

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 248**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2007 E 07728713 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 2013231**

54 Título: **Construcciones de P15 en horquilla y su utilización**

30 Prioridad:

03.05.2006 US 418384

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

20.02.2013

73 Titular/es:

**SESVANDERHAVE N.V. (100.0%)
INDUSTRIEPARK 15
3300 TIENEN, BE**

72 Inventor/es:

**LAUBER, EMMANUELLE;
GUILLEY, HUBERT;
RICHARDS, KEN;
JONARD, GERARD;
KLEIN, ELODIE y
GILMER, DAVID**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 396 248 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

Construcciones de P15 en horquilla y su utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a construcciones de ADN en horquilla y a su utilización para inducir el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en las plantas, y más en particular en plantas de remolacha azucarera, con el objetivo de obtener plantas que presentan un aumento de la resistencia o tolerancia a un virus tal como virus de la rizomanía de la remolacha (BNYVV). La presente invención se refiere además a células y plantas transgénicas que presentan una mayor resistencia a por ejemplo BNYVV, y a su descendencia.

Antecedentes según la invención

15 Un área de gran interés es la atribución a las plantas de resistencia o tolerancia a los virus. En los cultivos, gran parte de la cosecha se puede perder debido a las infecciones víricas.

La enfermedad vírica generalizada de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) denominada rizomanía es producida por un furovirus, el virus de la rizomanía de la remolacha (BNYVV) (1, 2) que transmite a la raíz de la remolacha el hongo de trasmisión por el suelo *Polymyxa betae* (3).

La enfermedad afecta significativamente a extensiones de tierra de la zona donde se cultiva la planta de la remolacha azucarera para uso industrial en Europa, EE.UU. y Japón, y todavía se está extendiendo en varios lugares de Europa Occidental (4, 5).

Desde 1986, un número de informes y publicaciones han descrito la utilización de secuencias nucleotídicas víricas aisladas expresadas en plantas para otorgar un alto nivel de tolerancia frente a un virus infeccioso específico o incluso para otorgar un tipo de resistencia de amplio espectro contra una serie de virus relacionados (6, 7, 8). Una de las estrategias más documentadas de resistencia vírica se basa en ingeniería genética, en muchas especies cultivadas tales como patata, calabaza, pepino o tomate, es el uso de la secuencia nucleotídica vírica que bajo el control de elementos reguladores de la planta, codifica la proteína de la cubierta del virus diana (9).

Sin embargo, incluso en la resistencia mediada por la proteína de la cubierta, la expresión de un determinado nivel de resistencia en la planta transgénica puede atribuirse a diferentes mecanismos tales como la cosupresión del ARN o una resistencia mediada por la proteína provocada por la producción de una secuencia de proteínas.

En general, la secuencia vírica se transformará en una célula o cultivo tisular apropiados de las especies vegetales utilizando un sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* o un procedimiento de transferencia de genes directo según las restricciones del procedimiento de cultivo tisular o cultivo celular que puede aplicarse con éxito en una especie dada. Una planta completa puede regenerarse y la expresión del transgén caracterizarse.

Aunque la remolacha azucarera se ha conocido como una especie recalcitrante en el cultivo celular, limitando el alcance de las aplicaciones prácticas de ingeniería genética en esta especie, hay ahora un número creciente de informes de la transformación lograda y de regeneración de plantas completas (38). También se han publicado (11, documento WO 91/13159) unos pocos ejemplos de la tolerancia a la ingeniería al BNYVV mediante la transformación y expresión de la secuencia de la proteína de la cubierta del BNYVV en el genoma de la remolacha azucarera, a pesar de que rara vez comunican datos sobre el conjunto plantas transgénicas de remolacha azucarera funcionales (12). En particular, los informes muestran datos limitados sobre el nivel de resistencia real observado en condiciones infectadas con plantas transgénicas de remolacha azucarera transformadas con un gen que codifica una secuencia de la proteína de la cubierta del BNYVV (13, 14).

Un paquete tecnológico completo que incluye un procedimiento de transformación de remolacha azucarera y la utilización expresión de la de la secuencia de proteínas de la cubierta del BNYVV como foco de resistencia en la planta transgénica de remolacha azucarera obtenida por dicho procedimiento de transformación se ha descrito en la solicitud de patente WO 91/13159.

Basándose en la información publicada, no puede concluirse que el mecanismo de resistencia mediado por la proteína de la cubierta proporciona cualquier potencial de otorgar a la planta de remolacha azucarera una inmunidad total a la infección por BNYVV inhibiendo completamente la multiplicación del virus y los mecanismos de difusión. Para identificar un mecanismo de resistencia que bloquea significativamente la propagación del virus en una etapa inicial del proceso de infección sería un criterio principal de éxito para desarrollar dicha resistencia transgénica. Además, dicha resistencia diversificaría los mecanismos de resistencia disponibles.

Debido a que la enfermedad se demuestra que se expande en muchos países o áreas, a una velocidad que depende de la combinación de numerosos factores ambientales y agrícolas locales, existe un gran interés en la diversificación y mejora de los mecanismos de resistencia genética que puedan, solos o en combinación, otorgar

una estrategia de larga duración en las variedades actuales y futuras de plantas de remolacha azucarera que se cultivan para uso industrial.

El genoma del furovirus de vena amarilla necrótico de remolacha (BNYVV) consta de cinco ARN plus con sentido, dos de los cuales (los ARN 1 y 2) codifican funciones esenciales para la infección de todas las plantas, mientras que las otras tres (los ARN 3, 4 y 5) están involucrados en la infección mediada por vectores de raíces de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). El movimiento de célula a célula de BNYVV está gobernado por un conjunto de tres genes víricos sucesivos, que se superponen ligeramente en ARN 2 conocidos como el bloque génico triple (BGT), que codifican, en orden, las proteínas víricas P42, P13 y P15 (los productos génicos se designan por su Mr calculado en kilodalton).

En la descripción siguiente, los genes BGT y las proteínas correspondientes se identificarán por los siguientes términos: BGT-1, BGT-2, BGT-3 o por su número de proteína vírica codificada P42, P13 y P15. Las contrapartidas de BGT están presentes en otros furovirus y en potex-, -carla y hordeivirus (15, 18, 19, 20, 21 y 22). La tabla 1 adjunta representa los virus que tienen una secuencia del BGT-3, el peso molecular del BGT-3 de dichos virus, su hospedador y referencias.

Se ha demostrado anteriormente que la expresión independiente de P15 a partir de una especie de replicación vírica de ARN conocido como "replicón", procedente del ARN 3 de BNYVV, inhibe la infección por BNYVV al interferir el movimiento célula a célula (16).

A fin de introducir un virus que comprende una secuencia de ácido nucleico del BGT-3 en una célula de la planta o una planta, se ha propuesto incorporar una construcción de ácido nucleico que comprende dicha secuencia de ácido nucleico BGT-3 unida operativamente a una o más secuencias reguladoras activas en dicha planta (documento WO 98/07875).

Sin embargo, mientras que la expresión de la secuencia vírica del BGT-3 natural en una planta transgénica permite el bloqueo de dicha infección vírica, la presencia de dicha secuencia natural puede provocar efectos perjudiciales sobre las propiedades agronómicas de las plantas o células vegetales transformadas. La presente invención consiste en el descubrimiento de que algunas secuencias víricas del BGT-3 mutadas (modificadas genéticamente) descritas en la presente invención son muy útiles en la ingeniería genética de las plantas de remolacha (azucarera) resistentes a BNYVV.

Objetivos según la invención

La presente invención pretende proporcionar procedimientos más fiables y medios para otorgar resistencia vírica, por ejemplo, resistencia vírica a BNYVV, resistencia a BNYVV ventajosamente extrema, en las plantas, más en particular sobre plantas de remolacha azucarera mediante la modificación genética o la transformación de las células vegetales.

La presente invención tiene como objetivo además proporcionar células vegetales modificadas genéticamente o transformadas que se pueden obtener como tales, que se pueden regenerar en plantas que presentan una mayor tolerancia o resistencia al virus vegetal por ejemplo BNYVV.

Aún otro objetivo consiste en proporcionar descendencia resistente, por ejemplo, descendencia resistente al BNYVV, semillas y otros órganos o estructuras reproducibles que se originan a partir de dichas plantas y células vegetales transformadas.

Sumario de la invención

Parece que la función de la secuencia natural BGT-3 en el movimiento de célula a célula implica por lo menos en parte de "interconectar" interacciones entre un elemento de la planta anfitriona (preferentemente un componente de los plasmodesmos) y un elemento de origen vírico (preferentemente otra proteína vírica implicada en el movimiento célula a célula). La interrupción del dominio de la secuencia natural BGT-3 (que supuestamente interactúa con el elemento anfitrión) o del dominio de la secuencia natural BGT-3 (que supuestamente interactúa con el elemento vírico) permite la inhibición del movimiento célula a célula.

Además, parece que dichas mutaciones específicas en una secuencia natural BGT-3 permiten la producción de mutantes producidos en una planta transgénica, que todavía van a interactuar con el elemento vírico, pero no con el elemento anfitrión. Estos mutantes podrían competir por sitios de unión en el elemento vírico de la secuencia natural BGT-3 producida en la etapa inicial de la infección vírica, y abortar la infección al inhibir el movimiento vírico a una célula adyacente.

Ventajosamente, la sustitución de por lo menos un aminoácido en otro aminoácido diferente de dicha secuencia se hace en regiones ricas en aminoácidos hidrófilos normalmente presentes en la superficie de la proteína en su configuración natural.

Preferentemente, la mutación o mutaciones puntuales permiten la sustitución de uno o dos aminoácidos en uno o dos aminoácidos diferentes.

5 En la Tabla 1 adjunta, se describen ejemplos preferidos de dichos virus que tienen una secuencia vírica natural BGT-3, el peso molecular del péptido BGT-3 correspondiente, sus anfitriones y una referencia. Las secuencias de BNYVV nucleotídica P15 y de aminoácidos específicas naturales están también ya descritas (17, secuencias naturales adjuntas como referencia en la presente memoria).

10 Las mutaciones puntuales anteriormente descritas se realizaron por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

15 En los mutantes anteriores que contenían la mutación puntual se ensayó su capacidad para activar el movimiento célula a célula de un mutante vírico (con una secuencia del BGT-3 disfuncional, preferentemente un mutante de BNYVV con un gen P15 disfuncional) cuando se expresa en trans desde un replicón. Estos mutantes fueron incapaces de activar dicho movimiento y se probó su capacidad para determinar para inhibir la infección con un virus BGT-3 natural coinoculado, preferentemente coinoculado con un BNYVV natural, cuando la forma mutante de la secuencia del BGT-3, preferentemente el gen P15, se expresó desde un replicón.

20 Se ha descubierto inesperadamente que el procedimiento de modificación genética (preferentemente una mutación puntual) podría utilizarse para obtener una secuencia vírica BGT-3 modificada (preferentemente una secuencia P15 de BNYVV modificada), que es capaz de bloquear la infección del virus sin producir efectos perjudiciales cuando se incorpora en el genoma de una planta o una célula de la planta.

25 Se entiende por "ser capaz de bloquear la infección vírica en una planta o una célula de la planta", la posibilidad de obtener un alto grado de tolerancia por la planta o célula de la planta transformada por dicha secuencia vírica BGT-3 modificada para dicha infección vírica, en particular la posibilidad de asegurar el bloqueo rápido y total de la multiplicación del virus y los mecanismos de difusión en la planta, preferentemente el bloqueo de la multiplicación del virus BNYVV y los mecanismos de difusión en una planta de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), incluyendo la remolacha forrajera, Swiss Chard y remolacha de mesa, que también puede estar sometida a dicha infección BNYVV.

35 Dicha tolerancia o resistencia podría medirse fácilmente por diversos procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia.

Preferentemente, las modificaciones genéticas en la secuencia vírica natural BGT-3 son mutaciones puntuales en las porciones de dicha secuencia vírica natural implicada en los mecanismos de movimientos víricos célula a célula.

40 La presente descripción también está relacionada con las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos víricas BGT-3 modificadas obtenidas (recuperadas) por dicho procedimiento (modificación y selección), más preferentemente las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos modificadas P15 de BNYVV obtenidas (recuperadas) por dicho procedimiento.

45 Preferentemente, dichas secuencias nucleotídicas y de aminoácidos P15 del BNYVV se seleccionan del grupo que consiste en las siguientes secuencias nucleotídicas o de aminoácidos correspondientes:

SEC. ID n° 1:

ATGGTGCTTGTGGTTGCAGTAGCTTTATCTAATATTGTATTGTACATACTTGCCGGTTGT 60

M V L V V A V A L S N I V L Y I V A G C

GTTGTTGTCAGTATGTTGTA^{CT}CACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120

V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y

GCGGGAGCAATTTTTAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGACAGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180

A G A I F K G S G C I M D R N S F A Q F

GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240

G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E

CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300

H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T

GAACTATTTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGCGGTGTTTTTGTTCATGATA 360

E T I F I I L S R L F G L A V F L F M I

TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTTGGTATCATAGATAA 399

C L M S I V W F W Y H R *

SEC. ID n° 3:

ATGGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60

M V L V V K V D L S N I V L Y I V A G C

GTTGTTGTCAGTATGTTGTA^{CT}CACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120

V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y

GCGGGAGCAATTTTTAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGCGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180

A G A I F K G S G C I M A A N S F A Q F

GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240

G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E

CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300

H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T

GAAACTATTTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGCGGTGTTTTTGTTCATGATA 360

E T I F I I L S R L F G L A V F L F M I

TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTGGTATCATAGATAA 399

C L M S I V W F W Y H R *

SEC ID nº 5:

ATGGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTGT 60

M V L V V K V D L S N I V L Y I V A G C

GTTGTTGTCAGTATGTTGTA^{CT}CACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120

V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y

GCGGGAGCAATTTTTAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGACAGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180

A G A I F K G S G C I M D R N S F A Q F

GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240

G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E

CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300

H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T

GAAACTATTTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGATGATTTTTTGTTCATGATA 360

E T I F I I L S R L F G L D D F L F M I

TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTGGTATCATAGATAA 399

C L M S I V W F W Y H R *

En la descripción siguiente, las diversas secuencias BGT-3 de BNYVV modificadas se denominarán en adelante "mutantes de P15", identificadas por la siguiente referencia: BNP15-Alal, correspondientes a SEC. ID. nº 1; BNP15-Ala4 correspondiente a SEC. ID. nº 3; BNP15-Asp9, correspondiente a la SEC. ID. nº 5.

Las secuencias nucleotídicas y las correspondientes de aminoácidos de SEC. ID. nº 1, SEC. ID. nº 3 y SEC. ID. nº 5 se puede comparar con la SEC. ID. nº 7, que es la secuencia de la secuencia nucleotídica y de aminoácidos P15 natural (SEC. ID. nº 8) ya descrita (17).

5 La presente descripción se refiere también al vector que comprende dicha secuencia nucleotídica modificada o un fragmento de la misma pudiendo estar unido operativamente a una o más secuencia(s) reguladora(s) activa(s) en una planta o una célula de la planta. Preferentemente, dicho vector es un plásmido que comprende ya dicha(s) secuencia(s) reguladora(s) activa(s) en una planta o una célula de la planta. El vector también puede ser una secuencia de nucleótidos de casete consistente en sólo una secuencia de nucleótidos de interés que debe insertarse en el genoma de una planta (en este caso una secuencia del BGT-3 modificada de BNYVV o un fragmento de la misma), que está asociado con uno o más promotores, secuencias terminales de nucleótidos y posiblemente secuencias reguladoras suficientes para obtener una expresión eficiente de las secuencias de interés, pero que está aún más (sustancialmente) exenta de otras secuencias de nucleótidos procariotas o plasmídicas (véase el documento EP 1 174 513).

15 La presente descripción se refiere también a un procedimiento para inducir una resistencia a un virus que comprende una secuencia del BGT-3, preferentemente uno de los virus descritos en la Tabla 1 adjunta, y más preferentemente el virus BNYVV, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

20 - preparación de una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se ha modificado genéticamente según el procedimiento según la descripción, o que comprende un fragmento de dicha secuencia modificada, y que está unido operativamente a una o más secuencias reguladoras activas en una planta o una célula de la planta,

25 - transformación de la célula de la planta con la construcción de ácido nucleico, y
- posiblemente regeneración de la planta transgénica a partir de la célula de la planta transformada.

Preferentemente, dicho procedimiento se utiliza para inducir una resistencia al BNYVV en una planta de remolacha azucarera o de una célula de remolacha azucarera. Dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

30 - preparación de una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico modificada obtenida por el procedimiento según la descripción, o que comprende un fragmento de dicha secuencia modificada, preferentemente preparando una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. nº 1, SEC. ID. nº 3 o SEC. ID. nº 5, o un fragmento de cualquiera de estos, estando operativamente unida a una o más secuencias reguladoras activas en una planta,

35 - transformación de la célula de la planta remolacha azucarera con la construcción de ácido nucleico, y
40 - posiblemente regenerar la planta de remolacha azucarera transgénica a partir de la célula de la planta transformada de remolacha azucarera.

45 La presente descripción se refiere también a la planta transgénica obtenida (recuperada) o a la célula de la planta transgénica resistente a una infección por un virus que comprende una secuencia del BGT-3, preferentemente uno de los virus descritos en la Tabla 1 adjunta, más preferentemente el virus BNYVV, comprendiendo dicha planta o célula de la planta una construcción de ácido nucleico que tiene una secuencia del BGT-3 de ácido nucleico modificada, que está operativamente unida a una o más secuencias reguladoras capaces de ser activas en una planta o una célula de la planta.

50 Preferentemente, dicha secuencia modificada de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las SEC. ID. nº 1, SEC. ID. nº 3 y SEC. ID. nº 5, que está unida operativamente a una o más secuencias reguladoras activas en una planta o una célula de la planta.

55 Preferentemente, la célula es una célula estomática y la secuencia reguladora comprende una secuencia promotora y una secuencia terminadora capaz de ser activa en una planta. Dicha secuencia promotora puede ser constitutiva o puede obtenerse de una secuencia promotora exterior, y se selecciona preferentemente del grupo que consiste en el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y/o el promotor poliubiquitina de *Arabidopsis thaliana*.

60 Ventajosamente, la secuencia promotora es un promotor específico de la raíz, que principalmente es capaz de ser activo en el tejido de la raíz de las plantas, en particular de las plantas de remolacha azucarera, tales como el promotor *par* o el gen de la hemoglobina de *Perosponia andersonii*.

65 Un aspecto adicional de la presente descripción se relaciona con un tejido de planta transgénica tal como fruto, tallo, raíz, tubérculo, semilla de la planta transgénica según la invención o una estructura reproducible (preferentemente

seleccionada del grupo que consiste en callos, brotes o embriones) obtenida de la planta transgénica o la célula de la planta según la invención.

5 Las técnicas de transformación de la planta, el cultivo tisular y la regeneración utilizados en el procedimiento según la descripción son bien conocidos por los expertos en la materia. Dichas técnicas son preferentemente las descritas en las solicitudes de patente internacional WO 95/101778, WO 91/13159 (correspondiente a la Solicitud de Patente Europea EP-B-0517833), WO 98/07875. Los protoplastos de células oclusivas, son los tejidos preferidos para la transformación de plantas de remolacha azucarera.

10 Estas técnicas se utilizan preferentemente para la preparación de plantas transgénicas de remolacha azucarera y células de la planta.

15 Entre las plantas de remolacha azucarera transformadas con las secuencias BGT-3 (P15) mutadas o genéticamente modificadas según la invención (SEC. ID. n° 1, 3, 5), se descubrió que las plantas presentaban claramente fuerte resistencia a BNYVV en bioanálisis y estos descubrimientos se confirmaron en ensayos de campo. Se encuentra fuerte resistencia a BNYVV, en particular, entre las plantas transformadas con la SEC. ID. n° 3.

20 La producción de una proteína P15 mutada parece ser que desencadena la resistencia. El análisis de transferencia Western demostró que la expresión de la proteína P15 mutada en plantas muy resistentes, transformadas con la SEC. ID. n° 3, se redujo fuertemente pero no obstante todavía está presente, lo que indica que el mecanismo de silenciamiento obtenido no era todavía lo suficientemente eficaz para degradar cada ARNm de P15.

25 La cantidad de p15 producida por plantas transgénicas superproductoras de p15 que no son silenciados por PTGS se comparó con la cantidad de p15 producida por plantas resistentes en las que el mecanismo de PTGS es activo.

30 Una caracterización molecular más detallada del material vegetal demostró la presencia de pequeñas moléculas de ARN complementarias tanto de las cadenas con sentido como antisentido de la secuencia del BGT-3 (P15) WT del BNYVV. En general se cree que la presencia de estos pequeños ARN con sentido y antisentido están innegablemente unidos a un mecanismo de resistencia inducida por silenciamiento génico tras la transcripción (por sus siglas en inglés, PTGS).

35 El análisis de transferencia Northern de plantas resistentes infectadas con el virus BNYVV confirmó la ausencia de ARN2 del BNYVV en comparación con las referencias sensibles. Debido a la especificidad de secuencias muy dependiente de la homología de las pequeñas moléculas de ARN con P15 generadas en las plantas resistentes, estas transcripciones activan el proceso de degradación de todo (entero) el ARN2.

En estas plantas se generó un mecanismo de PTGS sin ser activado por la construcción génica de por sí, más probablemente como resultado de los reestructuraciones de las inserciones.

40 Se ha descubierto inesperadamente que las construcciones en horquilla con las secuencias BGT-3 (p15) mutadas o fragmentos de los mismos en la orientación con sentido y antisentido de manera eficiente pueden activar de manera eficiente PTGS, dirigiéndose a la degradación del ARN2 de BNYVV por ejemplo Especialmente la secuencia mutada del BGT-3 de la SEC. ID. n° 3 (posiblemente más modificada por ejemplo para inhibir la traducción) y fragmentos o partes de los mismos que han demostrado ser muy eficaces en el desencadenamiento de PTGS de una manera muy reproducible.

50 Sin embargo, un aspecto adicional se refiere por tanto a estas moléculas de ARN bicatenario autocomplementario, a construcciones de ácidos nucleicos, en particular, construcciones de ADN o secuencias nucleotídicas, vectores o casetes de expresión para su expresión en células vegetales, a procedimientos y utilizaciones basados en los mismos.

55 Se proporciona una construcción de ácido nucleico, en particular una construcción de ADN, que altera la expresión de una proteína del movimiento BGT-3, comprendiendo dicha construcción de ácido nucleico una primera secuencia de ADN capaz de "expresar" en una célula un fragmento con sentido de una BGT-3 mutada de BNYVV que tiene por ejemplo una SEC. ID. n° 1, 3 ó 5 (modificada) o un fragmento o parte de dicha SEC. ID. n° 1, 3 ó 5 (modificada), y una segunda secuencia de ADN capaz de "expresar" en dicha célula una secuencia antisentido de dicha BGT-3 mutada del BNYVV que tiene una SEC. ID. n° 1, 3 ó 5 (modificada), o una parte o fragmento de dicha SEC. ID. n° 1, 3 ó 5 (modificada). Por "expresión" se entiende principalmente "transcripción" o la "generación de un fragmento de ARN (m)" (véase el párrafo siguiente). La transcripción puede ser seguida por la "traducción". Sin embargo, preferentemente la traducción se inhibe (ver a continuación). Por (modificada)" se entiende que la secuencia en cuestión se puede modificar más, por ejemplo, para inhibir la traducción. La expresión "SEC. ID. n° 3", por ejemplo, significa que se refiere a la SEC. ID. n° 3, como tal, así como a las secuencias SEC. ID. n° 3 "modificadas" tal como la SEC. ID. n° 10.

65 Se proporciona como tal una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente que comprende la secuencia SEC. ID. n° 3 (modificada) o un fragmento de la misma, y que comprende una secuencia antisentido de dicha SEC. ID. n°

3 (modificada) o una secuencia antisentido de dicho fragmento de la SEC. ID. nº 3 (modificada), en el que la secuencia vírica del BGT-3 cuando se transcribe en una célula es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario que se autocomplementa. Es proporcionada por ejemplo, una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC. ID. nº 3 y una secuencia antisentido de la SEC. ID. nº 3, (b) una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de la SEC. ID. nº 3 y una secuencia antisentido de dicho fragmento de la SEC. ID. nº 3, (c) una secuencia de nucleótidos que comprende una SEC. ID. nº 3 modificada y una secuencia antisentido de dicha SEC. ID. nº 3 modificada; y (d) una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de la SEC. ID. nº 3 modificada y una secuencia antisentido de dicho fragmento de la SEC. ID. nº 3 modificada; en la que dicha secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente cuando se transcribe en una célula es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario que se autocomplementa.

Preferentemente, las secuencias con sentido y antisentido están comprendidas en una sola secuencia de ácido nucleico, una sola cadena o molécula de ADN. Sin embargo, pueden estar presentes en o sobre dos secuencias diferentes de ácido nucleico, cadenas de ADN o moléculas que pueden emparejar bases y formar de este modo una molécula de ARN autocomplementario bicatenario.

Cuando se transcribe, la secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente produce una molécula de ARN con una secuencia de nucleótidos o una secuencia de ácido nucleico que comprende

1/ una secuencia de nucleótidos con sentido de por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos (nt) consecutivos, preferentemente por lo menos aproximadamente 15, 20 más preferentemente por lo menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, o incluso más preferentemente de aproximadamente 400 nucleótidos (nt) consecutivos – por ejemplo, la secuencia de SEC. ID. nº 3 (modificada) o un fragmento de la misma - que tiene entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia con por lo menos parte de la secuencia de p15 BNYVV WT (SEC. ID. nº 7), y

2/ una secuencia de nucleótidos antisentido que es suficientemente complementaria a esta secuencia de nucleótidos con sentido. Como tal, la molécula de ARN que se expresa (se transcribe y preferentemente no se traduce) es capaz de formar una molécula de ARN autocomplementario bicatenario cuando se expresa (transcribe) en cantidades suficientes, tal como una estructura de ARN artificial en horquilla, con un vástago de ARN bicatenario por apareamiento de bases entre las regiones con secuencia de nucleótidos con sentido y antisentido. Por "cantidades suficientes" se entiende una cantidad que basta para inducir PTGS, preferentemente para inducir un silenciamiento génico completo.

Las construcciones autocomplementarios en horquilla también se denominan construcciones en horquilla p15 (hp15) mutadas (BNYVV).

Preferentemente, las secuencias nucleotídicas con sentido y antisentido son entre si complementos. Deseablemente, existen menos de aproximadamente 50% de emparejamientos incorrecto entre los fragmentos de ARN con sentido y antisentido en la región complementaria, más deseablemente menos de aproximadamente 30% de emparejamiento incorrecto, preferentemente menos de aproximadamente 20% de emparejamiento incorrecto, más preferentemente menos de aproximadamente 10% de emparejamiento incorrecto, todavía más preferentemente menos de aproximadamente 5, 4, 3, 2 ó 1% de emparejamiento incorrecto.

Preferentemente, la longitud total de la secuencia de nucleótidos con sentido o secuencia de ADN es de por lo menos aproximadamente 10 nt, 15 nt, aún más preferentemente por lo menos de aproximadamente 20 nt, 25 nt, particularmente por lo menos aproximadamente de 50 nt, más particularmente por lo menos de aproximadamente 100 nt, especialmente por lo menos aproximadamente 150 nt, más especialmente por lo menos aproximadamente 200 nt, 250 nt, 300 nt, muy especialmente por lo menos aproximadamente 350 nt o aproximadamente 400 nt.

Se apreciará que cuanto mayor es la longitud total o completa de la secuencia de nucleótidos con sentido, los requisitos resultan menos severos para la identidad de secuencia entre la secuencia de nucleótidos con sentido total o completa (en este caso en particular una secuencia correspondiente a la SEC. ID. nº 3 o parte de la misma) y la correspondiente secuencia en el gen diana (en este caso, por ejemplo, la secuencia BNYVV P15 WT). Preferentemente, la secuencia de nucleótidos con sentido debe tener una identidad de secuencia en toda su longitud de por lo menos aproximadamente 75% con la secuencia de BNYVV P15 WT o parte de la misma, particularmente de por lo menos aproximadamente 80%, más particularmente de por lo menos aproximadamente 85%, muy especialmente de aproximadamente 90%, especialmente de aproximadamente 95%, más especialmente de aproximadamente 99% o incluso más (incluso, preferentemente menos de 100%). La secuencia del BGT-3 mutada preferida, p15-ala4 (SEC. ID. nº 3), tiene tres bases mutadas en comparación con WT p15, lo que corresponde a un 99,24% de homología o identidad de secuencia. Otra secuencia preferida según la invención, SEC. ID. nº 10, tiene cinco bases mutadas en comparación con WT p15, que corresponde a una homología o identidad de secuencia del 98,74% (véase la figura 8).

Sin embargo, se prefiere que la secuencia de nucleótidos con sentido incluya siempre una secuencia de aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos, en particular de aproximadamente 20 nt, sobre todo de aproximadamente 50 nt, especialmente de aproximadamente 100 nt, muy especialmente de aproximadamente 150 nt con 100% de identidad de secuencia con la parte correspondiente del ácido nucleico diana (la secuencia BNYVV WT P15 en este caso). Preferentemente, para calcular la identidad de secuencia y diseñar la secuencia de nucleótidos con sentido correspondiente, el número de huecos debe minimizarse, en particular para las secuencias de nucleótidos con sentido más cortas.

Preferentemente, la secuencia del BGT-3 con sentido modificada comprende por lo menos las siguientes modificaciones comparadas con la secuencia P15 WT (natural): el gen WT P15 está mutado en la posición 3 de ácido nucleico en la que G se sustituye por C, otra sustitución específica comprende la mutación de ácido nucleico en la posición 158 en la que A se sustituye por C, las sustituciones más específicas están dirigidas a mutaciones en las posiciones 160 y 161 en la que AG se sustituyen por GC, más otra mutación en la posición 397 en la que T se sustituye por C (SEC. ID. nº 10, véase también la figura 8). Dicha modificación en la posición 3 inhibe una iniciación de la traducción y la modificación en la posición 397 destruye la señal de terminación de la traducción. Otra secuencia del BGT-3 con sentido modificada preferida es la SEC. ID. nº 3, que contiene las siguientes modificaciones en comparación con el gen WT p15: una mutación de la posición 158 de ácido nucleico en la que A se sustituye por C, y más sustituciones específicas dirigidas a mutaciones en las posiciones 160 y 161 en la que AG se sustituyen por GC.

La longitud de la secuencia de nucleótidos antisentido está determinada en gran medida por la longitud de la secuencia de nucleótidos con sentido, y preferentemente corresponderá a la longitud de la última secuencia. Sin embargo, es posible utilizar una secuencia antisentido que difiere en longitud aproximadamente 10% a 50%, más preferentemente en aproximadamente 10% a aproximadamente 15% de la secuencia de nucleótidos con sentido.

De manera similar, la secuencia de nucleótidos de la región antisentido viene determinada en gran medida por la secuencia de nucleótidos de la región con sentido, y preferentemente es idéntica al complemento de la secuencia de nucleótidos de la región transcrita. Particularmente con regiones antisentido más largas, es sin embargo posible utilizar secuencias antisentido con una identidad de secuencia menor con el complemento de la secuencia de nucleótidos con sentido, preferentemente con una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 75%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, en particular de por lo menos aproximadamente 85%, más particularmente con una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90%, especialmente de por lo menos aproximadamente 95% de la secuencia con el complemento de la secuencia de nucleótidos con sentido.

No obstante, se prefiere que la secuencia de nucleótidos complementaria incluya siempre una secuencia de aproximadamente 10, aproximadamente 15 nucleótidos (nt) consecutivos, preferentemente de aproximadamente 20 nt, más preferentemente de aproximadamente 50 nt, especialmente de aproximadamente 100 nt, muy especialmente de aproximadamente 150 nt con una identidad de secuencia del 100% con el complemento de una parte correspondiente de la secuencia de nucleótidos con sentido. Es evidente que la longitud del tramo de los nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia del 100% con el complemento de la secuencia de nucleótidos con sentido no puede ser más larga que la propia secuencia de nucleótidos con sentido. Otra vez, preferentemente el número de huecos debe minimizarse, particularmente para las secuencias antisentido más cortas. Además, se prefiere también que la secuencia antisentido tenga una identidad de secuencia entre aproximadamente 75% a 100% con el complemento de la secuencia diana.

El orden de las secuencias de nucleótidos con sentido y antisentido en las secuencias de nucleótidos o construcciones de ADN se cree que no es crítico.

Preferentemente, las secuencias con sentido y antisentido en la secuencia vírica BGT-3 modificada están intercaladas por una secuencia de nucleótidos enlazadora o separadora, que es preferentemente un intrón. Este intrón preferentemente es un intrón vegetal, más preferentemente un intrón de remolacha (azucarera). Preferentemente, se utiliza un intrón de genes muy transcritos, más preferentemente de genes de remolacha azucarera muy transcritos. Preferentemente, los genes muy transcritos son genes del ARN ribosómico (24, 25).

Preferentemente, el fragmento BGT-3 con sentido en la secuencia del BGT-3 modificada genéticamente comprende una SEC. ID. nº 1, 3 o 5 (modificada), o partes o fragmentos de la misma. Por ejemplo secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según la invención puede comprender por lo menos 100 nt a 399 nt, 150 nt a 399 nt, o 163 nt a 399 nt de la SEC. ID. nº 1, 3 ó 5 (modificada).

Aún más preferentemente, el fragmento BGT-3 con sentido en la secuencia del BGT-3 modificada genéticamente comprende una SEC. ID. nº 3 (modificada) o partes o fragmentos de la misma. Por ejemplo la secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente puede comprender por lo menos 100 nt a 399 nt, 150 nt a 399 nt, o 163 nt a 399 nt de una SEC. ID. nº 3 (modificada). Aún más preferentemente, el fragmento BGT-3 con sentido en la construcción de ADN se compone de una SEC. ID. nº 3 (modificada) o partes (fragmentos) de la misma, por ejemplo, puede constar de por lo menos 100 nt a 399 nt, 150 nt a 399 nt o 163 nt a 399 nt de la SEC. ID. nº 3 (modificada).

- 5 Ventajosamente, el fragmento BGT-3 con sentido en la secuencia del BGT-3 modificada genéticamente según la invención está además mutado para contener por lo menos un codón de terminación de la traducción a fin de inhibir la traducción. Ventajosamente, se destruye el o los codones de terminación de dicho fragmento BGT-3 con sentido en la secuencia del BGT-3 modificada genéticamente según la invención. El codón de iniciación de la traducción también se pueden modificar para inhibir la iniciación de la traducción. El codón de iniciación ATG de la SEC. ID. n° 3, por ejemplo, se modificó en ATC y el codón de terminación TAA se modificó en CAA (véase la figura 8). Esta secuencia concreta se denomina SEC. ID. n° 3 "modificada". Un experto en la materia puede concebir muchas otras posibilidades.
- 10 Las construcciones preferidas son construcciones de ADN o secuencias de nucleótidos en las que el fragmento BGT-3 con sentido en la secuencia vírica del BGT-3 modificada genéticamente comprende la SEC. ID. n° 10. Aún más preferidos son las construcciones de ADN en el que el fragmento BGT-3 con sentido en la secuencia del BGT-3 modificada genéticamente consiste en la SEC. ID. n° 10.
- 15 Las secuencias del BGT-3 modificadas genéticamente según la invención comprenden la SEC ID n° 9 o n° 13. Aún más preferidas son las secuencias del BGT-3 modificadas genéticamente que consisten en la SEC. ID. n° 9 o n° 13.
- 20 Ventajosamente, la secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según la invención está unida operativamente a un promotor, preferentemente un promotor heterólogo que es activo en las raíces. Las secuencias activas preferidas del promotor en el tejido de la raíz de las plantas son el promotor *par* y el gen de la hemoglobina de *Perosponia andersonii*. Los más preferidos son los promotores específicos de la raíz de remolacha que son activos en las raíces de una planta de remolacha. Opcionalmente, una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y/o la poliadenilación u otras secuencias reguladoras (por ejemplo, secuencias que aumentan la transcripción) puede estar operativamente unida a la construcción de ADN según la invención.
- 25 Como tal, la invención se refiere además a un vector, en particular un vector de expresión o casete de expresión, que comprende una genéticamente modificada BGT-3 secuencia según la invención, operativamente enlazada con una o más secuencias reguladoras.
- 30 La presente invención se refiere además a una molécula de ARN autocomplementario bicatenario expresada por una secuencia del BGT-3 genéticamente modificada según la invención o por un vector o casete de expresión según la invención.
- 35 Otro aspecto según la invención se refiere a una célula anfitriona transformada con una secuencia del BGT-3 modificada genéticamente según la invención y/o con un vector según la invención y/o con una molécula de ARN según la invención. La célula anfitriona es preferentemente una célula vegetal, más preferentemente una célula de remolacha y más preferentemente una célula de remolacha azucarera.
- 40 La presente invención se refiere además a una planta transformada, preferentemente una planta transformada de remolacha, más preferentemente una planta de remolacha azucarera transformada, que comprende en su genoma una construcción de ADN y/o un vector según la invención, y/o que comprende en sus células una molécula de ARN según la invención.
- 45 Preferentemente, una construcción de ADN que comprende la secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según la invención y/o un vector que comprende la misma se utiliza para transformar material vegetal tal como las células vegetales y/o tejidos vegetales. Preferentemente, la secuencia del BGT-3 modificada según la invención está integrado de forma estable en el genoma de una célula (planta). Alternativamente, puede estar presente en forma episómica.
- 50 La presente invención por lo tanto también se refiere a células de plantas transformadas o modificadas genéticamente que comprenden dicha construcción de ADN y/o un vector y/o una molécula de ARN según la invención. También es posible utilizar las moléculas de ARN según la invención por sí mismas para otorgar resistencia o tolerancia a BNYVV (ver a continuación).
- 55 A continuación la presente invención se refiere a una planta transgénica, preferentemente una planta de remolacha azucarera, regenerada en una célula anfitriona, preferentemente una célula vegetal, que se transforma con una construcción de ADN, un vector y/o una molécula de ARN según la invención y que presenta una expresión alterada de una proteína de movimiento BGT-3. Preferentemente, la expresión de la molécula BGT-3 (p15) (BNYVV) está fuertemente reducida en comparación con una referencia (no transformada o sin transformar con una construcción en horquilla p15 según la invención).
- 60 Se proporciona en la presente memoria un ejemplo para la expresión (muy) reducida de p15 del BNYVV. La expresión de p15 del BNYVV en presencia de una molécula de ARN en horquilla p15 según la invención por lo tanto debe ser menor que la expresión en ausencia de la misma, preferentemente es sólo aproximadamente 25%, en particular sólo aproximadamente 10%, más particularmente es sólo de aproximadamente 5% de la expresión en
- 65

ausencia de la molécula de ARN con horquilla p15 según la invención o de la secuencia vírica BGT-3 genéticamente modificada que la codifica.

5 Ventajosamente BNYVV p15 expresión se reduce a un nivel que ya no es detectable. La presencia de la proteína p15 puede ser detectado por transferencia Western utilizando anticuerpos p15. Alternativamente, los niveles de esta proteína se puede determinar a través de la espectrometría de masa como es bien conocido en la técnica. Más preferentemente de no proteína p15 o piezas de la proteína se realizan a todos, lo que significa que la totalidad de su ARNm se degrada o inactivados por lo menos. Ventajosamente la expresión del gen p15 WT del virus es silenciado en las células vegetales y plantas transformadas con los procedimientos o medios según la invención.

10 Ventajosamente, no existe replicación vírica en una planta o célula de la planta transformada con una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente, construcción de ADN, vector o molécula de ARN según la invención.

15 Aún, otro aspecto se refiere a la descendencia de las plantas transformadas según la invención que comprende en el genoma de por lo menos parte de sus células una secuencia vírica BGT-3 genéticamente modificada y/o un vector según la invención, y/o que comprende en por lo menos parte de sus células una molécula de ARN según la invención. Preferentemente este material (la secuencia vírica modificada, el vector y/o la molécula de ARN) está presente en sustancialmente todas las células de la planta. Ventajosamente, la descendencia de una planta transformada según la invención presenta una expresión alterada de una proteína de movimiento BGT-3 (BNYVV). La misma estrategia se puede aplicar a todos los virus listados en la Tabla 1, sin embargo, la secuencia de P15 descrita en la presente memoria sólo se dirigirá al virus BNYVV. Los ejemplos de descendencia son tejidos vegetales como el fruto, el tallo, la raíz, el tubérculo y la semilla.

25 Aún otro aspecto según la invención se refiere a las semillas de una planta transformada, preferentemente una planta de remolacha azucarera transformada, según la invención.

La presente invención también se refiere a estructuras (vegetativamente) reproducibles, tales como callos, yemas, embriones, procedentes de una planta transformada según la invención.

30 Ventajosamente, esta descendencia, semillas, estructuras reproducibles, etc. comprende(n) en el genoma de por lo menos parte de sus células, preferentemente en sustancialmente todas sus células, una secuencia del BGT-3 vírica genéticamente modificada y/o un vector según a la invención y/o una molécula de ARN según la invención. Ventajosamente estos materiales vegetales pueden regenerarse en plantas o materiales vegetales resistentes al BNYVV.

35 Aún otro aspecto se refiere a la utilización de dichas semillas o estructuras vegetativamente reproducibles para la regeneración a partir de las mismas de una planta, que preferentemente es una planta de remolacha azucarera, que es resistente contra el BNYVV por ejemplo, y/o presenta una tolerancia mucho mayor a BNYVV.

40 Aún otro aspecto se refiere a un procedimiento para alterar la expresión de la totalidad del ARN2 y más en particular de una proteína de movimiento BGT-3 (BNYVV) en una planta o una célula de la planta, que comprende las etapas siguientes:

45 - Introducir en las células de una planta, que preferentemente es una planta de remolacha azucarera, una secuencia vírica BGT-3 (construcción de ADN) modificada genéticamente y/o un vector que comprende la misma según la invención para obtener una célula de la planta transformada, en la que la expresión en dichas células de planta de una molécula de ARN que es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario altera la expresión de la totalidad de ARN2 y más en particular de una proteína del movimiento BGT-3 (BNYVV) en dicha planta o célula de la planta y, ventajosamente, la expresión de cualquier otra proteína vírica localizada en el mismo ARN en dicha planta o dicha célula.

55 Aún otro aspecto según la invención se refiere a un procedimiento para inducir el silenciamiento tras la transcripción del gen del conjunto del ARN2 y más en particular de una proteína del movimiento BGT-3 (BNYVV) en una planta o una célula de la planta, que comprende la etapas siguientes:

60 - Introducir en las células de una planta, que preferentemente es una planta de remolacha azucarera, una secuencia modificada genéticamente vírica BGT-3 (construcción de ADN) y/o un vector que comprende la misma según la invención para obtener una célula de la planta transformada, en donde la expresión en dichas células vegetales de una molécula de ARN que es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario activa un mecanismo de silenciamiento génico tras la transcripción.

Con un procedimiento de la invención tal como se presenta en los párrafos anteriores el conjunto de ARN2 se degrada ventajosamente.

Todavía otro aspecto según la invención se refiere a un procedimiento para convertir a una planta o una célula de la planta en resistente o más tolerante a un virus de plantas presentado en la Tabla 1, por ejemplo BNYVV, que comprende las etapas siguientes:

- 5 - Introducir en las células de una planta, que preferentemente es una planta de remolacha azucarera, una secuencia vírica (construcción de ADN) del BGT-3 modificada genéticamente y/o un vector que comprende la misma según la invención para obtener una célula vegetal transformada, en la que la expresión en dichas células vegetales de una molécula de ARN que es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario es responsable de la resistencia y/o de una mayor tolerancia de dicha planta al virus de la planta, por ejemplo BNYVV.

10 Aún otro aspecto se refiere a un procedimiento para inducir resistencia extrema (altos niveles de inmunidad) en una planta o una célula de la planta, que comprende las etapas siguientes:

- 15 - Introducir en las células de una planta, que preferentemente es una planta de remolacha azucarera, una secuencia vírica BGT-3 (construcción de ADN) modificada genéticamente y/o un vector que comprende la misma según la invención para obtener una célula vegetal transformada, en la que la expresión en dichas células vegetales de una molécula de ARN que es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario es capaz de inducir una resistencia extrema (altos niveles de inmunidad) en plantas que comprenden una construcción de ADN y/o un vector según la invención, por lo menos en parte, con preferencia esencialmente todas sus células.

20 Todavía otro aspecto se refiere a un procedimiento para reducir (significativamente) o bloquear la propagación de un virus [preferentemente uno como el descrito en la Tabla 1 tal como el BNYVV] dentro de una planta, que comprende las etapas siguiente:

- 25 - Introducir en las células de una planta, que preferentemente es una planta de remolacha azucarera, una secuencia vírica BGT-3 (construcción de ADN) modificada genéticamente y/o un vector que comprende la misma según la invención para obtener una célula de la planta transformada, en la que la expresión en dichas células vegetales de una molécula de ARN que es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario es capaz de reducir o bloquear la propagación del virus dentro de la planta transformada de este modo o célula vegetal. La propagación del virus se puede reducir/bloquear reduciendo/bloqueando la multiplicación vírica (en todos o en determinados tipos de células), el transporte del virus en toda la planta (por ejemplo, bloqueando el transporte a larga distancia o el movimiento de célula a célula), o confinando la propagación del virus a determinados tejidos exclusivamente (por ejemplo, al parénquima vascular y no a las células de floema). Ventajosamente, la propagación del virus se reduce/bloquea hasta tal punto que en las raíces de las plantas transformadas con una construcción en horquilla p15 según la invención, se mide un valor de DO_{405} (véase el Ejemplo 7) de 0,2 o menos. Mejor, este valor es como máximo de 0,1. Aún mejor este valor de OD_{405} como máximo de 0,05, como máximo de 0,01 o incluso próximo a cero (niveles por debajo del límite de detección).

40 Alternativamente, una molécula de ARN según la invención se pueden introducir en células vegetales con objeto de alterar la expresión de una proteína del movimiento BGT-3 del BNYVV, inducir silenciamiento génico tras la transcripción de una proteína del movimiento BGT-3, haciendo a una planta o una célula de la planta resistente o más tolerante a BNYVV, con el objetivo de inducir resistencia extrema en una planta o una célula de la planta, o con objeto de bloquear o reducir la propagación del virus en la planta.

45 Un procedimiento según la invención puede comprender además la etapa de regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada.

Los procedimientos comprenden (por lo menos) una etapa de preparación de una construcción adecuada y de transformación de la planta (célula) con el mismo para alcanzar uno de los efectos anteriores (véase el párrafo 36).

50 Las plantas transformadas según la invención, ventajosamente, se ha descubierto que proporcionan niveles mayores de resistencia a BNYVV en comparación con los focos naturales de tolerancia/resistencia al virus (tal como 'Rizor', 'Holly' o *Beta maritima* subsp. *maritima* registro WB42 focos de resistencia bien conocidas en la técnica).

55 La transformación de la planta con una secuencia del BGT-3 genéticamente modificada según la invención, preferentemente una capaz de formar una estructura de horquilla, parece bloquear y/o reducir significativamente la propagación del virus a través del sistema radicular. Ventajosamente, el virus se puede evitar por la presente memoria para alcanzar el sistema de transposición a larga distancia. Ventajosamente, la transformación de plantas según la invención impide y/o reduce significativamente la multiplicación del virus en la corteza. Los procedimientos de la invención disminuyen ventajosamente la capacidad del virus para mantener un potencial infeccioso en el suelo.

60 La resistencia procedente de patógenos además parecía diferente de la que presentan en los focos naturales. La resistencia derivada de patógenos, como tal, puede combinarse ventajosamente con los mecanismos naturales de resistencia.

65

Ventajosamente, la combinación de diferentes focos de resistencia (natural y procedente de patógenos) puede conducir a un aumento de estabilidad (adicional) de la variedad resistente a la rizomanía y puede ayudar a asegurar una resistencia a largo plazo a uno o más patotipos (por lo menos a un patotipo).

5 **Breve descripción de los dibujos**

10 La figura 1 representa una secuencia vírica del BGT-3 modificada genéticamente según la invención (figuras 1a y b, SEC. ID. nº 9) con una secuencia de nucleótidos de p15 con sentido mutada (SEC. ID. nº 10, modificaciones comparadas con el WT en negrita subrayado en la presente memoria) y una secuencia de nucleótidos de p15 antisentido (cursiva negrita, SEC. ID. nº 12) intercalada con una secuencia intrónica de 91 pb (negrita subrayado, SEC. ID. nº 11). Unos pocos nucleótidos en la Fig. 1b se indican en cursiva (doble subrayado). Éstos no pertenecen a p15 ni al intrón pero todavía están presentes, ya que son los restos de la estrategia de clonación, que envuelven enzimas de restricción. Una construcción que comprende la SEC. ID. nº 9 también se conoce como construcción 2 de hp15.

15 La figura 2 representa una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente (figuras 2a y b, SEC. ID. nº 13) con una secuencia de nucleótidos p15 con sentido mutada y una secuencia de nucleótidos p15 antisentido (negrita cursiva) intercalada con una secuencia intrónica de 550 pb (negrita subrayado, SEC. ID. nº 14). En la Fig. 2b unos pocos nucleótidos están indicados en cursiva (doble subrayado). Éstos no pertenecen a p15 ni al intrón pero todavía están presentes, ya que éstos son los restos de la estrategia de clonación, que envuelven enzimas de restricción. Las secuencias de nucleótidos con sentido y antisentido de p15 en la presente memoria son las mismas que las proporcionadas en la Fig. 1b. Una construcción que comprende la SEC. ID. nº 13 se denomina también construcción 3 de hp15.

20 La figura 3 representa la secuencia p15 de WT (SEC. ID. nº 7 y nº 8).

25 La figura 4 es una representación esquemática del vector pFGC5941 en el que se introdujo el gen BNp15-ala4 en orientación con sentido y antisentido, intercalado por una secuencia intrónica del gen A de la chalcona sintasa de petunia (CHSA). Promotor 35S de CaMV: promotor 35S de CaMV; OCS3: señal de poliadenilación del gen de la octopina sintasa; MAS3: señal de poliadenilación del gen de la manopina sintasa; BAR: gen de resistencia al herbicida Basta; Km: gen de resistencia a kanamicina; RB, LB: límites de ADN-t a la izquierda y derecha.

30 Las figuras 5 es una representación esquemática de los vectores pS140 y pS142 en los que se introdujo el gen HNp15-ala4 en orientación con sentido y antisentido, intercalada por una secuencia intrónica de remolacha de 550 nt (Fig. 5A, pS140, construcción 3) y 91 nt (Fig. 5B, pS142, construcción 2), respectivamente. Promotor 35S de CaMV: promotor 35S de CaMV; NOS 3': terminador de nopalina sintasa; Kan: gen de resistencia a la kanamicina; RB, LB: límites izquierdo y derecho del ADN-t.

35 La figura 6 es un análisis estadístico de los datos de PTGS obtenidos con construcción 1 (hp15 con el intrón de petunia). Cada histograma representa el número (Y) y el tamaño (-Y) de las lesiones por hoja infectada. /: sin lesión, v: virus St1234, tp: tampón; hp: horquilla. En el eje Y: 1, 10, 20, 30, 100. En el eje -Y: 4. En el eje X, de izquierda a derecha: v; v + tampón MA; v + hpGF; v + hp15.

40 La figura 7 es un análisis estadístico de los datos de PTGS obtenidos con las construcciones 1, 2 y 3 respectivamente. Cada histograma representa el número (Y) y el tamaño (-Y) de las lesiones por hoja infectada. /: sin lesión, v: virus St1234, tp: tampón; hp: horquilla; hp15: construcción 1; pS140: construcción 3; pS142: construcción 2. En el eje Y: 1, 10, 20, 30, 40. En el eje -Y: 4. En el eje X, de izquierda a derecha: v; v + tampón MA; v + hpGF; v + hp15 (construcción 1); v + pS140 (construcción 3); v + pS142 (construcción 2).

45 La figura 8 destaca las diferencias en la SEC. ID. nº 10 en comparación con una secuencia WT hp5 BNYVV representada por SEC. ID. nº 7.

50 La figura 9 proporciona los resultados de una prueba de ELISA como medida para la presencia de partículas de virus en las raíces de las plantas cultivadas en el suelo infectado con BNYVV. Biotest Rz2007-003-A. THPR:- transformación con PEG.

55 La figura 10 proporciona los resultados de una prueba de ELISA como medida para la presencia de partículas de virus en las raíces de las plantas cultivadas en suelo infectado con BNYVV. Biotest Rz2007-002A. THPR: transformación con PEG. AgHP: transformación con *Agrobacterium*.

60 La figura 11 representa el vector pS138 tal como se utiliza en los experimentos de transformación génica directa con PEG.

65 La figura 12 representa el vector pS143 tal como se utiliza para la transformación mediada por *Agrobacterium*.

Descripción detallada

5 En una forma de realización preferida según la invención, la secuencia de nucleótidos BGT-3 modificada con sentido y antisentido que está comprendida en una molécula, lo que significa que el fragmento de ARN BGT-3 mutado con sentido y el fragmento de ARN BGT-3 mutado antisentido están comprendidos en una sola molécula de ARN. Ventajosamente, la molécula de ARN según la invención es capaz de plegarse de modo que dichos fragmentos de ARN comprendidos en la misma forman una molécula de ARN bicatenario en horquilla.

10 Como se utiliza en la presente memoria "horquilla de ARN" se refiere a cualquier molécula de ARN bicatenario autohibridada. En su representación más sencilla, un ARN en horquilla consiste en un vástago de doble cadena formado por las cadenas de ARN que se hibridan, conectadas por un solo bucle de ARN monocatenario, y también se conoce como un "ARN cacerola con mango". Sin embargo, la expresión "ARN en horquilla" también pretende incluir estructuras secundarias de ARN más complicadas que comprenden secuencias de ARN bicatenario autohibridado, pero también protuberancias internas y bucles. La estructura secundaria específica adaptada se determinará por la energía libre de la molécula de ARN, y se puede predecir para diferentes situaciones utilizando el programa informático apropiado tal como FOLDRNA (23).

20 Alternativamente, las secuencias de nucleótidos BGT-3 con sentido y antisentido modificadas pueden estar presentes en o sobre dos moléculas o secuencias de nucleótidos separadas, que pueden administrarse o suministrarse a una célula vegetal de forma simultánea y/o consecutiva, preferentemente sin que pase demasiado tiempo entre la primera y segunda secuencia de nucleótidos que se proporciona para que, cuando se transcribe, una molécula de ARN bicatenario pueda formarse por emparejamiento de bases.

25 Preferentemente, las secuencias de ADN según la invención se integra de manera estable en el genoma de la célula vegetal que se transforma con las secuencias víricas BGT-3 modificadas genéticamente según la invención y/o con un vector que comprende éstas.

30 Alternativamente, el transgén que comprende una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según la presente invención puede estar situado en un episoma o un vector que se autorreplica. Ejemplos de vectores que se autorreplican son los virus, en particular los geminivirus.

35 Una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según la presente invención también se puede transformar directamente en el genoma del plástido. La tecnología de transformación en plástidos se describe de manera exhaustiva en las patentes US nº 5.451.513, nº 5.545.817 y nº 5.545.818, en la solicitud PCT nº WO 95/16783, y en McBride et al. (1994) *Proc. Acad. Sci. USA* 91: 7301-7305. La técnica básica para la transformación en cloroplastos implica introducir regiones de ADN plástido clonado que flanquean un marcador seleccionable junto con la secuencia de nucleótidos de interés en un tejido diana adecuado, utilizando, por ejemplo, biolística o transformación de protoplastos (por ejemplo, cloruro de calcio o transformación mediada por PEG). Las 1 a 1,5 kb que flanquean las regiones facilitan la recombinación homóloga con el genoma del plástido y por lo tanto permiten la sustitución o modificación de regiones específicas del plástoma (genoma del cloroplasto).

45 Los procedimientos para la transformación y para la regeneración de plantas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han utilizado vectores plasmídicos Ti para el suministro de ADN extraño, así como la captación directa de ADN, liposomas, electroporación, microinyección y microproyectiles. Además, las bacterias del género *Agrobacterium* pueden utilizarse para transformar células vegetales.

50 Numerosos vectores de transformación disponibles para la transformación vegetal son conocidos por los expertos en la materia, y las construcciones de ADN o nucleótidos según la presente invención (que comprende la secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente) se puede utilizar junto con cualquiera de dichos vectores. La selección de vectores depende de la técnica de transformación preferida.

55 Los marcadores de selección utilizados rutinariamente en la transformación incluyen el gen *npt1* que confiere resistencia a la kanamicina y antibióticos relacionados (Messing & Vierra. *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan et al. *Nature* 304: 184-187 (1983)), el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (White et al., *Nucl. Acids Res.* 18: 1062 (1990), Spencer et al. *Theor. Appl. Genet.* 79: 625-631 (1990)), el gen *hph*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger y Diggelmann, *Mol. Cell. Biol.* 4: 2929-2931), el gen *dhfr* que confiere resistencia al metatrexato (Bourouis et al., *EMBO J.* 2 (7): 1099-1104 (1983)), el gen *EPSPS* que confiere resistencia al glifosato (patentes US nº 4.940.935 y nº 5.188.642), el gen *aac* (6') que codifica la resistencia a la gentamicina (WO 94/01560), o los genes *pat* e *imi* bien conocidos en la técnica.

65 Muchos vectores pueden conseguirse para la transformación o la modificación genética de células vegetales utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Éstos suelen ser portadores de por lo menos una secuencia límite de ADN-T e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984)). Los vectores típicos adecuados para transformación con *Agrobacterium* incluyen los vectores binarios pCIB200 y pCIB2001, así como el vector binario pCIB10 y derivados para la selección de higromicina de los mismos (véase, por ejemplo, la patente US nº

5.639.949). La ventaja de la utilización de técnicas con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de plantas es la presencia de un número bajo de copias y reestructuraciones mínima en comparación con otras técnicas.

La transformación sin la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* evita el requisito de secuencias de ADN-T en el vector de transformación seleccionado y por consiguiente los vectores que carecen de estas secuencias se utilizan además de vectores tales como los descritos anteriormente que contienen secuencias de ADN-T. Las técnicas de transformación que no se basan en *Agrobacterium* incluyen la transformación mediante transferencia directa de genes, el bombardeo de partículas, la captación de protoplastos (por ejemplo PEG y electroporación), transformación mediada por polen, transformación de ARN vegetal mediada por virus, microinyección, la transformación de tejidos embrionarios heridos y/o degradados por enzimas y/o de embriones inmaduros, la transformación mediada por liposomas, y similares. La elección del vector depende en gran medida de la selección preferida para la especie que se está transformando y el marcador de selección que se utiliza. Los vectores típicos adecuados para la transformación sin *Agrobacterium* incluyen pCIB3064, pSOG19 y pSOG35 (véase, por ejemplo la patente US nº 5.639.949).

Los componentes del sistema de expresión pueden modificarse, por ejemplo para aumentar la expresión de los fragmentos de ARN con sentido y antisentido.

"Casete de expresión", como se utiliza en la presente memoria significa una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos específica en una célula anfitriona apropiada, que comprende un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que está operativamente unida a señales de terminación.

El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés, en el presente caso una secuencia vírica BGT-3 genéticamente modificada según la invención, puede ser híbrido, lo que significa que por lo menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a por lo menos uno de sus demás componentes. El casete de expresión también puede ser uno que es de origen natural pero se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Por lo general, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al anfitrión, es decir, la secuencia de ADN específica de la casete de expresión no se encuentra de forma natural en la célula anfitriona y debe haber sido introducida en la célula anfitriona o en un ascendiente de la célula anfitriona por un episodio de transformación.

Los casetes de expresión pueden comprender también cualesquiera de las secuencias adicionales requeridas o seleccionadas para la expresión (y posiblemente la traducción) del transgén. Dichas secuencias incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, terminadores de la transcripción, secuencias externas para potenciar la expresión tal como intrones, secuencias vitales y secuencias previstas para la focalización del producto génico a orgánulos específicos y compartimentos celulares. Estas casetes de expresión pueden ser luego fácilmente transferidas a los vectores de transformación de plantas descritos anteriormente. La siguiente es una descripción de diversos componentes de casetes de expresión típicas.

"Elementos reguladores" se refiere a las secuencias implicadas en otorgar la expresión de una secuencia de nucleótidos. Los elementos reguladores comprenden usualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés y señales de terminación. También pueden comprender secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos o de interés. En el presente caso, la traducción de la secuencia de nucleótidos con sentido de la secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente se inhibe preferentemente, por modificación del codón de iniciación y/o de terminación de la traducción prevista (ver a continuación).

La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción sólo cuando la célula anfitriona se expone a algún estímulo externo concreto. En el caso de un organismo pluricelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico para un tejido particular u órgano o etapa de desarrollo.

El promotor unido operativamente a las secuencias de nucleótidos con sentido y/o antisentido según la invención puede ser un promotor natural de la célula que va a transformarse. El promotor puede ser alternativamente un promotor heterólogo, por ejemplo un promotor específico de tejido, un promotor regulado por el desarrollo, un promotor constitutivo o un promotor inducible. Los promotores apropiados son bien conocidos por el experto en la materia. En la presente invención se prefieren los promotores heterólogos fuertes que son activos en tejidos de la raíz o son principalmente activos en la misma (cuando la expresión en otros tejidos no se desea).

Una variedad de terminadores de transcripción pueden conseguirse para su uso en casetes de expresión. Estos son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transgén y de su correcta poliadenilación. Los terminadores de la transcripción apropiados son los que se conoce que funcionan en plantas e incluyen el terminador 35S de CaMV, el terminador tm/, el terminador de la opalina sintasa y el terminador rbcS E9 del guisante y similares.

Numerosas secuencias se han encontrado que potencian la expresión génica desde dentro de la unidad de transcripción y estas secuencias pueden utilizarse junto con las secuencias BGT-3 modificadas genéticamente de la invención para aumentar su expresión en plantas transgénicas. Por ejemplo, diversas secuencias intrónicas tales como los intrones del gen *Adhl* del maíz se ha demostrado que potencian la expresión. Además, un número de secuencias principales no traducidas procedentes de virus se sabe también que potencian la expresión.

Preferentemente, por lo menos un promotor "expresable en plantas" está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos con sentido y/o a la secuencia de nucleótidos antisentido (ver anteriormente). Preferentemente, las secuencias de nucleótidos con sentido y antisentido en la secuencia del BGT-3 modificada genéticamente según la invención están bajo el control del mismo o de los mismos promotor(es).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "promotor expresable en plantas" significa una secuencia de ADN que es capaz de controlar (iniciar) la transcripción en una célula de la planta. Esto incluye cualquier promotor de origen vegetal, pero también cualquier promotor de origen no vegetal que es capaz de dirigir la transcripción en una célula de planta o tejido, es decir, determinados promotores de origen vírico o bacteriano tales como el CaMV35S, el promotor del virus del trébol subterráneo nº 4 o nº 7, o los promotores génicos del ADN-T.

A continuación, se describen algunas opciones con respecto a la elección y arreglos del promotor, en función de si están comprendidas o no las secuencias de nucleótidos BGT-3 con sentido y antisentido modificadas genéticamente según la invención en una única secuencia de nucleótidos o en la cadena de ADN.

Las secuencias de nucleótidos con sentido y antisentido en la secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según la invención preferentemente están bajo el control de un único promotor, especialmente cuando ambos están comprendidos en una sola secuencia de nucleótidos. Pueden, sin embargo, también estar cada uno bajo el control de un promotor distinto (por ejemplo cuando se proporcionan en 2 secuencias diferentes). Es decir, la secuencia de ADN con sentido puede estar unida operativamente a un primer promotor y la secuencia de ADN antisentido unida operativamente a un segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor pueden ser el mismo promotor o pueden ser promotores diferentes. El promotor puede ser un promotor divergente o bidireccional capaz de iniciar la transcripción de secuencias de ADN en cada lado del promotor.

Cuando el fragmento de ARN con sentido y el fragmento de ARN antisentido están comprendidos en o se expresan como dos moléculas de ARN (dos cadenas de ARN separadas), la secuencia de ADN con sentido y la secuencia de ADN antisentido pueden estar operativamente unidas por ejemplo a un promotor bidireccional. Alternativamente, la secuencia de ADN con sentido puede estar operativamente unida a un primer promotor y la secuencia de ADN antisentido operativamente unida a un segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor pueden ser el mismo promotor o pueden ser promotores diferentes.

La secuencia antisentido puede ser la cadena de ADN complementaria de la secuencia del BGT-3 con sentido modificada en dicha molécula de ADN (en este caso una molécula de ADN que tiene dos cadenas). En este caso, es posible tener un promotor operativamente unido a dicha secuencia de ADN con sentido o a dicha antisentido, y un primer sitio de recombinación específico para el sitio entre dicho promotor y dicha secuencia de ADN transcrita o complementaria, y un segundo sitio de recombinación específico para el sitio en el extremo 3' de dicha secuencia de ADN con sentido y antisentido, en el que dichos primero y segundo sitios de recombinación específicos para el sitio son capaces de invertir dicha primera o segunda secuencia de ADN entre dichos primero y segundo sitios de recombinación específicos para el sitio en presencia de una recombinasa específica para el sitio. Como resultado de dicha inversión, dicho primer promotor es entonces capaz de expresar dicha secuencia de ADN con sentido (o antisentido, dependiendo de a qué secuencia de ADN estaba originalmente unida al promotor). La célula vegetal comprende además preferentemente una recombinasa específica para el sitio capaz de reconocer dichos sitios de recombinación específicos para el sitio.

La construcción o la secuencia de ADN según la invención, aparte de una secuencia de nucleótidos vírica BGT-3 con sentido y antisentido modificada, ventajosamente comprende además una secuencia de nucleótidos enlazadora o separadora entre las secuencias de ADN que codifican los fragmentos de ARN transcritos y complementarios.

En ausencia de dicha secuencia separadora, la molécula de ARN todavía será capaz de formar un ARN bicatenario, particularmente si la secuencia de nucleótidos con sentido y antisentido son mayores de aproximadamente 10 nucleótidos y parte de la secuencia de nucleótidos con sentido y/o antisentido se utilizará para formar el bucle que permite el apareamiento de bases entre las regiones con secuencia de nucleótidos con sentido y antisentido y la formación de un ARN bicatenario. Es de esperar que no existan límites de longitud o requisitos de secuencias relacionados con la región separadora, siempre que estos parámetros no interfieran con la capacidad de las regiones de ARN con la secuencia con sentido y antisentido de nucleótidos para formar un ARN bicatenario. En una forma de realización preferida, la región separadora varía en longitud de 5 a aproximadamente 1000 pb.

En una forma de realización preferida, el ARN en horquilla formado por la región con sentido y antisentido y en su caso la región separadora, es un ARN en horquilla artificial. Por "ARN en horquilla artificial" o "estructura tallo-bucle de ARN artificial", se entiende que dicho ARN en horquilla no es que se produzca de forma natural en la naturaleza.

Una secuencia de nucleótidos separadora o enlazadora preferida es una secuencia intrónica, preferentemente una en orientación con sentido, que mejora la eficiencia de la reducción de la expresión del ácido nucleico diana, p15 de BNYVV o ARN2 de BNYVV en el presente contexto. La mejora en la eficiencia se puede expresar como un aumento en la frecuencia de las plantas en las que se produce el silenciamiento o como un aumento en el nivel de reducción de p15 de BNYVV o de la expresión de ARN2.

Las secuencias intrónicas de nucleótidos preferidas proceden de genes vegetales, como los supuestos genes de ARN ribosómico o genes muy transcritos de plantas. Estos intrones pueden proceder de cualquier gen vegetal, sin embargo, preferentemente proceden de genes de plantas dicotiledóneas, por ejemplo, de genes de petunia, aún más preferentemente proceden de genes de remolacha (azucarera). También es posible utilizar sólo una parte de estos intrones (vegetales), por ejemplo por lo menos en los bordes que contienen señales de corte y empalme (ver a continuación). El conjunto de estos intrones y partes de los mismos en el contexto de la invención se denominan "fragmentos de intrón" o "secuencias intrónicas".

Una longitud preferida para dichas secuencias intrónicas de nucleótidos está comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 1000 pb, preferentemente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 600 pb, más preferentemente entre aproximadamente 90 y aproximadamente 550 pb. Las secuencias intrónicas preferidas comprenden la SEC. ID. nº 11 ó 14, o incluso más preferentemente consisten en la SEC. ID. nº 11 ó 14.

El tratamiento con intrones depende de las secuencias de unión de corte y empalme 5' y 3' apropiadas y por lo menos éstas deben mantenerse de una secuencia intrónica. Las secuencias de consenso para estas uniones se han obtenido de los ARNm tanto de animales como de plantas, pero sólo unos pocos nucleótidos son conocidos por ser invariables.

Ambos intrones de remolacha descritos a continuación (SEC. ID. nº 11 y nº 14) se descubrió que son muy adecuados, sin embargo, la secuencia más corta se comportó ligeramente mejor que la secuencia más larga.

La molécula de ARN, que comprende las secuencias de nucleótidos con sentido y antisentido capaces de formar, por ejemplo, una estructura en horquilla, que son producidas por la transcripción de los genes híbridos, también se pueden introducir directamente en una célula de la planta. Dichas moléculas de ARN podrían producirse por ejemplo por

- clonación de la región de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN con una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos con sentido de por lo menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene entre 75 y 100% de identidad de secuencia con por lo menos parte de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés y una secuencia de nucleótidos complementaria que incluye por lo menos 10 nucleótidos consecutivos, preferentemente por lo menos aproximadamente 15 nt, 20 nt, especialmente por lo menos aproximadamente 50 nt, más particularmente por lo menos aproximadamente 100 nt, especialmente por lo menos aproximadamente 150 nt, más especialmente por lo menos aproximadamente 200 nt, 250 nt, 300 nt, muy especialmente por lo menos aproximadamente 350 nt o aproximadamente 400 nt, y que tiene entre aproximadamente 75% a aproximadamente 100% de identidad de secuencia con el complemento de por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos con sentido, por lo que el ARN es capaz de formar un ARN bicatenario por apareamiento de bases entre las regiones con secuencia de nucleótidos con sentido y antisentido dando como resultado, por ejemplo una estructura de ARN en horquilla, bajo el control de un promotor adecuado para el reconocimiento por una ARN polimerasa dependiente de ADN en una reacción de transcripción *in vitro*, tal como, pero sin limitarse a un promotor específico de T7-polimerasa;
- realización de una reacción de transcripción *in vitro* añadiendo, entre otras la ARN-polimerasa dependiente de ADN adecuada, así como los reactivos necesarios para generar las moléculas de ARN; y
- aislamiento de las moléculas de ARN.

Los procedimientos de transcripción *in vitro*, así como otros procedimientos para la producción de ARN *in vitro* son bien conocidos en la técnica y pueden conseguirse kits comerciales. Los procedimientos para la introducción directa de ARN en células vegetales también pueden conseguirse por el experto e incluyen, pero no se limitan a electroporación, microinyección y similares.

La descripción también proporciona además: una planta resistente o tolerante a BNYVV que comprende en el genoma de por lo menos parte de sus células, preferentemente en sustancialmente todas sus células, una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según la invención y/o un vector que comprende la misma, que cuando se transcribe produce una molécula de ARN que desencadena PTGS y la destrucción de ARN2 del BNYVV por la presente. También se proporciona una planta resistente o tolerante a BNYVV que comprende en por lo menos parte de sus células, preferentemente en sustancialmente todas sus células, una molécula de ARN según la invención para conseguir el efecto descrito anteriormente.

Una "planta" se refiere a cualquier planta o parte de una planta en cualquier etapa de desarrollo. En ésta se incluyen también cultivos de recortes, de células o de tejidos y semillas. Tal como se utiliza junto con la presente invención, la expresión "tejido vegetal" incluye, pero no se limita a, plantas completas, células vegetales, órganos vegetales, semillas vegetales, protoplastos, callos, cultivos celulares y cualquier grupo de células vegetales organizados en unidades estructurales y/o funcionales. Estas últimas también se denominan estructuras reproducibles (de modo vegetativo) lo que significa que puede regenerarse en una planta completa.

La planta transformada obtenida, los tejidos vegetales y el material vegetal se pueden utilizar en un cultivo convencional y los esquemas de propagación o de regeneración de plantas producir plantas más transformadas con las mismas características (resistencia o tolerancia a virus) o para introducir la construcción de ADN según la presente invención en otras variedades de la misma o de una especie vegetal relacionada.

"Resistencia o tolerancia al virus" significa en la presente memoria que la célula o planta resistente o tolerante no es sensible o ha reducido la sensibilidad a uno o más virus, en comparación con una célula o planta sensible. En el presente caso, la resistencia y preferentemente la resistencia extrema a las infecciones por BNYVV están previstas. La resistencia o tolerancia, por ejemplo, significa que los síntomas habituales de una infección por virus, por ejemplo la infección por BNYVV, no existen o se reducen, o que la acumulación o la replicación del virus en la célula se evita o se reduce, o que el movimiento del virus, por ejemplo de célula a célula se evita o se reduce.

La presente invención se refiere a procedimientos para regular, es decir para alterar y preferentemente reducir significativamente o incluso inhibir completamente la expresión de un virus (BNYVV) p15 ARN2 gen en las células, preferentemente las células de la planta, o las plantas. PTGS inhibirán la expresión de cada gen localizado en el ARN 2.

Se observó que los procedimientos comúnmente disponibles carecen de previsibilidad. Los presentes procedimientos alivian estos problemas y proporcionan regulación reproducible y más eficaz de la resistencia vírica en plantas.

La invención se describe además haciendo referencia a los siguientes ejemplos detallados.

Estos ejemplos se proporcionan para fines de ilustración solamente, y no se pretende que sean restrictivos a menos que se especifique lo contrario.

Los principios demostrados en la presente memoria para BNYVV y P15 de BNYVV son satisfactoriamente aplicables igualmente a los virus del listado en la Tabla 1.

Ejemplos

Ejemplo 1: Caracterización de BNYVV. Plantas transgénicas resistentes

Se crearon tres estirpes transgénicas independientes de *Beta vulgaris* que expresan la proteína BNP15-Ala4 (codificada por la SEC. ID. nº 3). Dos de cada tres estirpes fueron resistentes a BNYVV.

La expresión de la proteína P15 se observó que era significativamente mayor en la estirpe sensible que en las estirpes resistentes. Se detectaron ARNsi, pero sólo en las plantas de la estirpe resistente a BNYVV (tabla 2).

La resistencia BNYVV por lo tanto puede ser activada por PGTS. Para probar más esta hipótesis, una hoja de cada estirpe se infectó con un inóculo vírico (Stras 1234 que proporciona ARN1, ARN2, ARN3 y ARN4). Pocas o ninguna lesión se desarrollaron en las hojas de las plantas resistentes que se infectaron como tales, mientras que las hojas de las plantas sensibles desarrollaron numerosas lesiones. En las plantas de las estirpes resistentes a BNYVV se detectaron moléculas de ARNsi específicas para P15, pero no en ninguna de las plantas sensibles.

No pudo detectarse ninguna modificación en la secuencia del gen p15 o en la secuencia del terminador de la transcripción.

Ejemplo 2: Construcciones en horquilla de P15

Para estudiar la funcionalidad del PTGS que produce la secuencia P15 (mutada), se construyó un vector binario de *Agrobacterium* que contiene un gen de P15 modificado genéticamente (por ejemplo, una SEC. ID. nº 3 (modificada)) en orientación con sentido y antisentido, intercaladas por un intrón de petunia o un intrón de remolacha azucarera.

A continuación se proporcionan los resultados obtenidos con las tres construcciones de hp15 (véanse las figuras 4 y 5). La secuencia intrónica en la construcción 1 procede de petunia (véase la figura 4), mientras que la secuencia intrónica en las construcciones 2 y 3 procede de la remolacha. Los montejes 2 y 3 se diferencian en la longitud del

intrón solamente: 550 nt en el caso del vector pS140 y 91 nt sólo en el caso del vector pS142 (figuras 5A y B respectivamente).

La creación de las construcciones de ADN según la invención y la clonación de estas construcciones en *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, un cepa GV3101 (desarmada)) se realizó según los procedimientos y técnicas bien conocidos en la técnica. Los fragmentos con sentido y antisentido de p15 y los intrones se generaron por RCP incluyendo enzimas de restricción específicas en los extremos. Mezclados con el eje central del vector, solamente una recombinación/inserción de los fragmentos era posible sobre la base de la compatibilidad de estas enzimas específicas en el extremo de los fragmentos. La enzima de restricción derecha del fragmento uno era la misma que la enzima de restricción izquierda del fragmento dos.

Para cada una de las construcciones anteriores, un homólogo en horquilla que contiene (los primeros 400 nt de) una secuencia de GFP [en lugar de una secuencia de p15 modificada genéticamente] se creó y utilizó como referencia (referencia en horquilla, denominada hpGF). Un tampón MA (MgCl₂ 10 mM, acetosiringona 200 M) sirvió además como referencia en el tratamiento.

Ejemplo 3: Protocolos experimentales

Se agroinfiltró material de la hoja de *Tetragonia expansa*, *Beta macrocarpa* y *Beta vulgaris* (inoculación foliar artificial de BNYVV nutritiva para las plantas) seguido de una infección de BNYVV (Stras 1234 o Stras 12 (que proporcionan ARN1 y ARN2)). Para los protocolos, véase a continuación y para las construcciones, ver anteriormente.

Las *Agrobacterium tumefaciens* que llevan una construcción de horquilla se cultiva durante la noche a 28°C. Las células se sedimentan por centrifugación (15 min a 5000 g) y se vuelven a poner en suspensión en tampón de MgCl₂ 10 mM que contiene acetosiringona (200 µM) y la D.O. 600 nm se ajustó a 1. La suspensión celular se mantiene a temperatura ambiente durante 3 h antes de la infiltración.

La agroinfiltración se realiza inyectando la solución de *Agrobacterium* en las hojas de plántones (por ejemplo, de *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Tetragonia expansa*, *Nicotiana benthamina*, *Chenopodium quinoa*) en la etapa de 4 hojas. Una jeringa de 2 ml sin aguja, se presiona en la cara superior de una hoja herida por la aguja. Se filtra cada hoja, excepto los cotiledones.

Cuatro días después de la agroinfiltración, las hojas tratadas se infectaron por inoculación mecánica frotando sobre hojas espolvoreadas previamente con carborundo con 10 a 25 µl de solución de inoculación (1 µg de ARN vírico (Stras 1234 o Stras 12), macaloide al 0,04%, tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,5).

Beta macrocarpa 10 µl de solución de inoculación/hoja

Beta vulgaris 25 µl de solución de inoculación/hoja

Tetragonia expansa 25 µl de solución de inoculación/hoja

Nicotiana benthaminana 20 µl de solución de inoculación/hoja

Las hojas de *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Tetragonia expansa* y *Nicotiana benthamina* se trataron como tales (ver anteriormente) y la presencia de síntomas de rizomanía se observó en las mismas 10 a 13 ddi (días después de la inoculación).

Ejemplo 4: Efecto de la expresión de ARNm de hp15 en la multiplicación de BNYVV

A: Las construcciones con el intrón de petunia

Los ejemplos siguientes describen algunos de los resultados obtenidos en la remolacha utilizando construcciones de hp15 según la invención.

Los resultados obtenidos con la construcción 1 (figura 4) se resumen en la figura 6. Se observaron lesiones cloróticas amarillas en hojas de *Beta vulgaris* que se agroinfiltraron con una suspensión que expresa la construcción de hpGF y en hojas infiltradas con el tampón MA. Estas lesiones fueron similares a las observadas en las hojas que no habían sido infiltradas ni inoculadas.

Ninguna de dichas lesiones se desarrolló en las hojas de las plantas que se agroinfiltraron con una suspensión que expresa la construcción de hp15 (construcción 1). Si se observaban algunas lesiones en todo caso, eran mucho más pequeñas y se cree que corresponden a las zonas donde la infiltración en la hoja no había sido óptima.

Estos resultados preliminares señalan que las construcciones de hp15 son adecuados para inducir PTGS en plantas de *B. vulgaris* y pueden producir resistencia a BNYVV.

B: Construcciones con el intrón de remolacha

Los experimentos anteriores se repitieron con un mayor número de plantas de remolacha y utilizando las construcciones 2 y 3, que se diferencian en la longitud del intrón único.

5 Todas las hojas infiltradas con el tampón de MA o con la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* que expresa un homólogo de hpGF se encontró que presentan un gran número de lesiones de aproximadamente 3-4 mm de diámetro. Las hojas de la planta agroinfiltrada con hp15 (construcciones 2 ó 3) no desarrollaron lesiones en absoluto, o un número muy bajo de lesiones 1 mm de diámetro como máximo. Los resultados representados en la figura 10 7 indican que la construcción 2 (con el intrón de remolacha de 91 nt) parece otorgar una mejor protección contra BNYVV.

C: Protección contra una infección por una cepa tipo P

15 El tipo P de BNYVV, encontrado alrededor de Pithiviers en Francia, consta de cinco ARN transcritos positivos. Esta cepa es muy patógena para las plantas de remolacha. Se cree que la expresión de una proteína p26 empeora los síntomas de rizomanía (26).

20 Los resultados descritos anteriormente (en el apartado (B)) se repitieron utilizando un BNYVV de tipo P como inóculo vírico.

No se observaron lesiones en las hojas de las plantas agroinfiltradas con una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* que expresa una construcción de hp15.

25 La inducción de PTGS por el intermedio de una construcción en horquilla tanto, parece ser por lo tanto un buen foco de resistencia contra una infección vírica, y en particular contra BNYVV. Incluso contra las cepas más agresivas se consiguió resistencia de las plantas.

30 Se supone que la expresión de la construcción de hp15 (en plantas) produce la formación de ARNds que es reconocida y cortada en trozos de aproximadamente 21 a 23 nt (ARNsi) por la enzima Dicer. Los ARNsi específicos de P15 formarán un complejo con RISC (complejo de silenciamiento producido por ARN), que a su vez dirigirá el homólogo de ARN, ARN 2, y determinadas especies de ARN subgenómico de BNYVV, y producen la degradación de este último. Como tal, el virus ya no será capaz de desplazarse de una célula a otra.

35 **Ejemplo 5: Las construcciones de hp15 según la invención bloquean la multiplicación vírica en las células corticales**

40 La presencia y propagación del BNYVV (tipos A, B, P) se estudió en una estirpe de cultivo 4D6834 ('4D') de remolacha azucarera diploide sensible, en los focos naturales de resistencia (registro Holly-1-4 ('Ho') y de *Beta vulgaris* ssp. *maritima* WB42 ('Bm')), y en las plantas de remolacha transformadas según la invención.

45 En los tejidos vasculares, la proteína de la cubierta vírica se observó en los elementos de tamiz del floema y parénquima vascular. Estas observaciones apoyan un movimiento de larga distancia a través del floema. Para protocolos detallados sobre por ejemplo infección vírica e inmunodetección véase Doucet, 2006, tesis doctoral, capítulo 5.

Los focos naturales de resistencia como 'Ho' resultaron ser sólo parcialmente resistentes. La resistencia de 'Ho' fue destruida por ejemplo en presencia de altos valores víricos.

50 Las plantas resistentes según la invención y los genotipos 'Bm' presentaban la misma limitación de propagación del virus. Una diferencia importante entre ambos, sin embargo, es que 'Bm' todavía permite que el virus se multiplique en las células corticales. Así, las partículas víricas son todavía accesibles a *P. betae* (vector fúngico), que parece infectar preferentemente la corteza. La multiplicación del virus y por consiguiente el mantenimiento de un potencial infeccioso, incluso si es en menor medida que en una variedad sensible, será posible y se mantendrá una 55 acumulación de la población infecciosa. La ventaja del genotipo resistente según la invención procede de su capacidad para prevenir la multiplicación del virus en la corteza. En comparación con 'Bm', disminuirá la capacidad del virus para mantener un potencial infeccioso en el suelo.

60 **Ejemplo 6: Conclusiones generales**

Se puede concluir a partir de los ejemplos anteriores que la resistencia de hp15 procedente del patógeno según la invención es muy eficiente, incluso contra de las cepas de BNYVV más agresivos.

65 Las construcciones de hp15 de la invención lograron producir resistencia de la planta procedente del patógeno. Las construcciones de hp15 probados produjeron todos una degradación del ARN2 por PTGS.

Los homólogos de hpGF nunca produjeron ningún mecanismo PTGS (observación visual). La degradación del ARN2 de BNYVV no se observó nunca en ese caso (análisis de transferencia Northern).

5 Los ejemplos anteriores se refieren a construcciones de hp15 que contienen una secuencia p15 completa. Los resultados positivos se obtuvieron sin embargo también cuando un fragmento (una parte o porción) de la secuencia de codificación de p15 se clonó en un vector adecuado en la orientación con sentido y antisentido. Por ejemplo, una construcción que contenía dos tercios del gen P15 de BNYVV también fue dirigido por los ARNsi (ARN de interferencia pequeño).

10 Lo anterior indica que las construcciones en horquilla P15 que contienen una secuencia del BGT-3 genéticamente modificada de BNYVV según la invención o una parte o fragmento de la misma, son muy adecuados para producir la PTGS, lo que redundará en plantas resistentes al BNYVV.

15 Las plantas transformadas se seleccionan preferentemente sobre los siguientes criterios para maximizar el éxito. Se seleccionan los transformantes que alojan una construcción de una sola copia y se analiza las plantas para determinar su resistencia a la infección por BNYVV. Las plantas que producen grandes concentraciones de ARN pequeños presentarán niveles muy altos y robustos de resistencia. La transformación de *Agrobacterium* y/o transformación de la planta según los principios descritos en el documento EP 1 174 513 se prefieren como técnica de transformación ya que estas técnicas minimizan las reestructuraciones.

20 **Ejemplo 7: Detección sistemática por ELISA de plantas transformadas cultivadas en tierra infectada**

25 Construcciones: El vector pS138 (Fig.11) se utilizó para la transformación génica directa con PEG; y el vector pS143 (Fig. 12) se utilizó para la transformación mediada por *Agrobacterium*. Ambos plásmidos contienen la construcción en horquilla P15-4 (BNP15-Ala4) con la secuencia del intrón corto (91 pb) como se muestra en las figuras 1A y 1B. En dichas construcciones, la secuencia transcrita de P15-4 corresponde a la SEC. ID. nº 3, la secuencia antisentido de P15-4 a la SEC. ID. nº 12 y el intrón a la SEC. ID. nº 11.

30 Transformación con PEG: La transformación con PEG se realizó en protoplastos de células guardas de remolacha azucarera, según el procedimiento descrito en el documento WO 95/10178. La selección del protoplasto y callo se realizó en imazamox 0,2 nM; los brotes y las plantas se seleccionaron en imazamox 20 nM. Los plantones transformados con PEG se etiquetaron como THPRxxx.

35 Transformación mediada por *Agrobacterium*: El material de partida para las transformaciones con *Agrobacterium* consistía en callos derivados de protoplastos de células guarda de remolacha azucarera, que brotan del disco de alginato cultivado en medio sólido PG1B (como se describe en el documento WO 95/10178).

40 La cepa de *Agrobacterium* (HAT 8000) se cultivó durante la noche en medio LB enriquecido con 25 mg/l de estreptomina y 2 mg/l de tetraciclina. Antes de la transformación, el cultivo bacteriano se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, y el sedimento se volvió a poner en suspensión en medio pGO enriquecido con acetosiringona 100 µM de para obtener una densidad de inóculo de DO₅₅₀ de 1,0.

45 Para la inoculación, la suspensión bacteriana se vierte en una placa de Petri con el alginato que contiene callos que brotan procedentes de células guarda. Después de 10 min, el alginato se retira y se seca sobre papel de filtro antes de ser colocado en un medio de cultivo conjunto (medio PG1B enriquecido con acetosiringona 100 µM y agarosa SeaPlaque al 0,9%, pH 5,8). Los cultivos se incubaron en la oscuridad a 27°C durante 1 a 2 días, después de lo cual individuo cada uno de los callos se transfirieron a un medio de selección enriquecido con 125 mg/l de cefotaxima, imazamox 0,2 nM y agarosa al 0,8%, pH 5,8. Dos semanas más tarde, los callos en desarrollo se transfirieron a medio PBN enriquecido con imazamox 0,2 nM y se cultivaron en la luz a 25°C. Los brotes emergentes y las plantas se seleccionaron en imazamox 20 nM. Las plántulas transformadas con *Agrobacterium* se etiquetaron como AgHPxxx.

50 Detección sistemática por ELISA: Para la detección sistemática por ELISA, se utilizaron únicamente transformantes que contienen 1 ó 2 copias de la construcción en horquilla. Los plantones *in vitro* se transfirieron a medio de enraizamiento. Después de 6 a 8 semanas, la transformantes enraizados *in vitro* que poseen un sistema radicular bien desarrollado se transfirieron a una mezcla de tierra/arena infestada con *Polymyxa betae* que contiene patotipo P de BNYVV, recogido en la región Pithiviers (Francia).

55 Después de una incubación de cuatro semanas a 18-19°C y 70% de humedad relativa, arena y tierra se lavó lejos de las raíces, y las partes de la raíz más bajas se utilizaron para la prueba ELISA. Los trozos de raíces se secaron sobre papel de filtro, se pesaron y se transfirieron a microtubos que se congelaron a -60°C durante una noche seguida por liofilización durante 2 a 3 días. Después de la liofilización, las muestras se molieron (2 x 1 min a 30 rpm/s).La cantidad correspondiente de tampón de extracción se añadió a cada tubo. Los tubos se agitaron hasta que el polvo se volvió a poner en suspensión y se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm. SE utilizaron 150 µl de esta sobrenadantes en el ensayo.

60

65

El contenido vírico en las raíces de cada plantón se analizó por ensayo inmunosorbente con enzima ligada (TAS-ELISA), intercalado triple con anticuerpos utilizando anticuerpos producidos contra la proteína de la cubierta del virus de Neogen (www.neogen.com). El valor de corte para las plantas resistentes adquirió un valor de DO₄₀₅ de 0,2.

5 Resultados: Cuanto menor sea el valor de ELISA, menor es la cantidad de virus presente en el sistema radicular de las plantas analizadas. Los resultados de dos pruebas biológicas diferentes (Rz2007-001A y Rz2007-002A) se resumen en las figuras 9 y 10. Las plantas de remolacha azucarera siguientes sirvieron como referencias positivas y negativas: 4D6834, una referencia sensible; DK1 8, una referencia resistente procedente de material de cultivo comercial; TMOC1867 y MOX63MSF1, las plantas transformadas con una construcción p15-ALA4 (construcción transcrita, no una construcción en horquilla).

15 En las plantas MOX63MSF1, se detectaron fragmentos de pequeños ARN. En estas plantas se generó de este modo un mecanismo de PTGS por lo tanto sin ser activado por el producto génico de por si, más probablemente como resultado de las reestructuraciones de las inserciones. Esto probablemente explica el alto nivel de resistencia observado en estas plantas.

20 En total, 20 de cada 29 estirpes transformadas con una construcción en horquilla p15 según la invención demostró ser resistente a la rizomanía. Sólo las estirpes siguientes se ha descubierto que son sensibles: THPR82, THPR90, Aghp150, Aghp155, THPR12, THPR15, THPR53, THPR239 y THPR270.

25 Los datos anteriores confirman una vez más que la resistencia de hp15 procedente de patógenos según la invención es de hecho muy eficiente, incluso contra las cepas de BNYVV más agresivos. Se observaron altos niveles de inmunidad por ejemplo en las siguientes estirpes vegetales transformadas de bioanálisis Rz2007-002A: THPR26, THPR118, THPR222 y THPR289. Las plantas con un alto nivel de inmunidad tienen ventajosamente un valor de DO₄₀₅ inferior a 0,05, más preferentemente inferior a 0,01 o casi 0 (cero).

Referencias

- 30 1. Tamada T. & Baba T., *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 39, pp. 325-332 (1973)
2. Kuszala M. & Putz C., *Annals of Phytopathology* 9, pp. 435-446 (1977)
3. Keskin B., *Archiv für Mikrobiology* 49, pp. 348-374 (1964)
- 35 4. Asher M.J.C., *Rhizomania In The sugar beet crop*, ed. D.A. Cooke and R.K. Scott, Chapman & Hall, London, pp. 312-338 (1993)
5. Richard-Molard M., *Rhizomanie In Institut français de la betterave industrielle. Compte-rendu des travaux effectués en 1994*, ITB, Paris pp. 225-229 (1995)
- 40 6. Powell A.P. et al., *Science* 232, pp. 738-743 (1986)
7. Fritchen J.H. & Beachy R.N., *Ann. Rev. Microbiol.* 47, pp. 739-763 (1993)
- 45 8. Wilson T.M.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, pp. 3134-3141 (1993)
9. Gonsalves D. & Slightom J. L., *Seminars in Virology* 4, pp. 397-405 (1993)
- 50 10. D'Halluin K. et al., *Biotechnology* 10, pp. 309-314 (1992)
11. Kallerhof J. et al., *Plant Cell Reports* 9, pp. 224-228 (1990)
12. Ehlers U. et al., *Theoretical and Applied Genetic* 81, pp. 777-782 (1991)
- 55 13. Kraus J. et al., *Field performance of transgenic sugar beet plants expressing BNYVV coat protein plants*, Fourth International Congress of Plant Molecular Biology, Int. Soc. for Plant. Molecular Biology, Amsterdam (1994)
14. Maiss E. et al., *Proceedings of the Third International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*, Monterey, pp. 129-139 (1994)
- 60 15. Gilmer et al., *Virology* 189, pp. 40-47 (1992)
16. Bleykasten-Grosshans et al., *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, pp. 240-246 (1997)
- 65 17. Bouzoubaa et al., *J. Gen. Virol.* 67, pp. 1689-1700 (1986)

18. Richards & Tamada, Annu. Rev. Phytopathol. 30, pp. 291-313 (1992)
19. Bouzoubaa et al., J. Gen. Virol. 68, pp. 615-626 (1987)
- 5 20. Herzog et al., J. Gen. Virol. 18, pp. 3147-3155 (1994)
21. Scott et al., J. Gen. Virol. 75, pp. 3561-3568 (1994)
22. Koonin & Dolja, Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol. 28, pp. 375-430 (1993)
- 10 23. Zuker and Stiegler, Nucl. Acids Res. 9, pp. 133-148 (1981)
24. Higgins, Encyclopedia of Life Sciences, pp. 1-10 (2001)
- 15 25. Raska et al., Biology of the Cell 96, pp. 579-594 (2004)
26. Tamada et al., Proceeding of the 3rd symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, American Society of Sugar Beet Technologists, Denver: p. 49 (1996)

Tabla 1

Virus	Tamaño del BGT-3	Anfitrión	Referencia
Virus del picado del tronco del manzano	8 kDa	manzana	Jelkman, <i>J. Gen. Virol.</i> 75, 1535-1542 (1994)
Virus de la quemadura del arándano	7 kDa	arándano	Cavileer <i>et al.</i> , <i>J. Gen. Virol.</i> 75, 711-720 (1994)
Virus M de la patata	7 kDa	patata	Zavriev <i>et al.</i> , <i>J. Gen. Virol.</i> 72, 9-14 (1991)
Virus del mosaico del trébol blanco	8 kDa	trébol	Forster <i>et al.</i> , <i>Nucl. Acids Res.</i> 16, 291-303 (1988)
Virus <i>Cymbidium</i> del mosaico	10 kDa	orquídea	Neo <i>et al.</i> , <i>Plant Mol. Biol.</i> 18, 1027-1029 (1992)
Virus X de la patata	8 kDa	patata	Rupasov <i>et al.</i> , <i>J. Gen. Virol.</i> 70, 1861-1869 (1994)
Virus del mosaico de la raya de la cebada	17 kDa	cebada	Gustafson <i>et al.</i> , <i>Nucl. Acids Res.</i> 14, 3895 -3909 (1986)
Virus de enanismo de los tallos (mop top) de la patata	21 kDa	patata	Scott <i>et al.</i> , <i>J. Gen. Virol.</i> 75, 3561-3568 (1994)
Virus de la mata del cacahuete	17 kDa	cacahuete	Herzog <i>et al.</i> , <i>J. Gen. Virol.</i> 75, 3147 a 3155 (1994)
Virus de la remolacha transmitido por el suelo	22 kDa	Remolacha azucarera	Koenig <i>et al.</i> , <i>Virology</i> 216, 202-207 (1996)

Tabla 2 : Detección de la expresión de la proteína P15 de ARNsi específico de P15 en plantas transgénicas. R: estirpe vegetal resistente a BNYVV; S: estirpe vegetal resistente a BNYVV, +: detección débil; ++: detección fuerte; - : sin detección

Línea nº	Sensibilidad a BNYVV	Expresión de la proteína P15	Detección de ARNsi
178	R	+	+
179	R	+	+
180	S	++	-

Listado de secuencias

	<110> SESVANDERHAVE N.V.	
5	<120> Construcciones de P15 en horquilla y su utilización	
	<130> BP.SES.002C/WO	
	<160> 14	
10	<170> Patente en versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 399	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia genéticamente modificada de TGB-3: BNP15-Ala1	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(399)	
25	<400> 1	
	atg gtg ctt gtg gtt gca gta gct tta tct aat att gta ttg tac ata 48	
	Met Val Leu Val Val Ala Val Ala Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile 15	
	1 5 10 15	
	gtt gcc ggt tgt gtt gtt gtc agt atg ttg tac tca ccg ttt ttc agc 96	
	Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser 30	
	20 25 30	
	aac gat gtt aaa gcg tcc agc tat gcg gga gca att ttt aag ggg agc 144	
	Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser 45	
	35 40 45	
	ggc tgt atc atg gac agg aat tct gct caa ttt ggg agt tgc gat 192	
	Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp 60	
	50 55 60	
	att cca aag cat gta gcc gag tcc atc act aag gtt gcc acc aaa gag 240	
	Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu 80	
	65 70 75 80	
	cac gat gtt gac ata atg gta aaa agg ggt gaa gtg acc gtt cgt gtt 288	
	His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val 95	
	85 90 95	
	gtg act ctc acc gaa act att ttt ata ata tta tct aga ttg ttt ggt 336	
	Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly 110	
	100 105 110	
	ttg gcg gtg ttt ttg ttc atg ata tgt tta atg tct ata gtt tgg ttt 384	
	Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe 125	
	115 120 125	
	tgg tat cat aga taa 399	
	Trp Tyr His Arg 130	
	130	
	<210> 2	
	<211> 132	
30	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
35	<400> 2	

ES 2 396 248 T3

Met Val Leu Val Val Ala Val Ala Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Ser
 20 25 30
 Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser
 35 40 45
 Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp
 50 55 60
 Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
 65 70 75 80
 His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
 85 90 95
 Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
 100 105 110
 Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
 115 120 125
 Trp Tyr His Arg
 130

- <210> 3
- <211> 399
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia genéticamente modificada de TGB-3: BNP15-Ala4
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(399)
- 15 <400> 3

atg gtg ctt gtg gtt aaa gta gat tta tct aat att gta ttg tac ata	48
Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile	
1 5 10 15	
gtt gcc ggt tgt gtt gtt gtc agt atg ttg tac tca ccg ttt ttc agc	96
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser	
20 25 30	
aac gat gtt aaa gcg tcc agc tat gcg gga gca att ttt aag ggg agc	144
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser	
35 40 45	
ggc tgt atc atg gcc gcg aat tcg ttt gct caa ttt ggg agt tgc gat	192
Gly Cys Ile Met Ala Ala Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp	
50 55 60	

ES 2 396 248 T3

```

att cca aag cat gta gcc gag tcc atc act aag gtt gcc acc aaa gag      240
Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
65          70          75          80

cac gat gtt gac ata atg gta aaa agg ggt gaa gtg acc gtt cgt gtt      288
His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
85          90

gtg act ctc acc gaa act att ttt ata ata tta tct aga ttg ttt ggt      336
Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
100          105          110

ttg gcg gtg ttt ttg ttc atg ata tgt tta atg tct ata gtt tgg ttt      384
Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
115          120          125

tgg tat cat aga taa      399
Trp Tyr His Arg
130

```

<210> 4
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

```

Met val Leu val val Lys val Asp Leu Ser Asn Ile val Leu Tyr Ile
1          5          10          15

val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser
20          25          30

Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser
35          40          45

Gly Cys Ile Met Ala Ala Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp
50          55          60

Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
65          70          75          80

His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
85          90          95

val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
100          105          110

Leu Ala val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
115          120          125

Trp Tyr His Arg
130

```

<210> 5
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia genéticamente modificada de TGB-3: BNP15-Asp9

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(399)

<400> 5

ES 2 396 248 T3

atg gtg ctt gtg gtt aaa gta gat tta tct aat att gta ttg tac ata	48
Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile	
1 5 10 15	
gtt gcc ggt tgt gtt gtt gtc agt atg ttg tac tca ccg ttt ttc agc	96
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser	
20 25 30	
aac gat gtt aaa gcg tcc agc tat gcg gga gca att ttt aag ggg agc	144
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser	
35 40 45	
ggc tgt atc atg gac agg aat tcg ttt gct caa ttt ggg agt tgc gat	192
Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp	
50 55 60	
att cca aag cat gta gcc gag tcc atc act aag gtt gcc acc aaa gag	240
Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu	
65 70 75 80	
cac gat gtt gac ata atg gta aaa agg ggt gaa gtg acc gtt cgt gtt	288
His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val	
85 90 95	
gtg act ctc acc gaa act att ttt ata ata tta tct aga ttg ttt ggt	336
Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly	
100 105 110	
ttg gat gat ttt ttg ttc atg ata tgt tta atg tct ata gtt tgg ttt	384
Leu Asp Asp Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe	
115 120 125	
tgg tat cat aga taa	399
Trp Tyr His Arg	
130	

<210> 6

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 6

Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile
1 5 10 15
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser
20 25 30
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser

ES 2 396 248 T3

35 40 45

Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp
50 55 60

Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
65 70 75 80

His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
85 90 95

Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
100 105 110

Leu Asp Asp Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
115 120 125

Trp Tyr His Arg
130

<210> 7

<211> 399

5 <212> ADN

<213> Virus de la rizomanía de la remolacha

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(399)

<223> Secuencia WT p15

<400> 7

atg gtg ctt gtg gtt aaa gta gat tta tct aat att gta ttg tac ata	48
Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile	
1 5 10 15	
ggt gcc ggt tgt gtt gtt gtc agt atg ttg tac tca ccg ttt ttc agc	96
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser	
20 25 30	
aac gat gtt aaa gcg tcc agc tat gcg gga gca att ttt aag ggg agc	144
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser	
35 40 45	
ggc tgt atc atg gac agg aat tcg ttt gct caa ttt ggg agt tgc gat	192
Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp	
50 55 60	
att cca aag cat gta gcc gag tcc atc act aag gtt gcc acc aaa gag	240
Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu	
65 70 75 80	
cac gat gtt gac ata atg gta aaa agg ggt gaa gtg acc gtt cgt gtt	288
His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val	
85 90 95	
gtg act ctc acc gaa act att ttt ata ata tta tct aga ttg ttt ggt	336
Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly	
100 105 110	
ttg gcg gtg ttt ttg ttc atg ata tgt tta atg tct ata gtt tgg ttt	384
Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe	
115 120 125	
tgg tat cat aga taa	399
Trp Tyr His Arg	
130	

15

ES 2 396 248 T3

<210> 8
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Virus de la rizomanía de la remolacha

5

<400> 8

```

Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile
 1          5          10          15
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser
          20          25          30
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser
          35          40          45
Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp
          50          55          60
Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
 65          70          75          80
His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
          85          90          95
Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
          100          105          110
Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
          115          120          125
Trp Tyr His Arg
          130
    
```

<210> 9
 <211> 902
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>

15 <223> Construcción de hp15 2: secuencia de intrón de remolacha con 91 nt de largo

<400> 9

```

atcgtgcttg tggttaaagt agatttatct aatattgtat tgtacatagt tgccggttgt    60
gttgttgtca gtatgttgta ctcaccgttt ttcagcaacg atgttaaagc gtccagctat    120
gcgggagcaa tttttaaagg gagcggctgt atcatggccg cgaattcgtt tgctcaattt    180
gggagttgcg atattccaaa gcatgtagcc gagtccatca ctaaggttgc caccaaagag    240
cacgatgttg acataatggt aaaaaggggt gaagtgaccg ttcgtgttgt gactctcacc    300
    
```

ES 2 396 248 T3

gaaactat^{tt} ttataat^{at} atctagatt^g tttgg^{ttt}g^g cggtg^{ttt}tt^t gttcatgata 360
 tgt^{tt}aat^{gt} ctatag^{ttt}g^t g^{ttt}ttg^{gt}at catagacaag gtaccta^{aat} cctg^{gtt}tt^{ta} 420
 tatgtactac tgtt^gtag^{ct} gaaatt^{tag}g tctt^{ctt}g^{ct} gaaatt^tat tctg^{ttt}ct^{gt} 480
 tttcact^{gtt} attcag^{tat}c gatt^{tt}gt^{cta} tgatac^{caa} accaaactat agacatt^{aaa} 540
 catatcatga acaaaaacac cgcca^{aac}ca aacaat^{ct}tag ataatattat aaaaat^{agt}t 600
 t^{cg}gtgagag tcacaacacg aacg^{gt}ctact tcacc^{ctt}t^t ttaccattat gtcaacat^{cg} 660
 t^gct^{ctt}tg^g tggcaac^{ctt} agt^gat^{gg}ac t^{cg}g^{ct}acat g^{ctt}ttg^{ga}at atc^gcaact^c 720
 cca^{aat}tgag caaacga^{att} cgcg^gccat^g atacag^{cc}gc tcc^{ctt}ta^{aaa} aatt^gct^{ccc} 780
 gcatag^{ct}g^g acg^{ctt}ta^{ac} atc^{gt}tt^gct^g aaaaac^ggt^g agtaca^{ac}at actgaca^{aca} 840
 acaca^{acc}g^g caactat^gta caataca^{ata} ttagata^{aat} ctact^{tt}ta^{ac} cacaag^cac^g 900
 at 902

<210> 10
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia con sentido p15 (basada en una secuencia modificada BNP15-Ala4)

10

<400> 10

atc^{gt}g^{ctt}g^t tgg^taa^{agt} agatt^tat^{ct} aatatt^{gt}at t^gtacat^{agt} t^gccg^{gtt}g^t 60
 g^{tt}g^{tt}g^tca g^tat^{gtt}g^{ta} ct^cacc^{gtt} t^tcag^{ca}ac^g at^gtt^{aa}ag^c g^tccag^{ct}at 120
 g^cg^gg^gag^{caa} t^{ttt}ta^{aag}g g^{ag}c^gg^{ct}g^t at^cat^gg^{cc}g c^gaatt^{ct}g^{tt} t^gct^{ca}att^t 180
 g^gg^{ag}tt^gc^g atatt^{cc}aaa g^cat^gtag^{cc} g^{ag}tc^{ca}ta c^taag^{gtt}g^c cac^{ca}aag^{ag} 240
 cac^gat^{gtt}g^t acataat^{ggt} aaaa^{agg}g^{gt} gaag^tg^{acc}g t^tc^gt^{gtt}g^t g^{act}ct^cacc 300
 gaaactat^{tt} ttataat^{at} atctagatt^g tttgg^{ttt}g^g cggtg^{ttt}tt^t gttcatgata 360
 tgt^{tt}aat^{gt} ctatag^{ttt}g^t g^{ttt}ttg^{gt}at catagaca^a 399

<210> 11
 <211> 91
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de intrón (derivada de la remolacha): largo de 91 nt

20

<400> 11

tcctg^{gtt}tt^t atatg^tacta ctg^{tt}g^tag^c t^gaaatt^{tag} g^tctt^{ctt}g^c t^gaaatt^{tat} 60
 ttctg^{ttt}cg^g tttt^{ct}act^{gt} tatt^cag^tat^c 91

25

<210> 12
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia antisentido p15 (basada en una secuencia BNP15-Ala4)

<400> 12

ES 2 396 248 T3

ttgtctatga taccaaaacc aaactataga cattaacat atcatgaaca aaaacaccgc 60
 caaaccaaac aatctagata atattataaa aatagtttcg gtgagagtca caacacgaac 120
 ggtcacttca ccccttttta ccattatgtc aacatcgtgc tctttggtgg caaccttagt 180
 gatggactcg gctacatgct ttggaatcgc gcaactccca aattgagcaa acgaattcgc 240
 ggccatgata cagccgctcc ctttaaaaat tgctcccga tagctggacg ctttaacatc 300
 gttgctgaaa aacggtgagt acaacatact gacaacaaca caaccggcaa ctatgtacaa 360
 tacaatatta gataaatcta ctttaaccac aagcacgat 399

5 <210> 13
 <211> 1360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción de hp15 3: secuencia de intrón de remolacha con 555 nt de largo

<400> 13

atcgtgcttg tggtaaagt agatttatct aatattgtat tgtacatagt tgccggttgt 60
 gttgttgta gtatgttgta ctcaccgttt ttcagcaacg atgttaaagc gtccagctat 120
 gcgggagcaa tttttaaagg gagcggctgt atcatggccg cgaattcgtt tgctcaattt 180
 gggagtgcg atattccaaa gcatgtagcc gagtccatca ctaaggttgc caccaaagag 240
 cacgatggtg acataatggt aaaaaggggt gaagtgaccg ttcgtggtgt gactctcacc 300
 gaaactatct ttataatatt atctagattg tttggtttgg cgggtgtttt gttcatgata 360
 tgtttaatgt ctatagtttg gttttggtat catagacaag gtaccacgtt tttctctctc 420
 ctaatttttc tcactttttt ttcactctcat tctgttttat gttctgtgaa tttattagta 480
 gatrratcta cttttctatc taattttgac gctagattaa tgattcagtt ttattattac 540
 attttccgga aaattgggta agttttgata atttaaata tttttttcc gtgatcaaat 600
 tgtagaatgt gtttaagttc gatagtttat atctttatga atttttgtgt ttgatctgat 660
 gatagtttta gtgattattg taacttttga aagtgtgtgt ttttatgtgt gtagcgattt 720
 gtatagtaaa taagattaat gatcatggct aaattatggc gtaggttaat tttagaagaa 780
 agtatttttt tgctaaattg aagtcactcg cgctcgtatta ttgcgatttc tgcactttta 840
 ctagctgaat tgagtttctt gattggatat tctttatgat tgaagttgtt ttgctattga 900
 atattcttta tgagattttt gaatgaagat tttctgtgaa ttaatatgat caggtatcga 960
 tttgtctatg atacaaaac caaactatag acattaaca tatcatgaac aaaaacaccg 1020
 ccaaaccaaa caatctagat aatattataa aatagtttc ggtgagagtc acaacacgaa 1080
 cggtcacttc accccttttt accattatgt caacatcgtg ctctttggtg gcaaccttag 1140
 tgatggactc ggctacatgc tttggaatat cgcaactccc aaattgagca aacgaattcg 1200
 cggccatgat acagccgctc ctttaaaaa ttgctcccgc atagctggac gctttaacat 1260
 cgttgctgaa aaacggtgag tacaacatac tgacaacaac acaaccggca actatgtaca 1320

15 atacaatatt agataaatct actttaacca caagcacgat 1360

<210> 14
 <211> 550
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de intrón (derivada de la remolacha): 550 nt de largo

25 <400> 14

ES 2 396 248 T3

acgtttttct ctctcctaatt ttttctcact tttttttcat ctcattctgt tttatgttct 60
gtgaatttat tagtagattt atctactttt ctatctaatt ttgacgctag attaatgatt 120
cagttttatt attacatttt ccggaaaatt ggtaagttt tgataattta aatgattttt 180
tttccgtgat caaattgtag aaattgttta agttcgatag tttatatctt tatgaatttt 240
tgtgtttgat ctgatgatag ttttagtgat tattgtaact tttgaaagtg tgtgttttta 300
tgtgtgtagc gatttgata gtaaataaga ttaatgatca tggctaaatt atggcgtagg 360
ttaatttttag aagaaagtat ttttttgcta aattgaagtc atctgcgtcg tattattgcg 420
atctctgcac ttttactagc tgaattgagt ttgctgattg gatattcttt atgattgaag 480
ttgttttgct attgaatatt ctttatgaga tttttgaatg aagatttttc tgtaattaat 540
atgatcaggt 550

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en
- (a) una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC. ID. nº 3 y una secuencia antisentido de la SEC. ID. nº 3;
- 10 (b) una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la SEC. ID. nº 3 y una secuencia antisentido de dicho fragmento de la SEC. ID. nº 3;
- (c) una secuencia de nucleótidos que comprende una SEC. ID. nº 3 modificada y una secuencia antisentido de dicha SEC. ID. nº 3 modificada; y
- 15 (d) una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de la SEC. ID. nº 3 modificada de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos y una secuencia antisentido de dicho fragmento de la SEC. ID. nº 3 modificada;
- en la que dicha secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente cuando se transcribe en una célula puede formar una molécula de ARN bicatenario autocomplementario y que comprende además un intrón que consiste en la SEC. ID. nº 11 intercalada entre las secuencias con sentido y antisentido, en la que cuando la secuencia vírica BGT-3 modificada se transcribe en una célula puede formar una molécula de ARN en horquilla.
- 20 2. Secuencia vírica BGT-3 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en dicha secuencia SEC. ID. nº 3 modificada un codón de inicio y/o terminación de la traducción de la secuencia SEC. ID. nº 3 se modifica(n) para inhibir la traducción.
- 25 3. Secuencia vírica BGT-3 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la SEC. ID. nº 9.
- 30 4. Secuencia vírica BGT-3 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste en la SEC. ID. nº 9.
5. Vector que comprende la secuencia vírica del BGT-3 modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 6. Vector según la reivindicación 5 unido operativamente a una o más secuencia(s) reguladora(s) activa(s) en una célula de planta.
7. Molécula de ARN bicatenario autocomplementario expresada por un vector según la reivindicación 5 o 6.
- 40 8. Procedimiento para inducir resistencia a un virus BNYVV en una planta de remolacha azucarera o en una célula de la planta remolacha azucarera que comprende:
- preparar una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores operativamente unida a una o más secuencia(s) reguladora(s) activa(s) en la planta o en la célula de la planta, y
- 45 transformar la célula de la planta con la construcción de ácido nucleico, induciendo así resistencia a los virus en la planta o en la célula de la planta.
- 50 9. Procedimiento para inducir el silenciamiento génico postranscripcional de la totalidad del ARN2 y más en particular de una proteína de movimiento BGT-3 en una planta de remolacha azucarera o en una célula de la planta de la remolacha azucarera, que comprende las etapas siguientes:
- preparar una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores unidas operativamente a una o más secuencia(s) reguladora(s) activa(s) en la planta o las células de planta, y
- 55 transformar la célula de planta con la construcción de ácido nucleico, pudiendo así la expresión en dichas células de planta de una molécula de ARN que puede formar una molécula de ARN bicatenario activar un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional.
- 60 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la célula de planta es una célula estomática.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, que comprende además regenerar una planta transgénica a partir de las células de planta transformadas.
- 65

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la secuencia reguladora comprende una secuencia promotora o una secuencia terminadora activa en una planta.
- 5 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva o exógena.
14. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la secuencia promotora se selecciona del grupo que consiste en el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el promotor poliubiquitina de *Arabidopsis thaliana*.
- 10 15. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la secuencia promotora es un promotor activo en el tejido radicular de las plantas de remolacha.
16. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho promotor activo en el tejido de la raíz de las plantas es el promotor par del gen de la hemoglobina de *Perosponia andersonii*.
- 15 17. Planta de remolacha azucarera transgénica o una célula de la planta de remolacha azucarera transgénica resistente a un virus BNYVV y que comprende una construcción de ácido nucleico que presenta una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 unidas operativamente a una o más secuencia(s) reguladora(s) activa(s) en la planta o la célula de la planta, que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, o que comprende una molécula de ARN bicatenario autocomplementario según la reivindicación 7.
- 20 18. Planta transgénica o célula de planta transgénica según la reivindicación 17, en la que la secuencia reguladora comprende una secuencia promotora y una secuencia terminadora que son activas en una planta.
- 25 19. Planta transgénica según la reivindicación 18, en la que dicho promotor es activo en el tejido radicular de las plantas.
- 30 20. Planta transgénica según la reivindicación 18 o 19, en la que dicho promotor es un promotor par del gen de la hemoglobina de *Perosponia andersonii*.
- 35 21. Planta transgénica o célula de planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en la que la(s) secuencia(s) reguladora(s) comprende(n) una secuencia promotora que es una secuencia vegetal constitutiva o exógena.
- 40 22. Planta transgénica o célula de planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en la que el promotor se selecciona de entre el grupo que consiste en el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el promotor poliubiquitina de *Arabidopsis thaliana*.
- 45 23. Tejido de planta transgénica procedente de la célula de la planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que dicho tejido se selecciona de entre el grupo que consiste en fruta, tallo, raíz, tubérculo y semilla, y en el que dicho tejido comprende una secuencia vírica BGT-3 genéticamente modificada según las reivindicaciones 1 a 4.
24. Estructura transgénica reproducible obtenida a partir de la célula de planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en la que dicha estructura reproducible se selecciona de entre el grupo constituido por callos, yemas o embriones, y en la que dicho tejido comprende una secuencia vírica BGT-3 modificada genéticamente según las reivindicaciones 1 a 4.

P15 con sentido	P15 antisentido
-----------------	-----------------

Intrón
91 bp

Fig. 1 A

```

ATCGTGCTTG TGGTTAAAGT AGATTTATCT AATATTGTAT TGTACATAGT TGCCGGTTGT
GTTGTTGTCA GTATGTTGTA CTCACCGTTT TTCAGCAACG ATGTTAAAGC GTCCAGCTAT
GCGGGAGCAA TTTTAAAGG GAGCGGCTGT ATCATGGCCG CGAATTCGTT TGCTCAATTT
GGGAGTTGCG ATATTCCAAA GCATGTAGCC GAGTCCATCA CTAAGGTTGC CACCAAAGAG
CACGATGTTG ACATAATGGT AAAAAGGGGT GAAGTGACCG TTCGTGTTGT GACTCTCACC
GAAACTATTT TTATAATATT ATCTAGATTG TTTGGTTTGG CGGTGTTTTT GTTCATGATA
TGTTTAATGT CTATAGTTTG GTTTTGGTAT CATAGACAAG GTACCTAAAT CCTGGTTTTA
TATGTACTAC TGTTGTAGCT GAAATTTAGG TCTTCTTGCT GAAATTTATT TCTGTTTCGT
TTTCACTGTT ATTCAGTATC GATTTGTCTA TGATACCAA ACCAAATAT AGACATTAAA
CATATCATGA ACAAAAACAC CGCCAAACCA AACAATCTAG ATAATATTAT AAAAATAGTT
TCGGTGAGAG TCACAACACG AACGGTCACT TCACCCCTTT TTACCATTAT GTCAACATCG
TGCTCTTTGG TGGCAACCTT AGTGATGGAC TCGGCTACAT GCTTTGGAAT ATCGCAACTC
CCAAATTGAG CAAACGAATT CGCGGCCATG ATACAGCCGC TCCCTTTAAA AATTGCTCCC
GCATAGCTGG ACGCTTTAAC ATCGTTGCTG AAAAACGGTG AGTACAACAT ACTGACAACA
ACACAACCGG CAACTATGTA CAATACAATA TTAGATAAAT CTACTTTAAC CACAAGCAG
AT
    
```

(SEC. ID. nº 9, 10, 11 y 12)

Fig. 1 B

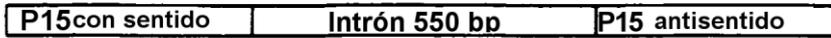


Fig. 2 A

ATCGTGCTTG TGGTTAAAGT AGATTTATCT AATATTGTAT TGTACATAGT TGCCGGTTGT
GTTGTTGTCA GTATGTTGTA CTCACCGTTT TTCAGCAACG ATGTTAAAGC GTCCAGCTAT
GCGGGAGCAA TTTTTAAAGG GAGCGGCTGT ATCATGGCCG CGAATTCGTT TGCTCAATTT
GGGAGTTGCG ATATTCCAAA GCATGTAGCC GAGTCCATCA CTAAGGTTGC CACCAAAGAG
CACGATGTTG ACATAATGGT AAAAAGGGGT GAAGTGACCG TTCGTGTTGT GACTCTCACC
GAAACTATTT TTATAATATT ATCTAGATTG TTTGGTTTGG CGGTGTTTTT GTTCATGATA
TGTTTAATGT CTATAGTTTG GTTTTGGTAT CATAGACAAG GTACCACGTT TTTCTCTCTC
CTAATTTTTC TCACTTTTTT TTCATCTCAT TCTGTTTTAT GTTCTGTGAA TTTATTAGTA
GATTTATCTA CTTTTCTATC TAATTTTGAC GCTAGATTAA TGATTCAGTT TTATTATTAC
ATTTTCCGGA AAATTGGTTA AGTTTTGATA ATTTAAATGA TTTTTTTTCC GTGATCAAAT
TGTAGAAATT GTTTAAAGTTC GATAGTTTAT ATCTTTATGA ATTTTTGTGT TTGATCTGAT
GATAGTTTTA GTGATTATTG TAACTTTTGA AAGTGTGTGT TTTTATGTGT GTAGCGATTT
GTATAGTAAA TAAGATTAAT GATCATGGCT AAATTATGGC GTAGGTTAAT TTTAGAAGAA
AGTATTTTTT TGCTAAATTG AAGTCATCTG CGTCGTATTA TTGCGATTTT TGCACTTTTTA
CTAGCTGAAT TGAGTTTGCT GATTGGATAT TCTTTATGAT TGAAGTTGTT TTGCTATTGA
ATATTCTTTA TGAGATTTTT GAATGAAGAT TTTCTGTGAA TTAATATGAT CAGGTATCGA
TTTGTCTATG ATACCAAAAC CAAACCTATAG ACATTAAACA TATCATGAAC AAAAACACCG
CCAAACCAA CAATCTAGAT AATATTATAA AAATAGTTTC GGTGAGAGTC ACAACACGAA
CGGTCACTTC ACCCCTTTTT ACCATTATGT CAACATCGTG CTCTTTGGTG GCAACCTTAG
TGATGGACTC GGCTACATGC TTTGGAAATAT CGCAACTCCC AAATTGAGCA AACGAATTCG
CGGCCATGAT ACAGCCGCTC CCTTTAAAAA TTGCTCCCGC ATAGCTGGAC GCTTTAACAT
CGTTGCTGAA AAACGGTGAG TACAACATAC TGACAACAAC ACAACCGGCA ACTATGTACA
ATACAATATT AGATAAATCT ACTTTAACCA CAAGCACGAT SEC. ID nº 13, 9, 14 y 12)

Fig. 2 B

ATGGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60
M V L V V K V D L S N I V L Y I V A G C
GTTGTTGTCAGTATGTTGTA C T C A C C G T T T T C A G C A A C G A T G T T A A A G C G T C C A G C T A T 120
V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y
G C G G G A G C A A T T T T T A A G G G G A G C G G C T G T A T C A T G G A C A G G A A T T C G T T T G C T C A A T T T 180
A G A I F K G S G C I M D R N S F A Q F
G G G A G T T G C G A T A T T C C A A A G C A T G T A G C C G A G T C C A T C A C T A A G G T T G C C A C C A A A G A G 240
G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E
C A C G A T G T T G A C A T A A T G G T A A A A G G G G T G A A G T G A C C G T T C G T G T T G T G A C T C T C A C C 300
H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T
G A A A C T A T T T T T A T A A T A T T A T C T A G A T T G T T T G G T T T G G C G G T G T T T T T G T T C A T G A T A 360
E T I F I I L S R L F G L A V F L F M I
T G T T T A A T G T C T A T A G T T T G G T T T T G G T A T C A T A G A T A A 399 (SEC. ID. n° 7)
C L M S I V W F W Y H R * (SEC. ID. n° 8)

Fig. 3

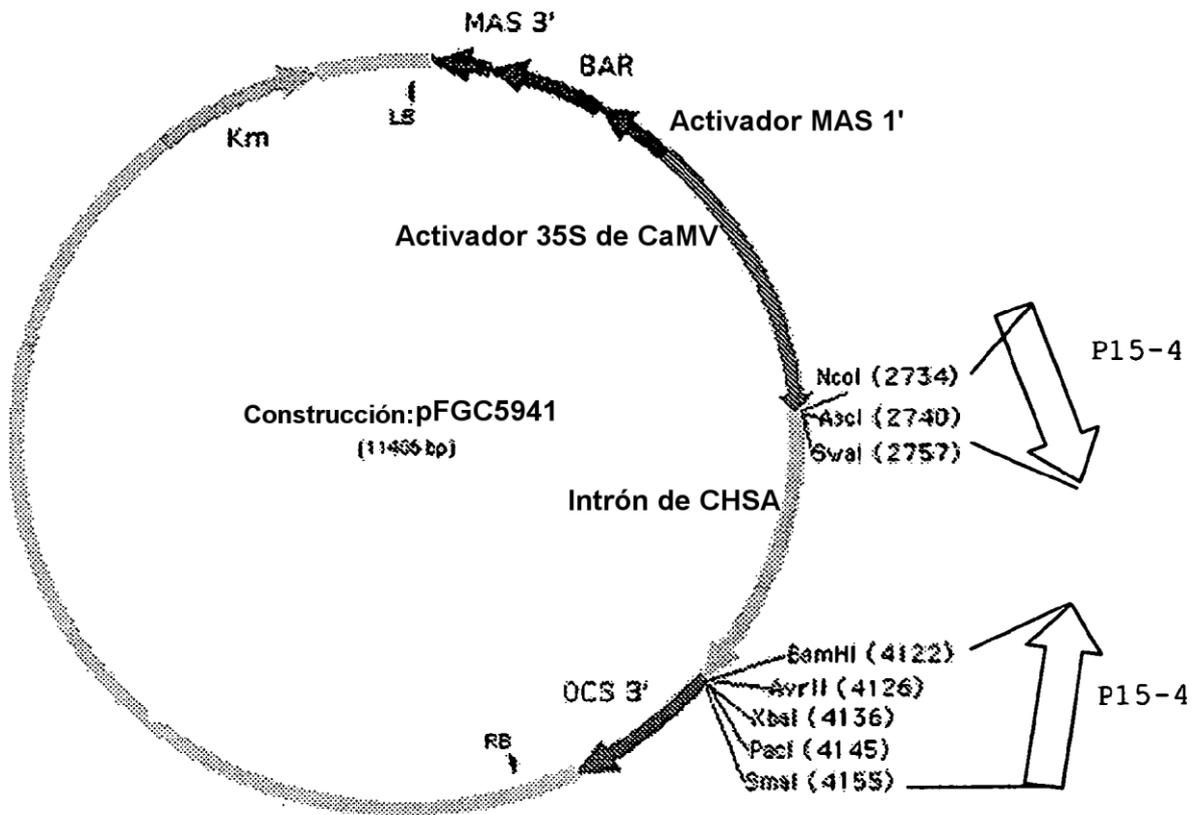


Fig. 4

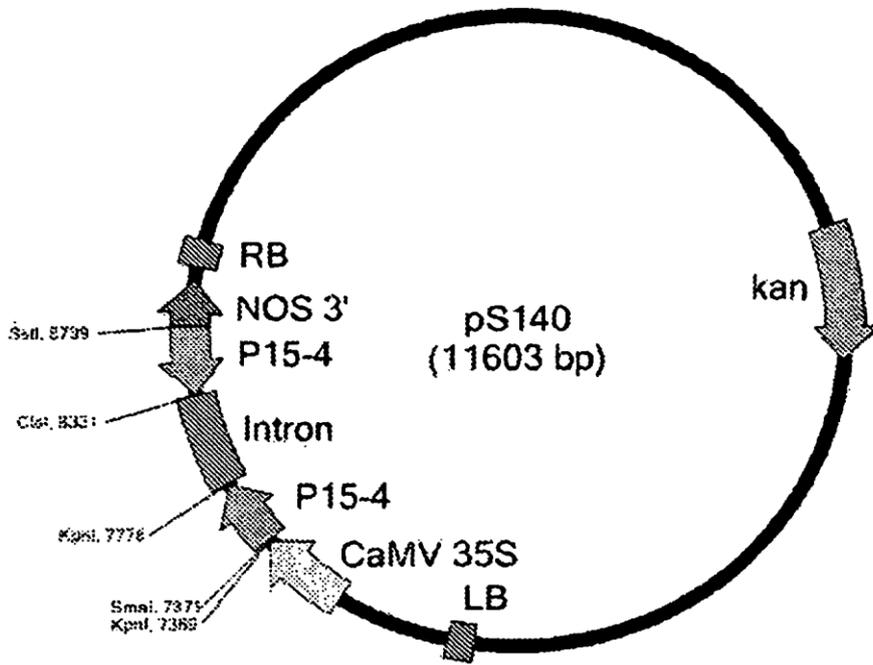


Fig. 5A

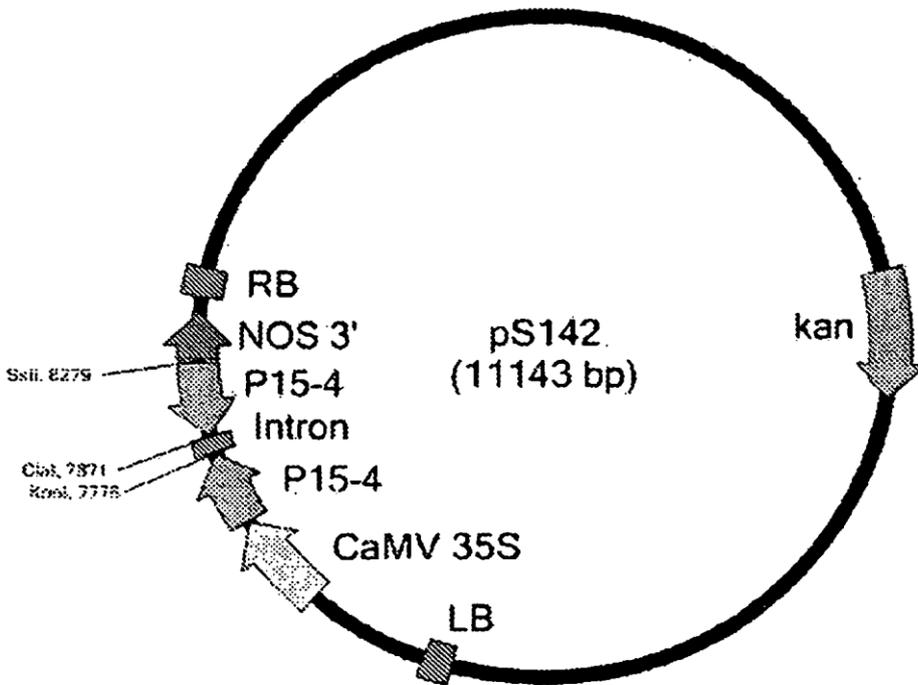


Fig. 5B

ATCGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60
GTTGTTGTCAGTATGTTGTACTCACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120
GCGGGAGCAATTTTTAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGCCGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180
GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240
CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300
GAAACTATTTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGCGGTGTTTTTGTTCATGATA 360
TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTTGGTATCATAGACA 399

(SEC ID n° 10)

Fig. 8

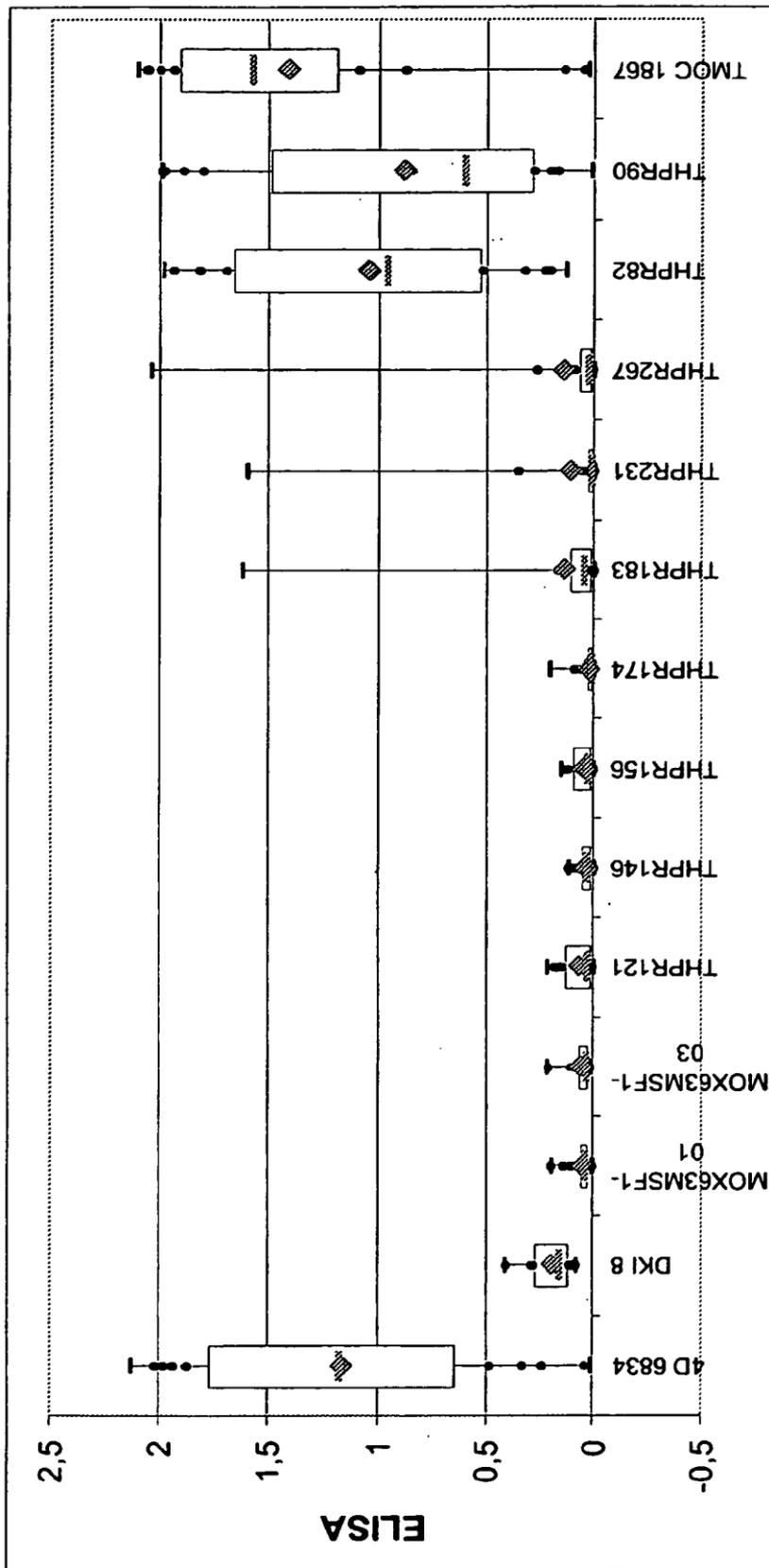


Figura 9

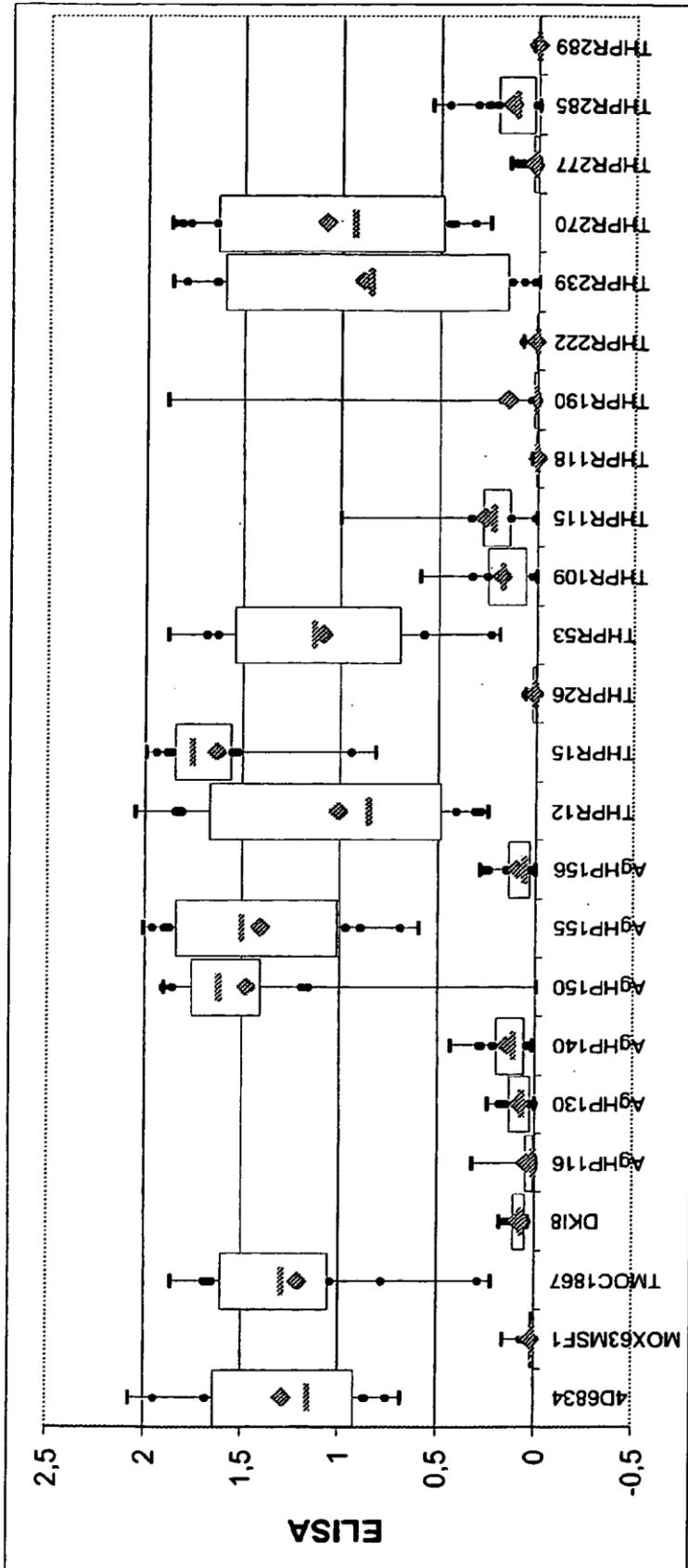


Figura 10

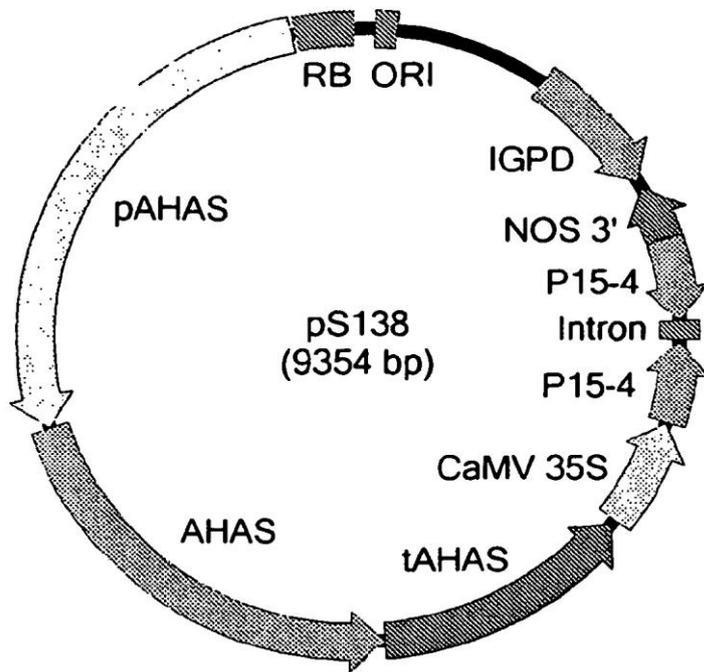


Figura 11

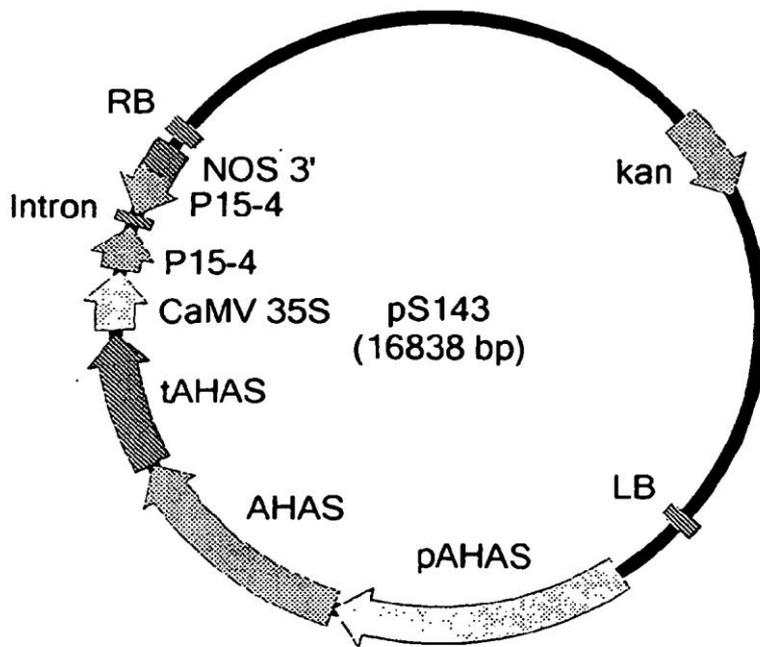


Figura 12