

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 entrenado 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.

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
25 variedad de especies herbáceas por inoculación mediante frotamiento de la savia.

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
30 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.

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
55 moléculas de ácido nucleico son ADN o ARN.

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.
60

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.

65 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*), SO₄ (*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		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
20 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
25 convencional, o cualquier procedimiento divulgado en el presente documento.

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 ATCACCCTT
 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 GGACGGAAGT TTTGAAGTAA AGATTGCTC TCCATATCAC CGAACTCCTG
CCAGATTGCT TGCTGGTCAA AGTCAG
```

Fragmento 7 (SEC ID N.º: 7)

```
AGAAGAAAT 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 GTTTTGTCAG TAGCATGTAT TATTTTGTGT
TATAATTTGT 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
GACCCAAGTGATATATATGTGTTTTGTTCAGTAGCATGTATTATTTTGTGTTATAAATTTGTTTT
AACTTGTTTTTCCGCTTTTGTGTGTTTTAGTTTTCATGCTTTTLAGTGGCGACAGTGTGTTGTTG
TCCTTTGGACACACTTGCCTAGTTGGACGCAAAAAGATTTTTCTTTCTTTTACTGGCGGC
CGCTCTAGCGTCGACCTTGTGAGAGTAAAATTTTTGTCTTTTTCCCGCCTACTGATGAAGA
25 AGAGAGGCCACCTGCCTTGTCAAGTGGGCATCAATCCTTATAGTCGCGAATGGACCGATTT
GTATCACCGCTTAGGTGAACTCTCTGATGTCGGATAACAATTGTGATTATAAGGCTTTTGAT
GGCCTAATTACGGAGCAAATTTTGTGAGTGGATCC

Concatenado 714 (SEC ID N.º: 19)

GGATCCAGAAGAAATTGAGATTGGTTCTCGTTTCTTCGATTTCACTTCGAATACTTGTAGG
GTATCTATGGGTGAAAATCCGTTTGTCTGCAATGATTGCCTGCCATGGATTGCATAGTGGTG
CGGCCGCTCTAGCGTCGACGGTACCAGATGAATTGTGCTTTCCATATCCTGATCCTAAGCA
35 GCCCGCCATCCTTAGCGCAGAGGATGAACGCCTTAAGGGAACGATCCATGAAGGATACAC
TCCGTTAAGGGATGGCATGAAGAAGTTTGTCTGAGCCAATGTATCTGCTAGAGGAAAAACT
ACTCGATGAAGTTGCAGGTGACATGGTTAGCAGCTGGTATGACTCGAGACCGGACCCAG
CTCCCTACTTTAGGGCTGTTGGGGCTTTTGCACCAACCCGGTCCGAGTTTGTTCGGGCCAT
TGTTGAAAGGCTCACCCGGCTACGGGAGGAGTCGAGAGCTGCGGCACCTTTTGCCGAATT
40 GCCAGGATCC

Concatenado 678 (SEC ID N.º: 20)

GGATCCTTAGTGAGTGGAAACGGGACCACTATGGACTGGAATGAACTTTTTAAGTATCCCGG
GGTGTATGTGGAAGAGGACGGAAAGTTTTGAAGTAAAGATTCCGCTCTCCATATCACCGAAC
45 TCCTGCCAGATTGCTTGGTCAAAGTCAGGCGGCCAGAAAGAAATTGAGATTGGTTCTC
GTTTCTTCGATTTCACTTCGAATACTTGTAGGGTATCTATGGGTGAAAATCCGTTTGTCTGCA
ATGATTGCCTGCCATGGATTGCATAGTGGTGGCGCCCTTTAGCTTTTATGGTAGAACCAAGT
TTCCCAGTCTAGTGATACGTAGATATCTAGGGTATCTGACTTTAAAAGACCCAAGTGTATA
TATGTGTTTTGTTCAGTAGCATGTATTATTTGTGTTATAAATTTGTTTTAACTTGTTTTTCCGCT
50 TTTGTGTGTTTGTGTTTCACTGCTTTTGTGCGACAGTGTGTTGTTGTCCTTTGGACACACT
TGCTAGTTGGACGCAAAAAGATTTTTCTTTCTTTTACTGGGATCC

Concatenado 123 (SEC ID N.º: 21)

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

Concatenado 375 (SEC ID N.º: 22)

5 GGATCCTACCTATGGTGTGATAATGTCTTCACTGTGGCACAATCTGTCATGCAGTATTTT
 ACTGGCGATGCTCTGAAAATGCAAATGGCAAAGCTTGGGGTAACTATTACTGATGGGAAA
 GATAAGTCTCTTTTCCACTATCCAGCCCGTCCACTGCTGGAATTAGAGTTTTTTGAAACGTG
 GATTTGTTAGAAGCTCTGGGGGTATGATAAATGCGCCTTTGGAAAAATTATCAATAATGAG
 10 TTCTTTGGTCTACATCAGAAGTGATGGCTCAGACATGTTGCAGAAACTATTGGACAATGTT
 AATACTGCACTTGTGCGAGCTTTATCTACATGGTGACTIONGAGACCGGCGGGCCAGAATAAA
 TTGAGATTGGTTCTCGTTTCTTCGATTTCACTTCGAATACTTGTAGGGTATCTATGGGTGAA
 AATCCGTTTGGCTGCAATGATTGCCTGCCATGGATTGCATAGTGGTGGCGCCGCTCCGGATG
 ATAGAAATCGTTGATCTTCTCAACTTGAGGCTGAGCCAGACTGACCTCAACCGTGAGAG
 GGCTAGCCGGCAAAGGAGTAATCTACTTTCCCAAGGATTGCCAGGCAAATAGATACTTGG
 15 CCACCCTGAATATACGTGATATGATCTCAGACTTCAAGGGATCC

Concatenado 168 (SEC ID N.º: 23)

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

Concatenado 245 (SEC ID N.º: 24)

35 GGATCCCTTGTTGAGAGTAAAATTTTTGTCTTTTTCCCGCCTACTGATGAAGAAGAGAGGC
 CACCTGCCTTGTCAAGTGGGCATCAATCCTTATAGTCGCGAATGGACCGATTTGTATCACC
 GCTTAGGTGAACTCTCTGATGTCGGATACAATTGTGATTATAAGGCTTTTGGATGGCCTAAT
 TACGGAGCAAATTTGAGTCTCGAGACCGGAGCGGCCCTGGCAATTTGGCAAAGAGTGCC
 GCAGCTCTCGACTCCTCCCGTAGCCGGGTGAGCCTTTCCACAATGGCCCGAACAAACTCGG
 ACCGGGTTGGTGCAAAAGCCCCAACAGCCCTAAAGTAGGGAGCTGGGGTCCGGATGATAG
 AAACGTTGATCTTCTCAACATGAGGCTGAGCCAGACTGTGCTCAACCGTGAGAGGGCTA
 40 GCCGGCAGAGGAGTAATCTACATTCCCAAGGATTGCCAGGCAAATAGATACTTGGGCACC
 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 GGATCCAGTAAAAAGAAAGGAAAAATCTTTTTGCGTCCAAGTGGCAAGTGTGTCCAAA
 GGACAAACAACACACTGTCGCCACTAAAAGCATGAACTAAACACACAAAAGCGGAAAAC
 AAGTTAAAACAATATAACACAAAATAATACCTGCTACTGACAAAACACATATATACACT
 60 TGGGTCTTTAAGTCAGATACCCTAGATATCTACGTATCACTAGACTGGGAAACTGGTTCT
 ACCATAAAAGCTAAAGGGCCGCTGACTTTGACCAGCAAGCAATCTGGCAGGAGTTCGGT
 GATATGGAGAGCGAATCTTTACTTCAAACTTCCGTCCTCTTCCACATACACCCCGGGATA
 CTTAAAAGTTCAATCCAGTCCATAGTGGTCCCGTTCCTCACTAAGGGCCCGCCGGTCT
 CGAGTCATACCAGTCTGAACCATGTCACCTGCAACTTCATCGAGTAGTTTTTCTCTAGC
 AGATACATTGGCTCAGCAAATCTTTCATGCCATCCCTAACGGAGTGTATCCTTCATGGA
 65 TCGTTCCCTTAAGGCGTTCATCCTCTGCGCTAAGGATGGCGGGCTGCTTAGGATCCCTTGA
 AGTCTGAGATCATATCACGTATATTCAGGGTGCCAAGTATCTATTTGCCTGGCAATCCTT
 GGAATGTAGATTACTCCTCTGCCGGCTAGCCCTCTCACGGTTGAGCTCAGTCTGGGCTCA

5 GTCTCAAGTTGAGGAAGATCAACGTTTCTATCATCCGGAGCGGCCGCACCACTATGCAATC
 CATGGCAGGCAATCATTGCAGCAAACGGATTTTCACCCATAGATACCCCTACAAGTATTCGA
 AGTGA AATCGAAGAAACGAGAACCAATCTCAATTTCTTCTGGGCCCGCCGGTCTCGAGTCA
 CCATGTAGATAAAGCTCGACAAGTGCAGTATTAACATTGTCCAATAGTTTCTGCAACATGT
 CTGAGCCATCACTTCTGATGTAGACCAAAGAATTCATTATTGATAATTTTTCCAAAGGGCGC
 10 ATTTATCATACCCCCAGAGCTTCTAACAAATCCACGTTTCAAAAACCTCTAATTCAGCAGT
 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
 AGCGCAGAGGATGAACGCCTTAAGGGAAACGATCCATGAAGGATACACTCCGTTAAGGGAT
 GGCATGAAGAAGTTTGCTGAGCCAATGTATCTGCTAGAGGAAAACTACTCGATGAAGIT
 GCAGGTGACATGGTTCAGACGTGGTATGACTCGACCTTGTTGAGAGTAAAATTTTTGTCTT
 TTTCCCGCTACTGATGAAGAAGAGAGGCCACCTGCCTTGTC AAGTGGGCATCAATCCTTA
 25 TAGTCGCGAATGGACCGATTTGTATCACCCTTAGGTGAACCTCCCTGATGTCGGATAACAAT
 TGTGATTATAAGGCTTTTGTATGGCCTAATTACGGAGCAAATTTTGAGTCTCGACTACCTAT
 GGTGATGATAATGTCTTCACTGTGGCACAATCTGTCTGCAGTACTTTACTGGCGATGCTC
 TGAAAATGCAAATGGCAAAGCTTGGGGTAACTATTACTGATGGGAAAGATAAGTCTCTTT
 CCACTATTCAGCCCGTCCACTGCTGGAATTAGAGTTTTTGAAACGTGGATTTGTTAGAAG
 30 CTCTGGGGGTATGATAAATGCGCCTTTGGAAAAATTATCAATAATGAGTTCCTTTGGICTIAC
 ATCAGAAGTGATGGCTCAGACATGTTGCAGAACTATTGGACAATGTTAATACTGCACTTG
 TCGAGCTTTATCTACATGGTACTCGGGACCGGCCGGCCCTTAGTGAGTGGAAACGGGACC
 ACTATGGACTGGAATGAACTTTTTAAGTATCCCGGGGTGTATGTGGAAGAGGACGGAAGT
 35 TTTGAAGTAAAGATTTCGCTCTCCATATCACCGAACCTCCTGCCAGATTGCTTGCTGGTCAA
 GTCAGGCGGCCCGAGAAGAAATTGAGATTGGTTCCTCGTTTCTTCGATTTCACTTCGAATACT
 TGTAGGGTATCTATGGGTGAAAATCCGTTTGTGCAATGATTGCCTGCCATGGATTGCATA
 GTGGTGCGGCCCTTTAGCTTTTATGGTAGAACCAGTTTCCAGTCTAGTGATACGTAGATA
 TCTAGGGTATCTGGCTTTAAAAGACCCAAGTGTATATATGTGTTTTGTGTCAGTAGCATGTAT
 40 TATCTTGTGTTATAATTTGTTTTAACTTGTTTTCCGCTTTTGTGTGTTTAGTTTCATGCTTTT
 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
50 promotor 35S de CaMV.

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
60 trigo.

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 fosfotricina 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*), SO₄ (*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 µEm-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 µEm-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 ± 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

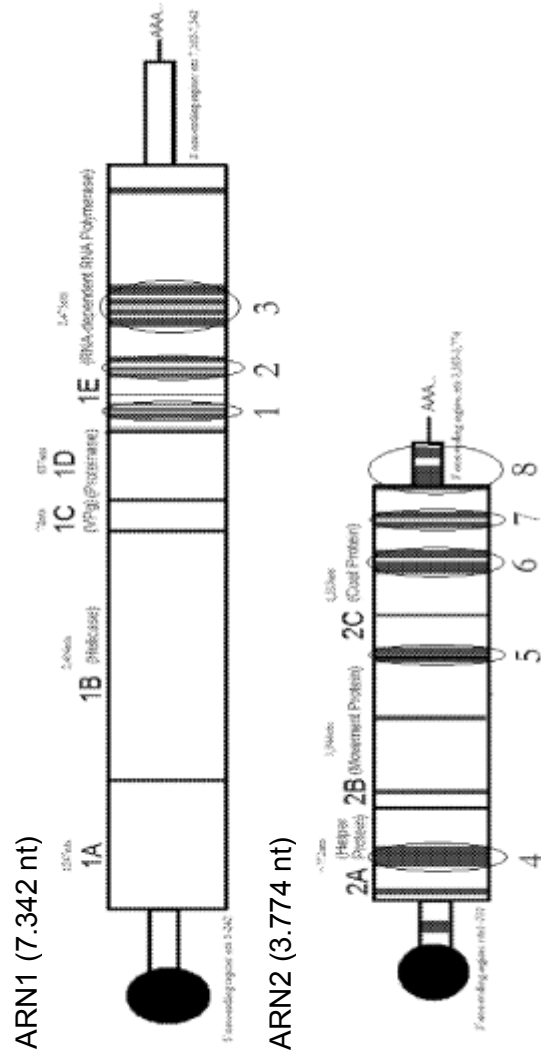
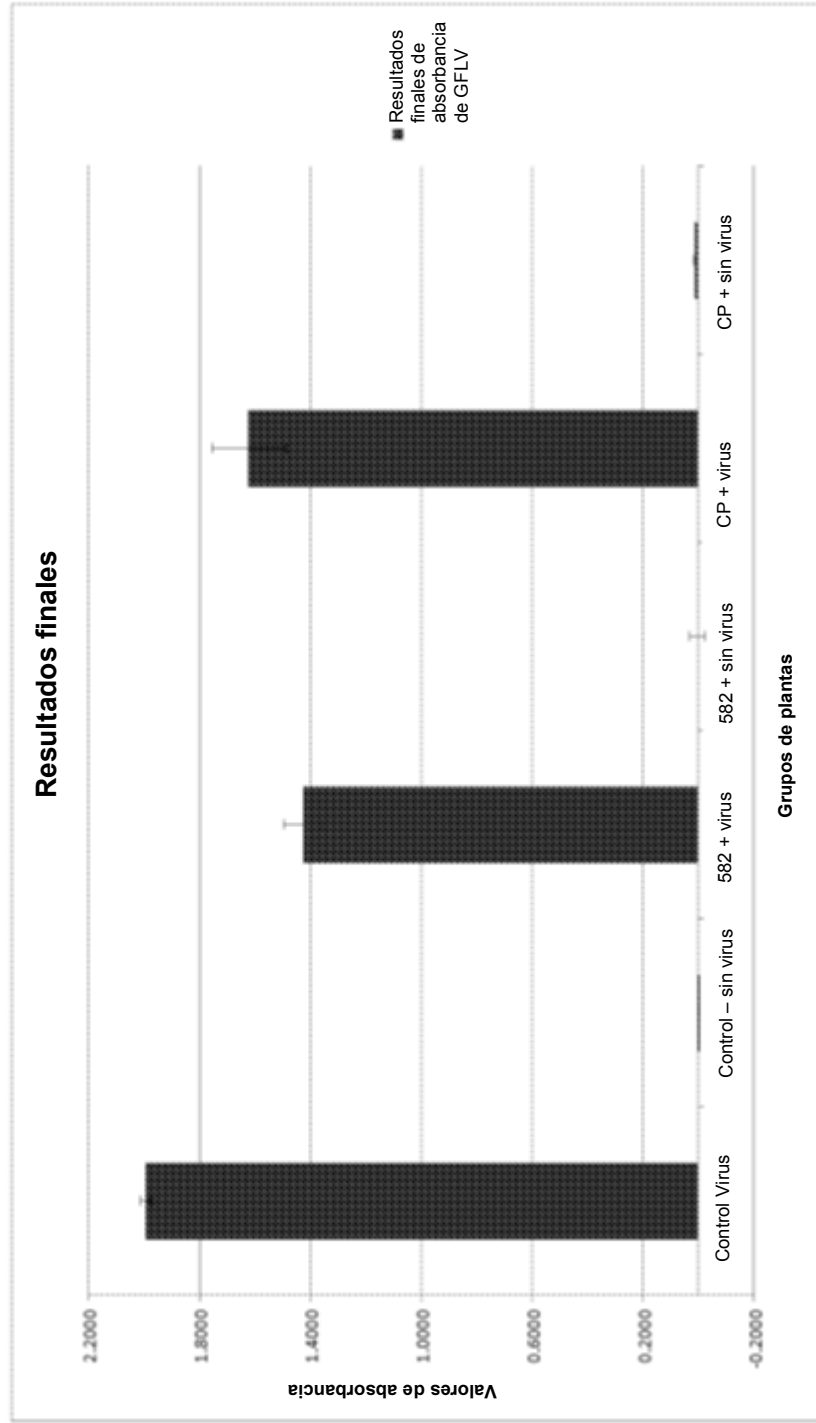


Figura 2



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 cagcccgccca 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

gccttgcaaa gtgggcatca atccttatag tgcgcaatgg 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 tggcaaagct 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 ctactttagg 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 ctcaactga 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 tgctgggcaaa agtcag	146	
30	<210> 7		
	<211> 115		
	<212> ADN		
	<213> Sintética		
35	<400> 7		
	agaagaaatt gagattggtt ctgtttctt cgatttcact tcgaatactt gtagggatc	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	
	tgactttaaag agaccaagt gtatatatgt gttttgtcag tagcatgtat tattttgtgt	120	

ES 2 567 104 T3

tataatttgt ttttaacttgt tttccgcttt tgtgtgttta gtttcatgct tttagtggcg 180
 acagtgtggt gtttgcctt tggacacact tgcctagttg 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 agaaacgctg 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
 ttaacttgtt ttccgctttt gtgtgtttag tttcatgctt ttagtggcga cagtgtgttg 480
 tttgtccttt ggacacactt gcctagttgg acgcaaaaag attttctctt tctttttact 540
 ggccggccgct 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 aagggaaacga tccatgaagg atacactccg 120
ttaagggatg gcatgaagaa gtttgctgag ccaatgtatc tgctagagga aaaactactc 180
gatgaagtgg 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 tgcagtatit 480
tactggcgat gctctgaaaa tgcaaatggc aaagcttggg gtaactatta ctgatgggaa 540
agataagtct ctttccacta ttccagcccg tccactgctg gaattagagt ttttgaaaacg 600
tggatttggg agaagctctg ggggtatgat aaatgcgcct ttggaaaaat tatcaataat 660
gagttctttg 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
gatgggaaaag ataagtctct ttccactatt ccagcccgtc cactgctgga attagagttt 180
ttgaaacgtg gatttgttag 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
actagttc 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 ccaaccgggt ccgagtttgt tcggggccatt gtggaaaggc 300
 tcaccggct acgggaggag tcgagagctg cggcactctt tgccgaattg ccagggccgc 360
 tccggatgat agaaaagttg 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 acctatgggt atgataatgt cttcactgtg gcacaatctg tcatgcagta 360
 ttttactggc gatgctctga aaatgcaaat ggcaaagctt ggggtaacta ttactgatgg 420
 gaaagataag tctctttcca ctattccagc ccgtccactg ctggaattag agtttttgaa 480
 acgtggattt gttataagct ctgggggtat gataaatgcg cctttggaaa aattatcaat 540
 aatgagttct ttggtctaca tcagaagtga tggctcagac ctgttcgaga aactattgga 600
 cagtgttaat actgcacttg tccagctttt ctagctgggt aggatcc 647

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

5

<400> 18

ggatccctgat agaaacgttg atcttcctca 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 gttataattt 300
 gttttaactt gttttccgct tttgtgtggt tagtttcatg ctttttagtg cgacagtgtg 360
 ttgtttgtcc tttggacaca cttgcctagt tggacgcaaa aagatttttc ctttcttttt 420
 actggcggcc gctctagcgt cgaccttgtt gagagtaaaa tttttgtctt tttcccgctt 480
 actgatgaag aagagaggcc acctgccttg tcaagtgggc atcaatcctt atagtcgaga 540
 atggaccgat ttgtatcacc gcttaggtga actctctgat gtcggataca attgtgatta 600
 taaggctttt gatggcctaa ttacggagca aattttgagt ggatcc 646

10

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

15

<400> 19

ggatccagaa gaaattgaga ttggttctcg tttcttcgat ttcacttcga ataactttag 60

ES 2 567 104 T3

ggtatctatg ggtgaaaatc cgtttgctgc aatgattgcc tgccatggat tgcatagtgg 120
 tgcggccgct ctacgctcga cggtaaccaga tgaattgtgc tttccatata ctgaccta 180
 gcagcccggc atccttagcg cagaggatga acgccttaag ggaacgatcc atgaaggata 240
 cactccgta agggatggca tgaagaagtt tgctgagcca atgtatctgc tagaggaaaa 300
 actactcgat gaagttgcag gtgacatggt tcagacgtgg tatgactcga gaccggaccc 360
 cagctcccta ctttagggct gttggggctt 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
 tgtatataatg 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 atatcctgat cctaagcagc ccgccatcct 60
 tagcgcagag gatgaacgcc ttaagggaac gatccatgaa ggatacactc cgtaagggga 120
 tggcatgaag aagtttgcct agccaatgta tctgctagag gaaaaactac tcgatgaagt 180
 tgcaggtgac atggttcaga cgtggtatga ctgcaccttg ttgagagtaa aatttttgc 240
 tttttccgc ctactgatga agaagagagg ccacctgcct tgtcaagtgg gcatcaatcc 300
 ttatagtcgc gaatggaccg atttgtatca 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 tTgaattaga gTttttgaaa cgtggatttg 600
 ttagaagctc tgggggtatg ataaatgcgc cTttggaaaa attatcaata atgagttctt 660
 tggTctacat cagaagtgat ggctcagaca tTttgcagaa 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 tTttgaaacg 180
 tggatttgtt agaagctctg ggggtatgat aatgcgcct tTggaaaaat tatcaataat 240
 gagttctttg gtctacatca gaagtgatgg ctCagacatg tTgcagaaac tattggacaa 300
 tgttaataact gcacttgtcg agctttatct acatggtgac tCgagaccgg cgggcccaga 360
 ataaattgag attggttctc gTttcttoga tTtCacttCg aatacttTga gggtatctat 420
 gggTgaaaaat ccgTttgctg caatgattgc ctgccatgga tTgcatagtg gtgcggccgc 480
 tccggatgat agaaatcgtt gatcttctc aactTgaggc tgagcccaga ctgacctcaa 540
 ccgtgagagg gctagccggc aaaggagtaa tctactttcc caaggattgc caggcaaata 600
 gatacttggc caccctgaat atacgtgata tgatctcaga cTtcaaggga tcc 653

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

ggatccggtg ccagatgaat tTgtgctttcc atatcctgat cctaagcagc ccgccatcct 60
 tagcgcagag gatgaacgcc tTaaagggaac gatccatgaa ggatacactc cgTtaaggga 120
 tggcatgaag aagTttgctg agccaatgta tctgctagag gaaaaactac tCgatgaagt 180
 tgcaggTgac atggttcaga cgtggtatga ctCgagaccg gcggggccctt agtgagtTga 240
 acgggaccac tatggactgg aatgaacttt tTaaagtatcc cggggTgtat gtggaagagg 300
 acggaagTtt tgaagtaaag attcgtctc catatcaccg 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 cgtggatgta 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 tggattaga gtttttgaaa cgtggatttg 600
 ttagaagctc tgggggtatg ataaatgcgc ctttgaaaa attatcaata atgagttctt 660
 tggctacat cagaagtgat ggctcagaca tgttcagaa actattggac aatgtaata 720
 ctgcacttgt cgagctttat ctacatggg actcgggacc ggcgggccct tagtgagtgg 780
 aacgggacca ctatggactg gaatgaactt ttaagtatc ccgggggtga tgtggaagag 840
 gacggaagtt ttgaagtaaa gattcgctct ccatacacc gaactcctgc cagattgctt 900
 gctggtcaaa gtcaggcggc ccagaagaaa ttgagattgg ttctcgtttc ttcgatttca 960
 cttcgaatac ttgtagggtg 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 aaaagatfff tcctttcttt ttactggcgg ccgctccgga ccccagctcc 1320
 ctactttagg gctggtgggg 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
 ggacaaaca 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
 caatecttgg 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 ctactgggggt caaaccagat atccataaat 480
 ccaaaggagc ttctgtggct cctgcacctt tgettaagca aagggtgtaa gtagtcgttc 540
 aatatgggcc tectgccgat attgaattgg tctaccggcc tcttgtgagg gaggaggaga 600
 agtctctcaa tatagtgggt ctgccaccta cccaaaaggt ggaagtaagg gtgccagttt 660
 gctgtgcacc caagtggatg gtggctatcc ctaagccacc ggtgaagcta gccctaaag 720
 ctagcaagct acggtttctt aaaggagccg tagcttacia tgggtgcaat 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 ttctgtgggtg gtagttaaga agaggaagct gccaaaggctt cctaaaattc	1080
tgectgagca 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
atttgatggc aggagagttt gcagacctct gcttgctatc tttggtgat aatgatgcac	1380
cgacgttgtc 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 ggtagaaaaa gtgcttattg	1860
cagccaaaat tatccctaat tgtgggatta ttctgggtgc ctttttgaca cttttctttg	1920
ctagcctggg gttaacagcc ctggagtgca ctgcagagga aatcttcaga atgcatgcgt	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 tgttggaagt atttactccc aggtttctgg acaggaaagt actttttttg	2280
acgagctttc tacaattggt tgcctagatg 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
ggcgggcggt	actggaagta	cgcaggaagg	atgggagttt	ctttacaccg	cgggcgtatg	3000
attcatgcat	tgaagttcgc	ttcatgcata	ataagtgtcc	gtatgttgat	tctgctgggg	3060
tgctcaggg	ccctgcagta	aacctccca	tggatgaagg	atggatcact	ccaagtgagg	3120
ctgttgacgt	tctcaaaaat	ctcttgggtg	aacacatttt	ggctgaggaa	gcaaagctgc	3180
tggaatacag	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	tttttgacgg	gcttgggtcca	aggacaaagc	aaagtagaga	3540
gtgtggaacg	tatggggaaa	gatagttctc	cggaacaaca	gaattttttt	aaacgcttga	3600
gtttatccga	gagaatttat	ctgaggctgt	gccaaatccg	cattgataat	atccagaaag	3660
aagagctggc	gggttctggt	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
ctcgcttgga	ggaaagatat	tcccctagaa	atcgttttgt	ctcgcgaatt	tctaaaatta	3960
ggggtgaggg	accttccaaa	ggacaagggtg	agcatgagga	attggttact	gagctctatt	4020
actattgtga	tggagttaag	aagctaattt	ccacgtgttg	gtttaagga	aggtcactct	4080
tgatgacgag	acatcaagcc	ctggccgttc	cgatcggcaa	tgaattgaa	gtaataacg	4140
ctgacggaac	aacaaaaaag	ttagtttggc	caggcaggca	ggaggatggc	aattgcaaag	4200
gcttcgtoga	attccctgaa	aatgagttag	ttgtctttga	gcatccacac	ttattgacac	4260
tgcccattaa	gtatgagaag	tactttgttg	atgatgccga	tagacagatt	tccccaacg	4320
ttgcggttaa	gtgttgcggt	gcgcgcttag	aagatggaat	tccccaatc	cacttttggg	4380
gcaaatatgc	aacagcccgc	agtgaagttc	atacgtgaa	agatgagggc	gggggaaatg	4440
tctaccagaa	caagataagg	cgctatattg	tttatgcgca	tgaagcaaag	aagtatgatt	4500
gtggagcctt	ggctgtggct	gtgatccaag	gaatcccaaa	agtcacgca	atgcttgttt	4560

ES 2 567 104 T3

ctgggaatag aggtgtgacc tactcttctg tgattccaaa ctacagttct tcttttatta 4620
 ggggagaagt gccatatgta ccagaagatg ggttagtgtc gaggggatat aggaaagtgg 4680
 gttatttgca cgcacggat gggccacatg tgccctctaa gacttccttc atgaaggtac 4740
 cagatgaatt gtgctttcca tatcctgatc ctaagcagcc cgccatcctt agcgcagagg 4800
 atgaacgcct taagggaacg atccatgaag gatacactcc gttaagggat ggcacgaaga 4860
 agtttgctga gccaatgtat ctgctagagg aaaaactact cgatgaagtt gcaggtgaca 4920
 tggttcagac gtggtatgac ccgggtgaat tccttgaaga tatttcttta gatcaagcta 4980
 tcaatgggga catggatgag gaatattttg accccctagt gatggacacg tctgaaggat 5040
 atcccgatgt tttagatcgt aaacctgggg aaaagggaaa ggcgagattc tttgttgggg 5100
 aaccaggaaa tagagccttt gtagctggtt gtaatcctga aaaggcttat taccaactag 5160
 aagaggactc taaaaccaag ataccttctt tggtagtat agaaaccca aaagacgaga 5220
 gattaaaaag aagtaaaatc gatactcctg gtacgagatt attttctgtg ctgcccttgg 5280
 catataatct cttgttgaga gtaaaatfff tgtctttttc ccgcctactg atgaagaaga 5340
 gaggccacct gccttgtaaa gtgggcatca atccttatag tcgcgaatgg accgatttgt 5400
 atcaccgctt aggtgaactc 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 gcttggggta actattactg atgggaaaga taagtctctt tccactattc 5880
 cagcccgtcc actgctggaa ttagagfff tgaaacgtgg atttgttaga agctctgggg 5940
 gtatgataaa tgcgcctttg gaaaaattat caataatgag ttctttggtc tacatcagaa 6000
 gtgatggctc agacatgtt cagaaactat tggacaatgt taatactgca cttgtcagac 6060
 tttatctaca tggatgata acttattttg aatcagtcag agctttttac ttcgagaaac 6120
 tccctcctgg cgtttataag gagttgacaa 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 agatgttacg 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 ttgttggacg caaaaagatt ttcttttttc 7320
 tttttactgt tatgcaaatt tt 7342

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

5

<400> 28

atgaaaaatg tttacgtttt cttacgttac cgtgatttca cttttcttta gccaaagatt 60
 taagaaactc aaaagtgaaa ctgccaagag ttaagaaac tcacaaagcg aagagtttaa 120
 gaaactcatc attgcttttt tgttctttta ttttgcgctt tatttgttta gcattttatt 180
 tagttctttt aaaaagcttt tgttttgttt ttctttttct ttacttgccc ttatgggcaa 240
 attttattat tccaacaggc ggcttgctgt ttgggctgct gggagaacc ctcatcttgg 300
 gggttctggt gaacaatggc tggcggccat taactgat cctccttcc gccaaactgt 360
 taaggaggat gtccaagaaa accgagaaca gccaaactgct gttcgaatgt tttcttggaa 420
 agttgggtcc gggcccattg acaatcccga gaaatgcgac tggcattttg tcttacggg 480
 cgagaggcca gcgccgtccc ggccggttaa agccgatgag gttgtggtgg tgccacaacc 540
 gaagaagggt gtgattccaa caccacctcc tccccagct cctacttta gggctgttgg 600
 ggcttttgca ccaaccgggt ccgagtttgt tcgggccatt gtggaaaggc 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 tttggaggct catcctgggtg gtccttgtct	840
tcctccccct cccccaatcc aaaatcctcc ctcttccag gagaggggtga gggagttttg	900
caggatgaag tcctgcacca aggctttcgc cttggaaacc tccctaggtc 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 gccctaggg gttgtggag gggaccctca accagagcca attacacgct	1320
agattttagg ctcaatggta tccgaccgg gacaaacaca ttggaaatat tgtataatcc	1380
tgtgtcggag gaagagatgg aagagtaccg ggacaggggc atgtcagctg tggtaattga	1440
tgcgctagaa atagccataa acccatttg catgcctgga aatcctacgg acttgactgt	1500
cgtagcgaca tatgggcatg agcgcgacat gacgcgcgcc tttattggat ctgcttccac	1560
attcttaggg aatgggttag ctagagccat tttctttcct ggtttgcaat atagccagga	1620
ggaaccaagg cgcgaatcta taattgcct atatgttgcc tctaccaatg cactgtgga	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