

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 789**

21 Número de solicitud: 201030821

51 Int. Cl.:

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 15/29** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **28.05.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**18.10.2012**

71 Solicitante/s:  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC)  
C/ SERRANO, 117  
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:  
**TRUNIGER, VERÓNICA;  
GOSALVEZ, BLANCA;  
BURGOS, LORENZO;  
RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, ANA M. y  
ARANDA, MIGUEL A.**

74 Agente/Representante:  
**Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **POLINUCLEÓTIDOS Y SU USO PARA OBTENER PLANTAS RESISTENTES A VIRUS.**

57 Resumen:

Polinucleótidos y su uso para obtener plantas resistentes a virus.

La presente invención se refiere a secuencias nucleotídicas de eIF4E utilizadas para la formación de un ARN de interferencia y su uso para silenciar específicamente el factor de iniciación de la traducción eIF4E pero no a su isoforma, el factor eIF(iso)4E, obteniendo de esta manera plantas resistentes a al menos un tipo de virus o que mejoran su resistencia al mismo, respecto de un control.

ES 2 388 789 A1

## DESCRIPCIÓN

**Polinucleótidos y su uso para obtener plantas resistentes a virus**

La presente invención se encuadra dentro del campo del sector de biotecnología de plantas, en concreto, la presente invención se refiere a  
5 secuencias nucleotídicas de *eIF4E* utilizadas para la formación de un ARN de interferencia y su uso para silenciar específicamente el factor de iniciación de la traducción eIF4E pero no a su isoforma, el factor eIF(iso)4E, obteniendo de esta manera plantas resistentes a al menos un tipo de virus o que mejoran su resistencia al mismo, respecto de un control.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La gran mayoría de los ARN mensajeros (mRNAs) de eucariotas tienen un  
15 grupo m<sup>7</sup>G (estructura cap) en su extremo 5' y una cola poli(A) en su extremo 3'. La interacción de estos extremos con factores de iniciación de la traducción (eIF) es importante para una traducción eficiente. En células de plantas se han identificado dos complejos de unión a la estructura cap, eIF4F y eIF(iso)4F. El primero está formado por eIF4E, una proteína pequeña de unión a estructuras  
20 cap, y eIF4G, una proteína grande que interacciona con otros factores de iniciación, incluyendo la proteína de unión a poli(A) (PABP), eIF4A y el factor eIF3 (Browning, 2004. Biochem. Soc. Trans., 32: 589-591). La interacción entre eIF4F y el mRNA está propuesta como el primer paso de la iniciación de la traducción, en el cual eIF4E provee la función de unión del 5'-cap durante la  
25 formación del complejo de iniciación en la mayoría de los mRNAs eucarióticos. Para una traducción eficiente es adicionalmente necesaria la circularización del mRNA (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2002. Curr. Op. Plant Biol., 5: 460-465) a través de una triple interacción en la cual eIF4G actúa como andamio, interaccionando con eIF4E y PABP. Como eIF4F, también eIF(iso)4F se  
30 compone de dos subunidades, la pequeña de unión a cap es eIF(iso)4E, y la subunidad grande eIF(iso)4G. eIF4F y eIF(iso)4F tienen actividades similares *in vitro* (Browning, 1996. Plant Mol. Biol., 32: 107-144) y existe evidencia de que

las dos son funcionalmente intercambiables, pero son capaces de diferenciar entre diferentes mRNAs *in vitro*. Mientras eIF(iso)4F media preferentemente la traducción de mRNAs no estructurados, eIF4F puede mediar la traducción de mRNAs sin cap y estructurados (Gallie y Browning, 2001. J. Biol. Chem., 276: 36951-36960). Experimentos *in vivo* también han permitido proponer que tiene 5 que haber cierto grado de redundancia funcional para las funciones de eIF4E, ya que mutantes de *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis) y pimiento que carecen de una de las dos isoformas no muestran ningún fenotipo y la expresión de la isoforma funcional suele estar incrementada (Duprat et al., 2002. The Plant 10 Journal, 32: 927-934; Yoshii et al., 2004. Journal of Virology, 78: 6102-6111; Sato et al., 2005. FEBS Lett., 579: 1167-1171; Ruffel et al., 2006. J. Gen. Virol., 87: 2089-2098). Por ejemplo, un mutante *knock-out* de *eIF(iso)4E* de arabidopsis, que no produce esta proteína, es aparentemente normal (y resistente a diversos virus) y expresa mayor cantidad de eIF4E (Duprat y col., 15 2002). Por otro lado, Combe y colaboradores (Combe et al., 2005. Plant Molecular Biology, 57: 749-760) han estudiado la reducción simultánea de la expresión de eIF4E y eIF(iso)4E en tabaco, que resultó en plantas con enanismo. Aparte de este papel fundamental en la iniciación de la traducción, eIF4E se acumula en el núcleo en cuerpos nucleares (*nuclear bodies*), donde 20 se ha demostrado que está involucrado en la exportación de varios mRNAs que contienen una estructura denominada *4E-sensitivity element* (Goodfellow y Roberts, 2008. J. Biochem. & Cell Biol., 40: 2675-2680).

En relación con la infección de células de plantas por virus, el clonaje y 25 caracterización de genes recesivos de resistencia a virus del huésped ha señalado a los factores de la familia eIF4E como factores de susceptibilidad requeridos por una amplia gama de virus (Robaglia y Caranta, 2006. Trends in Plant Science, 11: 40-45; Truniger y Aranda, 2009. Recessive Resistance to Plant Viruses. In Advances in Virus Research: Academic Press, pp. 119-159, 30 231). Entre los virus para los cuales eIF4E o su isoforma son esenciales para su multiplicación figuran varios virus pertenecientes a la familia *Potyviridae* en diferentes huéspedes, pero también algunos virus de otras familias, como por

ejemplo el virus de las manchas necróticas del melón (MNSV; Nieto et al., 2006. *The Plant Journal*, 48: 452-462) o el virus del mosaico del pepino (CMV; Yoshii et al., 2004. *Journal of Virology*, 78: 6102-6111). Al contrario de las funciones solapantes de estas isoformas en la traducción de genes del huésped, sus funciones no suelen ser solapantes en el ciclo de infección viral. Así los virus muestran una notable especificidad por cada una de las isoformas de eIF4E, ya que la falta de una de ellas puede llevar a su incapacidad de multiplicarse (Truniger y Aranda, 2009. *Recessive Resistance to Plant Viruses*. In *Advances in Virus Research*: Academic Press, pp. 119-159, 231).

10

La familia de eIF4E se compone de dos o más isoformas, muy conservadas entre diferentes organismos. En *Arabidopsis*, se conocen tres genes que codifican proteínas de la subfamilia eIF4E (*eIF4E1*, *eIF4E2* y *eIF4E3*), un gen que codifica eIF(iso)4E (base de datos de secuencias de *Arabidopsis* TAIR) y un gen de menor homología con las anteriores que codifica una proteína de unión a cap denominada nCBP (*novel cap-binding protein*) (Ruud et al., 1998. *J. Biol. Chem.*, 273: 10325-10330). En todas las especies de plantas en las que se tiene suficiente información se han identificado varias isoformas de *eIF4E* (Joshi et al., 2005. *BMC Evolutionary Biology*, 5: 48; Charron et al., 2008. *The Plant Journal*, 54: 56-68). En melón se ha identificado un gen que codifica eIF4E, uno que codifica eIF(iso)4E y un tercer gen con homología a nCBP de *Arabidopsis* (González-Ibeas et al., 2007. *BMC Genomics*, 8: 306).

El silenciamiento génico post-transcripcional es un proceso que consiste en una degradación específica dependiente de secuencia de ARN, que lleva a una supresión específica de la expresión génica. El silenciamiento génico es inducido por ARN de doble cadena (dsRNA) y mediado por pequeños ARNs interferentes (siRNA). Este proceso ha sido aprovechado para el estudio de funciones de genes a través de la reducción de su expresión. Wesley y colaboradores (Wesley et al., 2001. *The Plant Journal*, 27: 581-590) llevaron a cabo un estudio sobre el diseño de construcciones para obtener un silenciamiento efectivo y eficiente, para conseguir reducir la expresión de genes

específicos. Concluyeron que con construcciones de ARN tipo *hairpin* se obtenía la mayor eficiencia, estando el 90% de las plantas transformadas silenciadas para el transgén (Wesley et al., 2001. *The Plant Journal*, 27: 581-590). Pero los siRNAs, aparte de inducir el silenciamiento específico también  
5 pueden tener efectos no específicos sobre la expresión de otras proteínas no-dianas dependiendo esto de la secuencia del siRNA (Scacheri et al., 2004. *PNAS*, 101, 1892-1897; Jackson y Linsley, 2004. *Trends in Genetics*, 20: 521-524). Así, se ha demostrado que puede haber silenciamiento indirecto (no dirigido) en transcritos que son complementarios a tan solo 11 nucleótidos (nts)  
10 seguidos del total de 21 nts de los sRNAs (Jackson et al., 2003. *Nat Biotech*, 21: 635-637).

La infección por virus de las plantas generalmente conlleva la reducción en el crecimiento vegetal, disminución del rendimiento, menor calidad y pérdidas  
15 económicas. En la actualidad continúa la búsqueda de herramientas que permitan controlar la infección de las plantas por los virus o, preferiblemente la obtención de plantas resistentes a dichos virus para mejorar el rendimiento y la calidad de los frutos producidos por dichas plantas, evitando así las pérdidas económicas y la dificultad de abastecimiento de alimentos en zonas  
20 productoras deprimidas.

## **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

25 La presente invención provee secuencias nucleotídicas utilizadas para la formación de un ARN de interferencia capaz de silenciar de forma específica al factor de iniciación de la traducción eIF4E, pero no su isoforma eIF(iso)4E, permitiendo con ello obtener plantas resistentes a al menos un tipo de virus o que mejoran su resistencia al mismo, respecto de un control.

30

En la presente invención se aborda la obtención de líneas transgénicas de melón cuya expresión de eIF4E está reducida, para generar plantas más

- resistentes a diferentes tipos de virus. Para ello se planteó reducir específicamente la expresión de eIF4E y no la de su isoforma eIF(iso)4E. Esta reducción de la expresión de eIF4E se consiguió mediante la transformación de plantas de melón con una construcción, que resulta en la expresión de un ARN
- 5 tipo *hairpin*, capaz de inducir el silenciamiento génico específico del ARN mensajero de *eIF4E* de melón. Ya que las secuencias de *eIF4E* y *eIF(iso)4E* de melón tienen una alta identidad nucleotídica entre ellas (de hasta el 75%) y una identidad de alrededor del 50 % a nivel de aminoácidos, fue determinante seleccionar una secuencia que permitiera el silenciamiento específico de *eIF4E*
- 10 para evitar silenciar las dos isoformas a la vez. Con el fin de conseguir silenciamiento específico, se diseñaron varias secuencias nucleotídicas en el extremo 5' de *eIF4E* y en el extremo 3' de *eIF(iso)4E* y se insertaron independientemente en el vector con el objetivo de producir ARN tipo *hairpin*.
- 15 En contra de toda previsión, no pudieron obtenerse plantas transformadas con el vector que comprende la secuencia diseñada en el extremo 3' de *eIF(iso)4E* a pesar de haber seleccionado una secuencia que tiene tan solo un 31% de nucleótidos idénticos entre *eIF4E* y *eIF(iso)4E* (en una secuencia de 290 nts del extremo 3'). Sin embargo, se obtuvieron plantas transformadas con el
- 20 vector que comprende la secuencia diseñada en el extremo 5' de *eIF4E* que tiene un 40,6% de nucleótidos idénticos entre *eIF4E* y *eIF(iso)4E* (en una secuencia de 175 nts de dicho extremo 5'). Dichas plantas presentaron niveles normales de eIF(iso)4E y niveles de eIF4E, que no permitieron que el virus MNSV (virus de las manchas necróticas del melón) infectara dicha planta
- 25 transformada, obteniendo de esta manera plantas resistentes a este virus del melón. Estos resultados muestran que se ha reducido específicamente en torno a cinco veces la expresión de eIF4E, mientras la de eIF(iso)4E no se ve afectada.
- 30 Las ventajas técnicas que presenta la presente invención son la obtención de plantas resistentes a al menos un tipo de virus, que, a pesar de alterar la expresión de eIF4E a través de su silenciamiento génico, no altera la expresión

de su isoforma eIF(iso)4E, permitiendo con ello obtener plantas viables que resisten mejor la infección por virus. De esta manera se soluciona un problema técnico ampliamente planteado en el estado de la técnica.

5 Así pues, un aspecto de la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que expresa al menos un ARN de interferencia, donde dicho polinucleótido es cualquier secuencia que tiene el menos 19 nucleótidos, comprendida entre el nucleótido 1 y 352:

- a. de SEQ ID NO: 1, o
- 10 b. de cualquier secuencia homóloga de SEQ ID NO: 1 de una especie vegetal.

SEQ ID NO: 1 es la secuencia nucleotídica del gen *eIF4E* de melón (*Cucumis melo*) (Nº de acceso MU21698).

15 La secuencia homóloga de una especie vegetal se refiere a secuencias de especies distintas que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran  
20 en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra.

Una realización preferida se refiere al polinucleótido, donde dicho polinucleótido es la secuencia comprendida entre el nucleótido 1 y 352 de SEQ ID NO: 1.

25 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al polinucleótido, donde su secuencia nucleotídica es,

- a. SEQ ID NO: 2, o
- b. cualquier secuencia homóloga de SEQ ID NO: 2 de una especie vegetal.

30

La secuencia SEQ ID NO: 2 es la secuencia contenida en SEQ ID NO: 1 comprendida entre el nucleótido 171 y 345. Según una realización más preferida, la secuencia nucleotídica del polinucleótido es SEQ ID NO: 2.

- 5 En adelante, para referirse a cualquiera de los polinucleótidos anteriores, se podrá usar el término “polinucleótido de la invención” o “polinucleótido de la presente invención”.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que comprende el polinucleótido SEQ ID NO: 2, donde:

- 10 a. dicha secuencia tiene la estructura A-B,  
b. A es SEQ ID NO: 2 o cualquier secuencia homóloga de SEQ ID NO: 2 de una especie vegetal,  
c. B es SEQ ID NO: 3 cuando A es SEQ ID NO: 2, y  
15 d. B es cualquier secuencia nucleotídica complementaria e invertida de la secuencia SEQ ID NO: 2 cuando A es cualquier secuencia homóloga de SEQ ID NO: 2 de una especie vegetal.

La secuencia nucleotídica definida en este aspecto se refiere a una secuencia cuyo ARN, para el que codifica, es capaz de hibridar entre sí, formando una horquilla ya que en todos los casos, las secuencias A y B son totalmente complementarias entre sí. Una realización más preferida se refiere a la secuencia nucleotídica donde A es SEQ ID NO: 2 y B es SEQ ID NO: 3. Según otra realización más preferida, la secuencia nucleotídica además comprende una secuencia nucleotídica espaciadora situada entre A y B. Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica donde dicha secuencia espaciadora es un intrón o un fragmento de dicho intrón. Según una realización aún más preferida, el intrón es SEQ ID NO: 4.

30 La función de la secuencia espaciadora es actuar de bisagra de los pares de secuencias descritos para que se pueda producir el apareamiento o hibridación de las secuencias de ARN codificadas por el polinucleótido.

SEQ ID NO: 4 corresponde con el intrón Pdk de *Flaveria trinervia*.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 5. La secuencia SEQ ID  
5 NO: 5 es la secuencia que contiene SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 separadas por la secuencia espaciadora SEQ ID NO: 4.

En adelante, para referirse a cualquiera de las secuencias nucleotídicas anteriores, se podrá usar el término “secuencia nucleotídica de la invención” o  
10 “secuencia nucleotídica de la presente invención”.

En la presente invención también se contemplan las secuencias complementarias de cualquiera de los polinucleótidos o de las secuencias nucleotídicas de la presente invención.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al ARN tipo *hairpin*, transcrito a partir de la secuencia nucleotídica de la invención. Otro aspecto de la presente invención se refiere al ARN de interferencia generado a partir de la secuencia de ARN tipo *hairpin* según el aspecto anterior. En adelante, para referirse a  
20 cualquiera de los ARN anteriores, se podrá usar el término “ARN de la invención” o “ARN de la presente invención”.

Un ARN tipo *hairpin* (del inglés *hairpin RNA*) (o hpRNA) es una horquilla formada por la hibridación de las secuencias transcritas. En la presente  
25 invención, para la síntesis de las secuencias transcritas se ha usado como molde la secuencia nucleotídica de la invención. Un ARN tipo *hairpin* es un ARN de doble hebra (dsRNA) que es cortado por una endoribonucleasa, , la endoribonucleasa Dicer, dando como resultado fragmentos de alrededor de 21-  
30 25 nts. Estos fragmentos se conocen como pequeños ARN de interferencia (siRNA). Los siRNAs provocan el silenciamiento post-transcripcional de las secuencias nucleotídicas diana, llevando a la degradación del ARN mensajero, de forma que no se obtiene la proteína resultante de la expresión de las

secuencias de ARN mensajero. La enzima Dicer corta el dsRNA en fragmentos de doble cadena de alrededor de 21-25 nucleótidos (siRNA), con el extremo 5' fosforilado y dos nucleótidos sobresaliendo, sin aparear, en el extremo 3'. De las dos cadenas del siRNA solo una, denominada hebra guía, se incorpora en el complejo enzimático RISC mientras que la otra hebra se degrada. Las características termodinámicas del extremo 5' del siRNA determinan cual de las dos hebras se incorpora al complejo RISC. Normalmente se incorpora como hebra guía aquella con menor estabilidad en el extremo 5'. Para que se produzca el silenciamiento post-transcripcional, la hebra guía debe ser complementaria al ARN mensajero que se pretende silenciar. A continuación, el complejo RISC se une al ARN complementario de la hebra guía del siRNA presente en el complejo y se produce el corte del ARN mensajero.

Otro aspecto de la presente invención es un vector de expresión que comprende el polinucleótido o la secuencia nucleotídica de la invención.

El término "vector" se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector comprende el polinucleótido o secuencia nucleotídica de la invención que fusionado al mismo puede replicarse en el huésped correspondiente. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

En adelante, para referirse a cualquiera de los vectores de expresión anteriores, se podrá usar el término "vector de la invención" o "vector de la presente invención".

Otro aspecto de la presente invención es una célula aislada que comprende el polinucleótido, la secuencia nucleotídica, el ARN, o el vector de la invención.

En adelante, para referirse a cualquier célula aislada descrita, se podrá usar el término “célula de la invención” o “célula de la presente invención”. El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar (y expresar) un ADN ajeno transformado, como por ejemplo cualquiera de las cepas de la especie *Escherichia coli* o una bacteria capaz de transferir el ADN de interés al interior de una planta como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*. Preferiblemente, la célula hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino *Plantae*. Así pues, en el caso de que la célula sea vegetal, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una planta que comprende el polinucleótido, la secuencia nucleotídica, el ARN, el vector de la invención o la célula de la invención. El término “planta” engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación. Una realización preferida de la presente invención se refiere a la planta, donde dicha planta es del género *Cucumis*. La planta se selecciona de la lista que comprende pero sin limitarse *Cucumis aculeatus*, *Cucumis africanus*, *Cucumis anguria*, *Cucumis anguria* var. *anguria*, *Cucumis anguria* var. *longaculeata*, *Cucumis baladensis*, *Cucumis canoxyi*, *Cucumis carolinus*, *Cucumis dinteri*, *Cucumis dipsaceus*, *Cucumis ficifolius*, *Cucumis figarei*, *Cucumis globosus*, *Cucumis hastatus*, *Cucumis heptadactylis*, *Cucumis hirsutus*, *Cucumis humifructus*, *Cucumis hystrix*, *Cucumis hystrix* x *Cucumis sativus*, *Cucumis insignis*, *Cucumis kalahariensis*, *Cucumis meeusei*, *Cucumis melo*, *Cucumis melo* subsp. *agrestis*, *Cucumis melo* subsp. *melo*, *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, *Cucumis melo* var. *conomon*, *Cucumis melo* var. *inodorus*, *Cucumis metuliferus*, *Cucumis myriocarpus*, *Cucumis prophetarum*, *Cucumis prophetarum* subsp. *prophetarum*, *Cucumis pubescens*, *Cucumis pubituberculatus*, *Cucumis pustulatus*, *Cucumis quintanilhae*, *Cucumis rigidus*,

*Cucumis rostratus*, *Cucumis sacleuxii*, *Cucumis sagittatus*, *Cucumis sativus*, *Cucumis sativus* var. *hardwickii*, *Cucumis sativus* var. *sikkimensis*, *Cucumis thulinianus*, *Cucumis trigonus*, *Cucumis x hytivus* o *Cucumis zeyherii*. Según una realización más preferida, la planta es de la especie *Cucumis melo*, es  
 5 decir, melón.

Así mismo, la planta de la invención puede contener el polinucleótido o la secuencia nucleotídica de la invención en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis. La planta debe comprender el polinucleótido, la secuencia  
 10 nucleotídica, el ARN, el vector de la invención o la célula de la invención de forma que se exprese en un tejido específico (en un momento concreto del desarrollo vegetativo o dependiendo de las condiciones ambientales en donde se desarrolla) o de forma constitutiva o de forma ectópica (que se expresa en otras células o tejidos diferentes de las habituales y esperadas).

15

La planta de la invención puede generarse por transformación genética de células vegetales mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración del polinucleótido o de la secuencia nucleotídica de la invención en el ADN de la planta, ya sea éste  
 20 genómico, cloroplástico o mitocondrial seguida, aunque no necesariamente, de un programa de regeneración *in vitro* adecuado a las características y necesidades de la especie vegetal transformada. Así mismo, la planta también puede generarse por transferencia del polinucleótido o de la secuencia nucleotídica de la invención, por cruzamiento, es decir, empleando polen de la  
 25 planta de la invención para polinizar cualquier otra planta que no contenga el polinucleótido o la secuencia nucleotídica de la invención, o polinizando los gineceos de plantas que contengan el polinucleótido o la secuencia nucleotídica de la invención con otro polen de plantas que no contengan estas secuencias. Los métodos para conseguir la planta de la invención no se limitan  
 30 exclusivamente a los métodos descritos en este párrafo e incluyen métodos conocidos por el experto en la materia. Así mismo también se incluye la planta

que comprende la célula de la presente invención de forma estable o de forma transitoria.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al fruto de la planta de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere a la semilla o germoplasma de la planta de la invención.

El germoplasma es el material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o el material genético que puede perpetuar una especie o una población de un organismo. En la presente invención se considera que ejemplos de germoplasma son, por ejemplo pero sin limitarse: polen, propágulo o progenie.

En la presente invención se tiene en cuenta el polen como transmisor de los caracteres genéticos y fenotípicos, que puede llevarse a cabo por la polinización de cualquier variedad vegetal compatible con el polen al que se hace referencia. De este modo se consigue una planta que comprende el polinucleótido, la secuencia nucleotídica, el ARN, el vector de la invención o la célula de la presente invención y, tras los respectivos cruces y/o selecciones, se puede obtener una planta en la que el polinucleótido o la secuencia nucleotídica está integrada de forma estable (aunque también pueden expresarse de forma transitoria) y en un número de copias adecuado para obtener los mismos caracteres deseables en las posteriores generaciones.

Los propágulos son partes de la planta que permiten la propagación o reproducción asexual en vegetales, por la que se obtienen nuevas plantas u órganos individualizados. Los tejidos de la porción separada deben recuperar la condición de meristemas para producir todo el conjunto de órganos de la planta. El propágulo se selecciona, pero sin excluir, de la lista que comprende estolones, rizomas, tubérculos o bulbos.

- El término “progenie” hace referencia al resultado de la reproducción, es decir, el individuo o individuos producidos mediante la intervención de uno o más individuos parentales. Por ejemplo, la progenie de las plantas, obtenida mediante reproducción sexual, son las semillas, sin embargo la progenie de una planta puede ser cualquier célula resultante de la fusión de cualquier contenido celular, plasto, compartimento celular, ADN o cualquiera de sus combinaciones. En los procesos de división celular (como por ejemplo en el cultivo *in vitro*) la progenie son las células resultantes de la división.
- 5
- 10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido, de la secuencia nucleotídica, del ARN, del vector o de la célula de la invención para mejorar la resistencia de al menos una planta a al menos un virus, respecto de un control. El control es una planta que no contiene el polinucleótido, la secuencia nucleotídica, el ARN, el vector o la célula de la invención, preferiblemente que es de la misma especie o variedad que la planta de la invención. Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso donde la planta es del género *Cucumis*. Según una realización más preferida, la planta es de la especie *Cucumis melo*.
- 15
- 20 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso, donde el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) o el virus del mosaico de la sandía (WMV).
- 25 Otra realización preferida de la invención se refiere al polinucleótido SEQ ID NO: 2 o cualquier secuencia homóloga de SEQ ID NO: 2 de una especie vegetal; a la secuencia nucleotídica de la invención; al ARN de la invención; al vector o célula que comprende el polinucleótido SEQ ID NO: 2 o cualquier secuencia homóloga de SEQ ID NO: 2 de una especie vegetal, para obtener al menos una planta de la especie *Cucumis melo* resistente al virus MNSV. Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención y en la FIG. 4, se obtienen plantas de *Cucumis melo* viables, capaces de expresar eIF(iso)4E
- 30

pero no eIF4E, que son totalmente resistentes al virus de las manchas necróticas del melón, MNSV.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener al  
5 menos una planta de la especie *Cucumis melo*, resistente al virus MNSV, que comprende:

- a. transformar al menos una célula de la planta de la especie *Cucumis melo* con el vector de expresión que comprende el polinucleótido SEQ ID NO: 2, o la secuencia nucleotídica de la invención,
- 10 b. seleccionar la célula transformada que comprende el vector transformado según el paso (a),
- c. obtener al menos una planta resistente al virus MNSV a partir de la célula según el paso (b).

15 Una realización preferida de la presente invención se refiere al método donde el vector comprende el polinucleótido SEQ ID NO: 2. Otra realización preferida se refiere al método donde el vector comprende SEQ UD NO: 5.

La selección del vector que comprende el polinucleótido o la secuencia de la  
20 invención escogida, puede llevarse a cabo mediante técnicas como;

- Selección de al menos una célula que contenga el vector de la invención correspondiente mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la  
25 secuencia del vector.

- Digestión con enzimas de restricción mediante las cuales se obtenga un fragmento del polinucleótido o de la secuencia de la invención insertada en el vector.

30 La célula transformada con un vector que comprende el polinucleótido o la secuencia nucleotídica de la invención puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico, en este caso se

suele insertar el ADN, que contiene, entre otras secuencias, el polinucleótido o la secuencia nucleotídica de la invención. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias descritas se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos al medio de cultivo que suministra nutrientes a las mismas. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos o herbicidas está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del ADN del vector. También se puede seleccionar la célula que comprende el polinucleótido o la secuencia nucleotídica de la invención mediante cualquier otra técnica que permita discriminar su presencia o ausencia y/o su expresión.

Las células vegetales seleccionadas, pueden someterse a un programa de organogénesis o de embriogénesis somática mediante el cual se da lugar a una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que procede. Esto es posible gracias a que las células vegetales son totipotentes, es decir, mediante la combinación hormonal adecuada se las puede desdiferenciar y originar células embrionarias, que al contener una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenecen, tienen el potencial para regenerar una nueva planta completa. Además son necesarias condiciones de luz y temperatura idóneas para cada especie vegetal. Una vez que se ha regenerado la planta procedente de la célula vegetal seleccionada, se puede llevar a cabo un análisis de la presencia y/o de la expresión del polinucleótido o de la secuencia de la presente invención, pero sin limitarse a estas secuencias.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

5 **FIG. 1. Muestra el alineamiento (ClustalX) de las secuencias nucleotídicas de eIF4E (SEQ ID NO: 1; MU21698) eIF(iso)4E (SEQ ID NO: 6, MU5578) de melón.**

El fragmento de 175 nts, que fue elegido por su menor homología entre las dos secuencias, aparece en negrita y cursiva

10 **FIG. 2. Muestra el plásmido pHANNIBAL diseñado para conseguir silenciamiento génico.**

Esquema del plásmido pHANNIBAL con las dianas de restricción para insertar la secuencia elegida en los dos sentidos, separados por la secuencia del intrón *Pdk*. Las dianas utilizadas para este clonaje fueron *XhoI/EcoRI* y *BamHI/XbaI*.  
15

**FIG. 3. Muestra el plásmido binario p4Esil obtenido tras introducir el fragmento *NotI* (que contiene el promotor 35S de CaMV, el fragmento de eIF4E en ambas direcciones separados por el intrón *Pdk* y el terminador OCS) en el plásmido pART27.**  
20

eIF4E es la secuencia SEQ ID NO: 2 y E4Fle es la secuencia SEQ ID NO: 3, es decir, la secuencia complementaria e invertida de SEQ ID NO: 2.

25 **FIG. 4. Muestra los análisis llevados a cabo con plantas de generación T2 segregante (14-8 a 14-13; BGV-a-3 corresponde a planta control sin transformar) inoculadas con el virus MNSV $\alpha$ 5.**

Las representaciones mRNA *eIF(iso)4E* y mRNAs *eIF4E* se refiere a la  
30 cuantificación de los ARN mensajeros de *eIF4E* ) y *eIF(iso)4E* partiendo de ARN total, por RT-qPCR respecto a los datos obtenidos para la planta control sin transformar BGV-a-3 (valor 1.0);

La representación sRNAs se refiere a la identificación de sRNAs (pequeños ARN) (aprox. 21 nts) derivados del transgén mediante Northern-blot con una sonda marcada complementaria a la secuencia de SEQ ID NO: 2 (transgén), partiendo de ARN total.

- 5 La representación PCR se refiere al resultado de la amplificación de un fragmento de ADN genómico para determinar si las plantas contienen (+) o no (-) el transgén.

La representación MNSV $\alpha$ 5 se refiere a la determinación de la susceptibilidad (S) o resistencia (R) de las plantas al virus MNSV $\alpha$ 5, partiendo de ARN total,  
10 mediante RT-qPCR.

**FIG. 5. Muestra el alineamiento (ClustalX) de las secuencias nucleotídicas de *eIF4E* (SEQ ID NO: 1, MU21698) *eIF(iso)4E* (SEQ ID NO: 6, MU5578) de melón.**

15

El fragmento de 290 nts (SEQ ID NO: 7), que fue elegido para silenciar *eIF(iso)4E*, aparece en negrita y cursiva.

## 20 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente  
25 invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

**EJEMPLO 1. Análisis de las plantas transgénicas que expresan la secuencia SEQ ID NO: 5.**

Se ha analizado la descendencia obtenida por autofecundación (generación T2) de plantas de una generación T1 provenientes de la autofecundación de una única planta transformada, diploide, de generación T0. Previamente a estos análisis se comprobó que la segregación del transgén en las generaciones T1 y T2 era consistente con una única inserción, y que las plantas de la generación T1 que dieron lugar a las de la de la generación T2 analizadas eran heterocigotas para el transgén. Los análisis incluyeron: (i) determinación de la presencia del transgén mediante PCR, (ii) cuantificación de la acumulación de ARN mensajeros de *eIF4E* y *eIF(iso)4E* mediante RT-qPCR y (iii) identificación de pequeños ARNs (sRNAs) derivados del transgén mediante Northern-blot.

Los resultados de estos análisis mostraron que las plantas transgénicas (PCR (+), plantas 14-8, 14-9 y 14-13) contenían 7-9 veces menos ARN mensajero de *eIF4E* (FIG. 4, barras negras con valores entre 0.140-0.188) que las no transgénicas (PCR (-); plantas 14-10 a 14-12 y control BGV-a-3) (FIG. 4, barras negras con valores entre 1.000-1.288). Esta menor expresión de *eIF4E* coincidía con la aparición de sRNAs de aproximadamente 21 nts derivados del transgén (FIG. 4), mientras que las plantas no transformadas, que tenían mayores niveles de ARN mensajero de *eIF4E*, no contenían sRNAs derivados del transgén. Esta coincidencia entre menor cantidad de ARN mensajero de *eIF4E* y aparición de sRNAs derivados de éste demuestra que los niveles reducidos de *eIF4E* son consecuencia del silenciamiento inducido a través del transgén. Por otro lado, la acumulación del ARN mensajero de *eIF(iso)4E* fue similar en todas las plantas analizadas, independientemente de si eran plantas transformadas o no (FIG. 4, barras grises; valores entre 1.000-1.312).

Dado que en trabajos previos, los inventores habían demostrado que *eIF4E* es esencial para la multiplicación de MNSV (Nieto et al., 2006. The Plant Journal, 48: 452-462), el comportamiento de las plantas de la generación T2 segregantes

respecto a su susceptibilidad a MNSV sirvió como dato adicional sobre el grado de silenciamiento alcanzado con el transgén. Así, se inocularon las plantas de melón cuyo análisis se ha descrito (y de plantas control no transformadas), con el virus MNSV.

5

Los resultados de este análisis mostraron que el silenciamiento específico de *eIF4E* inducido en las plantas transgénicas era efectivo, ya que las plantas transgénicas fueron resistentes a MNSV, mientras que las no transgénicas fueron susceptibles (FIG. 4).

10

Es importante resaltar aquí, que a pesar de la alta homología de secuencia nucleotídica entre *eIF4E* y *eIF(iso)4E*, la acumulación del ARN mensajero de *eIF(iso)4E* no se ve alterada en las plantas transgénicas silenciadas para *eIF4E* en comparación con plantas no transformadas, lo cual significa que la secuencia elegida específicamente induce el silenciamiento de *eIF4E*, pero no de su isoforma.

15

## **EJEMPLO 2. Análisis de las plantas transgénicas que expresan la secuencia SEQ ID NO: 8.**

20

Paralelamente al silenciamiento de *eIF4E* se intentó el silenciamiento específico de *eIF(iso)4E*. Se eligió un fragmento del gen *eIF(iso)4E* de 290 nts (destacado en cursiva y negrita en la FIG. 5), correspondiente a SEQ ID NO: 7, para clonarlo, al igual que con el fragmento de *eIF4E*, SEQ ID NO: 2, en las dos direcciones en el plásmido pHANNIBAL, para dar lugar a SEQ ID NO: 8, con el fin de obtener ARN tipo hairpin. El fragmento SEQ ID NO: 7 se amplificó con los cebadores CE81 y CE82 y se clonó en pHANNIBAL con las mismas enzimas de restricción utilizadas para el clonaje de *eIF4E* (*Xba*I, *Xho*I, *Eco*RI y *Bam*HI). Con esta construcción transformada en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 se transformó en varias ocasiones hipocotilo de melón variedad BGV130, siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para la transformación con la secuencia SEQ ID NO: 5 para silenciar *eIF4E*.

25

30

De forma inesperada, no fue posible conseguir plantas transformadas con ninguno de los intentos de transformación, sugiriendo con ello que este resultado negativo era consecuencia de que esta construcción podría estar silenciando tanto *eIF4E* como *eIF(iso)4E* y que por tanto, sin ninguna isoforma de eIF4E, las plantas transformadas no eran viables (como ya se ha mencionado más arriba, en melón solo existen dos isoformas de eIF4E (eIF4E y eIF(iso)4E), y es necesaria la presencia de al menos una de ellas para la supervivencia de la planta o, en este caso concreto, para la obtención de más cantidad de células transformadas con la secuencia de interés).

10

Este resultado negativo demuestra la no obviedad de la selección de la secuencia necesaria para el silenciamiento de tan solo eIF4E y no de la isoforma eIF(iso)4E puesto que, a pesar de haber seleccionado esta secuencia SEQ ID NO: 7 por presentar diferencias significativas respecto de la secuencia alineada de eIF4E, el efecto técnico que se consigue no es el que el experto en la materia podría haber esperado.

15

## MATERIALES Y MÉTODOS

20

### 1. Construcción del plásmido binario para transformar las plantas.

Para llevar a cabo la construcción genética que exprese el ARN de interferencia tipo *hairpin* se utilizó el plásmido pHANNIBAL, que permite clonar la secuencia elegida en las dos direcciones inversas separadas por un intrón (Wesley et al., 2001. The Plant Journal, 27: 581-590) (FIG. 2). El transcrito de este transgén forma una estructura tipo *hairpin*, con una región de dsRNA (ARN de doble hebra), que será reconocida por el complejo RISC y, al contener la secuencia elegida, inducirá el silenciamiento del gen diana. Este plásmido fue obtenido de la organización CSIRO de Australia.

30

La secuencia elegida se introduce aprovechando las diferentes dianas de restricción en dirección inversa flanqueando el intrón Pdk. Para evitar que se silencie la isoforma de *eIF4E*, *eIF(iso)4E*, era esencial que la secuencia utilizada en la construcción del vector tuviera la menor identidad posible entre las dos isoformas. Para identificar el fragmento que cumpliera este requisito, se hizo un alineamiento de las secuencias de *eIF4E* (SEQ ID NO: 1; MU21698) y *eIF(iso)4E* (SEQ ID NO: 6; MU5578) con el programa informático ClustalX (FIG. 1). Se eligió un fragmento de *eIF4E* del extremo 5' de la secuencia que codifica para el ARN mensajero de una longitud de 175 nucleótidos (nts) (SEQ ID NO: 2) así como un fragmento del gen *eIF(iso)4E* del extremo 3' de 290 nts (SEQ ID NO: 7).

Esta secuencia de *eIF4E* (SEQ ID NO: 2) fue amplificada por PCR con los cebadores CE79 y CE80 del EST de melón (SEQ ID NO: 1) correspondiente a *eIF4E*. El fragmento SEQ ID NO: 7 de *eIF(iso)4E* de melón (SEQ ID NO: 6) se amplificó con los cebadores CE81 y CE82.

Estos cebadores llevan las dianas necesarias para el clonaje en pHANNIBAL (*Xba*I y *Xho*I en el caso de CE79 y CE81, *Eco*RI y *Bam*HI en el caso de CE80 y CE82). El producto de PCR fue digerido por separado con *Xba*I/*Bam*HI o *Xho*I/*Eco*RI e introducido subsiguientemente (uno tras otro) en pHANNIBAL digerido con las correspondientes enzimas. Las inserciones fueron verificadas por secuenciación con los cebadores CE163 y CE164 (Tabla 1), que corresponden a parte de la secuencia del CaMV 35S promotor y del OCS terminador, respectivamente (dirección opuesta).

Una vez introducidas las dos secuencias de *eIF4E* (o en su caso *eIF(iso)4E*) de dirección opuesta entre *Xba*I y *Bam*HI y *Xho*I y *Eco*RI en pHANNIBAL, se subclonó el fragmento *Not*I de esta construcción en el plásmido binario pART27 (con resistencia a spectinomicina y kanamicina; obtenido conjuntamente con pHANNIBAL del CSIRO) resultando en el plásmido p4Esil (FIG. 3) o el mismo plásmido que contiene la secuencia SEQ ID NO: 8 en lugar de SEQ ID NO: 5. El

clonaje se verificó por restricción y secuenciación con los cebadores CE163 y CE164.

**2. Transformación de las plantas con los vectores de expresión que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8 respectivamente.**

El plásmido binario final con la construcción para silenciar eIF4E, p4Esil, fue introducido en la bacteria *Agrobacterium thumefaciens* cepa EHA105 y utilizada en la transformación.

10

La transformación se llevó a cabo utilizando plantas de melón de la entrada BGV-130. Los explantos procedentes de plántulas crecidas *in vitro* fueron de 2 días de cotiledón y de 5 días de hipocotilo. El agrobacterium fue crecido durante toda la noche a 28 °C en medio LB con los antibióticos nalidixico (25 μg/ml) y espectinomicina (100 μg/ml). Al día siguiente se centrifugó y se resuspendió el cultivo de agrobacterium en medio SIM (20mM citrato de sodio, 2% sacarosa y pH= 5,5) y añadimos 100 μM acetosiringona. Éste se cultivó a 25 °C durante al menos 5 horas. Posteriormente se preparó una dilución de agrobacterium a una D.O.<sub>600</sub>= 0,4 a la que se añadieron los explantos, manteniéndolos en agitación durante 20 minutos. Después se colocaron en placas con medio de co-cultivo (medio de regeneración (4,3 mg/l de MS Gamborg B5, 1mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), 30 g/l de sacarosa, 0,6 g/l de MES y 100 μM acetosiringona). Se mantuvieron 4 días en co-cultivo y posteriormente los explantos se lavaron con medio de cocultivo y se pasaron a medio de transcocultivo, (medio de regeneración con los antibióticos necesarios para controlar el agrobacterium (300 mg/l cefotaxima y 200 mg/l vancomicina) y para la selección de las yemas transformadas (150 mg/l kanamicina)). Estas yemas regeneradas se pasaron a medio de elongación, (medio de regeneración sin BAP y sin antibióticos), formando plantas a las que se evaluaron la ploidía con un citómetro de flujo y se comprobó la presencia del transgén mediante PCR. Las plantas transformadas que resultaron diploides se llevaron a invernadero y se autofecundaron, dando lugar a frutos cuyas

25

30

semillas se evaluaron mediante selección con kanamicina. Así se comprobó que la segregación del transgén en las generaciones T1 y T2 era consistente con una única inserción, y que las plantas de la generación T1 que dieron lugar a las de la de la generación T2 analizadas eran heterocigotas para el transgén.

5

### **3. Inoculación con MNSV.**

Cotiledones expandidos de plantas de la generación T2 segregante (y de plantas control no transformadas) fueron inoculadas mecánicamente a los 7 días de edad con el virus MNSV, en concreto con el aislado denominado MNSV $\alpha$ 5 (Díaz et al., 2004. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17: 668-675). De estas plantas se recogieron los cotiledones a los 5 días post-inoculación para la extracción de ADN genómico y ARN total necesarias para llevar a cabo los análisis mostrados.

### **4. PCR de ADN genómico de hoja.**

Se partió de 50 mg de hoja para extraer el ADN genómico siguiendo el protocolo de Dellaporta et al. (1983) (Dellaporta et al., 1983. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21). La PCR para determinar la presencia del transgén en la planta (25  $\mu$ l finales) fue llevada a cabo con 200 ng de DNA genómico, utilizando los cebadores CE404 (secuencia de pHANNIBAL) y CE409 (secuencia específica del inserto de eIF4E) (Tabla 1) cada uno a 0.3  $\mu$ M, siguiendo las indicaciones de la polimerasa Go-Taq de PROMEGA. En las plantas transgénicas se amplificó un fragmento de 175 nts o de 290 nts según el caso (plantas que comprenden SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8), en las no-transgénicas no se amplificó ningún fragmento.

### **5. Transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).**

Para la preparación de ARN total de cotiledón inoculado mecánicamente con MNSV (aislado MNSV $\alpha$ 5) se partió de 0.1 g de material vegetal siguiendo las indicaciones de TRI-Reagent (SIGMA). La transcripción reversa (RT) (utilizable para las 4 qPCRs) se hizo con 2  $\mu$ g de RNA total siguiendo las indicaciones para la

transcriptasa reversa (*Expand Reverse Transcriptase* de ROCHE) y utilizando dos cebadores, un oligodT de 14Ts (complementario a la cola poli(A) de los ARNs mensajeros) y CE294 (complementario a la secuencia de MNSV [que no tiene cola poli(A)]), cada cebador a 1  $\mu$ M (20 pmoles) en 20  $\mu$ l finales de reacción. La qPCR se hizo por triplicado, utilizando 1  $\mu$ l de la reacción de RT (100 ng de ARN) por cada punto, 0.15  $\mu$ M de cada cebador (ver a continuación) y 15  $\mu$ l de mezcla para qPCR (*Power SYBR Green PCR Master mix* de Applied Biosystems) en 30  $\mu$ l finales; Para la cuantificación del ARN mensajero de MNSV por qPCR se utilizaron los cebadores complementarios a MNSV CE293 y CE294 (Tabla 1); para la cuantificación del ARN mensajero de *eIF4E* por qPCR se utilizaron los cebadores CE147 y CE148 (Tabla 1); para la cuantificación del ARN mensajero de *eIF(iso)4E* por qPCR se utilizaron los cebadores CE149 y CE150 (Tabla 1). Para las cuantificaciones se normalizaron las muestras respecto a la amplificación obtenida del gen endógeno de la ciclofilina con los cebadores CE155 y CE156. En todas estas qPCRs se amplificó sólo un fragmento (de una longitud de 100 nts).

## 6. Northern-blot de pequeños ARNs (sRNAs).

5  $\mu$ g de ARN total fueron separados en un gel 20% Urea/poliacrilamida en tampón de electroforesis TBE 1x y posteriormente transferidos a una membrana de *nylon* cargada positivamente (ROCHE), en tampón TBE 0.5x a 80 mA durante 25 min. El ARN se fijó a la membrana con luz UV (Stratalinker, 1200 Joules x 100) y se hibridó durante 14 horas a 42 °C con una sonda de ARN marcada con digoxigenina complementaria a la secuencia completa del transgén (*DIG RNA labeling mix*, ROCHE). Los lavados se llevaron a cabo a 50 °C con 2xSSC/2% SDS (dos veces), 1xSSC/1% SDS y 0.5xSSC/1% SDS, consecutivamente. La detección del ARN marcado, hibridado a las secuencias complementarias en la membrana, se hizo con anticuerpos contra la digoxigenina (*anti-DIG Fab fragments*, ROCHE) conjugados con fosfatasa alcalina (AP), a través de su reacción con CSPD (ROCHE), siguiendo el protocolo del fabricante.

**TABLA 1.** Cebadores utilizados

CE79	<u>GGCCTCTAGACTCGAGTAGTTGAAGATTCGATG</u>	SEQ ID NO: 9
CE80	<u>GGCCGAATTCGGATCCGAGGCTGATGCACTAG</u>	SEQ ID NO: 10
CE81	<u>GGCCTCTAGACTCGAGCATTGGTAGGAAATGG</u>	SEQ ID NO: 11
CE82	<u>GGCCGAATTCGGATCCGCTACTACATTGAAGG</u>	SEQ ID NO: 12
CE163	CCCCACCCACGAGG	SEQ ID NO: 13
CE164	CCGGCGGTAAGGATC	SEQ ID NO: 14
CE404	CGCACAATCCCACCTATCCTTC	SEQ ID NO: 15
CE409	CCACGTCCTCTAGGGTTTTG	SEQ ID NO: 16
CE293	GCCCCAGGGAAATCCTAGAAT	SEQ ID NO: 17
CE294	CCGCTGTCACCACGTTCTTTA	SEQ ID NO: 18
CE147	TTCGGTTCCTTCCCTTCCAT	SEQ ID NO: 19
CE148	CCGCCGATGTAGCTTTCATC	SEQ ID NO: 20
CE149	GGTATTTTCAGCGCCCAAGA	SEQ ID NO: 21
CE150	CCAATTTATGGGACTGCGGAT	SEQ ID NO: 22
CE155	CGATGTGGAAATTGACGGAA	SEQ ID NO: 23
CE156	CGGTGCATAATGCTCGGAA	SEQ ID NO: 24

## REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado que expresa al menos un ARN de interferencia, donde dicho polinucleótido es SEQ ID NO: 2.  
5
2. Secuencia nucleotídica aislada que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1, donde:
  - a. dicha secuencia tiene la estructura A-B,
  - b. A es SEQ ID NO: 2, y
  - 10 c. B es SEQ ID NO: 3
3. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 2, donde además comprende una secuencia nucleotídica espaciadora situada entre A y B.
- 15 4. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 3, donde la secuencia nucleotídica espaciadora es un intrón o un fragmento de dicho intrón.
5. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 4, donde el intrón es SEQ ID NO: 4.  
20
6. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 5, donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 5.
7. ARN tipo *hairpin*, transcrito a partir de la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.  
25
8. ARN de interferencia generado a partir de la secuencia de ARN tipo *hairpin* según la reivindicación 7.
- 30 9. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1, o la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

5 10. Célula aislada que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1; la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6; el ARN según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8; o el vector según la reivindicación 9.

10 11. Planta que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1; la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6; el ARN según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8; el vector según la reivindicación 9 o la célula según la reivindicación 10.

12. Planta según la reivindicación 11, donde dicha planta es del género *Cucumis*.

15 13. Planta según la reivindicación 12, donde dicha planta es de la especie *Cucumis melo*.

14. Fruto de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.

20 15. Semilla o germoplasma de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.

25 16. Uso del polinucleótido según la reivindicación 1; la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6; el ARN según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8; el vector según la reivindicación 9 o la célula según la reivindicación 10, para mejorar la resistencia de al menos una planta a al menos un virus, respecto de un control.

30 17. Uso según la reivindicación 16, donde la planta es del género *Cucumis*.

18. Uso según la reivindicación 17, donde la planta es de la especie *Cucumis melo*.
- 5 19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), el virus del mosaico amarillo del calabacín o el virus del mosaico de la sandía.
- 10 20. Uso del polinucleótido según la reivindicación 1; la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6; el ARN según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8; del vector o célula que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1, para obtener al menos una planta de la especie *Cucumis melo* resistente al virus MNSV.
- 15 21. Método para obtener al menos una planta de la especie *Cucumis melo*, resistente al virus MNSV, que comprende:
- a. transformar al menos una célula de la planta de la especie *Cucumis melo* con el vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1, o la secuencia
  - 20 nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6,
  - b. seleccionar la célula transformada que comprende el vector transformado según el paso (a),
  - c. obtener al menos una planta resistente al virus MNSV a partir de la célula según el paso (b).
- 25 22. Método según la reivindicación 21, donde el vector comprende el polinucleótido según la reivindicación 2.
- 30 23. Método según la reivindicación 22, donde el vector comprende la secuencia nucleotídica según la reivindicación 6.



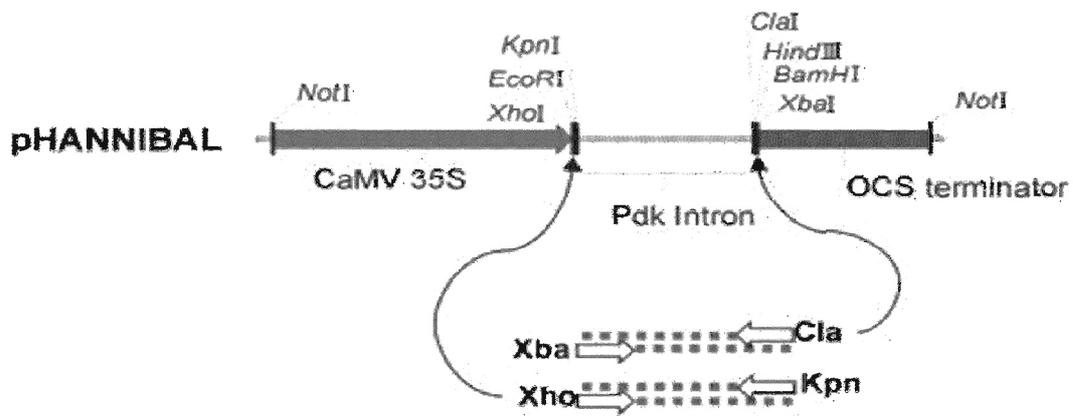


FIG. 2

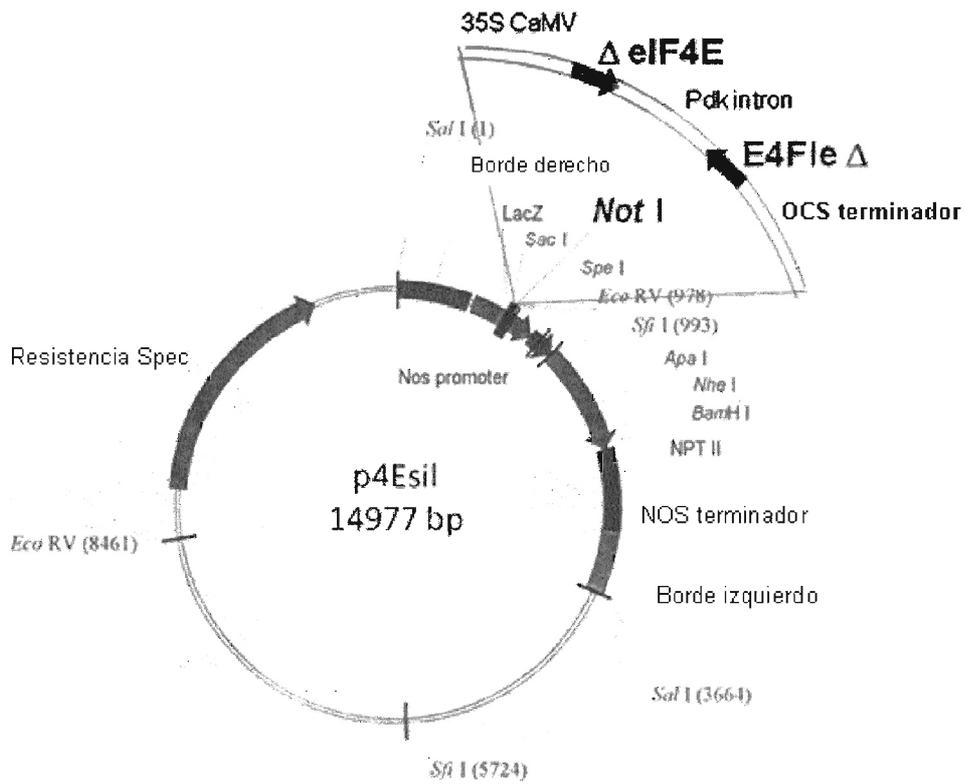


FIG. 3

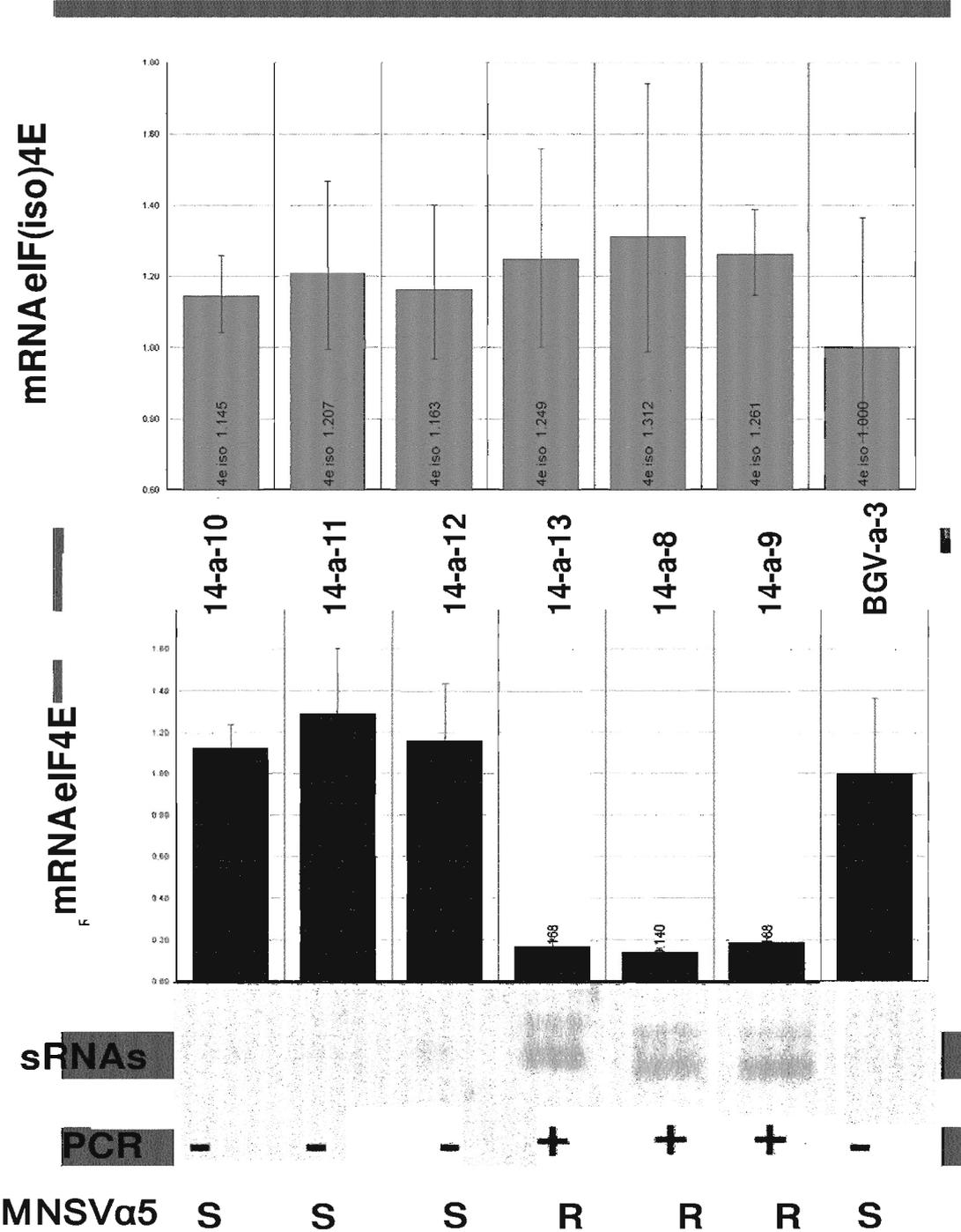


FIG. 4



# ES 2 388 789 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
 <120> Polinucleótidos y su uso para obtener plantas resistentes a virus  
 <130> ES1641.743  
 <160> 24  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 925  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo  
 <400> 1  
 ggaagcccaa gggataaagg ttttaagtcg aaaattgtac cacaaaaggc cgactcaaac 60  
 gcctaacaga aatccgagg gcggtgccat tcttcttcgg ttccttcct tccattgatt 120  
 cgattctca gataactctc cattccaca agcactgaaa acccaaatg gtagttgaag 180  
 attcgatgaa agctacatcg gcggaagatc tttctaattc cattgctaata caaacacct 240  
 gaggacgtgg cggtgacgaa gatgaggaac ttgaggaagg tgagatcgtc ggcgacgacg 300  
 acctcgactc ctccaatttg tccgcgtccc tagtgcata gcctcacct ctggagcact 360  
 cttggacctt ttggttcgat aacctatctg ccaaatcaa gcaagccacc tggggtgcgt 420  
 ctattcgacc gatctatacc ttctctaccg tcgaggagtt ctggagtgtt tacaacaaca 480  
 ttcacatcc aagcaaattg gcgatgaggg cagatttgta ctgcttcaa cataaaattg 540  
 agcctaaatg ggaagatccc gtttgtgcta atggagggaa atggactgtg aactttcaa 600  
 ggggaaaatc tgataatggc tggttgtaca cgctgcttc tatgatcgga gaacagtttg 660  
 actgtggtga tgaaatttgt ggagcagttg ttaatgttag gtctgggcag gataaaatat 720  
 caatttgac gaagaatgct tccaatgaag ctgcgcaggc gagcattgga aaacagtgga 780  
 aggagtttct tgattacaat gagagcattg gctttatatt ccacgatgac gcaaagaaat 840  
 tcgatagaca tgcaagaat aatatatgg tgtgatctgt acggtttcta gtgcgtggcg 900  
 tgggaggagg ataactcgtc ctatt 925  
 <210> 2  
 <211> 175  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo  
 <400> 2  
 gtagttgaag attcgatgaa agctacatcg gcggaagatc tttctaattc cattgctaata 60  
 caaacacct caaacacct gaggacgtgg cggtgacgaa gatgaggaac ttgaggaagg tgagatcgtc 120  
 ggcgacgacg acctcgactc ctccaatttg tccgcgtccc tagtgcata gcctc 175  
 <210> 3  
 <211> 175  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

ES 2 388 789 A1

<400> 3  
gaggctgatg cactagggac gcggacaaat tggaggagtc gaggtcgtcg tcgccgacga 60  
tctcaccttc ctcaagttcc tcactcttctg caccgccacg tcctctaggg ttttgattag 120  
caatggaatt agaaagatct tccgccgatg tagctttcat cgaatcttca actac 175

<210> 4  
<211> 829  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Intron pdk + polilinker

<400> 4  
ggatccgaat tcggtacccc aattggtaag gaaataatta ttttcttttt tccttttagt 60  
ataaaatagt taagtgatgt taattagat gattataata atatagttgt tataattgtg 120  
aaaaaataat ttataaatat attgtttaca taaacaacat agtaatgtaa aaaaatatga 180  
caagtgatgt gtaagacgaa gaagataaaa gttgagagta agtatattat ttttaatgaa 240  
tttgatcgaa catgtaagat gatatactag cattaatatt tgttttaatc ataatagtaa 300  
ttctagctgg tttgatgaat taaatatcaa tgataaaata ctatagtaaa aataagaata 360  
aataaattaa aataatattt ttttatgatt aatagtttat tatataatta aatatctata 420  
ccattactaa atatttttagt ttaaaagtta ataaatattt tgttagaaat tccaatctgc 480  
ttgtaattta tcaataaaca aatatataaa taacaagcta aagtaacaaa taatatcaaa 540  
ctaatagaaa cagtaatcta atgtaacaaa acataatcta atgctaatat aacaaagcgc 600  
aagatctatc attttatata gtattatttt caatcaacat tcttattaat ttctaaataa 660  
tactttagt tttattaact tctaaatgga ttgactatta attaaatgaa ttagtcgaac 720  
atgaataaac aaggtaacat gatagatcat gtcatttgtt tatcattgat cttacatttg 780  
gattgattac agttgggaaa ttgggttcga aatcgataag cttggatcc 829

<210> 5  
<211> 1179  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 4 + SEQ ID NO: 3

<400> 5  
gtagttgaag attcgatgaa agctacatcg gcggaagatc tttctaattc cattgctaata 60  
caaaacccta gaggacgtgg cggtgacgaa gatgaggaac ttgaggaagg tgagatcgtc 120  
ggcgacgacg acctcgactc ctccaatttg tccgcgtccc tagtgcataca gcctcggatc 180  
cgaattcggg accccaattg gtaaggaaat aattattttc ttttttctt ttagtataaa 240  
atagttaagt gatgttaatt agtatgatta taataatata gttgttataa ttgtgaaaaa 300  
ataatttata aatatattgt ttacataaac aacatagtaa tgtaaaaaaa tatgacaagt 360

ES 2 388 789 A1

gatgtgtaag acgaagaaga taaaagttga gagtaagtat attatTTTTta atgaatttga 420  
 tcgaacatgt aagatgatat actagcatta atatttGttt taatcataat agtaatttcta 480  
 gctggtttga tgaattaaat atcaatgata aaatactata gtaaaaaataa gaataaataa 540  
 attaaaataa tattTTTTta tgattaatag tttattatat aattaaatat ctataccatt 600  
 actaaatatt ttagtttaaa agttaataaa tattttGtta gaaattccaa tctgcttgta 660  
 atttatcaat aaacaaaata ttaaataaca agctaaagta acaaataata tcaaactaat 720  
 agaaacagta atctaagta acaaaacata atctaagct aatataacaa agcgcaagat 780  
 ctatcatttt atatagtatt attttcaatc aacattctta ttaatttcta aataatactt 840  
 gtagttttat taacttctaa atggattgac tattaattaa atgaattagt cgaacatgaa 900  
 taaacaaggt aacatgatag atcatgtcat tgtgttatca ttgatcttac atttggattg 960  
 attacagttg ggaaattggg ttcgaaatcg ataagcttg atccgaggct gatgcactag 1020  
 ggacgcgac aaattggagg agtcgaggtc gtcgctgccg acgatctcac cttcctcaag 1080  
 ttctcatct tcgtcaccgc cacgtcctct agggTTTTga ttagcaatgg aattagaaag 1140  
 atcttccgcc gatgtagctt tcatcgaatc ttcaactac 1179

<210> 6  
 <211> 940  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 6  
 tattgatcga taatttccct tttcttacc ccaattcatt ctagggggta ttttcagcgc 60  
 ccaagatatg gccggtgagg tagcggtgga ggggtgctgtg gcggtggcgg cggcggcgctc 120  
 agaagtggcc gattccaatc cgcagtcca taaattggag agaaaatgga ctttttggtt 180  
 tgataaccag tccaggccga agcaaggtgc tgcctggggc acctctcttc gcaaggtcta 240  
 taccttcgaa accgtcgaag aattttgggtg tttgtacgat cagttattca agccaagcaa 300  
 gttaccggcg aatgcagatt ttcacctgtt caaaactgga gttgaaccga aatgggaaga 360  
 tcccgagtgc gctaattggag gaaaatggac tgtcaccagc agtagaaagg ctaaccttga 420  
 taacatgtgg ctggaaacgt tgatggcttt gattggggaa caatttgagg agtctgatga 480  
 gatctgtggc gtagttgcca gtgtgcgcca gaggcaggac aaacttgctc tgtggaccaa 540  
 gacagcaaca aacgaggctg ctcatagtag cattggtagg aatggaagg agattatcga 600  
 cgtaaatgac aagatttctt tcagctttca tgaggatttg agaagggaaa agtcagcaaa 660  
 agctcgatac agtgtttgat cattaactgc atcatgtcga gctgctaaat tttgaggaag 720  
 atactaaaca atatattttc gacatacttg tcattgttac atttcttttc tttttgggt 780  
 ttgtttttta tttcaagacg aatcaattaa gatctttcat gttttgaaga atgcgcagaa 840  
 tttccttca atgtagtagc cttgtcaatt tattatttag atccgttctt attgagaaat 900  
 atactgatat tatgtataat taattgtatt gtatgtttac 940

ES 2 388 789 A1

<210> 7  
 <211> 291  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 7  
 gcattggtag gaaatggaag gagattatcg acgtaaataga caagatttcc ttcagctttc 60  
 atgaggattt gagaagggaa aagtcagcaa aagctcgata cagtgtttga tcattaactg 120  
 catcatgtcg agctgctaaa ttttgaggaa gatactaaac aatataatatt cgacatactt 180  
 gtcattgtta catttctttt cttctttggg tttgtttttt atttcaagac gaatcaatta 240  
 agatctttca tgttttgaag aatgcbgaga attttccttc aatgtagtag c 291

<210> 8  
 <211> 1411  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 7 + SEQ ID NO: 4 + Secuencia invertida y complementaria de SEQ ID NO: 7

<400> 8  
 gcattggtag gaaatggaag gagattatcg acgtaaataga caagatttcc ttcagctttc 60  
 atgaggattt gagaagggaa aagtcagcaa aagctcgata cagtgtttga tcattaactg 120  
 catcatgtcg agctgctaaa ttttgaggaa gatactaaac aatataatatt cgacatactt 180  
 gtcattgtta catttctttt cttctttggg tttgtttttt atttcaagac gaatcaatta 240  
 agatctttca tgttttgaag aatgcbgaga attttccttc aatgtagtag cggatccgaa 300  
 ttcggtacc caattggtaa ggaaataatt attttctttt ttccttttag tataaaatag 360  
 ttaagtgatg ttaattagta tgattataat aatatagttg ttataattgt gaaaaaataa 420  
 tttataaata tattgtttac ataaacaaca tagtaatgta aaaaaatag acaagtgatg 480  
 tgtaagacga agaagataaa agttgagagt aagtatatta tttttaatga atttgatcga 540  
 acatgtaaga tgatatacta gcattaatat ttgttttaat cataatagta attctagctg 600  
 gtttgatgaa ttaaatatca atgataaaat actatagtaa aaataagaat aaataaatta 660  
 aaataatatt tttttatgat taatagttta ttatataatt aaatatctat accattacta 720  
 aatatttttag tttaaaagtt aataaatatt ttgttagaaa ttccaatctg cttgtaattt 780  
 atcaataaac aaaatattaa ataacaagct aaagtaacaa ataatatcaa actaatagaa 840  
 acagtaatct aatgtaacaa aacataatct aatgctaata taacaaagcg caagatctat 900  
 cattttatat agtattattt tcaatcaaca ttcttattaa tttctaaata atactttag 960  
 ttttattaac ttctaaatgg attgactatt aattaaatga attagtcgaa catgaataaa 1020  
 caaggtaaca tgatagatca tgtcattgtg ttatcattga tcttacattt ggattgatta 1080  
 cagttgggaa attgggttcg aatcgataa gcttgatcc gctactacat tgaaggaaaa 1140  
 ttctgcat tcttcaaac atgaaagatc ttaattgatt cgtcttgaaa taaaaccaa 1200  
 acccaaagaa gaaaagaat gtaccaatga caagtatgtc gaaaatatat tgtttagtat 1260

ES 2 388 789 A1

cttcctcaaa atttagcagc tcgacatgat gcagttaatg atcaaact gtatcgagct 1320  
 tttgctgact tttcccttct caaatcctca tgaagctga aggaaatctt gtcatttacg 1380  
 tcgataatct ccttccattt cctaccaatg c 1411

<210> 9  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 9  
 ggcctctaga ctcgagtagt tgaagattcg atg 33

<210> 10  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 10  
 ggccgaattc ggatccgagg ctgatgcact ag 32

<210> 11  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 11  
 ggcctctaga ctcgagcatt ggtaggaaat gg 32

<210> 12  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 12  
 ggccgaattc ggatccgcta ctacattgaa gg 32

<210> 13  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 13  
 cccccaccca cgagg 15

<210> 14  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 14  
 ccggcggtaa ggatc 15

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Cucumis melo

<400> 15

cgcacaaatcc cactatcctt c	21
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Cucumis melo	
<400> 16	
ccacgtcctc tagggttttg	20
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Cucumis melo	
<400> 17	
gccccaggga aatcctagaa t	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Cucumis melo	
<400> 18	
ccgctgtcac cacggtcttt a	21
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Cucumis melo	
<400> 19	
ttcggttcct tcccttccat	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Cucumis melo	
<400> 20	
ccgccgatgt agctttcatc	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Cucumis melo	
<400> 21	
ggtattttca gcgccaaga	20
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Cucumis melo	
<400> 22	
ccaatttatg ggactgcgga t	21
<210> 23	
<211> 20	

ES 2 388 789 A1

<212> DNA  
<213> Cucumis melo

<400> 23  
cgatgtggaa attgacggaa 20

<210> 24  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Cucumis melo

<400> 24  
cggcgcataa tgctcggaa 19



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030821

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PU YANG et al., "Simple construction of chimerichairpin RNA for virus resistance in plants" Journal of Virological Methods (2010), 166,101-105, doi:10.1016/j.jviromet.2010.03.008. Todo el documento.	1-23
A	WO 2004057941 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC) 15.07.2004, todo el documento.	1-23

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
27.09.2012

Examinador  
M. Hernández Cuellar

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01H5/00** (2006.01)

**C12N15/29** (2006.01)

**C12N15/82** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01H, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PU YANG et al., "Simple construction of chimerichairpin RNA for virus resistance in plants" Journal of Virological Methods (2010), 166,101-105, doi:10.1016/j.jviromet.2010.03.008. todo el documento.	
D02	WO 2004057941 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC)	15.07.2004

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención proporciona secuencias nucleotídicas utilizadas para la formación de un RNA de interferencia capaz de silenciar de forma específica al factor de iniciación de la traducción eIF4E, pero no su isoforma eIF(ISO)4E, permitiendo con ello obtener plantas resistentes a múltiples virus como el virus del amarilleo de las venas del pepino (CVYV), el virus marroquí del mosaico de la sandía (MWMV), el virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) y el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV).

**1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

El documento D01 describe un método de construcción de hRNA quiméricos que utiliza la técnica OE-PCR. Los hRNA obtenidos se emplean para conferir a las plantas resistencia frente a virus patógenos. Estos hRNA pueden tener simultáneamente como dianas dos o múltiples secuencias de los virus patógenos o de los propios genes de la planta que los virus requieren para su infección. Tal y como se describe en la página 104 (2ª columna y Fig. 3), los autores han diseñado un hRNA quimérico que silencia los factores de iniciación de la traducción eIF4E e eIF(ISO)4E de Carica papaya.

El documento D02 describe un método para conferir a las plantas resistencia a los virus de la familia Potviridae. El método se basa en el silenciamiento génico del factor de iniciación a la traducción eIF4E. Según las reivindicaciones 3 y 5 el silenciamiento de eIF4E se consigue con un oligonucleótido antisentido complementario a RNA mensajero de eIF4E que actúa como RNA interferente (RNAi).

Las secuencias utilizadas en D01 y D02 no presentan identidad alguna con las secuencias reivindicadas en la invención. Por otra parte, y a diferencia de las secuencias del documento D01, las secuencias de la invención presentan la particularidad de que son capaces de silenciar el factor eIF4E pero no alteran la expresión de su isoforma eIF(ISO)4E. En este sentido, en opinión de esta Oficina las reivindicaciones 2-27 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986 respectivamente.