 AGTAAAAGGTGGACAAACCATAAAGTCATGGTGAGGTGGCTTTCTCGCTTCTCCACTATCTTGATCGGTAC
 TTCATCGCTCGAAGGTCACCTCCACCTCTAAATGAAGTTGGCCTCACATGCTTCGCGAATTGGTGTACAAAG
 AGCTAAATAGTAAAGTGAGGGATGCAGTAATTTCAATTGATTGATCAAGAACGTGAAGGAGAACAGATTGACAG
 AGCTCTACTGAAGAATGTACTAGATATATTTGTGGAAATTGGTATGGGGCAAATGGATTACTATGAAAATGAC
 TTTGAAGCTGCCATGCTTAAAGATACTGCTGCTTATTACTCTAGGAAGGCTTCCAATTGGATCCTAGAAGATT
 CTTGTCCCGATTATATGCTTAAAGCAGAGGAGTGCTTGAACGAGAAAAGGATAGGGTTTCCCACTATTTGCA
 CTCTAGTAGCGAGCCAAAGTTGTTGGAGAAAAGTTCAACATGAACTATTATCTGTTTATGCTACTCAACTGCTG
 GAAAAAGAGCATTACAGGATGCCATGCATTGCTTAGAGATGACAAGGTGGAAGATTTGTC AAGGATGTTCCGTC
 TATTCTCCAAAATACCGAAGGGACTGGATCCAGTTTCCAACATATTTAAGCAGCATGTAAGTCTGTAAGGAAC
 AGCACTGGTCAAACAGGCAGAAAGATGCTGCAAGTAACAAGAAGGCTGAGAAAAAGGACATAGTTGGTCTGCAG
 GAACAGGTTTTTGTAAAGAAAAGTGATTGAGCTTCACGACAAGTACTTGGCTTATGTGAATGATTGTTTCCAAA
 ACCACACACTTTTCCATAAGGCTCTCAAGGAAGCTTTTGAAGTATTTTGAATAAGGGTGTGCTGGAAGTTC
 TAGTGCAGAATTGCTTGCTACCTTTTGTGATAACATCCTTAAGAAAAGGTGGGAGTGAGAAGTTGAGTGATGAA
 GCAATCGAGGAGACACTTGAGAAGGTTGTGAAGTTGTTGGCATAACATTTGCGACAAAAGATCTGTTTGCTGAAT
 TCTATAGAAAAAACTTGCCCGAAGGCTTCTCTTTGACAAGAGCGGAACGATGACCACGAGAGAAGTATATT
 GACCAAATGAAGCAACAATGTGGTGGTCAGTTCACTTCTAAGATGGAGGGAATGGTTACTGATTTGACTTTG
 GCAAGGGAGAACCAACTAGTTTTGAGGAGTATCTGAGCAATAATCCACAAGCGAGTCCGTCATCGACCTGA
 CTGTTACTGTTTTAACTACTGGATTTTGGCCAAGCTACAAGTCTTTTGACCTCAACCTGCCGGCAGAGATGGT
 AAAGTGTGTTGAAGTTTTTCAGAGAGTTTTATCAAACAAAACCAAGCATCGAAAACCTTACATGGATTTACTCA
 TTGGGTACTTGTAACATCAGTGGAAAATTTGAACCGAAAACGATGGAGCTGATTGTGACAACTTATCAGGCTT
 CTGCCCTGTTGCTATTCAATTCTTCGGATAGACTAAGTTACTCGGAAATCATGACACAATTAATTTGAGTGA
 CGATGATGATGTTAGACTACTCCACTCGTTGTGTCATGIGCCAAGTATAAAATCTTAATAAGGAACCAAAATACG
 AAAACCATCTCTCCGAACGATCATTTTGTAGTTCATGCAAAATCTCCGACAAAATGAGGAGAATAAAGATCC
 CTCTCCGCCTGTGGATGAGAAAAAGAAAGTCATTGAAGATGTTGACAAGGATCGAAGGTATGCTATTGACGC
 CTCAATCGTGCGTATCATGAAGAGTCGGAAAAGTTCTTGGTCATCAGCAACTAGTGATGGAGTGCGTCGAGCAA
 TTGGGCCGTATGTTCAAGCCCGATTTC AAGGCGATAAAGAAGAGAATTGAAGACCTGATCACTCGGGATTATC
 TAGAGAGAGACAAAGACAACCCCACTTGTTTAGGTACTTGGCTTGA