

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 104**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09824233 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2348815**

54 Título: **Diseño por ingeniería de resistencia amplia y duradera a virus del entrenudo corto infeccioso de la vid en plantas**

30 Prioridad:

**31.10.2008 US 110405 P**

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

**19.04.2016**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)  
Cornell Center for Technology Enterprise &  
Commercialization, 395 Pine Tree Road, Suite 310  
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**FUCHS, MARC y  
OLIVER, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 567 104 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**

Diseño por ingeniería de resistencia amplia y duradera a virus del entrenudo corto infeccioso de la vid en plantas

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos n.º: 61/110.405 presentada el 31 de octubre de 2008.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La invención se refiere a resistencia a enfermedades en plantas.

15 El virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV) es un nepovirus de la uva, que se transmite de una planta a otra por el nematodo daga, *Xiphinema index*. GFLV es el agente responsable de la enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid, que existe en todo el mundo. La enfermedad recibe el nombre por el aspecto en forma de hojas en abanico de las hojas infectadas por GFLV. Es una de las enfermedades más dañinas y extendidas de la vid. Los síntomas de infección por GFLV incluyen morfología anormal de los brotes y decoloraciones de las hojas, produciendo un aspecto de tipo abanico (Agrinos, Plant Pathology, 3ª Edición, Academic Press, 1988, pág. 687-688).  
20 Además, la producción de frutos de viñas infectadas es baja, produciendo las vides pequeños racimos que tienen un cuajado y maduración anormales de los frutos. Finalmente, las vides infectadas degeneran y mueren.

25 Se cree que la propagación a larga distancia de GFLV es por el uso de material vegetal infectado. Aunque se cree que el espectro natural de hospedadores está restringido a la uva, GFLV también se puede transmitir a una amplia variedad de especies herbáceas por inoculación mediante frotamiento de la savia.

30 Las estrategias actuales para controlar la enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid y otras enfermedades inducidas por nepovirus en viñedos incluyen el control de nematodos (por ejemplo, fumigación del suelo y uso de otros pesticidas), cultivo de portainjertos para resistencia a alimentación de nematodos, cultivo de vides para resistencia a GFLV y siembra de vides certificadas sin enfermedad. En consecuencia, existe una necesidad de agentes y procedimientos útiles para controlar GFLV así como otras enfermedades víricas de las plantas.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 Se ha descubierto que construcciones derivadas de múltiples regiones conservadas de virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV) proporcionan resistencia de amplio espectro y duradera a GFLV. En consecuencia, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleico, vectores, células, plantas y partes de plantas, productos y procedimientos útiles para proteger las plantas de enfermedades causadas por virus de plantas.

40 En un aspecto, la memoria descriptiva presenta una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que tiene un primer fragmento de ácido nucleico y un segundo fragmento de ácido nucleico. Estos primero y segundo fragmentos de ácido nucleico son cada uno sustancialmente idénticos a uno del fragmento 1 al fragmento 8 (SEC ID N.ºs: 1-8) o un complemento de los mismos, con la condición de que la molécula de ácido nucleico tenga menos del 99 % de identidad de secuencia con GFLV ARN1 (SEC ID N.º: 27) y GFLV ARN2 (SEC ID N.º: 28) o un fragmento  
45 de ácido nucleico de las mismas. En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico incluye adicionalmente un tercer fragmento de ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a uno del fragmento 1 al fragmento 8 o un complemento de los mismos. En otros modos de realización más, la molécula de ácido nucleico es concatenado 463, 582, 714, 678, 123, 375, 168, 245, 12367845, o 375168 (SEC ID N.ºs: 17-26, respectivamente). Cada una de estas moléculas de ácido nucleico se ha diseñado por ingeniería para conferir resistencia a un patógeno de plantas  
50 en una planta que expresa la molécula de ácido nucleico.

55 En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico está unida de forma funcional a un promotor (por ejemplo, un promotor regulado por el desarrollo, específico de orgánulo, específico de tejido, constitutivo, o específico de célula). En otros modos de realización más, el promotor es inducible por uno o más agentes externos. Dichas moléculas de ácido nucleico son ADN o ARN.

60 En otro aspecto, la memoria descriptiva presenta un vector que incluye cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico del vector está unida de forma funcional, en una orientación con sentido o una orientación anti-sentido, a un promotor.

65 En otro aspecto, la memoria descriptiva presenta una célula que incluye cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente o cualquiera de los vectores mencionados anteriormente. Células ejemplares incluyen células bacterianas, de insecto, de mamífero, o vegetales.

La presente invención se define, inter alia, por los siguientes puntos:

1. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que comprende un primer fragmento de ácido nucleico y un segundo fragmento de ácido nucleico, en la que dicha molécula de ácido nucleico tiene menos del 99 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 27 (GFLV ARN1) y la SEC ID N.º: 28 (GFLV ARN2) o un fragmento de ácido nucleico de las mismas y en el que dicho primero y segundo fragmentos de ácido nucleico son cada uno al menos un 90 % idénticos a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N.º: 1 (fragmento 1), SEC ID N.º: 2 (fragmento 2), SEC ID N.º: 3 (fragmento 3), SEC ID N.º: 4 (fragmento 4), SEC ID N.º: 5 (fragmento 5), SEC ID N.º: 6 (fragmento 6), SEC ID N.º: 7 (fragmento 7) y SEC ID N.º: 8 (fragmento 8) o un complemento de las mismas.
2. La molécula de ácido nucleico del punto 1, comprendiendo adicionalmente dicha molécula de ácido nucleico un tercer fragmento de ácido nucleico que es idéntico a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N.º: 1 (fragmento 1), SEC ID N.º: 2 (fragmento 2), SEC ID N.º: 3 (fragmento 3), SEC ID N.º: 4 (fragmento 4), SEC ID N.º: 5 (fragmento 5), SEC ID N.º: 6 (fragmento 6), SEC ID N.º: 7 (fragmento 7) y SEC ID N.º: 8 (fragmento 8) o un complemento de las mismas.
3. La molécula de ácido nucleico del punto 2, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N.º: 17 (concatenado 463), SEC ID N.º: 18 (concatenado 582), SEC ID N.º: 19 (concatenado 714), SEC ID N.º: 20 (concatenado 678), SEC ID N.º: 21 (concatenado 123), SEC ID N.º: 22 (construcción concatenada 375), SEC ID N.º: 23 (concatenado 168), SEC ID N.º: 24 (concatenado 245), SEC ID N.º: 25 (concatenado 12367845) y SEC ID N.º: 26 (concatenado 375168).
4. La molécula de ácido nucleico del punto 1, confiriendo dicha molécula de ácido nucleico resistencia a un patógeno de plantas en una planta que expresa dicha molécula de ácido nucleico.
5. La molécula de ácido nucleico del punto 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico está unida de forma funcional a un promotor, en el que el promotor es opcionalmente un promotor regulado por el desarrollo, específico de orgánulo, específico de tejido, constitutivo o específico de célula y/u opcionalmente es inducible por uno o más agentes externos.
6. La molécula de ácido nucleico del punto 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico es ADN o ARN.
7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico del punto 1, en el que la molécula de ácido nucleico está opcionalmente unida de forma funcional en una orientación con sentido traducible, con sentido no traducible, o anti-sentido a un promotor.
8. Una célula que comprende el vector del punto 7, en la que dicha célula es opcionalmente una célula bacteriana o vegetal.
9. Una planta o componente vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico del punto 1 o el vector del punto 7.
10. La planta o componente vegetal del punto 9, en el que dicha planta es una dicotiledónea, en el que dicha dicotiledónea es opcionalmente una planta de uva y en el que dicha planta de uva es opcionalmente un miembro del género *Vitis*.
11. La planta o componente vegetal del punto 10, en el que dicho componente vegetal es una uva, embrión somático, injerto, o portainjertos.
12. Un procedimiento para potenciar la resistencia a un patógeno de plantas en una planta, comprendiendo dicho procedimiento:
  - (a) proporcionar una célula vegetal que expresa la molécula de ácido nucleico del punto 1; y
  - (b) regenerar una planta o componente vegetal a partir de dicha célula vegetal, en el que dicho ácido nucleico se expresa en dicha planta y en el que dicha planta tiene resistencia potenciada a un patógeno de plantas en comparación con una planta no transformada correspondiente, en el que dicha planta es opcionalmente una dicotiledónea, en el que dicha dicotiledónea es opcionalmente una planta de uva, preferentemente un miembro del género *Vitis* y en el que dicho patógeno de plantas es opcionalmente un virus, preferentemente un virus del entrenudo corto infeccioso de la vid.
13. Un procedimiento para aumentar la resistencia a enfermedad vírica en una célula de planta de uva, comprendiendo dicho procedimiento transformar dicha célula de planta de uva con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 1, en el que la expresión de dicho ácido nucleico en dicha célula de planta de uva aumenta la resistencia de dicha célula de planta de uva a enfermedad vírica y en el que dicha enfermedad vírica es opcionalmente un virus del entrenudo corto infeccioso de la vid y en el que dicho procedimiento opcionalmente comprende además propagar una planta de uva a partir de dicha célula vegetal.

14. El procedimiento de los puntos 12 o 13, en el que dicho componente vegetal es una uva, embrión somático, injerto, o portainjertos.

- 5 15. La planta de uva de cualquiera de los puntos 9-11, en la que la expresión de dicho ácido nucleico en dicha célula de planta de uva aumenta la resistencia de dicha célula de planta de uva a enfermedad vírica, en la que dicha enfermedad vírica es opcionalmente enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid.

10 En otros aspectos más, la memoria descriptiva presenta una planta o componente vegetal que incluye las moléculas de ácido nucleico o vectores mencionados anteriormente. Dichas plantas incluyen monocotiledóneas o dicotiledóneas. Plantas ejemplares útiles en la invención incluyen uva, frambuesa, fresa, cereza, lúpulo, grosella negra, grosella, saúco, ruibarbo, lechuga, tomate, pepino, apio, narciso, o forsitia. Modos de realización de dichas plantas son plantas de uva y componentes vegetales de uva tales como un fruto de uva, un embrión somático, un injerto, o un portainjertos.

15 En otro aspecto, la memoria descriptiva presenta un procedimiento para potenciar la resistencia un patógeno de plantas en una planta, incluyendo el procedimiento: (a) proporcionar una célula vegetal que expresa cualquiera de las moléculas de ácido nucleico o combinaciones descritas en el presente documento o vectores descritos en el presente documento; y (b) regenerar una planta o componente vegetal a partir de la célula vegetal, en el que las moléculas de ácido nucleico se expresan en la planta y en el que la planta tiene resistencia potenciada a un patógeno de plantas en comparación con una planta no transformada correspondiente. En un modo de realización, el procedimiento proporciona resistencia potenciada a un virus tal como GFLV o el virus del mosaico del arabis (ArMV). En otros modos de realización, los procedimientos proporcionan resistencia potenciada a GFLV o ArMV en, por ejemplo, uva, frambuesa, fresa, cereza, lúpulo, grosella negra, grosella, saúco, ruibarbo, lechuga, tomate, pepino, apio, narciso y forsitia. En otro modo de realización, los procedimientos proporcionan resistencia potenciada a GFLV en plantas de uva.

20 En otros modos de realización, cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente o cualquiera de los vectores mencionados anteriormente incluyen un transgén encontrado en la vid transgénica. En otros modos de realización más, la molécula de ácido nucleico se expresa en una orientación con sentido o anti-sentido. En otros modos de realización más, dichas moléculas de ácido nucleico o dichos vectores se expresan como una secuencia con sentido no traducible (es decir, no traducida en una proteína porque la molécula de ácido nucleico o vector tiene, por ejemplo, un codón de inicio fuera de la fase de lectura estando el resto del ARNm fuera de fase).

30 En consecuencia, en otro aspecto más, la memoria descriptiva presenta un procedimiento para potenciar la resistencia a enfermedad vírica en una célula de planta de uva, incluyendo el procedimiento transformar la célula de planta de uva con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico o combinaciones descritas en el presente documento o vectores descritos en el presente documento, en el que la expresión del ácido nucleico en la célula de planta de uva aumenta la resistencia de la célula de planta de uva a enfermedad vírica. En un modo de realización, el procedimiento incluye adicionalmente propagar una planta de uva a partir de la célula vegetal. Células vegetales de uva ejemplares incluyen células del fruto, células de injerto, o células de portainjertos. Y de nuevo, el procedimiento es útil para potenciar la resistencia de una planta de uva a enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid.

35 En otro aspecto más, la memoria descriptiva presenta una una planta de uva o tejido vegetal de uva que incluye cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente o cualquiera de los vectores mencionados anteriormente, en el que la expresión del ácido nucleico o vector en la célula de planta de uva aumenta la resistencia de la célula de planta de uva a enfermedad vírica.

40 En otro aspecto, la memoria descriptiva presenta un producto derivado de una planta de uva transformada con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente o cualquiera de los vectores mencionados anteriormente. En algunos modos de realización, el producto es un producto alimenticio (por ejemplo, mermeladas, pasas, pulpa de uva, una bebida tal como un vino o zumo, o un agente químico tal como resveratrol).

45 Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles para proporcionar resistencia o tolerancia a enfermedades o ambas en una diversidad de vides (por ejemplo, *Vitis* spp., híbridos de *Vitis* spp. y todos los miembros de los subgéneros *Euvitis* y *Muscadinia*) a patógenos víricos (por ejemplo, GFLV), incluyendo variedades de cultivo de injerto y portainjertos. Variedades de cultivo de injerto ejemplares incluyen, sin limitación, aquellas que se mencionan como uvas de mesa o pasas y aquellas usadas en la producción de zumo y vino tales como Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay (por ejemplo, CH 01, CH 02, CH Dijon), Merlot, Pinot Noir (PN, PN Dijon), Semillon, White Riesling, Lambrusco, Thompson sin semillas, Autumn sin semillas, Niagara sin semillas y Seval Blanc. Las variedades de cultivo de portainjertos que son útiles en la invención incluyen, sin limitación, *Vitis rupestris* Constantia, *Vitis rupestris* St. George, *Vitis* California, *Vitis* girdiana, *Vitis* rotundifolia, *Vitis* rotundifolia Carlos, Richter 110 (*Vitis berlandieri* x *rupestris*; "110R"), 101-14 Millardet et de Grasset (*Vitis riparia* x *rupestris*; "101-14 Mgt"), Teleki 5C (*Vitis berlandieri* x *riparia*), Courderc 3309 (*Vitis riparia* x *rupestris*; "C3309"), *Riparia* Gloire de Montpellier

(*Vitis riparia*), 5BB Teleki (selección Kober, *Vitis berlandieri* x *riparia*), SO<sub>4</sub> (*Vitis berlandieri* x *rupestris*), 41B Millardet (*Vitis vinifera* x *berlandieri*), Ramsey (*Vitis champinii*), K5140 (*Vitis champinii* x *Vitis riparia*) y 039-16 (*Vitis vinifera* x *Muscadinia*).

5 La invención también presenta frutos, injertos, portainjertos, embriones somáticos o cigóticos, células, o semillas que se producen a partir de cualquiera de las plantas transgénicas o componentes vegetales descritos en el presente documento.

10 Preferentemente, la vid útil en la invención es un miembro del género *Vitis*; y el componente de vid es un fruto, un embrión somático, un injerto, un portainjertos, o un bloque madre. En otros modos de realización, la enfermedad del entrenudo corto infeccioso es enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid causada por un nepovirus de la uva. En otros modos de realización más, el nepovirus es un GFLV o un ArMV.

15 En otro aspecto, la memoria descriptiva presenta un viñedo que incluye tres o más vides o componentes de vid transgénicos cada uno de los cuales expresa una o más de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, en el que la molécula de ácido nucleico aumenta la resistencia de las vides o componentes de vid transgénicos en el viñedo a enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid.

20 La invención también presenta injertos, portainjertos, embriones somáticos o cigóticos, células, o semillas que se producen a partir de cualquiera de las vides o componentes de vid transgénicos descritos en el presente documento. La invención también incluye una célula de uva que se ha transformado con una molécula de ácido nucleico que se posiciona para expresión por unión funcional del transgén a una región de control de la expresión de plantas que proporciona resistencia a un patógeno vírico. Dichas células de uva después se usan para generar portainjertos, injertos, embriones somáticos, o semillas usando procedimientos que se conocen en la técnica (por ejemplo, los descritos en el presente documento).

25 Por "molécula de ácido nucleico" se entiende una molécula, por ejemplo, ARN o ADN, que tiene una secuencia de dos o más nucleótidos de origen natural o modificados, unidos covalentemente. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, mono- o bicatenaria y puede incluir nucleótidos modificados o no modificados, o mezclas o combinaciones de los mismos. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas ácidas libres.

30 Por "fragmento de ácido nucleico" se entiende un segmento contiguo de una molécula de ácido nucleico. La longitud de un segmento de ácido nucleico puede variar desde al menos un par de bases (por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 330, 350, 400, 450, 500, 700, 1000, 1500, o 2000 pares de bases) hasta la longitud completa de la molécula de ácido nucleico. Cuando se menciona en el presente documento que una molécula de ácido nucleico tiene más de un fragmento de ácido nucleico, se entiende que estos fragmentos de ácido nucleico ocupan partes no solapantes de la molécula de ácido nucleico.

40 Por "identidad de secuencia" se entiende (en el contexto de comparación de la secuencia de una molécula de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico con una secuencia de referencia) que la molécula de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico tiene la misma secuencia que la secuencia de referencia o tiene un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales en las localizaciones correspondientes dentro de la secuencia de referencia cuando la secuencia de longitud completa de la molécula de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico se alinea de forma óptima con la longitud completa de la secuencia de referencia. Dentro de este contexto, el porcentaje de nucleótidos que son iguales entre dos secuencias se calcula con referencia a la longitud de la secuencia más larga. La identidad de secuencia puede calcularse entre ADN y ADN, ARN y ARN, o ADN y ARN. Cuando se calcula una identidad de secuencia entre ADN y ARN, se aprecia bien en la técnica que los restos de timidina son equivalentes a los restos de uracilo para los propósitos de este cálculo. Además, se aprecia bien en la técnica que si el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia complementaria inversa con la secuencia de referencia es mayor que el de la secuencia directa, entonces el porcentaje de identidad de secuencia es la cantidad primera. Se puede usar el algoritmo de Needleman-Wunsch, por ejemplo, para determinar la identidad de secuencia en base a alineaciones globales óptimas. Están disponibles al público programas informáticos para determinar la identidad de secuencia de ácidos nucleicos en, por ejemplo, el sitio web del European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Por ejemplo, en la siguiente alineación global de secuencia entre el fragmento 1 de GFLV y el Concatenado 714,

## ES 2 567 104 T3

Fragmento1	1		0
Concatenado714	1	GGATCCAGAAGAAATTGAGATTGGTTCTCGTTTCTTCGATTTCACTTCGA	50
Fragmento1	1		0
Concatenado714	51	ATACTTGTAGGGTATCTATGGGTGAAAATCCGTTTGCTGCAATGATTGCC	100
Fragmento1	1	ggtaccaga	9
Concatenado714	101	TGCCATGGATTGCATAGTGGTGC GGCCGCTCTAGCGTCGACGGTACCAGA	150
Fragmento1	10	tgaattgtgctttccatatacctgatcctaagcagcccgccatccttagcg	59
Concatenado714	151	TGAATTGTGCTTTCCATATCCTGATCCTAAGCAGCCCGCCATCCTTAGCG	200
Fragmento1	60	cagaggatgaacgccttaagggaaacgatccatgaaggatacactccgtta	109
Concatenado714	201	CAGAGGATGAACGCCTTAAGGGAACGATCCATGAAGGATACACTCCGTTA	250
Fragmento1	110	agggatggcatgaagaagtttgcctgagccaatgtatctgctagaggaaaa	159
Concatenado714	251	AGGGATGGCATGAAGAAGTTTCTGAGCCAATGTATCTGCTAGAGGAAAA	300
Fragmento1	160	actactcgatgaagttgcaggtgacatggttcagacgtggatga	204
Concatenado714	301	ACTACTCGATGAAGTTGCAGGTGACATGGTTCAGACGTGGTATGACTCGA	350
Fragmento1	205		204
Concatenado714	351	GACCGGACCCCAGCTCCCTACTTTAGGGCTGTTGGGGCTTTTGCACCAAC	400
Fragmento1	205		204
Concatenado714	401	CCGGTCCGAGTTTGTTCGGGCCATTGTGGAAAGGCTCACCCGGCTACGGG	450
Fragmento1	205		204
Concatenado714	451	AGGAGTCGAGAGCTGCGGCACCTTTGCGCAATTGCCAGGATCC	494

5 estas dos secuencias tienen un 43 % de identidad de secuencia porque se alinean 204 pares de bases de 494 pares de bases (la longitud de la secuencia más larga).

10 Por "sustancialmente idéntica" se entiende (en el contexto de comparación de la secuencia de una molécula de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico con una secuencia de referencia) que las secuencias tienen una identidad de secuencia, calculada usando procedimientos descritos anteriormente, de al menos el 85 % (por ejemplo, al menos el 85 %, 87 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %).

15 Por "resistencia potenciada a un patógeno de plantas" se entiende un nivel mayor de resistencia a un patógeno (por ejemplo, un virus tal como un GFLV o un ArMV) en una planta transgénica (o componente o célula vegetal, semilla, o embrión somático de la misma) que el nivel de resistencia respecto a una planta de control (por ejemplo, una planta no transgénica). En un modo de realización, el nivel de resistencia a un patógeno en una planta transgénica es de al menos un 5 a un 10 % (y preferentemente un 20 %, 30 %, o 40 %) mayor que la resistencia de una planta de control. En otros modos de realización, el nivel de resistencia al patógeno es un 50 % mayor, 60 % mayor y más preferentemente incluso un 75 % o 90 % mayor que una planta de control; siendo lo más preferido hasta el 100 % de resistencia en comparación con una planta de control. El nivel de resistencia se mide usando procedimientos convencionales. Por ejemplo, el nivel de resistencia a enfermedad del entrenudo corto infeccioso puede determinarse comparando elementos y características físicas (por ejemplo, altura y peso de la planta, o comparando síntomas de enfermedad, por ejemplo, desarrollo retardado de lesiones, tamaño reducido de las lesiones, marchitamiento y enrollamiento de las hojas, moteado y necrosis de las hojas, deformidad de las cañas, cantidad de entrenudos, anillos en mosaico en las hojas y decoloración de las células) de vides transgénicas. La infectividad de un nepovirus de la uva (por ejemplo, un GFLV o un ArMV) también puede controlarse usando, por ejemplo, ELISA convencional, o cualquier procedimiento divulgado en el presente documento.

25

Por "unido de forma funcional" se entiende que un gen y una o más secuencias reguladoras están conectados de tal forma que permita la expresión génica cuando se unen las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) a la una o más secuencias reguladoras.

5 Por "célula vegetal" se entiende cualquier célula con auto-propagación unida por una membrana semi-permeable y que contiene un plástido. Una célula vegetal, como se usa en el presente documento, se obtiene de, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejidos de callo, protoplastos, hojas, raíces, brotes, embriones somáticos y cigóticos, así como de cualquier parte de un tejido u órgano reproductor o vegetativo.

10 Por "componente vegetal" se entiende una parte, segmento, u órgano obtenido de una planta o célula vegetal intacta. Componentes vegetales ejemplares incluyen, sin limitación, embriones somáticos, frutos, hojas, frutos, injertos y portainjertos.

15 Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico, sea una molécula de origen natural u otra cosa, puede estar "sustancialmente purificada", si se desea, lo que se refiere a una molécula separada de sustancialmente todas las demás moléculas normalmente asociadas con ella en su estado nativo. Más preferentemente una molécula sustancialmente purificada es la especie predominante presente en una preparación. Una molécula sustancialmente purificada puede estar más de un 60 % libre, preferentemente un 75 % libre, más preferentemente un 90 % libre y lo más preferentemente un 95 % libre de las demás moléculas (excluyendo el disolvente) presentes en la mezcla natural. La expresión "sustancialmente purificada" no pretende abarcar moléculas presentes en su estado nativo.

20 Como se ha analizado anteriormente, los autores de la invención describen moléculas de ácido nucleico útiles para proporcionar vides transgénicas con resistencia contra la enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid causada por el virus, virus del entrenudo corto infeccioso de la vid. En consecuencia, como hay pocas alternativas para controlar el virus del entrenudo corto infeccioso de la vid en uvas, la invención proporciona varios avances importantes y ventajas para los viticultores. La invención, por ejemplo, facilita un medio eficaz y económico para la protección contra la enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid y otras enfermedades inducidas por nepovirus de la uva. Dicha protección reduce o minimiza la necesidad de prácticas químicas tradicionales (por ejemplo, fumigación del suelo) típicamente usadas por los viticultores para controlar la propagación de un nepovirus de la uva y proporciona protección contra estos patógenos causantes de enfermedad. Además, como las plantas de uva que expresan dichas secuencias de nepovirus de la uva son menos vulnerables a infección por nepovirus de la uva y la enfermedad del entrenudo corto infeccioso, la invención proporciona adicionalmente una eficacia aumentada de producción, así como mejoras en la calidad, color, aroma y cosecha de uvas. Además, como la invención reduce la necesidad de protección química contra patógenos de la vid, beneficia al entorno donde están plantados los viñedos. La invención también se puede usar para proporcionar protección contra otras enfermedades causadas por nepovirus (por ejemplo, virus del mosaico del Arabis) en, por ejemplo, frambuesa, fresa, cereza, lúpulo, grosella negra, grosella, saúco, ruibarbo, lechuga, tomate, pepino, apio, narciso y forsitia.

35 40 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de los modos de realización preferidos de la misma y a partir de las reivindicaciones.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 Figura 1: Muestra dos ARN genómicos de GFLV. Las regiones de conservación identificadas por el análisis de secuencia de GFLV se muestran en negro. Los círculos indican agrupaciones de estas regiones en los 8 fragmentos elegidos de ácido nucleico. El dibujo no está a escala.

50 Figura 2: Muestra valores de absorbancia de DAS-ELISA para GFLV en plantas *Nicotiana benthamiana* agro-infiltradas con i) sin construcción, ii) construcción concatenada 582, o iii) una construcción del gen de la proteína de cubierta traducible (CP). Las plantas se inocularon mecánicamente con GFLV (Virus) o no (sin virus).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

55 Las moléculas purificadas de ácido nucleico, vectores, células, plantas, componentes vegetales, productos y procedimientos de la presente invención se refieren a la protección de plantas (por ejemplo, plantas de uva) contra enfermedades de plantas causadas por virus de plantas (por ejemplo, GFLV y el ArMV serológicamente relacionado). A continuación se proporcionan detalles adicionales de la invención.

#### 60 **Nepovirus**

Nepovirus es un género de virus de la familia *Comoviridae* que se transmiten por nematodos. Los nepovirus se clasifican como virus de tipo IV según el sistema de Baltimore; es decir, tienen un genoma de ARN, monocatenario, de dos partes. Estos dos segmentos del genoma de ARN, ARN1 y ARN2, están encapsulados por separado en partículas víricas icosaédricas. ARN1, de aproximadamente 8.000 pares de bases de longitud, codifica genes importante para la replicación del virus (por ejemplo, ARN polimerasa dependiente de ARN). ARN2, entre 4000 a

7000 pares de bases de longitud, tiene genes que codifican la proteína de Movimiento y la proteína de Cubierta y es importante para la transmisión célula-célula del virus. Cada ARN tiene una extensión poli(A) 3'. Se incluyen en el género de nepovirus el virus del mosaico del arabis (ArMV) y el virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV).

5 **Virus del entrenudo corto infeccioso de la vid**

El virus del entrenudo corto infeccioso de la vid es un patógeno de la vid que puede propagarse sobre largas distancias en el suelo y entre nematodos de plantas. Un vector para la enfermedad es el nematodo *Xiphinema index*. El virus también puede transmitirse por siembra e injerto. La enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid es una enfermedad vírica generalizada de la vid, causada por GFLV, que se encuentra en todas las regiones de cultivo de vides. *Vitis spp.* es un huésped natural principal de la enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid. La enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid se caracteriza por malformaciones de las hojas y cañas y por diversos tipos de decoloraciones foliares del follaje (por ejemplo, moteado, amarilleamiento, manchas anulares, patrones de líneas). Se reducen los racimos de uvas en cantidad y tamaño y los frutos pierden dulzor y acidez. Las pérdidas en cultivo debido a la enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid pueden ser muy altas (de hasta el 90 %). La propagación local del virus es difícil de controlar. El virus persiste en las raíces de vides alzadas y puede permanecer en vectores de nematodo durante varios meses. El control de los vectores por fumigación del suelo es difícil e ineficaz y otras estrategias tales como barbecho prolongado, rotación de cultivos, laboreo y control de malezas son igualmente ineficaces.

20 **Virus del mosaico del arabis**

El virus del mosaico del arabis, también conocido como el virus del enanismo amarillo de la frambuesa o el virus del mosaico del ruibarbo, está serológicamente relacionado con GFLV. ArMV se encuentra en muchas especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se ha demostrado que provoca enanismo amarillo en frambuesa, arrugamiento en mosaico y amarillo en fresa, moteado atrofiado en pepino, atrofia clorótica en lechuga, atrofia y necrosis en apio, tejido amarillo en forsitia y mosaico en ruibarbo. ArMV también se encuentra en muchas otras plantas incluyendo uva, cereza, grosella negra, grosella, saúco, tomate, narciso, remolacha azucarera, lúpulo, rábano picante, *Narcissus*, rosa, *Sambucus nigra*, *Ligustrum vulgare* y trébol blanco. Vectores para ArMV incluyen los nematodos que habitan el suelo, independientes, *Xiphinema diversicaudatum* y *Xiphinema coxi*.

**Metodología**

35 Análisis de información de secuencia de GFLV

Los autores de la invención han analizado la información de secuencia del genoma de GFLV y se han identificado tramos de secuencia que pueden incorporarse en construcciones transgénicas para proporcionar resistencia a una amplia gama de variantes de GFLV. El análisis de los autores de la invención provocó la identificación de regiones del genoma que poseen altos niveles de conservación a nivel de nucleótidos. Las búsquedas de los autores de la invención se centraron en la variación de nucleótidos individuales. Se eligieron solamente regiones del genoma de al menos 20 pb de longitud que contenían más de un 95 % de conservación de más del 85 % de los nucleótidos individuales. La conservación dentro del ARN genómico ARN2 se determinó a través de alineación de toda la información de secuencia disponible de GFLV usando el algoritmo ClustalX e identificación de posiciones de nucleótidos en las que el nucleótido dominante estaba presente el 95 % de las veces. La conservación del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) en el ARN genómico ARN1 se determinó por alineación de la información de secuencia de GFLV disponible con el nepovirus ArMV muy relacionado e identificación de regiones de conservación usando la misma metodología descrita anteriormente. Las regiones conservadas identificadas usando estos procedimientos, como se ilustra en la Figura 1, se utilizaron para desarrollo de construcciones posterior.

50 Diseño de construcciones transgénicas

Después del análisis de secuencia de GFLV en el que se identificaron tramos conservados de nucleótidos de GFLV, estos tramos se agruparon en ocho regiones más grandes (rodeadas con círculo en la Figura 1). Estas ocho regiones se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Ocho regiones de ARN1 y ARN2 identificadas por análisis de secuencia de GFLV así como su longitud, los genes de los que se deriva cada región y las regiones más cortas de conservación incluidas dentro de cada región.

Región (desde el extremo 5' de ARN)	Longitud total	Genes incluidos	Regiones conservadas incluidas
4743-4935 nt (ARN1)	193 nt	RdRp	4743-4807 nt (65 nt), 4851-4875 nt (25 nt) y 4903-4935 nt (33 nt)

ES 2 567 104 T3

5300-5483 nt (ARN1)	184 nt	RdRp	5300-5342 nt (43 nt), 5368-5393 nt (26nt) y 5431-5483 nt (53nt)
5746-6073 nt (ARN1)	328 nt	RdRp	5746-5813 nt (68 nt), 5824-5855 (32 nt), 5868-5920 nt (43 nt) y 6001-6073 nt (73 nt)
582-700 nt (ARN2)	119 nt	Proteína Auxiliar (2A)	582-700 nt (119 nt)
1991-2137 nt (ARN2)	147 nt	Proteína de Movimiento (2B) y de Cubierta (2C)	1991-2021 nt (31 nt) y 2088-2137 nt (50 nt)
2811-2935 nt (ARN2)	125 nt	CP (2C)	2811-2874 nt (64 nt) y 2904-2935 nt (32 nt)
3132-3232 nt (ARN2)	101 nt	CP (2C)	3132-3174 nt (33 nt) y 3207-3232 nt (26 nt)
3531-3757 nt (ARN2)	227 nt	CP (2C) y región no codificante 3'	3531-3588 nt (58 nt) y 3692-3757 nt (67 nt)

Después de la identificación de estas regiones, se clonaron ocho fragmentos de ácido nucleico que abarcaban estas regiones a partir del ADNc de GFLV. Las secuencias de estos ocho fragmentos de ácido nucleico se dan a continuación:

5

Fragmento 1 (SEC ID N.º: 1)

GGTACCAGAT GAATTGTGCT TTCCATATCC TGATCCTAAG CAGCCCGCCA TCCTTAGCGC  
 AGAGGATGAA CGCCTTAAGG GAACGATCCA TGAAGGATAC ACTCCGTTAA GGGATGGCAT  
 10 GAAGAAGTTT GCTGAGCCAA TGTATCTGCT AGAGGAAAAA CTA CTCTCGATG AAGTTGCAGG  
 TGACATGGTT CAGACGTGGT ATGA

Fragmento 2 (SEC ID N.º: 2)

CTTGTTGAGA GTAAAATTTT TGTCTTTTTC CCGCCTACTG ATGAAGAAGA GAGGCCACCT  
 GCCTTGTCAG GTGGGCATCA ATCCTTATAG TCGCGAATGG ACCGATTTGT ATCACCGCTT  
 15 AGGTGAACFC TCTGATGTCG GATACAATTG TGATTATAAG GCTTTTGATG GCCTAATTAC  
 GGAGCAAAT TTGAGT

20

Fragmento 3 (SEC ID N.º: 3)

TACCTATGGT GATGATAATG TCTTCACTGT GGCACAATCT GTCATGCAGT ATTTTACTGG  
 25 CGATGCTCTG AAAATGCAAA TGGCAAAGCT TGGGGTAACT ATTACTGATG GGAAAGATAA  
 GTCTCTTTCC ACTATTCCAG CCCGTCCACT GCTGGAATTA GAGTTTTTGA AACGTGGATT  
 TGTTAGAAGC TCTGGGGGTA TGATAAATGC GCCTTTGGAA AAATTATCAA TAATGAGTTC  
 TTTGGTCTAC ATCAGAAGTG ATGGCTCAGA CATGTTGCAG AACTATTGG ACAATGTTAA  
 30 TACTGCACTT GTCGAGCTTT ATCTACATGG TGA

Fragmento 4 (SEC ID N.º: 4)

CCCCAGCTCC CTA CTTTAGG GCTGTTGGGG CTTTTGCACC AACCCGGTCC GAGTTTGTTC  
 35 GGGCCATTGT GGAAAGGCTC ACCCGGCTAC GGGAGGAGTC GAGAGCTGCG GCACTCTTTG  
 CCGAATTGCC A

## ES 2 567 104 T3

### Fragmento 5 (SEC ID N.º: 5)

```
TGATAGAAAC GTTGATCTTC CTCAACTTGA GGCTGAGCCC AACTGAGCT CAACCGTGAG
AGGGCTAGCC GGCAGAGGAG TAATCTACAT TCCCAAGGAT TGCCAGGCAA ATAGATACTT
GGGCACCCCTG AATATACGTG ATATGATCTC AGACTTCAAG
```

### Fragmento 6 (SEC ID N.º: 6)

```
TTAGTGAGTG GAACGGGACC ACTATGGACT GGAATGAACT TTTTAAGTAT CCCGGGGTGT
ATGTGGAAGA GGACGGGAAGT TTTGAAGTAA AGATTGCTC TCCATATCAC CGAACTCCTG
CCAGATTGCT TGCTGGTCAA AGTCAG
```

### Fragmento 7 (SEC ID N.º: 7)

```
ACAAGAAATT GAGATTGGTT CTCGTTTCTT CGATTTCACT TCGAATACTT GTAGGGTATC
TATGGGTGAA AATCCGTTTG CTGCAATGAT TGCCTGCCAT GGATTGCATA GTGGT
```

### Fragmento 8 (SEC ID N.º: 8)

```
TTTAGCTTTT ATGGTAGAAC CAGTTTCCCA GTCTAGTGAT ACGTAGATAT CTAGGGTATC
TGACTTTAAA AGACCCAAGT GTATATATGT GTTTTGTGAG TAGCATGTAT TATTTTGTGT
TATAAATTTGT TTTAACTTGT TTTCCGCTTT TGTGTGTTTA GTTTCATGCT TTTAGTGGCG
ACAGTGTGTT GTTTGTCTT TGGACACACT TGCCTAGTTC GACGCAAAA GATTTTTCCT
TTCTTTTAC TG
```

Se usó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar estos fragmentos de ácido nucleico a partir del ADNc de GFLV F13. Los fragmentos de ácido nucleico amplificados posteriormente se ligaron en diversos concatenados, con la intención de combinar regiones conservadas de múltiples genes (incluyendo la ARN polimerasa dependiente de ARN, proteína auxiliar, proteína de movimiento y proteína de cubierta) dentro del genoma de GFLV para proporcionar resistencia contra diversas variantes de GFLV (es decir, para posibilitar resistencia de amplio espectro), volviendo para una cepa GFLV individual más difícil de mutar para superar la resistencia proporcionada por transgenes derivados de estos fragmentos de ácido nucleico. .

Los fragmentos de ácido nucleico de GFLV pueden concatenarse de diversos modos. En un ejemplo de trabajo, se concatenan dos fragmentos de ácido nucleico sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8 (por ejemplo, fragmento 1 + fragmento 2, fragmento 5 + fragmento 8, o fragmento 4 + fragmento 7) sin ninguna secuencia intermedia entre los fragmentos de ácido nucleico. De forma alternativa, los dos fragmentos de ácido nucleico se concatenan con uno o más pares de bases (por ejemplo, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, o 1000 pares de bases) de secuencias intermedias entre los fragmentos de ácido nucleico. La longitud y composición de secuencia intermedia entre dos fragmentos cualesquiera de ácido nucleico de estos concatenados pueden variar de acuerdo con técnicas de ligamiento de ácidos nucleicos conocidas en la técnica. Los presentes concatenados también pueden tener secuencias flanqueantes de uno o más pares de bases (por ejemplo, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, o 1000 pares de bases) en uno o ambos lados de los fragmentos de ácido nucleico. Los fragmentos de ácido nucleico pueden orientarse cada uno, independientemente, en una orientación con sentido o anti-sentido (por ejemplo, con sentido/con sentido, con sentido/anti-sentido, anti-sentido/con sentido, o anti-sentido/anti-sentido).

En otro ejemplo de trabajo, se concatenan tres fragmentos de ácido nucleico sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8 sin ninguna secuencia intermedia entre estos fragmentos de ácido nucleico. De forma alternativa, los tres fragmentos de ácido nucleico pueden tener uno o más pares de bases (por ejemplo, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, o 1000 pares de bases) de secuencia intermedia entre dos fragmentos de ácido nucleico consecutivos cualesquiera. Estos concatenados también pueden tener uno o más pares de bases (por ejemplo, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, o 1000 pares de bases) de secuencia flanqueando uno o ambos lados de los fragmentos de ácido nucleico. Cada fragmento de ácido nucleico en la concatenación puede tener un porcentaje de identidad de secuencia con los fragmentos 1-8 SEC ID N.º: 1-8 que varía independientemente de los de otros fragmentos de ácido nucleico en el concatenado.

Se describen moléculas ejemplares de ácido nucleico que tienen tres fragmentos de ácido nucleico sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8 en los siguientes concatenados. Como se usa en el presente documento, el nombre de cada concatenado es un conjunto de dígitos correspondientes, en orden, a los fragmentos de ácido nucleico presentes en el concatenado. Por ejemplo, el concatenado 463 incluye fragmento 4, fragmento 6 y fragmento 3, en ese orden.

Concatenado 463 (SEC ID N.º: 17)

GGATCCCCCAGCTCCCTACTTTAGGGGCTGTTGGGGCTTTTGCACCAACCCGGTCCGAGTT  
TGTTCCGGCCATTGTGGAAAGGCTCACCCGGCTACGGGAGGAGTTCGAGAGCTGCGGCAC  
5 CTTTGCCGAATTGCCAGGGCCCTTAGTGAGTGGAAACGGGACCACTATGGACTGGAATGAA  
CTTTTAAAGTATCCCGGGGTGTATGTGGAAAGAGGACGGAAAGTTTTGAAGTAAAGATTCCGCT  
CTCCATATCACCCGAACCTCCTGCCAGATTGCTTGGTCAAAGTCAGGCGGCCGCTCTAGC  
GTCGACTACCTATGGTGATGATAATGTCTTCACTGTGGCACAATCTGTCATGCAGTATTTT  
10 ACTGGCGATGCTCTGAAAATGCAAATGGCAAAGCTTGGGGTAACTATTACTGATGGGAAA  
GATAAGTCTCTTCCACTATCCAGCCCGTCCACTGCTGGAATTAGAGTTTTTAAAACGTG  
GATTTGTTATAAGCTCTGGGGGTATGATAAATGCGCCTTTGGAAAAATTATCAATAATGAG  
TTCTTTGGTCTACATCAGAAGTGATGGCTCAGACCTGTTGCAGAAACTATTGGACAGTGT  
AATACTGCACTTGTCCAGCTTTTCTAGCTGGTGAGGATCC

Concatenado 582 (SEC ID N.º: 18)

GGATCCTGATAGAAACGTTGATCTTCTCAACTTGAGGCTGAGCCCAGACTGAGCTCAACC  
GTGAGAGGGCTAGCCGGCAGAGGAGTAATCTACATTCCCAAGGATTGCCAGGCAAATAGA  
20 TACTTGGGCACCCTGAATATACGTGATATGATCTCAGACTTCAAGGGGCCCTTTAGCTTTT  
ATGGTAGAACCAAGTTTCCAGTCTAGTGATACGTAGATATCTAGGGTATCTGACTTTAAAA  
GACCCAAGTGATATATATGTGTTTTGTTCAGTAGCATGTATTATTTTGTGTTATAAATTTGTTT  
AACTTGTTTTCCGCTTTTGTGTGTTTTAGTTTTCATGCTTTTAGTGGCGACAGTGTGTTGTTG  
TCCTTTGGACACACTTGCCTAGTTGGACGCAAAAAGATTTTTCTTTCTTTTACTGGCGGC  
CGCTCTAGCGTCGACCTTGTGAGAGTAAAATTTTTGTCTTTTTCCCGCCTACTGATGAAGA  
25 AGAGAGGCCACCTGCCTTGTCAAGTGGGCATCAATCCTTATAGTCGCGAATGGACCGATTT  
GTATCACCGCTTAGGTGAACTCTCTGATGTCGGATACAATTGTGATTATAAGGCTTTTGAT  
GGCCTAATTACGGAGCAAATTTTGTGAGTGGATCC

Concatenado 714 (SEC ID N.º: 19)

GGATCCAGAAGAAATTGAGATTGGTTCTCGTTTCTTCGATTTCACTTTCGAATACTTGTAGG  
GTATCTATGGGTGAAAATCCGTTTGTCTGCAATGATTGCCTGCCATGGATTGCATAGTGGTG  
CGGCCGCTCTAGCGTCGACGGTACCAGATGAATTGTGCTTTCATATCCTGATCCTAAGCA  
35 GCCCGCCATCCTTAGCGCAGAGGATGAACGCCTTAAGGGAACGATCCATGAAGGATACAC  
TCCGTTAAGGGATGGCATGAAGAAGTTTGTCTGAGCCAATGTATCTGCTAGAGGAAAAACT  
ACTCGATGAAGTTGCAGGTGACATGGTTAGACAGTGGTATGACTCGAGACCGGACCCAG  
CTCCCTACTTTAGGGCTGTTGGGGCTTTTGCACCAACCCGGTCCGAGTTTGTTCGGGCCAT  
TGTGGAAAGGCTCACCCGGCTACGGGAGGAGTCGAGAGCTGCGGCACCTTTTGCCGAATT  
40 GCCAGGATCC

Concatenado 678 (SEC ID N.º: 20)

GGATCCTTAGTGAGTGGAAACGGGACCACTATGGACTGGAATGAACTTTTTAAGTATCCCGG  
GGTGTATGTGGAAGAGGACGGAAAGTTTTGAAGTAAAGATTCCGCTCTCCATATCACCGAAC  
45 TCCTGCCAGATTGCTTGGTCAAAGTCAGGCGGCCAGAAAGAAATTGAGATTGGTTCTC  
GTTTCTTCGATTTCACTTTCGAATACTTGTAGGGTATCTATGGGTGAAAATCCGTTTGTCTGCA  
ATGATTGCCTGCCATGGATTGCATAGTGGTGGCGCCCTTTAGCTTTTATGGTAGAACCAAGT  
TTCCCAGTCTAGTGATACGTAGATATCTAGGGTATCTGACTTTAAAAGACCCAAGTGTATA  
TATGTGTTTTGTTCAGTAGCATGTATTATTTTGTGTTATAAATTTGTTTTAACTTGTTTTCCGCT  
50 TTTGTGTGTTTGTGTTTTCATGCTTTTGTGCGACAGTGTGTTGTTTGTCTTTGGACACACT  
TGCTAGTTGGACGCAAAAAGATTTTTCTTTCTTTTACTGGGATCC

Concatenado 123 (SEC ID N.º: 21)

GGATCCGGTACCAGATGAATTGTGCTTTCCATATCCTGATCCTAAGCAGCCCGCCATCCTT  
AGCGCAGAGGATGAACGCCTTAAGGGAACGATCCATGAAGGATACACTCCGTTAAGGGAT  
55 GGCATGAAGAAGTTTGTCTGAGCCAATGTATCTGCTAGAGGAAAAACTACTCGATGAAGTT  
GCAGGTGACATGGTTCAGACGTGGTATGACTCGACCTTGTGAGAGTAAAAATTTTTGTCTT  
TTCCCGCCTACTGATGAAGAAGAGAGGCCACCTGCCTTGTCAAGTGGGCATCAATCCTTA  
TAGTCGCGAATGGACCGATTTGTATCACCCGCTTAGGTGAACTCTCTGATGTCGGATACAAT  
60 TGTGATTATAAGGCTTTGATGGCCTAATTACGGAGCAAATTTTGTGACTCGACTACCTAT  
GGTGATGATAAATGTCTTCACTGTGGCACAATCTGTTCATGCAGTATTTTACTGGCGATGCTC  
TGAAAATGCAAATGGCAAAGCTTGGGGTAACTATTACTGATGGGAAAGATAAGTCTCTTT  
CCACTATCCAGCCCGTCCACTGCTGGAATTAGAGTTTTTAAAACGTGGATTTGTTAGAAG  
CTCTGGGGGTATGATAAATGCGCCTTTGGAAAAATTATCAATAATGAGTTCTTTGGTCTAC  
65 ATCAGAAGTGATGGCTCAGACATGTTGCAGAAACTATTGGACAATGTTAATACTGCACTTG  
TCGAGCTTTATCTACATGGTGAGGATCC

Concatenado 375 (SEC ID N.º: 22)

5 GGATCCTACCTATGGTGTATGATAATGTCTTCACTGTGGCACAATCTGTCATGCAGTATTTT  
 ACTGGCGATGCTCTGAAAATGCAAATGGCAAAGCTTGGGGTAACTATTACTGATGGGAAA  
 GATAAGTCTCTTTCCACTATCCAGCCCGTCCACTGCTGGAATTAGAGTTTTTTGAAACGTG  
 GATTTGTTAGAAGCTCTGGGGGTATGATAAATGCGCCTTTGGAAAAATTATCAATAATGAG  
 10 TTCTTTGGTCTACATCAGAAGTGATGGCTCAGACATGTTGCAGAACTATTGGACAATGTT  
 AATACTGCACTTGTGCGAGCTTTATCTACATGGTACTCGAGACCGGCGGGCCAGAATAAA  
 TTGAGATTGGTTCTCGTTTCTTCGATTTCACTTCGAATACTTGTAGGGTATCTATGGGTGAA  
 AATCCGTTTGGCTGCAATGATTGCCTGCCATGGATTGCATAGTGGTGGCGCCGCTCCGGATG  
 ATAGAAATCGTTGATCTTCTCAACTTGAGGCTGAGCCCAGACTGACCTCAACCGTGAGAG  
 GGCTAGCCGGCAAAGGAGTAATCTACTTTCCCAAGGATTGCCAGGCAAATAGATACTTGG  
 15 CCACCCTGAATATACGTGATATGATCTCAGACTTCAAGGGATCC

Concatenado 168 (SEC ID N.º: 23)

20 GGATCCGGTACCAGATGAATTGTGCTTTCCATATCCTGATCCTAAGCAGCCCGCCATCCTT  
 AGCGCAGAGGATGAACGCCTTAAGGGAACGATCCATGAAGGATACACTCCGTTAAGGGAT  
 GGCATGAAGAAGTTTGGCTGAGCCAATGTATCTGCTAGAGGAAAACTACTCGATGAAGTT  
 GCAGGTGACATGGTTCAGACGTGGTATGACTCGAGACCGGCGGGCCCTTAGTGAGTGGAA  
 CGGGACCACATGGACTGGAATGAACCTTTTAAGTATCCCGGGGTGTATGTGGAAGAGGA  
 CGGAAGTTTGAAGTAAAGATTCCGCTCCATATCACCGAACTCCTGCCAGATTGCTTGTCT  
 25 GGTCAAAGTCAGGCGGCCCTTAGCTTTTATGGTAGAACCAGTTTCCAGTCTAGTGATAC  
 GTAGATATCTAGGGTATCTGACTTTAAAAGACCCAAGTGTATATATGTGTTTTGTCAGTAG  
 CATGTATTATTTTGTGTTATAATTTGTTTTAACTTGTTTTCCGCTTTTGTGTGTTTAGTTTCA  
 TGCTTTTAGTGCGACAGTGTGTTGTTTGTCTTTGGACACACTTGCCTAGTTGGACGCAA  
 AAAGATTTTCTTTTCTTTTTACTGGGATCC

Concatenado 245 (SEC ID N.º: 24)

30 GGATCCCTTGTTGAGAGTAAAATTTTTGTCTTTTTCCCGCCTACTGATGAAGAAGAGAGGC  
 CACCTGCCTTGTCAAGTGGGCATCAATCCTTATAGTCGCGAATGGACCGATTTGTATCACC  
 35 GCTTAGGTGAACTCTCTGATGTCGGATACAATTGTGATTATAAGGCTTTTGGATGGCCTAAT  
 TACGGAGCAAATTTGAGTCTCGAGACCGGAGCGGCCCTGGCAAATTTGGCAAAGAGTGCC  
 GCAGCTCTCGACTCCTCCCGTAGCCGGGTGAGCCTTTCCACAATGGCCCGAACAACTCGG  
 ACCGGGTTGGTGCAAAGCCCCAACAGCCCTAAAGTAGGGAGCTGGGGTCCGGATGATAG  
 AAACGTTGATCTTCTCAACATGAGGCTGAGCCCAGACTGTGCTCAACCGTGAGAGGGCTA  
 40 GCCGGCAGAGGAGTAATCTACATTTCCCAAGGATTGCCAGGCAAATAGATACTTGGGCACC  
 CTGAATATACGTGATATGATCTCAGACTTCAAGGGATCC

45 Otros ejemplos de trabajo presentan moléculas de ácido nucleico que tienen más de 3 fragmentos de ácido nucleico  
 sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de la presente  
 invención puede tener 4 fragmentos de ácido nucleico sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8 (por ejemplo,  
 fragmento 2 + fragmento 4 + fragmento 5 + fragmento 7 o fragmento 3 + fragmento 1 + fragmento 6 + fragmento 1).  
 En otro ejemplo, una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede tener 5 fragmentos de ácido  
 nucleico sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8 (por ejemplo, fragmento 2 + fragmento 4 + fragmento 5 +  
 fragmento 7 + fragmento 2). En otro ejemplo, una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede tener 6  
 50 fragmentos de ácido nucleico sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8 (por ejemplo, fragmento 3 + fragmento  
 7 + fragmento 5 + fragmento 1 + fragmento 6 + fragmento 8, como se describe a continuación en el concatenado  
 375168).

Concatenado 375168 (SEC ID N.º: 25)

55 GGATCCCAGTAAAAAGAAAGGAAAAATCTTTTTGCGTCCAAGTGGCAAGTGTGTCCAAA  
 GGACAAACAACACACTGTCGCCACTAAAAGCATGAACTAAACACACAAAAGCGGAAAAC  
 AAGTTAAAACAATTTATAACACAAAATAATACCTGCTACTGACAAAACACATATATACACT  
 60 TGGGTCTTTAAGTCAGATACCCTAGATATCTACGTATCACTAGACTGGGAAACTGGTTCT  
 ACCATAAAAGCTAAAGGGCCGCTGACTTTGACCAGCAAGCAATCTGGCAGGAGTTCGGT  
 GATATGGAGAGCGAATCTTTACTTCAAACTTCCGTCCTCTTCCACATACACCCCGGGATA  
 CTTAAAAGTTCAATCCAGTCCATAGTGGTCCCGTTCCTCACTAAGGGCCCGCCGGTCT  
 CGAGTCATACCAGTCTGAACCATGTCACCTGCAACTTCATCGAGTAGTTTTTCTCTAGC  
 65 AGATACATTGGCTCAGCAAATCTTTCATGCCATCCCTAACGGAGTGTATCCTTCATGGA  
 TCGTTCCCTTAAGGCGTTCATCCTCTGCGCTAAGGATGGCGGGCTGCTTAGGATCCCTTGA  
 AGTCTGAGATCATATCACGTATATTCAGGGTGCCAAGTATCTATTTGCCTGGCAATCCTT  
 GGAATGTAGATTACTCCTCTGCCGGCTAGCCCTCTCACGGTTGAGCTCAGTCTGGGCTCA

5 GTCTCAAGTTGAGGAAGATCAACGTTTCTATCATCCGGAGCGGCCGCACCACTATGCAATC  
 CATGGCAGGCAATCATTGCAGCAAACGGATTTTCACCCATAGATACCCCTACAAGTATTCGA  
 AGTGA AATCGAAGAAACGAGAACCAATCTCAATTTCTTCTGGGCCCGCCGGTCTCGAGTCA  
 CCATGTAGATAAAGCTCGACAAGTGCAGTATTAACATTGTCCAATAGTTTCTGCAACATGT  
 CTGAGCCATCACTTCTGATGTAGACCAAAGAATTCATTATTGATAATTTTTCCAAAGGGCGC  
 ATTTATCATACCCCCAGAGCTTCTAACAAATCCACGTTTCAAAAACCTCTAATTCAGCAGT  
 10 GGACGGGCTGGAATAGTGGAAAGGGACTTATCTCTCCCATCAGTAATAGTTACCCCAAGCT  
 TTGCCATTTGCATTTTCAGAGCATCGCCAGTAAAATACTGCAGACAGATTGTGCCACAGTG  
 AAGACATTATCATCACCATAGGTAGGATCC

Otros ejemplos de trabajo más presentan moléculas de ácido nucleico que tienen más de 6 (por ejemplo, 7, 8, o más) fragmentos de ácido nucleico sustancialmente idénticos a los fragmentos 1-8. A continuación se describe un concatenado que tiene 8 fragmentos de ácido nucleico, el concatenado 12367845:

Concatenado 12367845 (SEC ID N.º: 26)

20 GGATCCGGTACCCGATGAATTGTGCTTTCATATCCTGATCCTAAGCAGCCCGCCATCCTT  
 AGCGCAGAGGATGAACGCCTTAAGGGAACGATCCATGAAGGATACACTCCGTTAAGGGAT  
 GGCATGAAGAAGTTTGCTGAGCCAATGTATCTGCTAGAGGAAAACTACTCGATGAAGIT  
 GCAGGTGACATGGTTCAGACGTGGTATGACTCGACCTTGTTGAGAGTAAAATTTTTGTCTT  
 TTTCCCGCTACTGATGAAGAAGAGAGGCCACCTGCCTTGTC AAGTGGGCATCAATCCTTA  
 25 TAGTCGCGAATGGACCGATTTGTATCACCGCTTAGGTGAACCTCCCTGATGTCGGATACAAT  
 TGTGATTATAAGGCTTTTGATGGCCTAATTACGGAGCAAATTTTGAGTCTCGACTACCTAT  
 GGTGATGATAATGTCCTTCACTGTGGCACAATCTGTCTGCAGTACTTTACTGGCGATGCTC  
 TGAAAATGCAAATGGCAAAGCTTGGGGTAACTATTACTGATGGGAAAGATAAGTCTCTTT  
 CCACTATTCAGCCCGTCCACTGCTGGAATTAGAGTTTTTGAAACGTGGATTTGTTAGAAG  
 30 CTCTGGGGGTATGATAAATGCGCCTTTGGAAAAATTATCAATAATGAGTTCCTTTGGICTAC  
 ATCAGAAGTGATGGCTCAGACATGTTGCAGAACTATTGGACAATGTTAATACTGCACTTG  
 TCGAGCTTTATCTACATGGTACTCGGGACCGGCCGGCCCTTAGTGAGTGGAAACGGGACC  
 ACTATGGACTGGAATGAACTTTTTAAGTATCCCGGGGTGTATGTGGAAGAGGACGGAAGT  
 35 TTTGAAGTAAAGATTTCGCTCTCCATATCACCGA ACTCCTGCCAGATTGCTTGCTGGTCAA  
 GTCAGGCGGCCCAGAAGAAATTGAGATTGGTTCTCGTTTCTTCGATTTCACTTCGAATACT  
 TGTAGGGTATCTATGGGTGAAAATCCGTTTGTGCAATGATTGCCTGCCATGGATTGCATA  
 GTGGTGCGGCCCTTTAGCTTTTATGGTAGAACCAGTTTCCAGTCTAGTGATACGTAGATA  
 TCTAGGGTATCTGGCTTTAAAAGACCCAAGTGTATATATGTGTTTTGTGTCAGTAGCATGTAT  
 40 TATCTTGTGTTATAATTTGTTTTAACTTGTTTTCCGCTTTTGTGTGTTTAGTTTCATGCTTT  
 AGTGGCGACAGTGIGTIGTTTTGTCTTTGGACACACTTGCCTAGTTGGACGCAAAAAGATT  
 TTTCCCTTTCTTTTACTGGCGGCCGCTCCGGACCCAGCTCCCTACTTTAGGGCTGTTGGGG  
 CTTTTGCACCAACCCGGTCCGAGTTTGTTCGGGCCATTGTGGAAAGGCTCACCCGGCTACG  
 45 GGAGGAGTCGAGAGCTGCGGCACTCTTGGCGAATTGCCAGGGCCGCTCCGGATGATAGA  
 AACGTTGATCTTCTCAACTTGAGGCTGAGCCAGACTGAGCTCAACCGTGAGAGGGCTAG  
 CCGGCAGAGGAGTAATCTACATTTCCAAGGATTGCCAGGCAAATAGATACTTGGGGCGCCC  
 TGAATATACGIGATATGATCTCAGACTTCAAGGGATCC

50 En otro ejemplo de trabajo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento de ácido nucleico que es sustancialmente idéntico al concatenado 463, 582, 714, 678, 123, 375, 168, 245, 12367845, o 375168 (SEC ID N.º: 17-26).

55 Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento puede contener más de una copia del mismo fragmento de ácido nucleico (por ejemplo, fragmento 6 + fragmento 7 + fragmento 7 (es decir, un concatenado 677)). En algunos modos de realización, todos los fragmentos de ácido nucleico en la molécula son el mismo fragmento de ácido nucleico (por ejemplo, fragmento 1 + fragmento 1 (es decir, un concatenado 11) o fragmento 2 + fragmento 2 + fragmento 2 (es decir, un concatenado 222)).

60 Otras moléculas ejemplares de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, las SEC ID N.º: 9-16.

Construcción de transgenes de plantas

65 Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente puede expresarse como un transcrito de ARNm con sentido traducible o con sentido no traducible o como un transcrito de ARNm anti-sentido por una línea celular de uva transfectada de forma estable o por una vid o componente de vid transgénico. Están disponibles al

público varios vectores adecuados para transfección estable o extracromosómica de células vegetales, o para el establecimiento de plantas transgénicas. Los procedimientos para construir dichas líneas celulares también se conocen bien en la técnica.

5 Típicamente, los vectores de expresión de plantas incluyen (1) un gen clonado (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que expresa un ARN de nepovirus de la uva con sentido traducible, con sentido no traducible, o anti-sentido) sometido al control transcripcional de secuencias de control de la expresión 5' y 3' y (2) un marcador de selección dominante. Dichos vectores de expresión de plantas también pueden contener, si se desea, una región reguladora promotora (por ejemplo, una que confiere expresión inducible o constitutiva, inducida por patógeno o  
10 heridas, regulada por el entorno o el desarrollo, o específica de célula o tejido), un sitio de partida para el inicio de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

15 Una vez se obtiene la molécula de ácido nucleico deseada como se ha descrito anteriormente, puede manipularse en una diversidad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede, si se desea, combinarse con otras moléculas de ácido nucleico en una diversidad de formas. En sus partes componentes, se combina una molécula de ácido nucleico en una construcción que tiene una región de control de inicio de la transcripción capaz de promover la transcripción en una célula de vid huésped.

20 En general, las construcciones implican regiones reguladoras funcionales en plantas. Por ejemplo, la secuencia traducible con sentido para una molécula de ácido nucleico puede unirse en su extremo 5' a una región reguladora del inicio de la transcripción, por ejemplo, una secuencia encontrada de forma natural en la región cadena arriba 5' de un gen estructural de plantas. En otro ejemplo, la secuencia no traducible con sentido para una molécula de ácido nucleico puede unirse en su extremo 5' a una región reguladora del inicio de la transcripción. En otro ejemplo  
25 más, la secuencia anti-sentido para una molécula de ácido nucleico puede unirse en su extremo 5' a una región reguladora del inicio de la transcripción. Están disponibles numerosas regiones de inicio de la transcripción que proporcionan regulación constitutiva o inducible.

30 Para aplicaciones en las que se desea expresión en el desarrollo, celular, tisular, hormonal, o ambiental, se obtienen regiones no codificantes cadena arriba 5' apropiadas de otros genes, por ejemplo, de genes regulados durante el desarrollo de los meristemos, desarrollo de las semillas, desarrollo de los embriones, desarrollo de las hojas, desarrollo de los tallos, o desarrollo de los zarcillos.

35 También pueden proporcionarse regiones de terminación de transcritos reguladoras en construcciones de ADN de la presente invención. Pueden proporcionarse regiones de terminación de transcritos por la molécula de ácido nucleico o cualquier región conveniente de terminación de la transcripción derivada de una fuente génica diferente (por ejemplo, los terminadores NOS o 35S de CaMV). La región de terminación de transcritos contendrá preferentemente al menos 1 a 3 kb de secuencia 3' respecto al gen estructural del que se obtiene la región de terminación. Pueden emplearse construcciones de expresión de plantas que tienen la molécula de ácido nucleico de la presente invención  
40 como la secuencia de interés para su expresión (en la producción de ARNm bien en la orientación anti-sentido o bientraducible con sentido o bien no traducible con sentido) con una amplia gama de vides. Dichas plantas modificadas por ingeniería genética son útiles para una diversidad de aplicaciones industriales y agrícolas. De forma importante, la presente invención es aplicable a todas las vides o componentes de vid y será fácilmente aplicable a cualesquiera procedimientos de transformación o de regeneración nuevos o mejorados de la uva.

45 Las construcciones de expresión incluyen al menos un promotor unido de forma funcional a al menos una secuencia con sentido traducible, con sentido no traducible, o anti-sentido (también son deseables combinaciones). Un ejemplo de un promotor de plantas útil de acuerdo con la invención es un promotor de caulimovirus, por ejemplo, un promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Estos promotores confieren altos niveles de expresión en la mayoría de tejidos vegetales y la actividad de estos promotores no es dependiente de proteínas codificadas por virus. CaMV es una fuente para ambos promotores 35S y 19S. En la mayoría de tejidos de plantas transgénicas, el promotor 35S de CaMV es un promotor fuerte. El promotor de CaMV también es muy activo en monocotiledóneas. Además, la actividad de este promotor puede aumentarse adicionalmente (es decir, entre 2 a 10 veces) mediante duplicación del promotor 35S de CaMV.  
50

55 Otros promotores útiles de plantas incluyen, sin limitación, el promotor de la nopalina sintasa (NOS), el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la actina del arroz, el promotor de la ciclasa y el promotor del virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca. Aún otros promotores ejemplares útiles en la invención incluyen, sin limitación, el promotor del virus del moteado amarillo del Commelina, promotor del badnavirus de la caña de azúcar, promotor del virus baciliforme del tungro del arroz, elemento vírico del estriado del maíz y promotor del virus del enanismo del trigo.  
60

65 Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable expresar cualquiera de las moléculas de ácido nucleico en un tejido apropiado, a un nivel apropiado, o en un momento apropiado del desarrollo. Para este propósito, existe una variedad de promotores génicos, cada uno con sus propias características distintas incorporadas en sus secuencias reguladoras, que se ha demostrado que se regulan en respuesta a señales inducibles tales como el entorno,

hormonas, y/o signos de desarrollo. Éstos incluyen, sin limitación, promotores génicos que son responsables de expresión génica regulada por calor, expresión génica regulada por luz; el promotor *rbcS* del maíz; el gen de la proteína de unión a clorofila *a/b*; el promotor *Arabssu*; o el promotor *rbs* del arroz, expresión génica regulada por hormonas (por ejemplo, las secuencias sensibles a ácido abscísico (ABA) del gen *Em* del trigo; los promotores *HVA1* y *HVA22* inducibles por ABA y *rd29A* descritos para cebada y *Arabidopsis*); y expresión génica inducida por heridas (por ejemplo, de *wun1*), expresión génica específica de órgano (por ejemplo, del gen de la proteína de almacenamiento específica de tubérculo; el gen de la zeína de 23 kDa del maíz; o el gen de la beta-faseolina de la judía verde), o promotores inducibles por patógeno (por ejemplo, promotores *PR-1*, *prp-1* o de beta-1,3 glucanasa, el promotor *wirla* inducible por hongos del trigo y los promotores inducibles por nematodos, *TobRB7-5A* y *Hmg-1*, del tabaco y el perejil, respectivamente).

Los vectores de expresión en plantas también pueden incluir opcionalmente señales de procesamiento del ARN, por ejemplo, intrones, que se ha demostrado que son importantes para síntesis y acumulación del ARN eficaces. La localización de las secuencias de corte y ajuste del ARN puede influir drásticamente en el nivel de expresión transgénica en plantas. En vista de este hecho, puede posicionarse un intrón cadena arriba o cadena abajo de una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento en el transgén para modular los niveles de expresión génica.

Además de las secuencias reguladoras de control 5' mencionadas anteriormente, los vectores de expresión también pueden incluir regiones de control reguladoras que están presentes generalmente en las regiones 3' de genes de plantas. Por ejemplo, puede incluirse la región terminadora 3' en el vector de expresión para aumentar la estabilidad del ARNm. Una de dichas regiones terminadoras puede obtenerse de la región terminadora PI-II de la patata. Además, otros terminadores habitualmente usados se obtienen de las señales de la octopina sintasa o la nopalina sintasa.

El vector de expresión en plantas también contiene típicamente un gen marcador seleccionable dominante usado para identificar aquellas células que han quedado transformadas. Genes seleccionables útiles para sistemas de plantas incluyen genes que codifican genes de resistencia a antibióticos, por ejemplo, aquellos que codifican resistencia a higromicina, kanamicina, bleomicina, G418, estreptomycin, o espectinomycin. También se pueden usar genes necesarios para la fotosíntesis como marcadores seleccionables en cepas deficientes en fotosíntesis. Finalmente, se pueden usar genes que codifican resistencia a herbicidas como marcadores seleccionables; genes de resistencia a herbicidas útiles incluyen el gen *bar* que codifica la enzima fosfinotricina acetiltransferasa y que confiere resistencia al herbicida de amplio espectro BASTA® (Hoechst A G, Frankfurt, Alemania).

Además, si se desea, la construcción de expresión en plantas puede contener una secuencia de molécula de ácido nucleico modificada o completamente sintética que se ha cambiado para potenciar el rendimiento del gen en plantas.

Debe ser fácilmente evidente para un experto en la técnica de biología molecular, especialmente en el campo de biología molecular de plantas, que el nivel de expresión génica es dependiente, no solamente de la combinación de promotores, señales de procesamiento del ARN y elementos terminadores, sino también del modo en que se usan estos elementos para aumentar los niveles de expresión del gen marcador seleccionable.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento se clonaron en el plásmido pEPT8. El plásmido pEPT8 es un derivado de pUC18 que contiene un casete de expresión en plantas con el promotor CaMV 35S y secuencia terminadora que permitirá que las construcciones se expresen de forma constitutiva en la planta huésped. Después de esta etapa, el casete de expresión en plantas se escinde del plásmido pEPT8 y se clona en el plásmido binario pGA482G para la transformación de plantas huésped con las construcciones de interés. Una vez se han construido construcciones potenciales (por ejemplo, construcciones concatenadas), cada una se ensaya para la eficacia contra diversas cepas de GFLV en entornos tanto de laboratorio como de campo.

#### Ensayo transitorio para determinar la eficacia de las construcciones concatenadas

Para identificar construcciones concatenadas con la actividad anti-GFLV más eficaz, se usó un ensayo transitorio basado en una planta modelo *Nicotiana benthamiana*, un huésped sistémico de GFLV que es susceptible a agroinfiltración. En primer lugar, se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con suspensiones de *Agrobacterium tumefaciens* que portaban construcciones genéticas derivadas de GFLV para mediar la expresión transitoria de transgenes y finalmente el silenciamiento. Después, las plantas agroinfiltradas se inocularon mecánicamente con GFLV y se midieron los efectos anti-víricos de las construcciones concatenadas con potencial de silenciamiento controlando el desarrollo de síntomas, si fuera aplicable e investigando la acumulación de virus mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) de tipo sándwich de doble anticuerpo (DAS) con anticuerpos específicos para GFLV y ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcripción inversa (RT) con cebadores apropiados. También se confirmó la inhibición de la multiplicación del virus controlando la producción y acumulación de ARNip en hojas agroinfiltradas usando procedimientos de prueba de bandas de Northern convencionales con ARN total enriquecido en moléculas pequeñas y sondas específicas para GFLV. Se usaron cantidades apropiadas de réplicas de plantas para cada construcción ensayada. Este ensayo transitorio proporciona una exploración rápida para evaluar si el silenciamiento se activa por construcciones genéticas de GFLV y si las

construcciones interfieren con la multiplicación del virus. El ensayo transitorio también proporciona un medio para una rápida exploración inicial para la resistencia sin la necesidad de generar transformantes estables para cada construcción, limitando la cantidad de eventos de portainjertos de vid transgénicos a ensayarse en viñedos infectados de forma natural y acelerando el desarrollo de portainjertos de vid resistentes a GFLV de valor comercial.

Se evaluó el potencial de la construcción concatenada 582 en interferir con la multiplicación de GFLV usando este ensayo transitorio. Los resultados se muestran en la figura 2. Se muestran valores de absorbancia de DAS-ELISA para GFLV en plantas de *Nicotiana benthamiana* agro-infiltradas con construcción concatenada 582 o una construcción del gen de la proteína de cubierta (CP) traducible. Las plantas se inocularon mecánicamente con GFLV o no. Se observó una reducción significativa en la acumulación de virus en plantas agroinfiltradas con la construcción concatenada 582 en comparación con los controles. La reducción en la acumulación de virus fue más pronunciada para la construcción concatenada 582 que para la construcción del gen CP traducible.

#### Transformación de vides

En general, tras la construcción del vector de expresión en plantas, están disponibles varios procedimientos convencionales para la introducción del vector en un huésped vegetal, generando de ese modo una planta transgénica. Estos procedimientos incluyen (1) transformación mediada por *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*), (2) el sistema de suministro de partículas, (3) protocolos de microinyección, (4) procedimiento con polietilenglicol (PEG), (5) captación de ADN mediada por liposomas, (6) protocolos de electroporación y (7) por agitación con vórtice. El procedimiento de transformación no es fundamental para la invención. Puede emplearse cualquier procedimiento que proporcione transformación eficaz. Algunos procedimientos ejemplares para transformar uvas se encuentran en Scorza et al. (*Plant Cell Reports* 14: 589 592, 1995), Baribault et al. (*J. Expt. Bot.* 41: 1045 1049, 1990), Mullins et al. (*BioTechnology* 8: 1041 1045, 1990), Nakano et al. (*J. Expt. Bot.* 45: 649 656, 1994), Kikkert et al. (*Plant Cell Rep.* 15: 311 316, 1995), Krastanova et al. (*Plant Cell Rep.* 1: 550 554, 1995), Scorza et al. (*Plant Cell Rep.* 14: 589 592, 1994), Scorza et al. (*J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 616 619, 1996), Martinelli et al. (*Theor Appl Genet.* 88: 621 628 y Legall et al. (*Plant Sci.* 102: 161 170, 1994). Como están disponibles procedimientos más nuevos para transformar plantas o uvas u otras células huésped, pueden aplicarse directamente también.

Plantas adecuadas para su uso en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, vides (por ejemplo, *Vitis* spp., híbridos de *Vitis* spp. y todos los miembros de los subgéneros *Euvitis* y *Muscadinia*), incluyendo variedades de cultivo de injerto o de portainjertos. Variedades de cultivo de injerto ejemplares incluyen, sin limitación, aquellas que se mencionan como uvas de mesa o pasas y aquellas usadas en la producción de vino tales como Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay (por ejemplo, CH 01, CH 02, CH Dijon), Merlot, Pinot Noir (PN, PN Dijon), Semillon, White Riesling, Lambrusco, Thompson sin semillas, Autumn sin semillas, Niagrara sin semillas y Seval Blanc. Otras variedades de cultivo de injerto que pueden usarse incluyen aquellas habitualmente mencionadas como uvas de mesa o pasas, tales como Alden, Almeria, Anab-E-Shahi, Autumn Black, Beauty sin semillas, Black Corinth, Black Damascus, Black Malvoisie, Black Prince, Blackrose, Bronx sin semillas, Burgrave, Calmeria, Campbell Early, Canner, Cardinal, Catawba, Christmas, Concord, Dattier, Delight, Diamond, Dizmar, Duchess, Early Muscat, Emerald sin semillas, Emperor, Exotic, Ferdinand de Lesseps, Fiesta, Flame sin semillas, Flame Tokay, Gasconade, Gold, Himrod, Hunisa, Hussiene, Isabella, Italia, July Muscat, Khandahar, Katta Kourgane, Kishmishi, Loose Perlette, Malaga, Monukka, Muscat of Alexandria, Muscat Flame, Muscat Hamburg, New York Muscat, Niabell, Niagara, Olivette blanche, Ontario, Pierce, Queen, Red Malaga, Ribier, Rish Baba, Romulus, Ruby sin semillas, Schuyler, Seneca, Suavis (IP 365), Thompson sin semillas y Thomuscat. También se incluyen aquellas usadas en la producción de vino, tales como Aleatico, Alicante Bouschet, Aligote, Alvarelhao, Aramon, Baco blanc (22A), Burger, Cabernet franc, Caberet, Sauvignon, Calzin, Carignan, Charbono, Chardonnay, Chasselas dore, Chenin blanc, Clairette blanche, Early Burgundy, Emerald Riesling, Feher Szagos, Femao Pires, Flora, French Colombard, Fresia, Furmint, Gamay, Gewurztraminer, Grand noir, Gray Riesling, Green Hungarian, Green Veltliner, Grenache, Grillo, Helena, Inzolia, Lagrein, Lambrusco de Salamino, Malbec, Malvasia bianca, Mataro, Melon, Merlot, Meunier, Mission, Montua de Pilas, Muscadelle du Bordelais, Muscat blanc, Muscat Ottonel, Muscat Saint-Vallier, Nebbiolo, Nebbiolo fino, Nebbiolo Lampia, Orange Muscat, Palomino, Pedro Ximenes, Petit Bouschet, Petite Sirah, Peverella, Pinot noir, Pinot Saint-George, Primitivo di Gioia, Red Veltliner, Refosco, Rkatsiteli, Royalty, Rubired, Ruby Cabernet, Saint-Emilion, Saint Macaire, Salvador, Sangiovese, Sauvignon blanc, Sauvignon gris, Sauvignon vert, Scarlet, Seibel 5279, Seibel 9110, Seibel 13053, Semillon, Servant, Shiraz, Souzao, Sultana Crimson, Sylvaner, Tarmat, Teroldico, Tinta Madeira, Tinto cao, Touriga, Traminer, Trebbiano Toscano, Trousseau, Valdepenas, Viognier, Walschriesling, White Riesling y Zinfandel.

Las variedades de cultivo de portainjertos que son útiles en la invención incluyen, sin limitación, *Vitis rupestris* Constantia, *Vitis rupestris* St. George, *Vitis California*, *Vitis girdiana*, *Vitis rotundifolia*, *Vitis rotundifolia* Carlos, Richter 110 (*Vitis berlandieri* x *rupestris*), 101-14 Millardet et de Grasset (*Vitis riparia* x *rupestris*), Teleki 5C (*Vitis berlandieri* x *riparia*), 3309 Courderc (*Vitis riparia* x *rupestris*), *Riparia Gloire de Montpellier* (*Vitis riparia*), 5BB Teleki (selección Kober, *Vitis berlandieri* x *riparia*), SO<sub>4</sub> (*Vitis berlandieri* x *rupestris*), 41B Millardet (*Vitis vinifera* x *berlandieri*) y 039-16 (*Vitis vinifera* x *Muscadinia*). Variedades de cultivo de portainjertos adicionales que pueden usarse incluyen Courderc 1202, Couderc 1613, Couderc 1616, Couderc 3309, Dog Ridge, Foex 33EM, Freedom, Ganzin 1 (A x R n.º: 1), Harmony, Kober 5BB, LN33, Millardet & de Grasset 41B, Millardet & de Grasset 420A, Millardet & de Grasset 101-

14, Oppenheim 4 (S04), Paulsen 775, Paulsen 1045, Paulsen 1103, Richter 99, Richter 110, Riparia Gloire, Ruggeri 225, Saint-George, Salt Creek, Teleki 5A, Vitis rupestris Constantia, Vitis California y Vitis girdiana.

En general, la transferencia y expresión de transgenes en células vegetales, incluyendo plantas de uva, son ahora prácticas rutinarias para los expertos en la técnica y se han convertido en herramientas principales para realizar estudios de expresión génica en plantas y para producir variedades de plantas mejoradas de interés agrícola o comercial.

#### Regeneración de vides transgénicas

Pueden regenerarse células vegetales transformadas con un vector de expresión en plantas, por ejemplo, a partir de células individuales, tejido de callo, o discos foliares de acuerdo con técnicas de cultivo de tejido vegetal convencionales. Se conoce bien en la técnica que diversas células, tejidos y órganos de casi cualquier planta pueden cultivarse satisfactoriamente para regenerar una planta entera; dichas técnicas se conocen bien en la técnica.

En un ejemplo particular, se introduce en *Agrobacterium* por transformación una molécula de ácido nucleico clonada con sentido traducible, con sentido no traducible (por ejemplo, que tiene un codón de parada que incluye un ATG fuera de fase de lectura después del codón de inicio), o anti-sentido de la presente invención sometida al control del promotor 35S de CaMV y el terminador de la nopalina sintasa y que porta un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a kanamicina). Se realiza transformación de vides con *Agrobacterium* que contiene vector como se describe por Scorza y Cordts (Plant Cell Reports 14:589-592, 1995), que se incorpora por la presente por referencia. Se seleccionan transformantes teóricos después de unas pocas semanas en medios de cultivo de tejido vegetal que contiene kanamicina. Después el material vegetal resistente a kanamicina se coloca en medio de cultivo de tejido vegetal sin hormonas para el inicio de la formación de raíces.

Después se exploran las plantas transgénicas que expresan el marcador de selección para la transmisión del transgén por técnicas convencionales de detección como se ha descrito anteriormente. Cada planta transgénica positiva y su descendencia transgénica son únicas en comparación con otras plantas transgénicas establecidas con el mismo transgén. La integración del ADN transgénico en el ADN genómico de la planta es, en la mayoría de los casos, aleatoria y el sitio de integración puede afectar profundamente a los niveles y patrones tisulares y de desarrollo de expresión del transgén. Por consiguiente, habitualmente se exploran varias líneas transgénicas para cada transgén para identificar y seleccionar plantas con los perfiles de expresión más apropiados.

Se evalúan líneas transgénicas para los niveles de expresión del transgén. Se determina inicialmente la expresión a nivel de ARN para identificar y cuantificar plantas positivas a la expresión. Se emplean técnicas convencionales para análisis del ARN y se incluyen ensayos de prueba de bandas de Northern y ensayos de evacuación nuclear. Las plantas ARN-positivas después se analizan para resistencia a infección por GFLV usando procedimientos convencionales. Las vides transformadas que expresan una secuencia con sentido no traducible que tienen resistencia a la enfermedad del entrenudo corto infeccioso respecto a plantas de control se aceptan como útiles en la invención.

#### Protocolo de transformación

Se usó el siguiente protocolo de transformación para producir portainjertos de vides transgénicas que expresan construcciones concatenadas. Se obtuvieron portainjertos de vides transgénicas que expresaban construcciones concatenadas por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de cultivos embriogénicos somáticos. Se iniciaron cultivos embriogénicos a partir de anteras inmaduras de 3309 Couderc (*V. riparia* x *V. rupestris*), 101-14 Millardet et De Grasset (*V. riparia* x *V. rupestris*), *V. rupestris* St. George, 110 Richter (*V. rupestris* x *V. berlandieri*) y SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*). Se cultivaron anteras aisladas en medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa al 0,2 %, 0,2 mg/l de bencilaminopurina (BA), 1,1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 7,2 g/l de agar Noble a 28 °C en la oscuridad. Este medio se menciona como medio de inducción de embriones (EIM). Se hizo sub-cultivo de callos primarios a intervalos de 3-4 semanas. Se usó la cepa C58Z707 de *A. tumefaciens* desarmada que albergaba plásmidos binarios con construcciones concatenadas para la transformación de callos embriogénicos por cultivo en EIM que contenía 100 mg/l de acetosiringona a 25 °C en la oscuridad durante 48 horas de co-cultivo. Después, los callos embriogénicos se transfirieron a medio de inducción de embriones suplementado con 300 mg/l de cefotaxima, 200 mg/l de carbenicilina, 100 mg/l de acetosiringona y 25 mg/l de kanamicina y se cultivaron a 28 °C en la oscuridad. Se obtuvieron grupos de callos embriogénicos secundarios con embriones en desarrollo por transferencia de callos embriogénicos primarios en medio MS de media fuerza suplementado con medio de diferenciación de embriones (EDM; 10 g/l de sacarosa, 3,6 ml/l de glicerol y 7,2 g/l de agar Noble). Este medio se menciona como Cultivos que se mantuvieron a 28 °C en la oscuridad durante uno a dos meses con sub-cultivos a intervalos de 3 semanas. La germinación y crecimiento de embriones se consiguió transfiriendo grupos embriogénicos con embriones diferenciados a MS de fuerza total con medio de elongación de embriones (EEM; 20 g/l de sacarosa, 3,6 ml/l de glicerol, 1 g/l de hidrolizado de caseína y 7,2 g/l de agar Noble). Los cultivos se hicieron crecer en la oscuridad a 28 °C con sub-cultivos cada tres semanas durante uno-dos meses. Los embriones elongados (5-15 mm de longitud) se transfirieron a medio de regeneración de embriones (ERM; medio de plantas

leñosas sin vitaminas pero suplementado con 0,1 mg/l de BA, 3 g/l de carbón activado, sacarosa al 1,5 % y 7,2 g/l de agar Noble) para la regeneración de plantas. Los embriones elongados se mantuvieron a 25 °C con un fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad) con luz fluorescente fría a 45  $\mu\text{Em-2s-1}$  en una habitación de cultivos tisular. Se propagarán plántones derivados de embriones en germinación como esquejes nodales individuales en ERM en tarros de comida de bebé para la multiplicación y formación de raíces con luz fluorescente fría a 45  $\mu\text{Em-2s-1}$  en una habitación de cultivo tisular. Después de 2-4 semanas, los plántones con raíces se plantaron en macetas en mezcla Cornell (una mezcla de turba, vermiculita, piedra caliza molida y uni-mix 10-20-5) y se cultivaron a  $25 \pm 5$  °C con un fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad) en un invernadero. Se produjo un total de 12 líneas independientes de portainjertos 3309C y 6 líneas independientes de portainjertos S04 que expresaban las construcciones concatenadas 582 y 714 usando el protocolo anterior.

#### Evaluación de resistencia de vides transgénicas

La resistencia de vides transgénicas a infección por GFLV puede evaluarse, por ejemplo, en un sitio de viñedo infectado por GFLV de forma natural. La resistencia puede ensayarse, por ejemplo, por inspección visual del desarrollo de síntomas, evaluando el vigor de la planta y determinando la acumulación de virus en el tiempo usando rt-PCR o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) de tipo sándwich de doble anticuerpo (DAS), o por medición de la producción de la producción de alimento con la condición de que los portainjertos se injerten con material de injertos. Se dan procedimientos ejemplares para evaluar la resistencia de vides a infección vírica en Vigne et al. (Transgenic Res. 13:165-173), Komar et al. (Plant Disease 92:1689-1694) y Valat et al. (Plant Science 170:739-747).

#### Ensayo de campo

Pueden ensayarse plantas de uva maduras transformadas con las construcciones de la presente invención en las condiciones de campo en viñedos (es decir, parcelas de tierra que incluyen tres o más vides o componentes de vid transgénicos que expresan cualquiera de las moléculas de ácido nucleico o vectores descritos en el presente documento) infestados con virus (por ejemplo, GFLV) en cualquier localización adecuada tal como, por ejemplo, Chile, California, o Francia de acuerdo con procedimientos convencionales.

#### **Productos alimenticios**

En algunos aspectos, la memoria descriptiva presenta productos derivados de plantas transformadas con las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente. Los productos alimenticios derivados de plantas de uva incluyen frutos de uva (por ejemplo, coles negro, azul, negro azulado, dorado, rojo, verde, púrpura y blanco en variedades con semillas y sin semillas). Las variedades comunes de uvas incluyen uvas Thompson, Flame, Ruby, Perlette y Tokay. Productos alimenticios adicionales de uva incluyen pasas (uvas secas), mermeladas y confituras. Las bebidas derivadas de uvas incluyen vinos y zumos. Las variedades de vino incluyen Pinot Noir, Merlot, Chardonnay y Cabernet Sauvignon. Muchos vinos se conocen por la marca, o se nombran por las regiones en que se cultivan (por ejemplo, Bordeaux y Chianti).

Productos alimenticios adicionales de la memoria descriptiva incluyen los derivados de uva, frambuesa, fresa, cereza, lúpulo, grosella negra, grosella, saúco, ruibarbo, lechuga, tomate, pepino, apio, narciso y forsitia. Los usos comunes de estas plantas en productos alimenticios se conocen bien en la técnica. Éstos incluyen frutas, confituras, mermeladas, ensaladas, cerveza, zumos, pasteles, helado, salsas, galletas y similares.

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que comprende un primer fragmento de ácido nucleico y un segundo fragmento de ácido nucleico, en la que dicha molécula de ácido nucleico tiene menos del 99 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 27 (GFLV ARN1) y la SEC ID N.º: 28 (GFLV ARN2) o un fragmento de ácido nucleico de las mismas y en el que dicho primero y segundo fragmentos de ácido nucleico son cada uno al menos un 90 % idénticos a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N.º: 1 (fragmento 1), SEC ID N.º: 2 (fragmento 2), SEC ID N.º: 3 (fragmento 3), SEC ID N.º: 4 (fragmento 4), SEC ID N.º: 5 (fragmento 5), SEC ID N.º: 6 (fragmento 6), SEC ID N.º: 7 (fragmento 7) y SEC ID N.º: 8 (fragmento 8) o un complemento de las mismas.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, comprendiendo adicionalmente dicha molécula de ácido nucleico un tercer fragmento de ácido nucleico que es idéntico a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N.º: 1 (fragmento 1), SEC ID N.º: 2 (fragmento 2), SEC ID N.º: 3 (fragmento 3), SEC ID N.º: 4 (fragmento 4), SEC ID N.º: 5 (fragmento 5), SEC ID N.º: 6 (fragmento 6), SEC ID N.º: 7 (fragmento 7) y SEC ID N.º: 8 (fragmento 8) o un complemento de las mismas.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N.º: 17 (concatenado 463), SEC ID N.º: 18 (concatenado 582), SEC ID N.º: 19 (concatenado 714), SEC ID N.º: 20 (concatenado 678), SEC ID N.º: 21 (concatenado 123), SEC ID N.º: 22 (construcción concatenada 375), SEC ID N.º: 23 (concatenado 168), SEC ID N.º: 24 (concatenado 245), SEC ID N.º: 25 (concatenado 12367845) y SEC ID N.º: 26 (concatenado 375168).
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, confiriendo dicha molécula de ácido nucleico resistencia a un patógeno de plantas en una planta que expresa dicha molécula de ácido nucleico.
5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico está unida de forma funcional a un promotor, en la que el promotor es opcionalmente un promotor regulado por el desarrollo, específico de orgánulo, específico de tejido, constitutivo o específico de célula y/u opcionalmente es inducible por uno o más agentes externos.
6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico es ADN o ARN.
7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico está opcionalmente unida de forma funcional en una orientación con sentido traducible, con sentido no traducible, o anti-sentido a un promotor.
8. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 7, en la que dicha célula es opcionalmente una célula bacteriana o vegetal.
9. Una planta o componente vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o el vector de la reivindicación 7.
10. La planta o componente vegetal de la reivindicación 9, en el que dicha planta es una dicotiledónea, en la que dicha dicotiledónea es opcionalmente una planta de uva y en la que dicha planta de uva es opcionalmente un miembro del género *Vitis*.
11. La planta o componente vegetal de la reivindicación 10, en el que dicho componente vegetal es una uva, embrión somático, injerto, o portainjertos.
12. Un procedimiento para potenciar la resistencia a un patógeno de plantas en una planta, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a) proporcionar una célula vegetal que expresa la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1; y
  - (b) regenerar una planta o componente vegetal a partir de dicha célula vegetal, en el que dicho ácido nucleico se expresa en dicha planta y en el que dicha planta tiene resistencia potenciada a un patógeno de plantas en comparación con una planta no transformada correspondiente, en el que dicha planta es opcionalmente una dicotiledónea, en el que dicha dicotiledónea es opcionalmente una planta de uva, preferentemente un miembro del género *Vitis* y en el que dicho patógeno de plantas es opcionalmente un virus, preferentemente un virus del entrenudo corto infeccioso de la vid.
13. Un procedimiento para aumentar la resistencia a enfermedad vírica en una célula de planta de uva, comprendiendo dicho procedimiento transformar dicha célula de planta de uva con una molécula de ácido nucleico

de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de dicho ácido nucleico en dicha célula de planta de uva aumenta la resistencia de dicha célula de planta de uva a enfermedad vírica y en el que dicha enfermedad vírica es opcionalmente un virus del entrenudo corto infeccioso de la vid y en el que dicho procedimiento opcionalmente comprende además propagar una planta de uva a partir de dicha célula vegetal.

5 14. El procedimiento de las reivindicaciones 12 o 13, en el que dicho componente vegetal es una uva, embrión somático, injerto, o portainjertos.

10 15. La planta de uva de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la expresión de dicho ácido nucleico en dicha célula de planta de uva aumenta la resistencia de dicha célula de planta de uva a enfermedad vírica, en la que dicha enfermedad vírica es opcionalmente enfermedad del entrenudo corto infeccioso de la vid.

15

20

Figura 1

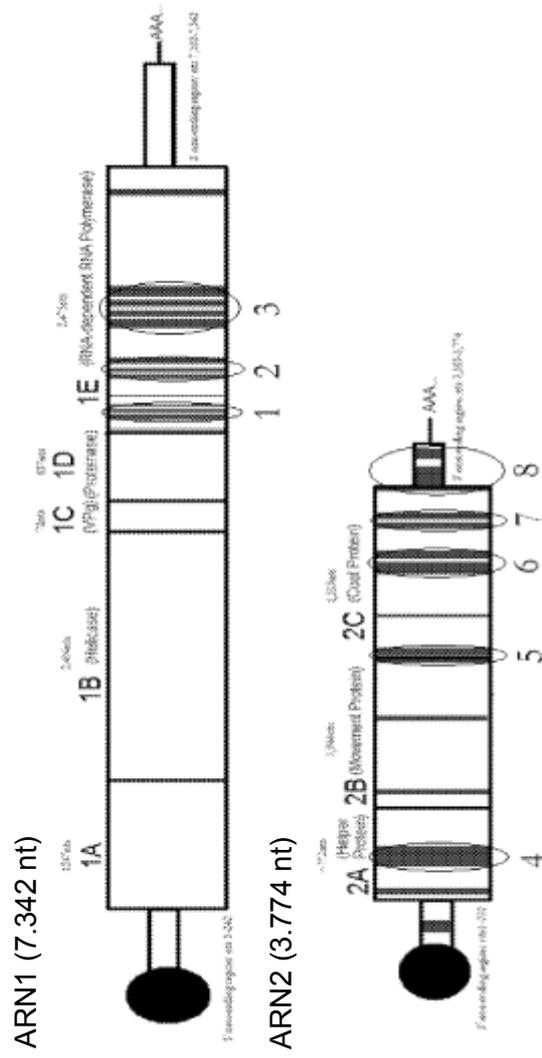
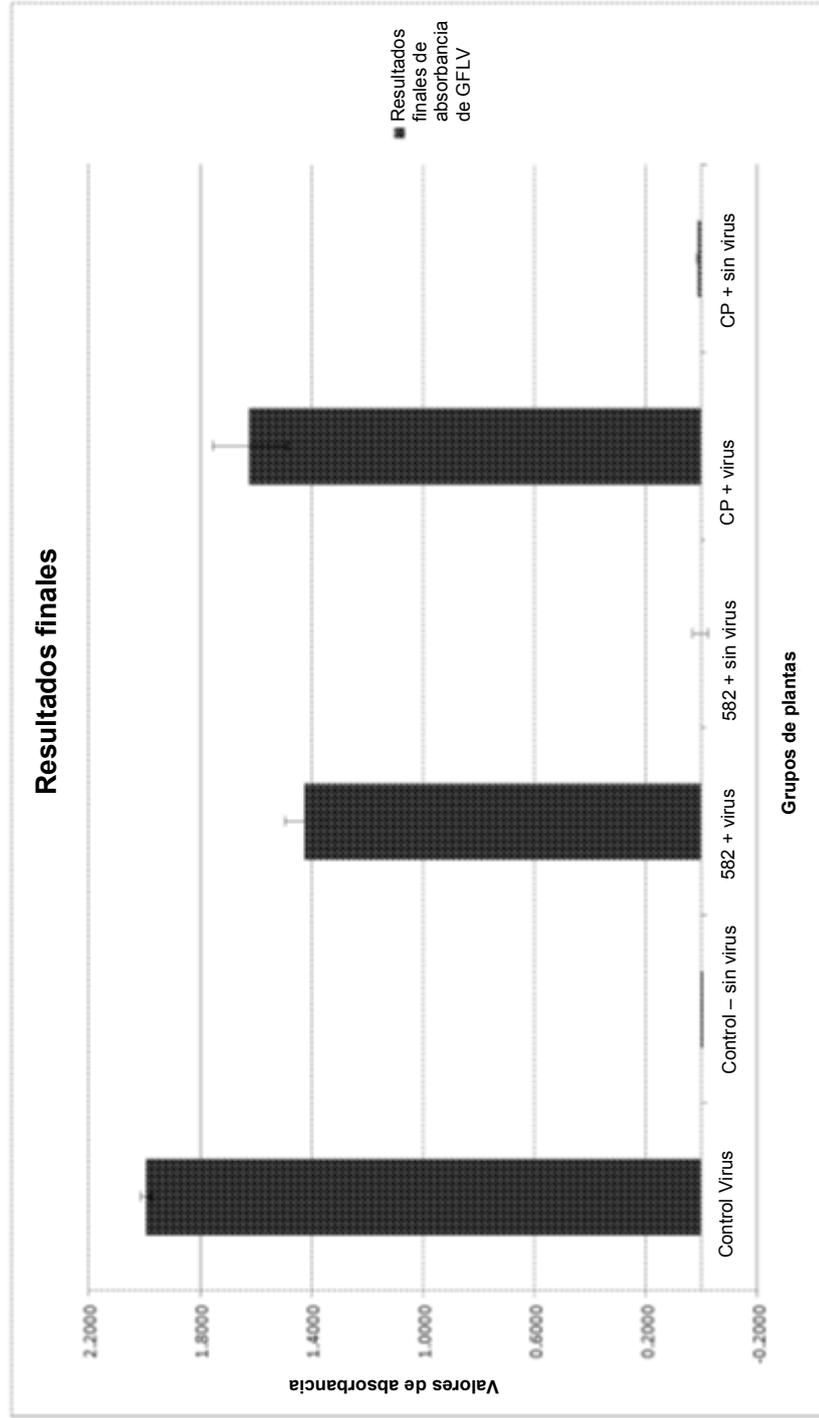


Figura 2



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fuchs. Marc

5 <120> Diseño por ingeniería de resistencia amplia y duradera a virus del entrenudo corto infeccioso de la vid en plantas

<130> 50341/013WO2

10 <160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 204

<212> ADN

<213> Sintética

<400> 1

20 ggtaccagat gaattgtgct ttccatatcc tgatcctaag cagcccgcca tcccttagcgc 60

agaggatgaa cgccttaagg gaacgatcca tgaaggatac actccgtaa gggatggcat 120

gaagaagttt gctgagccaa tgtatctgct agaggaaaaa ctactcgatg aagttgcagg 180

tgacatggtt cagacgtggt atga 204

<210> 2

<211> 196

25 <212> ADN

<213> Sintética

<400> 2

cttgttgaga gtaaaatfff tgtctttttc ccgcctactg atgaagaaga gaggccacct 60

gccttgtaaa gtgggcatca atccttatag tgcggaatgg accgatttgt atcaccgctt 120

aggtgaactc tctgatgtcg gatacaattg tgattataag gcttttgatg gcctaattac 180

30 ggagcaaatt ttgagt 196

<210> 3

<211> 333

35 <212> ADN

<213> Sintética

<400> 3

tacctatggt gatgataatg tcttcaactgt ggcacaatct gtcatgcagt attttactgg 60

cgatgctctg aaaatgcaaa tggcaaaagct tggggtaact attactgatg ggaaagataa 120

gtctctttcc actattccag cccgtccact gctggaatta gagtttttga aacgtggatt 180

tgttagaagc tctgggggta tgataaatgc gcctttggaa aaattatcaa taatgagttc 240

tttggctctac atcagaagtg atggctcaga catggttcag aaactattgg acaatgttaa 300

tactgcactt gtcgagcttt atctacatgg tga 333

40

ES 2 567 104 T3

	<210> 4		
	<211> 131		
	<212> ADN		
	<213> Sintética		
5	<400> 4		
	ccccagctcc ctacttttagg gctgttgggg cttttgcacc aaccCGgtcc gagtttgttc	60	
	gggccattgt ggaaaggctc acccggctac gggaggagtc gagagctgcg gcactctttg	120	
	ccgaattgcc a	131	
10	<210> 5		
	<211> 160		
	<212> ADN		
	<213> Sintética		
15	<400> 5		
	tgatagaaac gttgatcttc ctcaacttga ggctgagccc agactgagct caaccgtgag	60	
	agggctagcc ggcagaggag taatctacat tcccaaggat tgccaggcaa atagatactt	120	
	gggcaccctg aatatacgtg atatgatctc agacttcaag	160	
20	<210> 6		
	<211> 146		
	<212> ADN		
	<213> Sintética		
25	<400> 6		
	ttagtgagtg gaacgggacc actatggact ggaatgaact tttaagtat cccgggggtg	60	
	atgtggaaga ggacggaagt ttggaagtaa agattcgctc tccatatcac cgaactcctg	120	
	ccagattgct tgctgggtcaa agtcag	146	
30	<210> 7		
	<211> 115		
	<212> ADN		
	<213> Sintética		
35	<400> 7		
	agaagaaatt gagattggtt ctgtttctt cgatttcact tcgaatactt gtaggtatc	60	
	tatgggtgaa aatccgtttg ctgcaatgat tgctgccat ggattgcata gtggt	115	
40	<210> 8		
	<211> 252		
	<212> ADN		
	<213> Sintética		
40	<400> 8		
	tttagctttt atggtagaac cagtttccca gtctagtgat acgtagatat ctagggtatc	60	
	tgactttaa agaccaagt gtatatatgt gttttgtcag tagcatgtat tattttgtgt	120	

ES 2 567 104 T3

tataatttgt ttttaacttgt tttccgcttt tgtgtgttta gtttcatgct tttagtggcg 180  
 acagtgtggt gtttgtcctt tggacacact tgcctagtgt gacgcaaaaa gatttttctt 240  
 ttctttttac tg 252

5 <210> 9  
 <211> 666  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

<400> 9

gagcggccgc tccggacccc agctccctac tttagggctg ttggggcttt tgcaccaacc 60  
 cggctccgagt ttgttcgggc cattgtggaa aggctcaccg ggctacggga ggagtcgaga 120  
 gctgcggcac tctttgccga attgccaggg cccttagtga gtggaacggg accactatgg 180  
 actggaatga actttttaag tatcccgggg tgtatgtgga agaggacgga agttttgaag 240  
 taaagattcg ctctccatat caccgaactc ctgccagatt gcttgctggt caaagtcagg 300  
 cggccgctct agcgtcgact acctatggtg atgataatgt cttcactgtg gcacaatctg 360  
 tcatgcagta ttttactggc gatgctctga aaatgcaaat ggcaaagctt ggggtaacta 420  
 ttactgatgg gaaagataag tctctttcca ctattccagc ccgtccactg ctggaattag 480  
 agtttttgaa acgtggattt gttagaagct ctgggggtat gataaatgcg ctttggaag 540  
 aattatcaat aatgagttct ttggtctaca tcagaagtga tggctcagac atgttgcaga 600  
 aactattgga caatgttaat actgcacttg tcgagcttta tctacatggt gactcagac 660  
 cggttc 666

10

<210> 10  
 <211> 664  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

15

<400> 10

gagcggccgc tccggatgat agaaaogttg atcttctca acttgaggct gagcccagac 60  
 tgagctcaac cgtgagaggg ctagccggca gaggagtaat ctacattccc aaggattgcc 120  
 aggcaaatag atacttgggc accctgaata tacgtgatat gatctcagac ttcaaggggc 180  
 ctttagctt ttatggtaga accagtttcc cagtctagtg atacgtagat atctagggta 240  
 tctgacttta aaagacccaa gtgtatatat gtgttttgtc agtagcatgt attattttgt 300  
 gttataattt gttttaactt gttttccgct tttgtgtgtt tagtttcatg cttttagtgg 360  
 cgacagtgtg ttgtttgtcc tttggacaca cttgcctagt tggacgcaaa aagatttttc 420  
 ctttctttt actggcggcc gctctagcgt cgacctgtt gagagtaaaa tttttgtctt 480

ES 2 567 104 T3

tttcccgcct actgatgaag aagagaggcc acctgccttg tcaagtgggc atcaatcctt 540  
 atagtcgcga atggaccgat ttgtatcacc gcttaggtga actctctgat gtcggataca 600  
 attgtgatta taaggctttt gatggcctaa ttacggagca aattttgagt ctcgagaccg 660  
 gttc 664

5 <210> 11  
 <211> 508  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

<400> 11

gagccggcgg gccagaaga aattgagatt ggttctcgtt tcttcgattt cacttcgaat 60  
 acttgtaggg tatctatggg tgaaaatccg tttgctgcaa tgattgcctg ccatggattg 120  
 catagtggtg cggccgctct agcgtcgacg gtaccagatg aattgtgctt tccatatacct 180  
 gatcctaagc agcccgccat ccttagcgcga gaggatgaac gccttaaggg aacgatccat 240  
 gaaggataca ctccgttaag ggatggcatg aagaagtttg ctgagccaat gtatctgcta 300  
 gaggaaaaac tactcgatga agttgcaggt gacatggttc agacgtggta tgactcgaga 360  
 ccggacccca gctccctact ttagggctgt tggggctttt gcaccaaccc ggtccgagtt 420  
 tgttcgggcc attgtggaag ggctcaccocg gctacgggag gagtcgagag ctgcggcact 480  
 ctttgccgaa ttgccagggc ccaactagt 508

10

15 <210> 12  
 <211> 557  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

<400> 12

gagccggcgg gcccttagtg agtggaacgg gaccactatg gactggaatg aactttttaa 60  
 gtatcccggg gtgtatgtgg aagaggacgg aagttttgaa gtaaagattc gctctccata 120  
 tcaccgaact cctgccagat tgcttgctgg tcaaagtcag gcggcccaga agaaattgag 180  
 attggttctc gtttcttcga tttcacttcg aatacttgta gggatatctat gggtgaaaat 240  
 ccgtttgctg caatgattgc ctgccatgga ttgcatagtg gtgcggccct ttagctttta 300  
 tggtagaacc agtttcccag tctagtgata cgtagatata tagggatatct gactttaaaa 360  
 gacccaagtg tatatatgtg ttttgtcagt agcatgtatt attttgtgtt ataatttgtt 420  
 ttaacttggt ttcgcctttt gtgtgtttag tttcatgctt ttagtggcga cagtgtgttg 480  
 tttgtccttt ggacacactt gcctagttgg acgcaaaaag attttctctt tctttttact 540  
 ggcggccgct ctagatc 557

20

<210> 13  
 <211> 773

ES 2 567 104 T3

<212> ADN  
<213> Sintética

<400> 13

5  
gagctagcgt cgacgggtacc agatgaattg tgctttccat atcctgatcc taagcagccc 60  
gccatcctta ggcgagagga tgaacgcctt aagggaacga tccatgaagg atacactccg 120  
ttaagggatg gcatgaagaa gtttgctgag ccaatgtatc tgctagagga aaaactactc 180  
gatgaagtgt caggtgacat gggttcagacg tgggatgact cgaccttggt gagagtaaaa 240  
tttttgtcct tttcccgctt actgatgaag aagagaggcc acctgccttg tcaagtgggc 300  
atcaatcctt atagtcgcga atggaccgat ttgtatcacc gcttaggtga actctctgat 360  
gtcggataca attgtgatta taaggctttt gatggcctaa ttacggagca aattttgagt 420  
ctcgactacc tatggtgatg ataatgtcct cactgtggca caatctgtca tgcagtatct 480  
tactggcgat gctctgaaaa tgcaaatggc aaagcttggg gtaactatta ctgatgggaa 540  
agataagtct ctttccacta ttccagcccg tccactgctg gaattagagt ttttgaaaacg 600  
tggatttgtt agaagctctg ggggtatgat aaatgcgcct ttggaaaaat tatcaataat 660  
gagttccttg gtctacatca gaagtgatgg ctgagacatg ttgcagaaac tattggacaa 720  
tgtaataact gcacttgtcg agctttatct acatggtgac tcgagaccgg ttc 773

<210> 14  
<211> 668  
<212> ADN  
<213> Sintética

<400> 14

10  
gagctagcgt cgactaccta tggatgatgat aatgtcttca ctgtggcaca atctgtcatg 60  
cagtatttta ctggcgatgc tctgaaaatg caaatggcaa agcttggggg aactattact 120  
gatgggaaag ataagtctct ttccactatt ccagcccgtc cactgctgga attagagttt 180  
ttgaaacgtg gatttggttag aagctctggg ggtatgataa atgcgccttt ggaaaaatta 240  
tcaataatga gttctttggg ctacatcaga agtgatggct cagacatggt gcagaaacta 300  
ttggacaatg ttaataactgc acttgtcgag ctttatctac atggtgactc gagaccggcg 360  
ggcccagaag aaattgagat tggttctcgt ttcttcgatt tcacttcgaa tacttgtagg 420  
gtatctatgg gtgaaaatcc gtttgctgca atgattgcct gccatggatt gcatagtggg 480  
gcggccgctc cggatgatag aaacgttgat cttcctcaac ttgaggctga gccagactg 540  
agctcaaccg tgagagggct agccggcaga ggagtaatct acattcccaa ggattgccag 600  
gcaaatagat acttggggcac cctgaatata cgtgatatga tctcagactt caaggggccc 660  
15  
actagtcc 668

ES 2 567 104 T3

<210> 15  
 <211> 657  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

5

<400> 15

gagctagcgt cgacgggtacc agatgaattg tgctttccat atcctgatcc taagcagccc 60  
 gccatcctta ggcgagagga tgaacgcctt aagggaaacga tccatgaagg atacactccg 120  
 ttaagggatg gcatgaagaa gtttgctgag ccaatgtatc tgctagagga aaaactactc 180  
 gatgaagttg caggtgacat ggttcagacg tggatgact cgagaccggc gggcccttag 240  
 tgagtggaac gggaccacta tggactggaa tgaacttttt aagtatcccg ggggtgatgt 300  
 ggaagaggac ggaagttttg aagtaaagat tcgctctcca taccaccgaa ctccctgccag 360  
 attgcttgct ggtcaaagtc aggcggccct ttagctttta tggtagaacc agtttcccag 420  
 tctagtgata cgtagatata tagggtatct gactttaaaa gacccaagtg tatatatgtg 480  
 ttttgtcagt agcatgtatt attttgtgtt ataatttgtt ttaacttgtt ttcgcctttt 540  
 gtgtgttttag tttcatgctt ttagtggcga cagtgtgttg tttgtccttt ggacacactt 600  
 gcctagttgg acgcaaaaag atttttcctt tctttttact ggcggccgct ctagatc 657

10 <210> 16  
 <211> 540  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

15 <400> 16

gagctagcgt cgaccttggt gagagtaaaa ttttgtctt tttcccgcct actgatgaag 60  
 aagagaggcc acctgccttg tcaagtgggc atcaatcctt atagtcgga atggaccgat 120  
 ttgtatcacc gcttaggtga actctctgat gtcggataca attgtgatta taaggctttt 180  
 gatggcctaa ttacggagca aattttgagt ctgagaccg gaccccagct cctacttta 240  
 gggctgttgg ggcttttgca ccaaccggg ccgagtttgt tcggggccatt gtggaaaggc 300  
 tcaccggct acgggaggag tcgagagctg cggcactctt tgccgaattg ccagggccgc 360  
 tccggatgat agaaacgttg atcttctca acttgaggct gagcccagac tgagctcaac 420  
 cgtgagaggg ctagccggca gaggagtaat ctacattccc aaggattgcc aggcaaatag 480  
 atacttgggc accctgaata tacgtgatat gatctcagac ttcaaggggc cactagttc 540

20 <210> 17  
 <211> 657  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

25 <400> 17

ES 2 567 104 T3

ggatcccccc agctccctac tttagggctg ttggggcttt tgcaccaacc cgggccgagt 60  
 ttgttcgggc cattgtggaa aggctcaccg ggctacggga ggagtcgaga gctgcggcac 120  
 tctttgcega attgccaggg cccttagtga gtggaacggg accactatgg actggaatga 180  
 actttttaag tatccccggg tgtatgtgga agaggacgga agttttgaag taaagattcg 240  
 ctctccatat caccgaactc ctgccagatt gcttgctggt caaagtcagg cggccgctct 300  
 agcgtcgact acctatggtg atgataatgt cttcactgtg gcacaatctg tcatgcagta 360  
 ttttactggc gatgctctga aaatgcaaat ggcaaagctt ggggtaacta ttactgatgg 420  
 gaaagataag tctctttcca ctattccagc ccgtccactg ctggaattag agtttttgaa 480  
 acgtggatth gttataagct ctgggggtat gataaatgcg cctttggaaa aattatcaat 540  
 aatgagttct ttggtctaca tcagaagtga tggctcagac ctggtgcaga aactattgga 600  
 cagtgttaat actgcacttg tccagctttt ctagctggtg aggatcc 647

<210> 18  
 <211> 646  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

5

<400> 18

ggatcctgat agaaacgttg atcttccctca acttgaggct gagcccagac tgagctcaac 60  
 cgtgagaggg ctagccggca gaggagtaat ctacattccc aaggattgcc aggcaaatag 120  
 atacttgggc accctgaata tacgtgatat gatctcagac ttcaaggggc cctttagctt 180  
 ttatggtaga accagtttcc cagtctagtg atacgtagat atctagggta tctgacttta 240  
 aaagacccaa gtgtatatat gtgttttgtc agtagcatgt attattttgt gttataatth 300  
 gttttaactt gttttccgct tttgtgtgth tagtttcatg ctttttagtg cgacagtgtg 360  
 ttgtttgtcc tttggacaca cttgcctagt tggacgcaaa aagatttttc ctttcttttt 420  
 actggcggcc gctctagcgt cgaccttght gagagtaaaa tttttgtctt tttcccgcct 480  
 actgatgaag aagagaggcc acctgccttg tcaagtgggc atcaatcctt atagtcgca 540  
 atggaccgat ttgtatcacc gcttaggtga actctctgat gtcggataca attgtgatta 600  
 taaggctttt gatggcctaa ttacggagca aatthtgagt ggatcc 646

10

<210> 19  
 <211> 494  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

15

<400> 19

ggatccagaa gaaattgaga ttggttctcg tttcttcgat ttcacttoga ataactttag 60

ES 2 567 104 T3

ggtatctatg ggtgaaaatc cgtttgctgc aatgattgcc tgccatggat tgcatagtgg 120  
 tgcggccgct ctacgctcga cggtaaccaga tgaattgtgc tttccatata ctgaccta 180  
 gcagcccgcc atccttagcg cagaggatga acgccttaag ggaacgatcc atgaaggata 240  
 cactccgta agggatggca tgaagaagtt tgctgagcca atgtatctgc tagaggaaaa 300  
 actactcgat gaagttgcag gtgacatggt tcagacgtgg tatgactcga gaccggaccc 360  
 cagctcccta ctttagggct gttggggcct ttgcaccaac ccggtcggag tttgttcggg 420  
 ccattgtgga aaggctcacc cggtacggg aggagtcgag agctgcgga ctctttgccg 480  
 aattgccagg atcc 494

<210> 20  
 <211> 539  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

5

<400> 20

ggatccttag tgagtggaac gggaccacta tggactggaa tgaacttttt aagtatcccg 60  
 ggggtgatgt ggaagaggac ggaagttttg aagtaaagat tcgctctcca taccaccgaa 120  
 ctctgcccag attgcttgct ggtcaaagtc aggcggccca gaagaaattg agattggttc 180  
 tcgtttcttc gatttcaact cgaatacttg tagggtatct atgggtgaaa atccgtttgc 240  
 tgcaatgatt gcctgccatg gattgcatag tggtgcgcc ctttagcttt tatggtagaa 300  
 ccagtttccc agtctagtga tacgtagata tctagggat ctgactttaa aagaccaag 360  
 tgtatatatg tgttttgtca gtagcatgta ttattttgtg ttataatttg ttttaacttg 420  
 ttttccgctt ttgtgtgttt agtttcatgc ttttagtggc gacagtgtgt tgtttgtcct 480  
 ttggacacac ttgcctagtt ggacgcaaaa agatttttcc tttcttttta ctgggatcc 539

10

<210> 21  
 <211> 757  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

15

<400> 21

ggatccggta ccagatgaat tgtgctttcc atactctgat cctaagcagc ccgccatcct 60  
 tagcgcagag gatgaacgcc ttaagggaac gatccatgaa ggatacactc cgtaagggga 120  
 tggcatgaag aagtttgcct agccaatgta totgctagag gaaaaactac tcgatgaagt 180  
 tgcaggtgac atggttcaga cgtggtatga ctgcacctg ttgagagtaa aattttgtc 240  
 tttttccgc ctactgatga agaagagagg ccacctgcct tgtcaagtgg gcatcaatcc 300  
 ttatagtcgc gaatggaccg atttgatca ccgcttaggt gaactctctg atgtcggata 360

ES 2 567 104 T3

caattgtgat tataaggcct ttgatggcct aattacggag caaatTTTga gtctcgacta 420  
 cctatggtga tgataatgtc ttcactgtgg cacaatctgt catgcagtat tttactggcg 480  
 atgctctgaa aatgcaaagt gcaaagcttg gggtaactat tactgatggg aaagataagt 540  
 ctctttccac tattccagcc cgtccactgc tggaaattaga gtttttgaaa cgtggatttg 600  
 ttagaagctc tgggggtatg ataaatgcgc ctttgaaaa attatcaata atgagttctt 660  
 tggctacat cagaagtgat ggctcagaca tgttcagaa actattggac aatgttaata 720  
 ctgcacttgt cgagctttat ctacatggtg aggatcc 757

5 <210> 22  
 <211> 653  
 <212> ADN  
 <213> Sintética  
 <400> 22

ggatcctacc tatggtgatg ataatgtctt cactgtggca caatctgtca tgcagtatTT 60  
 tactggcgat gctctgaaaa tgcaaatggc aaagcttggg gtaactatta ctgatgggaa 120  
 agataagtct ctttccacta ttccagcccg tccactgtctg gaattagagt tttgaaaacg 180  
 tggatttgtt agaagctctg ggggtatgat aatgcgcct ttggaaaaat tatcaataat 240  
 gagttctttg gtctacatca gaagtgatgg ctgagacatg ttgcagaaac tattggacaa 300  
 tgttaataact gcacttgtcg agctttatct acatggtgac tcgagaccgg cgggcccaga 360  
 ataaattgag attggttctc gtttcttcga tttcacttgc aatacttgta gggtatctat 420  
 ggggtgaaaaat ccgtttctg caatgattgc ctgccatgga ttgcatagtg gtgcggccgc 480  
 tccggatgat agaaatcgtt gatcttctc aacttgaggc tgagcccaga ctgacctcaa 540  
 ccgtgagagg gctagccggc aaaggagtaa tctactttcc caaggattgc caggcaaata 600  
 gataactggc caccctgaat atacgtgata tgatctcaga cttcaaggga tcc 653

10  
 15 <210> 23  
 <211> 639  
 <212> ADN  
 <213> Sintética  
 <400> 23

ggatccggta ccagatgaat tgtgctttcc atatcctgat cctaagcagc ccgccatcct 60  
 tagcgcagag gatgaacgcc ttaagggaac gatccatgaa ggatacactc cgTTaaggga 120  
 tggcatgaag aagtttctg agccaatgta tctgctagag gaaaaactac tcgatgaagt 180  
 tgcaggtgac atggttcaga cgtggtatga ctgagaccg gcgggccctt agtgagtgga 240  
 acgggaccac tatggactgg aatgaacttt ttaagtatcc cgggggtgat gtggaagagg 300  
 acggaagttt tgaagtaaag attcgtctc catatcaccc aactcctgcc agattgcttg 360

ES 2 567 104 T3

ctggtcaaag tcaggcggcc ctttagcttt tatggtagaa ccagtttccc agtctagtga 420  
 tacgtagata tctaggggat ctgactttaa aagacccaag tgtatataatg tgttttgtca 480  
 gtagcatgta ttattttgtg ttataatttg ttttaacttg ttttccgctt ttgtgtgttt 540  
 agtttcatgc ttttagtggc gacagtgtgt tgtttgtcct ttggacacac ttgcctagtt 600  
 ggacgcaaaa agatttttcc tttcttttta ctgggatcc 639

5 <210> 24  
 <211> 524  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

<400> 24

ggatcccttg ttgagagtaa aatttttgtc tttttccgc ctactgatga agaagagagg 60  
 ccacctgcct tgtcaagtgg gcatcaatcc ttatagtcgc gaatggaccg atttgtatca 120  
 ccgcttaggt gaactctctg atgtcggata caattgtgat tataaggctt ttgatggcct 180  
 aattacggag caaatTTTga gtctcgagac cggagcggcc ctggcaattt ggcaaagagt 240  
 gccgcagctc tcgactcctc ccgtagccgg gtgagccttt ccacaatggc ccgaacaaac 300  
 tcggaccggg ttggtgcaaa agccccaaaca gccctaaagt agggagctgg ggtccggatg 360  
 atagaaacgt tgatcttcc caacatgagg ctgagcccag actgtgctca accgtgagag 420  
 ggctagccgg cagaggagta atctacattc ccaaggattg ccaggcaaat agatacttgg 480  
 10 gcaccctgaa tatacgtgat atgatctcag acttcaaggg atcc 524

15 <210> 25  
 <211> 1620  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

<400> 25

ggatccggta cccgatgaat tgtgctttcc atatcctgat cctaagcage ccgccatcct 60  
 tagcgcagag gatgaacgcc ttaagggAAC gatccatgaa ggatacactc cgTTAagggA 120  
 tggcatgaag aagtttGctg agccaatgta tctgctagag gaaaaactac tcgatgaagt 180  
 tgcaggtgac atggttcaga cgtggtatga ctcgacctg ttgagagtaa aatTTTgtc 240  
 tttttccgc ctactgatga agaagagagg ccacctgcct tgtcaagtgg gcatcaatcc 300  
 ttatagtcgc gaatggaccg atttgtatca ccgcttaggt gaactccctg atgtcggata 360  
 caattgtgat tataaggctt ttgatggcct aattacggag caaatTTTga gtctcgacta 420  
 cctatggtga tgataatgtc ttcactgtgg cacaatctgt catgcagtac tttactggcg 480  
 atgctctgaa aatgcaaatg gcaaagcttg gggtaactat tactgatggg aaagataagt 540

ES 2 567 104 T3

ctctttccac tattccagcc cgtccactgc tggaaattaga gtttttgaaa cgtggatttg 600  
 ttagaagctc tgggggtatg ataaatgcgc ctttgaaaa attatcaata atgagttctt 660  
 tggctacat cagaagtgat ggctcagaca tgttgacagaa actattggac aatggttaata 720  
 ctgcacttgt cgagctttat ctacatgggtg actcgggacc ggcgggccct tagtgagtgg 780  
 aacgggacca ctatggactg gaatgaactt ttaagtatc ccgggggtgta tgtggaagag 840  
 gacggaagtt ttgaagtaaa gattcgctct ccatacacc gaactcctgc cagattgctt 900  
 gctggtcaaa gtcaggcggc ccagaagaaa ttgagattgg ttctcgtttc ttcgatttca 960  
 cttcgaatac ttgtagggta tctatgggtg aaaatccgtt tgctgcaatg attgcctgcc 1020  
 atggattgca tagtggtgcg gccctttagc ttttatggta gaaccagttt cccagtctag 1080  
 tgatacgtag atatctaggg tatctggctt taaaagacc aagtgtatat atgtgttttg 1140  
 tcagtagcat gtattatctt gtgttataat ttgttttaac ttgttttccg cttttgtgtg 1200  
 tttagtttca tgcttttagt ggcgacagtg tgttgtttgt cctttggaca cacttgccta 1260  
 gttggacgca aaaagatttt tcctttcttt ttactggcgg ccgctccgga ccccagctcc 1320  
 ctactttagg gctgttgggg cttttgcacc aaccgggtcc gagtttgttc gggccattgt 1380  
 ggaaaggctc acccggctac gggaggagtc gagagctgcg gcaactcttg ccgaattgcc 1440  
 agggccgctc cggatgatag aaacgttgat cttcctcaac ttgaggctga gccagactg 1500  
 agctcaaccg tgagagggct agccggcaga ggagtaatct acattcccaa ggattgccag 1560  
 gcaaatagat acttgggcgc cctgaatata cgtgatatga tctcagactt caagggatcc 1620

<210> 26  
 <211> 1247  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

5

<400> 26

ggatcccagt aaaaagaaag gaaaaatctt tttgogtcca actaggcaag tgtgtccaaa 60  
 ggacaaacaa cacactgtcg ccactaaaag catgaaacta aacacacaaa agcggaaaac 120  
 aagttaaac aaattataac acaaaataat acctgctact gacaaaacac atatatacac 180  
 ttgggtcttt taagtcagat accctagata tctacgtatc actagactgg gaaactggtt 240  
 ctaccataaa agctaaaggg ccgcctgact ttgaccagca agcaatctgg caggagttcg 300  
 gtgatatgga gagcgaatct ttacttcaaa acttccgtcc tcttccacat acaccocggg 360  
 atacttaaaa agttcattcc agtccatagt ggtcccgttc cactcactaa gggcccggcg 420  
 gtctcgagtc ataccacgtc tgaacatgt cacctgcaac ttcacogagt agtttttctt 480  
 ctagcagata cattggctca gcaaacttct tcatgccatc ccttaacgga gtgtatcctt 540

10

ES 2 567 104 T3

catggatcgt tcccttaagg cgttcatect ctgcgctaag gatggcgggc tgcttaggat 600  
 cccttgaagt ctgagatcat atcacgtata ttcaggggtgc ccaagtatct atttgccctgg 660  
 caatccttgg gaatgtagat tactcctctg ccggctagcc ctctcacggg tgagctcagt 720  
 ctgggctcag tctcaagttg aggaagatca acgtttctat catccggagc ggccgcacca 780  
 ctatgcaatc catggcaggc aatcattgca gcaaacggat tttcacccat agatacccta 840  
 caagtattcg aagtgaaatc gaagaaacga gaaccaatct caatttcttc tgggcccggcc 900  
 ggtctcgagt caccatgtag ataaagctcg acaagtgcag tattaacatt gtccaatagt 960  
 ttctgcaaca tgtctgagcc atcacttctg atgtagacca aagaattcat tattgataat 1020  
 ttttccaaag ggcgatttat cataccccca gagcttctaa caaatccacg tttcaaaaac 1080  
 tctaattcca gcagtggacg ggctggaata gtggaaaggg acttatctct cccatcagta 1140  
 atagttacc caagctttgc catttgcatt ttcagagcat cgccagtaaa atactgcaga 1200  
 cagattgtgc cacagtgaag acattatcat caccataggt aggatcc 1247

<210> 27  
 <211> 7342  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

5

<400> 27

atgaaaatth cccacaagtt cttacgttac cgtgattgca atcttttctt gtgaagagtt 60  
 taagaaactc aagattgaaa tcctttgcga agagtttaag aaactcacc ctcgaagcgt 120  
 ttaagaaacg cattgtttta ttgtgcttgt tgcttatttt gtgcagttta cttttaatct 180  
 acatatttta ctgtgttatt tatttaagtt taattttgta gttgtaaaag ttgtttgcca 240  
 ctatgtggca ggtgcctgag ggctcccagt gctgctgcac tgggaagtcc ttttcaaacg 300  
 cggaggctaa ggaactccgc tacgtgtgct catggtggat gagcacacgt cttgttaagg 360  
 ctgaggctcc tectcagcaa tcaaggaaga gtgggatagc gcccactccc ctaaaatcca 420  
 aagggacat tcaggtctca ctcccaaagg ctactggggg caaacccagt atccataaat 480  
 ccaaaggagc ttctgtggct cctgcacctt tgettaagca aagggtgtgaa gtagtcgttc 540  
 aatatgggcc tectgccgat attgaattgg tctaccggcc tcttgtgogg gaggaggaga 600  
 agtctctcaa tatagtgggt ctgccaccta cccaaaaggt ggaagtaagg gtgccagttt 660  
 gctgtgcacc caagtggatg gtggctatcc ctaagccacc ggtgaagcta gccctaaag 720  
 ctagcaagct acggtttctt aaaggagccg tagcttacia tgggtgtcaat tttattgaca 780  
 ctaaggggaa agtctctcta tctgagggcg caaagaggat ccttaggggg atccgcgttg 840  
 ctgcaaagca acgtcttctg gctgcgcgca ggtctgctgc gtgcaagaag gtgagggcca 900

10

# ES 2 567 104 T3

agcgtgctct tgccgagttt gaggcaatcg ttcaaagtga acgattggac cagttaaaga	960
ctgggttcca agtgggtgctt ccagcaccaa agatgagctg cagcttaaaa gaagctgctc	1020
cttctaccac ttctgtggtg gtagttaaga agaggaagct gccaaaggctt cctaaaattc	1080
tgctgagca ggacttctcc tgcttagagg gctttgactg gggggagaaa tcccaccag	1140
ttgaggtaga catcgaggat gattggatcc tcgtggaaaa acctgtcctt aagagacagg	1200
ctgtgcaaac tgcacagggc agggcaaccg aggcctaac tcggtttgca gctaccagtg	1260
gcttctcact gggcgccac caaaagggtg aagatttcgc ttcgtctggt gaagcggaat	1320
atgtgatggc aggagagttt gcagacctct gcttgcatac tttggtgat aatgatgcac	1380
cgacgttgc tgcgactatt gaggaactca gggatagcaa agatttteta gaggctatcg	1440
aactcctcaa gttggaatta gctgaaattc caacagactc cactacatgt gccccattta	1500
aacaatgggc ttctgctgcc aagcagatgg ctaaaggggg tggcactatg gttggggatt	1560
ttactagagc tgctggagcc gctgtcgta tctcttttga tatggcagtg gaatttctgc	1620
aagataaagc gttaaagttc tgtaaaagaa tctttgacgt aacaatggct ccatatctcc	1680
agcatcttgc cagtgcacat tccatcctta agaagatttg ggaaaaattg tcagaatgga	1740
tggaaagcct caagagtaaa gctagttag cacttgaagt aatgcggcaa cacgccattt	1800
tcgcttagg tgctatggtt ataggaggtg tagtagtggt ggtagaaaa gtgcttattg	1860
cagccaaaat tatccctaat tgtgggatta ttctgggtgc ctttttgaca cttttctttg	1920
ctagcctggg gttaacagcc ctggagtga ctgcagagga aatcttcaga atgcatgctg	1980
gttgtaaaag tgctatttac tccatgtatt ctgttgacaga gcctactatg gctgatgagg	2040
gagaatctca cactatgggg gcgactcagg gacttgataa tgcaattcag gccctgactc	2100
gagtaggaca gagtatgata agcttcaaac tggggagctt ttcataattat gcaaagatag	2160
cccaggggtt tgaccaactt gcaaggggta agcgagcaat aggtgaactt actagtggc	2220
tcatcgatct tgttgggaagt atttactccc aggtttctgg acaggaaagt actttttttg	2280
acgagctttc tacaattggt tgccatagatg tgagagcatg gctactgaaa agtaagcgtg	2340
ttcggttgca agtggaaaca atggccatag gcgatagaat aaccttgat actattgcca	2400
aattgttaga agaaggccac aagatactgg tcactgcggc aggtgttcca aggaaaacgt	2460
ctgctgattt tacaatgtgc atcaaggaag aagtgtctaa gttggaagaa gtgcatgcca	2520
gaacggcatg tgcgggaatc aatgagggta tgcgagcttt tccttttttg gtgtacattt	2580
ttggtgcttc acagtctggg aagacaacaa tagcaaatc aatcattatt ccagctttgc	2640
tggaagaaat gaatcttccc aagagctcag tttattccag gcccaagact ggtgggtttt	2700
ggagtgggta tgctaggcaa gcatgtgtga aagttgacga tttttatgca attgagcaga	2760

ES 2 567 104 T3

ccctagcct ggcgagttct atgattgatg tggatgaattc agaaccttat ccctcgaca 2820  
 tggcttacat tcacgagaag ggaatgtcaa tggattctcc attagttgta accactgcaa 2880  
 ataccgccgt gcctctacc aattctcagg tggatggactt gccgtcattt tataacagga 2940  
 gggcggcggg actggaagta cgcaggaagg atgggagttt ctttacaccg cgggcgtatg 3000  
 attcatgcat tgaagttcgc ttcattgcata ataagtgtcc gtatggtgat tctgctgggg 3060  
 tgcctcaggg ccctgcagta aacctccca tggatgaagg atggatcact ccaagtgagg 3120  
 ctggtgcagt tctcaaaaat ctcttgggtg aacacatttt ggctgaggaa gcaaagctgc 3180  
 tggataacag agagcggatt ggtaatgacc atcccatata taacgcagca aaggaattca 3240  
 taggcaacat gcactatcct gggcagtggc tgactgctga acagaagagt acctatggaa 3300  
 tcaaggatga tggattctct ttccttgccg ttgatggaaa gatatacaag tacaatgtac 3360  
 tgggtaagtt gaatccatgt gagtctgaac caccacatcc caatgtgatt ccatggttgg 3420  
 aaaagaaaac attagaaatt gtacattggg atgtgcataa acatattgcc actggtcccc 3480  
 gcaatgcact ggttgcatgc tttttgcagg gcttgggtcca aggacaaagc aaagtagaga 3540  
 gtgtggaacg tatggggaaa gatagttctc cggaacaaca gaattttttt aaacgcttga 3600  
 gtttatccga gagaatttat ctgaggctgt gccaaatccg cattgataat atccagaaag 3660  
 aagagctggc gggttctggg agagggccca tggcaatatt gagagagtgt ctgatgaaga 3720  
 gtaagcaggt agtgggtgaa aactactcat tgctattgac attggtggct attctcttgc 3780  
 ttatcagtgc tgcttacacg ctactctcaa cagtgggtggc tctggcgggt tgctctagtt 3840  
 ttgctggtgg tatggttgca gtgacggctg tcaacaatgc ttctataccg tgttcagagc 3900  
 ctgccttggg ggaagatat tcccctagaa atcgttttgt ctgcgcaatt tctaaaatta 3960  
 ggggtgaggg accttccaaa ggacaagggtg agcatgagga attggttact gagctctatt 4020  
 actattgtga tggagttaag aagctaattt ccacgtgttg gtttaagga aggtcactct 4080  
 tgatgacgag acatcaagcc ctggccgttc cgatcggcaa tgaaattgaa gtaataacg 4140  
 ctgacggaac aacaaaaaag ttagtttggc caggcaggca ggaggatggc aattgcaaag 4200  
 gcttcgtoga attccctgaa aatgagttag ttgtctttga gcatccacac ttattgacac 4260  
 tgcccattaa gtatgagaag tactttgttg atgatgccga tagacagatt tccccaacg 4320  
 ttgcggttaa gtgttgctt gcgcgcttag aagatggaat tccccaatc cacttttggg 4380  
 gcaaatatgc aacagcccgc agtgaagttc atacgctgaa agatgagggc ggggaaatg 4440  
 tctaccagaa caagataagg cgctatattg tttatgcgca tgaagcaaag aagtatgatt 4500  
 gtggagcctt ggctgtggct gtgatccaag gaatcccaaa agtcatcgca atgcttgttt 4560

## ES 2 567 104 T3

ctgggaatag aggtgtgacc tactcttctg tgattccaaa ctacagttct tcttttatta	4620
ggggagaagt gccatatgta ccagaagatg ggtagtgtc gaggggatat aggaaagtgg	4680
gttatttgca cgcacggat gggccacatg tgccctctaa gacttccttc atgaaggtac	4740
cagatgaatt gtgctttcca tatcctgatc ctaagcagcc cgccatcctt agcgcagagg	4800
atgaacgcct taagggaaac atccatgaag gatacactcc gttaagggat ggcacgaaga	4860
agtttgctga gccaatgtat ctgctagagg aaaaactact cgatgaagtt gcaggtgaca	4920
tggttcagac gtggtatgac ccgggtgaat tccttgaaga tatttcttta gatcaagcta	4980
tcaatgggga catggatgag gaatattttg acccctagt gatggacacg tctgaaggat	5040
atcccgatgt tttagatcgt aaacctgggg aaaagggaaa ggcgagattc tttgttgggg	5100
aaccaggaaa tagagccttt gtagctggtt gtaatcctga aaaggcttat taccaactag	5160
aagaggactc taaaaccaag ataccttctt tggttagtat agaaaccca aaagacgaga	5220
gattaaaaag aagtaaaatc gatactcctg gtacgagatt atttctgtg ctgcccttgg	5280
catataatct cttgttgaga gtaaaatfff tgtctttttc ccgcctactg atgaagaaga	5340
gaggccacct gccttgtaa gtgggcatca atccttatag tcgcgaatgg accgatttgt	5400
atcaccgctt aggtgaaact tctgatgtcg gatacaattg tgattataag gcttttggatg	5460
gcctaattac ggagcaaatt ttgagtacga tcgccgatat gatcaatgct ggatatcgtg	5520
accctgtcgg caataggcag aggaaaaatt tgctcctagc aatatgtgga cgcctctcta	5580
tctgtggaaa tcaagtgtat gccactgaag caggcatacc ttcaggctgt gctctcacag	5640
tagtactcaa ttccatfff aaagaactac tgatgagata ttgcttcaag aaaatagttc	5700
ccctgtgta caaggaatgt tttgacagat gtgtcgtgct cttacctat ggtgatgata	5760
atgtcttca tgtggcaca tctgtcatgc agtatfffac tggcgatgct ctgaaaatgc	5820
aaatggcaaa gcttgggta actattactg atgggaaaga taagtctctt tccactattc	5880
cagcccgtcc actgctggaa ttagagfff tgaaaactgg atttgttaga agctctgggg	5940
gtatgataaa tgccctttg gaaaaattat caataatgag ttctttggtc tacatcagaa	6000
gtgatggctc agacatgtt cagaaactat tggacaatgt taatactgca cttgtcagac	6060
ttatctaca tggatgata acttattttg aatcagtcag agctttttac ttcgagaaac	6120
tcctcctgg cgttataag gagttgaca cgtggtttca agcagaatca tttcatgagt	6180
gtcagaagag tggagagagt ggttataagc cacaagggtc cattgagatt agtcatggag	6240
cagcttttgc cagttttact caacaagctg gtacagagtt ggaaaagcat gacatttgcc	6300
ctggcttatc gattgcagga actaagtaca ttgctactga gaatgagatt gttttgtctc	6360
ttagttcogt cctaccggg gatagaaatg ttttcaagtt ggatctgcct tgtggagacg	6420

ES 2 567 104 T3

ggatagggcg tttgccttcc aatgcagta tcttaaactt gagaaaaccg ggcttgggta 6480  
 tgagattgtg caagcgtgcc caagatgaaa agaagacctt agttattcgt gacgaaaggc 6540  
 catacattgg tgcattggca gttgcttgca tatgtggaga gagttttggc ttcggggcaac 6600  
 agagcgttct tgcgctttat gccaaacttgt tgggaccaa tcagaggaat ggcttagcca 6660  
 gttatTTTTc tgattttgaa agtcccatc atatcaagaa agtccatgcc aaaacaaact 6720  
 cttatgaggg ggggtaagct ttaaaggaaa ttttactttt ttgtgagact attttctatg 6780  
 aagccaccga aatggatact aggaaagtga tgttgcaaaa tcaaccagac gtctatccta 6840  
 gtataagtct tgttgggggg gtttgtttcc caaatgaggg aggagagcct ggagccatgt 6900  
 actcggaaac agatgtaacg atggctagag aggttcaagg agtctatgta agtgaagcgt 6960  
 gcgtgaaatg ttgcaggcgt tgtgtaggag tagcaaccag ggttgtgact gatacgcac 7020  
 tttttggcaa caatctttta aagactcatc ttaaggcttt gaggaaaatt cagaatcata 7080  
 catgccttag gaaataagcc ttccaattct tggactggg ataaccaagt ttaaataacc 7140  
 cagtttcttt tgcctttcat gctcttttag gcaattgaat attagagcat ttgtgttatt 7200  
 gtttgtttta acttgttttc tgcttttagt tgttttcttt catgctttta gtggcgacag 7260  
 tgtgttgttt gtcctttgga accacttgcc ttgttgagc caaaaagatt ttcttttttc 7320  
 tttttactgt tatgcaaatt tt 7342

<210> 28  
 <211> 3774  
 <212> ADN  
 <213> Sintética

5

<400> 28

atgaaaaatg tttacgtttt cttacgttac cgtgatttca cttttcttta gccaaagagt 60  
 taagaaactc aaaagtgaaa ctgccaagag ttaagaaac tcacaaagcg aagagttaa 120  
 gaaactcatc attgcttttt tgttctttta ttttgcgctt tatttgttta gcattttatt 180  
 tagttctttt aaaaagcttt tgttttgttt ttctttttct ttacttgccc ttatgggcaa 240  
 attttattat tccaacaggc ggcttgctg ttgggctgct gggagaacc ctcatcttgg 300  
 gggttctggt gaacaatggc tggcggccat taactgat cctccttcc gccaaactgt 360  
 taaggaggat gtccaagaaa accgagaaca gccaaactgct gttcgaatgt tttcttgtaa 420  
 agttgggtcc gggcccattg acaatcccga gaaatgcgac tggcattttg tcttacggg 480  
 cgagaggcca gcgccgtccc ggccggttaa agccgatgag gttgtggtgg tgccacaacc 540  
 gaagaagggt gtgattcaa caccacctc tccccagct cctacttta gggctgttgg 600  
 ggcttttgca ccaaccgggt ccgagtttgt tcgggccatt gtggaaagge tcaccggct 660

10

## ES 2 567 104 T3

acgggaggag	tcgagagctg	cggcactcct	tgccgaattg	ccattggagt	accctcaggg	720
tgctcctctg	aagttgagcc	tggcggcgaa	attcgccatg	ctcaaacata	ccacttggag	780
gaagtggat	gacactagtg	atgagcgcct	tttgaggct	catcctggtg	gtccttgtct	840
tcctccccct	cccccaatcc	aaaatcctcc	ctccttccag	gagaggggtga	gggagttttg	900
caggatgaag	tcctgcacca	aggctttcgc	cttggaaac	tccttaggtc	tcaataaggc	960
ctgggtaggt	ttagtggaca	tcccagtac	ttctgtgtgc	tgtgcggatg	ggaagactac	1020
cggtgggcag	acaattgccc	aggaagctga	tcctttgcaa	cataggatca	gtacgtcagt	1080
agcccccggt	agggcacaat	ggatctccga	gcgcagacaa	gctctgcgga	ggagagagca	1140
agcaaatagc	ttcgaaggtc	ttgctgctca	aaccgatatg	acttttgagc	aggccaggaa	1200
tgcttatctt	ggtgctgccg	acatgattga	gcaaggccta	ccgctgcttc	cccctctgcg	1260
cagcgttac	gcccctaggg	gtttgtggag	gggaccctca	accagagcca	attacacgct	1320
agattttagg	ctcaatggta	ttccgaccgg	gacaaacaca	ttggaaatat	tgtataatcc	1380
tgtgtcggag	gaagagatgg	aagagtaccg	ggacaggggc	atgtcagctg	tggttaattga	1440
tgcgctagaa	atagccataa	accatttgg	catgcctgga	aatcctacgg	acttgactgt	1500
cgtagcgcaca	tatgggcatg	agcgcgacat	gacgcgcgcc	tttattggat	ctgcttccac	1560
attcttaggg	aatgggttag	ctagagccat	ttctcttct	ggtttgcaat	atagccagga	1620
ggaaccaagg	cgcgaatcta	taattgcct	atatgttgcc	tctaccaatg	ccactgtgga	1680
tactgattca	gtcttggcag	ccattagtgt	tggcactttg	cgtcaacatg	ttggttccat	1740
gcactaccgg	acagtggcta	gtaccgtgca	ccaggctcag	gtgcaaggaa	cgacgctcag	1800
ggctactatg	atgggtaaca	ctgtcgtagt	atcacctgaa	ggaagcctgg	ttactggaac	1860
ccctgaagca	agagttgaaa	tagggggcgg	ttctagtatt	aggatggtgg	gacctctaca	1920
gtgggaaagt	gtggaggaac	cagggcaaac	cttctctatc	agaagccggt	cacggtctgt	1980
gaggattgat	agaaacgttg	atcttctca	acttgagget	gagcccagac	tgagctcaac	2040
cgtgagagga	ttagctggta	gaggagtaat	ctacattccc	aaggattgcc	aggcaaatag	2100
atacttgggc	accctgaata	tacgtgatat	gatctcagac	ttcaagggtg	tccagtatga	2160
aaagtggata	actgcaggat	tagtcatgcc	tactttcaag	atagttatta	ggctacctgc	2220
aatgccttt	actggattga	catgggtgat	gagctttgat	gcttataacc	ggataactag	2280
tagaattact	gctagtgcgg	atcctgtata	caccttgtca	gtcccacatt	ggcttatcca	2340
ccataagttg	ggcacgtttt	catgtgagat	agactatgga	gaattgtgtg	gtcatgctat	2400
gtggtttaaa	tcaaccacat	ttgaatctcc	aaggttgcat	ttcacgtggt	taacgggcaa	2460

ES 2 567 104 T3

caacaaagag ttagcggcag actggcaagc tgtcgtagaa ctatatgccg aattggaaga 2520  
ggccacttct ttccttggga aaccaacttt ggtttttgac ccaggtgttt tcaatggcaa 2580  
atccaattt cttacttgcc ctcccatatt ctttgattta acggccgtca eggcccttag 2640  
gagtgctggg ctgacattgg ggcaagtccc aatggttggc accactaagg tttataatct 2700  
aaacagcact cttgtgagtt gtgttttggg tatgggaggt actgttagag ggagggtgca 2760  
catttgctgc ccaatcttct acagtattgt tttatgggtc gttagtgagt ggaacgggac 2820  
cactatggac tggaatgaac tttttaagta tcccggggtg tatgtggaag aggacggaag 2880  
ttttgaagta aagattogct ctccatatca ccgaactcct gccagattgc ttgctgttca 2940  
aagtcagaga gacatgagct ctcttaattt ttatgcaata gcaggaccta tcgctccttc 3000  
gggtgagact gcgcaacttc ctattgttgt gcagatagat gaaattgtgc gccagatct 3060  
ctctttacca agttttgaag atgactattt cgtatgggtg gatttttctg aattcactct 3120  
tgataaagaa gaaattgaga ttggttctcg tttcttcgat ttcacttcga atactttag 3180  
ggtatctatg ggtgaaaatc cgtttgctgc aatgattgcc tgccatggat tgcatagtgg 3240  
tgtattagac ctcaaactcc aatggagtct gaacaccgaa ttcggcaaga gcagcgggag 3300  
cgttaccatc acgaagctgg tgggtgataa ggccatgggt ctggacggac ettctcacgt 3360  
ttttgccata caaaaactag agggaactac agagtgtttg gttgggaatt ttgcaggagc 3420  
aaacccaaac actcgttttt ccctttatag tcgctggatg gcaattaaat tggatcaagc 3480  
aaagagtatt aaagtactcc gcgttttgtg caagccccgt ccaggcttta gcttttatgg 3540  
tagaaccagt ttcccagtct aggggtatctg actttaaaag acccaagtgt atatatgtgt 3600  
tttgtcagta gcatgtatta ttttgtgta taatttgtt taacttgtt tccgcttttg 3660  
tgtgtttagt ttcattgctt tagtggcgac agtgtgttgt ttgtcctttg gacacacttg 3720  
cctagtggga cgcaaaaaga tttttcctt ctttttactg ttttgcaaat ttat 3774