

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 316**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/08</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/82</b>	(2006.01)
<b>C12N 7/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/63</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/10</b>	(2006.01)		
<b>G01N 33/569</b>	(2006.01)		
<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)		
<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)		
<b>C12Q 1/04</b>	(2006.01)		
<b>A01H 1/04</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2008 PCT/NL2008/050076**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2008 WO08150158**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2008 E 08712602 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2170933**

54 Título: **Nuevo virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate**

30 Prioridad:

**07.06.2007 US 759603**

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

**11.11.2016**

73 Titular/es:

**MONSANTO INVEST B.V. (100.0%)  
Leeuwenhoekweg 52  
2661 CZ Bergschenhoek, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DEN HEUVEL, JOHANNES FRANCISCUS  
JOHANNA MARIA;  
MARIS, PAULUS, CORNELIS;  
VERBEEK, MARINUS;  
DULLEMANS, ANNETTE, MARIA y  
VAN DER VLUGT, RENÉ, ANDRIES, ANTONIUS**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 589 316 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

Nuevo virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate

## 5 SECTOR DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra en el sector de las enfermedades de las plantas. Más en particular, la invención se refiere a procedimientos para la detección de un nuevo virus de planta aislado del tomate, a procedimientos de detección de plantas resistentes y a las utilidades del nuevo virus de planta.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tomate *Solanum lycopersicum* (anteriormente *Lycopersicon esculentum*) es susceptible a un gran número de especies virales. Entre algunos de los virus del tomate más destacados se incluyen el virus del bronceado del tomate (TSWW; género *Tospovirus*); virus del mosaico del pepino (PepMV; género *Potexvirus*) y virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV; género *Begomovirus*). El daño que estas enfermedades causan en la planta varía desde la decoloración de las hojas y lesiones necróticas hasta la pérdida severa de cultivos y la muerte de la planta.

15

20

La capacidad de obtener plantas resistentes es de suma importancia para los cultivadores comerciales y, para algunos de los virus más dañinos desde el punto de vista económico, se han producido variedades de plantas resistentes. Sin embargo, de vez en cuando, surgen nuevos virus que pueden causar un daño considerable en los cultivos.

25

En 1996, se dio a conocer que un nuevo virus de tomate había infectado a las plantas de tomate en los Estados Unidos e Italia desde 1993 y se denominó virus clorosis infeccioso del tomate (TICV; género *Crinivirus*; duffus y otros, 1996). En 1998 se dio a conocer otro nuevo virus de tomate del mismo género. Se observó que este virus había infectado las plantas de tomate en los Estados Unidos desde 1989 y se denominó virus clorosis del tomate (ToCV; Wisler y otros, 1998). Resultó que estos nuevos virus se extendieron mediante una mosca blanca, siendo el insecto un vector de transmisión de la enfermedad muy eficaz.

30

En general, se cree que aumentará la distribución geográfica de virus conocidos y que seguirán apareciendo nuevos virus, en parte como resultado de la recombinación de diferentes virus para formar nuevas cepas o nuevos virus. El desarrollo de cultivares resistentes puede desempeñar un papel importante en el éxito de la gestión de estas enfermedades.

35

## CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

Recientemente, se descubrió un nuevo virus en plantas de tomate de España, que provocaba síntomas que no podían atribuirse a ningún virus conocido. Las plantas mostraban lesiones necróticas en las hojas y anillos marrones en los frutos y mostraron una reducción en el crecimiento. Las pruebas serológicas (ELISA) indicaron la presencia del virus del mosaico del pepino (PepMV). Las investigaciones con microscopía electrónica revelaron, de hecho, las partículas similares a barras habituales de los potexvirus. Sin embargo, también se encontraron partículas virales de forma esférica en el tejido de la hoja infectada. Los inventores fueron capaces de separar el nuevo virus del complejo con PepMV. El nuevo virus se denominó provisionalmente virus del torrado del tomate (ToTV).

45

Después del descubrimiento del virus ToTV, se aisló un virus nuevo y muy relacionado de una planta de tomate del estado de Sinaloa en México. Esta planta mostró síntomas conocidos localmente como "enfermedad de la marchitez", incluyendo una necrosis foliar severa, empezando en la base de los folíolos, y anillos necróticos en los frutos. (Esta enfermedad no se debe confundir con otro virus conocido por causar lo que se llama en México "marchitez manchada del tomate", el agente causante de la cual es el virus del bronceado del tomate (TSWV) o virus de la marchitez manchada del tomate (VMMT), [véase, por ejemplo, De la Torre-Almaráz y otros, *Agrociencia* 36: 211-221, 2002]). Las partículas de virus aisladas de las plantas infectadas son isométricas con un diámetro de aproximadamente 28 nm. El genoma viral consiste en dos moléculas (+)ARN de cadena simple de 7221 (ARN1) y 4906 nucleótidos (ARN2). La cápside vírica contiene tres proteínas de la cubierta de 35, 26 y 24 kDa, respectivamente. Las características antes mencionadas; síntomas, morfología, número y tamaño de las proteínas de la cubierta, y el número de ARN, son similares a las del virus del torrado del tomate (ToTV) descrito previamente. El análisis de secuencia del genoma viral completo muestra que este nuevo virus está relacionado con ToTV, pero es distinto del mismo y, junto con ToTV, pertenece a un nuevo género de virus de plantas. Para este nuevo virus se propone el nombre de virus de la marchitez del tomate (ToMarV).

50

55

60

Para poder rastrear su origen, el seguimiento de su epidemiología y evitar la posible propagación de la enfermedad, es de gran importancia para poder reconocer la enfermedad en una etapa temprana. Sólo entonces pueden tomarse suficientes medidas para aislar las plantas e iniciar las precauciones fitosanitarias. Actualmente, no hay herramientas de diagnóstico. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar herramientas de diagnóstico para esta enfermedad. Además, en la actualidad no existen plantas conocidas por albergar resistencia específica a este nuevo virus, aunque existe la necesidad de desarrollar dichas plantas resistentes.

65

El virus de planta se denominó provisionalmente virus de la marchitez del tomate (ToMarV) y se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) en Braunschweig, Alemania, el 10 de julio de 2007 con los números de referencia de deposición de PRI-TMarV0601 (DSM 19656).

ToMarV es parte de un nuevo género de virus de plantas de las que ToTV es la cepa tipo. Cuando se hace referencia en el presente documento a "ToTV", se pretende indicar el género amplio de virus que comparten niveles de homología, tal como se indica en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario. Este género amplio incluye ToTV-E01 (DSM 16999), así como PRI-TMarV0601, depositada el 10 de julio de 2007 en el Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, una autoridad depositaria internacional bajo el Tratado de Budapest. El material depositado recibió el número de acceso DSM 19656.

El virus provoca síntomas de enfermedad en plantas de tomate, así como en otras plantas, y puede provocar los síntomas por sí mismo, o en un complejo con otros virus o enfermedades.

Los primeros síntomas sistémicos consisten en manchas necróticas en la parte superior de la planta, empezando en la base de las hojas de un foliolo. Las manchas necróticas se expanden y están rodeadas por un área verde claro o amarillo (véase la figura 1). No todas las hojas infectadas sistémicas muestran síntomas, sin embargo, el virus se puede detectar en estas hojas, por ejemplo, mediante microscopía electrónica. Los frutos infectados con ToTV muestran anillos necróticos. El crecimiento de las plantas infectadas se puede reducir en comparación con las plantas no infectadas.

La descripción anterior se refiere a plantas recién infectadas con el virus aislado y no debe reflejar necesariamente los síntomas exactos encontrados en el campo. Factores, tales como la raza o variedad vegetal, etapa de desarrollo, presión de enfermedades adicionales y factores abióticos (por ejemplo, la temperatura y la humedad relativa) determinarán finalmente la expresión y las características de los síntomas.

Las partículas virales son de forma esférica (icosaédrica) con un diámetro de aproximadamente 28 nm (véase la figura 2). Las partículas de virus consisten, como mínimo, en tres proteínas de la cápside de aproximadamente 23, 26 y 35 kDa (véase la figura 3). Después de la purificación, el virus muestra, como mínimo, dos bandas visibles en un gradiente de sulfato de cesio. La banda visible superior (fracción superior del virus) contiene una molécula de ARN de aproximadamente 5,5 kb (más precisamente 5,2 kb) y la banda visible inferior (fracción inferior) contiene una molécula de ARN de aproximadamente 8 kb (más precisamente 7,7 kb) (véase la figura 4). La inoculación de ambas bandas combinadas en plantas de tabaco da lugar a una infección.

ToTV es mecánicamente transmisible a varias especies de *Nicotiana*. Un tampón de inoculación estándar (por ejemplo, un tampón de fosfato 0,03 M a pH 7,7) es adecuado. Para la propagación de ToTV, son preferentes *N. glutinosa*, *N. tabacum* y *N. benthamiana*. Las especies de tabaco *N. hesperis* "67A" y *N. occidentalis* "P1" son muy sensibles a ToTV y muestran síntomas sistémicos después de 3-4 días. Estas especies de tabaco se vuelven muy necróticas en poco tiempo y, por lo tanto, son más adecuadas para utilizar como planta indicadora que como huésped de propagación. La *N. glutinosa* reacciona con lesiones locales cloróticas y una clorosis sistémica y deformación leve de las hojas. La *N. benthamiana* no muestra síntomas locales y reacciona con clorosis sistémica y la deformación de las hojas.

Dicho virus comprende, de manera preferente, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70%, de manera más preferente, como mínimo, del 80%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 90%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 95%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 98%, y de la manera más preferente, como mínimo, del 99%, con las mismas. Dichos virus también están comprendidos por el término ToTV tal como se utiliza en el presente documento.

Dicho virus se asocia con enfermedades del tomate conocidas bajo los nombres de "torrado", "marchitez" y/o "enfermedad de las manchas de chocolate", y/o dicho virus muestra, basándose en el análisis taxonómico numérico de descriptores taxonómicos esencialmente tal como se define en tabla 1, que está más estrechamente relacionado con ToTV que con cualquier otro aislado viral disponible en colecciones públicas, y dicho virus tiene como característica esencial que se asocia con una enfermedad que provoca lesiones necróticas en el tomate.

La presente invención da a conocer un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% con las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo y sus cadenas complementarias.

En el presente documento se describe un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, secuencias que tienen una

homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70%, de manera más preferente, como mínimo, del 80%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 90%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 95%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 98%, y de la manera más preferente, como mínimo, del 99% con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y sus cadenas complementarias y fragmentos específicos de ToTV de las mismas. Dicho ácido nucleico se puede obtener a partir de un virus tal como se ha descrito.

La presente invención da a conocer, además, un polipéptido aislado o recombinante que puede obtenerse a partir de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o a partir de un virus que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, en el que dicho polipéptido se selecciona del grupo que comprende las proteínas de la cápside de 23, 26 y 35 kDa, la ARN polimerasa dependiente de ARN y la posible proteína de movimiento (MP) de ToMarV, tal como se indica en la figura 12.

También se describe un polipéptido aislado o recombinante que puede obtenerse a partir de un virus, tal como se ha descrito, o un fragmento específico de ToTV del mismo. Dicho polipéptido se selecciona, de manera preferente, del grupo que comprende las proteínas de la cápside de 23, 26 y 35 kDa de ToTV y fragmentos específicos de ToTV de las mismas.

También se da a conocer un antígeno que comprende un polipéptido según la presente invención.

También se describe un antígeno que comprende un polipéptido o fragmento específico de ToTV del mismo.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un anticuerpo dirigido, de manera específica, contra un antígeno, según la presente invención, un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o contra un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%, con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las secuencias del genoma viral completo.

La presente invención da a conocer, además, un procedimiento para producir un anticuerpo contra un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o contra un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%, con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las secuencias del genoma viral completo, que comprende las etapas de proporcionar el virus, o una proteína o un fragmento de péptido del mismo; inmunizar un huésped vertebrado apropiado con dicho virus, proteína o fragmento de péptido, y recoger de la sangre o esplenocitos dichos anticuerpos de huésped vertebrado contra dicho virus, proteína o fragmento de péptido.

También se describe un procedimiento para producir un anticuerpo contra ToTV que comprende las etapas de: a) proporcionar un virus ToTV, o una proteína (recombinante) o fragmento de péptido del mismo; b) inmunizar un huésped vertebrado adecuado con dicho virus, proteína o fragmento de péptido, y c) recoger de la sangre (incluyendo el suero) o esplenocitos dichos anticuerpos de huésped vertebrado contra dicho virus, proteína o fragmento de péptido. Dicho procedimiento comprende, además, de manera preferente, las etapas de d) seleccionar un esplenocito productor de anticuerpos, e) fusionar dicho esplenocito a una línea celular de hibridoma inmortalizada y f) permitir que dicha fusión de hibridoma produzca anticuerpos monoclonales. También se describe un anticuerpo que puede obtenerse mediante un procedimiento de producción de un anticuerpo contra ToTV.

La presente invención da a conocer, además, un procedimiento para identificar un aislado viral como un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o como un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%, con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las

secuencias del genoma viral completo, que comprende hacer reaccionar dicho aislado viral o un componente del mismo con un cebador específico de ToMarV o un anticuerpo según la presente invención.

5 También se describe un procedimiento para detectar la presencia de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o de un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%,  
10 con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las secuencias del genoma viral completo, en una muestra que comprende determinar en dicha muestra de la presencia del virus o componente del mismo mediante la reacción de dicha muestra con un cebador específico de ToMarV o un anticuerpo según la presente invención.

15 También se describe un procedimiento para identificar un aislado viral como un virus ToTV que comprende hacer reaccionar dicho aislado viral o un componente del mismo con un anticuerpo.

También se describe un procedimiento para detectar la presencia de ToTV en una muestra que comprende determinar en dicha muestra la presencia de un virus ToTV o componente del mismo mediante la reacción de dicha muestra con un polinucleótido o un anticuerpo.  
20

La presente invención da a conocer, además, un procedimiento para identificar una planta que es resistente a un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o a un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%, con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las secuencias del genoma viral completo, que comprende las etapas de a) exponer una planta o parte de una planta a una dosis infecciosa del virus, y b) identificar dicha planta como una planta resistente cuando, después de dicha exposición, los síntomas de la enfermedad en dicha planta o parte de la planta permanecen ausentes o se retrasan en la expresión o, como mínimo, se reducen en su gravedad o se localizan en relación con una planta de control susceptible, y/o el virus o las secuencias genómicas del mismo no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia del virus se reduce, como mínimo, cuantitativamente, en relación a una planta de control susceptible.  
25  
30  
35

También se describe un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV, que comprende las etapas de: a) exponer una planta o parte de una planta a una dosis infecciosa de ToTV, y b) identificar dicha planta como una planta resistente a ToTV cuando, después de dicha exposición, i) los síntomas de la enfermedad en dicha planta o parte de la planta permanecen ausentes o se retrasan en la expresión o, como mínimo, se reducen en su gravedad en relación con una planta de control susceptible, y/o ii) el virus ToTV o las secuencias genómicas de ToTV no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia del virus ToTV se reduce, como mínimo, cuantitativamente, en dicha planta en relación a una planta de control susceptible  
40  
45

La etapa a) incluye un período de incubación de una duración suficientemente larga para permitir el establecimiento de síntomas de la enfermedad detectables en las plantas de control susceptibles expuestas a una dosis infecciosa comparable de virus. Mediante la realización de este procedimiento, se pueden identificar en la planta todas las formas de resistencia, entre las que se incluyen la resistencia total, la resistencia parcial, la hipersensibilidad y la tolerancia. A efectos de confirmar la tolerancia, debe confirmarse la presencia (sistémica) del virus en la planta (células). La etapa b) puede implicar la realización de un procedimiento para detectar la presencia de ToTV en una muestra de dicha planta o parte de la planta, en el que se utiliza un anticuerpo o polinucleótido en procedimientos estándar para pruebas de hibridación de nucleótidos o inmunoensayos, bien conocidos para el experto en la materia. De manera alternativa, la etapa b) puede comprender poner en contacto una parte de dicha planta expuesta con una planta indicadora susceptible. De esta manera, se puede detectar la presencia de una infección sistémica o local en dicha planta expuesta a través de la observación de la aparición de la enfermedad en la planta indicadora o incluso una planta indicadora de contacto adicional en contacto con dicha primera planta indicadora en contacto.  
50  
55

También se describe un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV que comprende las etapas de identificar una planta donante resistente a ToTV mediante la realización de cualquiera de los procedimientos anteriores para identificar una planta resistente a ToTV, cruzar dicha planta donante resistente a ToTV con una planta receptora (cuya planta receptora puede ser susceptible a ToTV o resistente a ToTV, pero es, de manera adecuada, una planta resistente a ToTV en caso de que el fenotipo resistente sea causado por un gen recesivo) y seleccionar entre una planta vástago (por ejemplo, una planta F<sub>1</sub>, una planta F<sub>2</sub> y una planta autofecundada) una planta resistente mediante la realización de un procedimiento para identificar la resistencia a ToTV en una planta, tal como se ha descrito anteriormente. En el caso de que el rasgo de resistencia sea un rasgo recesivo, las plantas  
60  
65

resistentes se pueden encontrar entre las plantas vástago de las autofecundaciones de la F1 o F2 o generaciones posteriores. Dicha planta donante resistente a ToTV y la planta receptora son, de manera preferente, plantas de la familia de las solanáceas o de la familia de las cucurbitáceas. Dicha planta receptora es, de manera preferente, una planta de tomate, una planta de berenjena, una planta de pimiento, una planta de melón, una planta de sandía o una planta de pepino, de manera más preferente, una planta de la especie *Solanum lycopersicum*, de manera más preferente, una línea de *S. lycopersicum* que posee características comercialmente deseables.

También se describe una planta resistente a ToTV, de manera preferente, una planta de tomate, una planta de berenjena, una planta de pimiento, una planta de melón, una planta de sandía o una planta de pepino, o una parte de las mismas, tal como una semilla, que puede obtenerse mediante un procedimiento de producción de una planta resistente a ToTV, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

También se describe un kit de diagnóstico para detectar la presencia de ToTV en una muestra o para identificar la resistencia a ToTV en una planta que comprende un virus, un polinucleótido, un polipéptido, un antígeno y/o un anticuerpo.

También se describe la utilización de un virus, un polinucleótido, un polipéptido, un antígeno o un anticuerpo para la producción de una composición de diagnóstico.

También se describe una composición de diagnóstico que comprende un virus, un polinucleótido, un polipéptido, un antígeno o un anticuerpo.

La presente invención da a conocer, además, un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%, con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las secuencias del genoma viral completo, su genoma, o partes que confieren resistencia del mismo como agente antiviral.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o de un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%, con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las secuencias del genoma viral completo, o su genoma, o partes del mismo, como vector de expresión.

También se describe la utilización de ToTV, o partes del genoma viral de ToTV, como vector de expresión.

La presente invención da a conocer, además, una forma atenuada de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o de un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98%, con las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de las secuencias del genoma viral completo, o su genoma, o partes del mismo, para la premunición de una planta.

También se describe la utilización de una forma atenuada de un virus ToTV, o su genoma, o partes del mismo, para la premunición de una planta.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

##### Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ToTV" debe interpretarse como una referencia al nuevo género de virus que comparte los niveles de homología de ARN, tal como se indica en el presente documento, a menos que se indique o se prevea expresamente lo contrario (por ejemplo, cuando se comparan ToMarV y ToTV, el término ToTV debe interpretarse como una referencia a la especie ToTV-E01. Este amplio género incluye, como mínimo, la especie ToTV-E01 (DSM 16999), así como PRI-TMarV0601. El género se define mediante los niveles de

homología entre las secuencias de ARN del genoma viral (o traducidas a secuencias de ADN), o los niveles de homología entre las secuencias de aminoácidos de los marcos abiertos de lectura dentro del genoma viral.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "resistente a ToTV", debe interpretarse como una referencia a la resistencia de una planta, en particular, una planta de tomate, al establecimiento de una infección, o al establecimiento de una enfermedad causada por una especie viral del nuevo género de virus que comparte los niveles de ARN de homología, tal como se indica en el presente documento, a menos que se indique o se prevea expresamente lo contrario.

10 El término "fragmento específico de ToTV", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia que es específica para el género de virus que comprende ToTV y ToMarV, tal como se han descrito en el presente documento. Con el término "específico" se entiende que el ácido nucleico es capaz de hibridarse específicamente en condiciones de hibridación rigurosas el ácido nucleico de dicho virus.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ToMarV" debe interpretarse como una referencia a una especie dentro del nuevo género de virus ToTV, cuyo género comparte los niveles de homología de ARN, tal como se indica en el presente documento, a menos que se indique o se prevea expresamente lo contrario (por ejemplo, cuando ToMarV y ToTV se comparan en el presente documento, el término ToMarV debe interpretarse como una referencia a la especie PRI-TMarV0601). El término "ToMarV" también debe interpretarse como una referencia a un virus que pertenece a esta nueva especie dentro del nuevo género de virus ToTV, en el que dicha nueva especie comparte los niveles de homología en las secuencias de nucleótidos o aminoácidos aceptados, en general, entre los virólogos para indicar diferentes aislamientos (cepas) que pertenecen a la misma especie. Dichos niveles de homología intraespecíficos están habitualmente por encima del 80 al 90%, por ejemplo, por encima del 93% para secuencias de nucleótidos y, posiblemente, incluso más elevado para secuencias de aminoácidos.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "parte de la planta" indica una parte de una planta, incluyendo células individuales y tejidos celulares, tales como células de plantas que están intactas en plantas, grupos de células y cultivos de tejidos a partir de los cuales se pueden regenerar las plantas. Entre los ejemplos de partes de la planta se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, células individuales y tejidos de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, tallos, brotes y semillas; así como polen, óvulos, embriones, hojas, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, tallos, brotes, esquejes, rizomas, semillas, protoplastos, callos y similares.

35 El término "muestra" incluye una muestra de una planta, de una parte de una planta o de un vector de transmisión, o una muestra de suelo, agua o aire.

40 El término "vector de transmisión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al agente o sustancia que propaga la enfermedad. Entre los vectores de transmisión de ToTV en el campo pueden comprender, aunque sin limitarse a los mismos, animales, tales como artrópodos (en particular, los de las clases de insectos y arácnidos), nematodos (en particular, los de la clase de adenofóreos), pero también animales más grandes, tales como, por ejemplo, aves, conejos y ratones, hongos (es decir, el filo *Eumycota*, en particular, los hongos de la clase *Phycomycota*), plantas (parásitas) (entre las que se incluyen los miembros de la familia *Cuscutaceae*), polen, semilla, agua, partículas del suelo e incluso manos, equipos y zapatos humanos.

45 El término planta "vástago" se refiere a cualquier planta resultante como progenie de una reproducción vegetal o sexual de una o más plantas parentales o descendientes de las mismas. Por ejemplo, una planta vástago se puede obtener mediante clonación o autofecundación de una planta parental o mediante el cruce de dos plantas parentales e incluyen autofecundaciones, así como la F1 o F2 o generaciones posteriores. Una F1 es una planta vástago de primera generación producida a partir de plantas parentales, como mínimo, una de los cuales se utiliza por primera vez como donante de un rasgo, mientras que la planta vástago de segunda generación (F2) o posteriores generaciones (F3, F4, etc.) son muestras producidas a partir de las autofecundaciones de F1, F2, etc. Una F1 puede ser (y, normalmente, es), por tanto, un híbrido resultante de un cruce entre dos verdaderas plantas parentales de cultivo (un cultivo verdadero es homocigoto para un rasgo), mientras que una F2 puede ser (y, normalmente, es) un vástago resultante de la autopolinización de dichos híbridos de F1.

60 El término "resistente", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una planta que es capaz de resistir la multiplicación en sus células y/o el movimiento (sistémico) del virus a otras células y/o el desarrollo de síntomas de la enfermedad después de la infección con dicho virus, el cual es capaz de infectar y multiplicarse en las correspondientes variedades no resistentes o susceptibles de dicha planta. El término se utiliza para incluir dichas formas identificables por separado de resistencia como "resistencia total", "inmunidad", "resistencia parcial", "hipersensibilidad" y "tolerancia".

65 "Resistencia total" se refiere a la imposibilidad total del virus de desarrollarse después de la infección, y puede ser el resultado de la imposibilidad del virus de entrar en la célula (sin infección inicial) o puede ser el resultado de la imposibilidad del virus de multiplicarse en la célula e infectar células posteriores (sin infección subliminal, sin

propagación). La presencia de resistencia total se puede determinar mediante el establecimiento de la ausencia de partículas virales o ARN viral en las células de la planta, así como la ausencia de cualquier síntoma de la enfermedad en dicha planta, después de la exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de virus (es decir, después de la "infección"). Entre los cultivadores, este fenotipo se refiere a menudo como "inmune". "Inmunidad", tal como se utiliza en el presente documento, por lo tanto, se refiere a una forma de resistencia caracterizada por la ausencia de replicación viral, incluso cuando el virus se transfiere activamente en las células, por ejemplo, mediante electroporación.

Una "dosis infecciosa" se define como una dosis de partículas virales o ácido nucleico del virus capaz de infectar una planta, cuya dosis puede variar entre plantas y entre aislados de ToTV probados. Teóricamente, será suficiente una cantidad de aproximadamente 1 a 10 a una cantidad de aproximadamente 500 a 5000 partículas virales de dicho virus o los ácidos nucleicos del mismo. De esta manera, se puede conseguir una infección mediante la inoculación mecánica de partículas de virus o ácido nucleico del virus purificados en las plantas.

"Resistencia parcial" se refiere a la multiplicación reducida del virus en la célula, el movimiento (sistémico) reducido del virus y/o el desarrollo reducido de síntomas después de la infección. La presencia de resistencia parcial se puede determinar mediante el establecimiento de la presencia sistémica de títulos bajos de partículas virales o ARN viral en la planta y la presencia de síntomas disminuidos o retrasados de la enfermedad en dicha planta después de la exposición de dicha planta a una dosis infecciosa del virus. Los títulos de virus se pueden determinar mediante la utilización de un procedimiento de detección cuantitativa (por ejemplo, un procedimiento ELISA o una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa [RT-PCR]). Entre los cultivadores, este fenotipo se refiere a menudo como "resistente intermedio".

El término "hipersensible" se refiere a una forma de resistencia mediante la cual la infección permanece local y no se propaga de forma sistémica, por ejemplo, debido a la necrosis local de tejido infectado o la falta de movimiento sistémico más allá del tejido inoculado. Las plantas hipersensibles muestran síntomas de la enfermedad locales, pero graves, y se puede establecer la presencia local del virus en dichas plantas.

"Tolerante" se utiliza en el presente documento para indicar un fenotipo de una planta, en el que los síntomas de la enfermedad permanecen ausentes después de la exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de virus, mediante lo cual se pueden establecer la presencia de una infección viral sistémica o local, la multiplicación del virus, como mínimo, la presencia de secuencias genómicas virales en células de dicha planta y/o la integración genómica de las mismas. Las plantas tolerantes son, por tanto, resistentes a la expresión de los síntomas, pero son portadores asintomáticos del virus. A veces, pueden estar presentes secuencias virales o incluso multiplicarse en las plantas sin causar síntomas de la enfermedad. Este fenómeno también se conoce como "infección latente". Algunos virus de ADN y ARN pueden llegar a ser indetectables después de una infección primaria para solamente volver a aparecer más tarde y producir la enfermedad aguda. En infecciones latentes, el virus puede existir en una forma oculta no infecciosa verdaderamente latente, posiblemente como un genoma integrado o un agente episomal (de manera que las partículas virales no se pueden encontrar en el citoplasma, mientras que los protocolos de PCR pueden indicar la presencia de secuencias de ácido nucleico viral) o como un agente infeccioso y de replicación continua. Un virus reactivado puede propagarse e iniciar una epidemia entre los contactos susceptibles. La presencia de una "infección latente" es indistinguible de la presencia de un fenotipo "tolerante" en una planta.

El término "susceptible" se utiliza en el presente documento para referirse a una planta que no tiene resistencia al virus resultante en la entrada del virus en las células de la planta y la multiplicación y propagación sistémica del virus, dando lugar a los síntomas de la enfermedad. El término "susceptible" es, por tanto, equivalente a "no resistente". Una planta susceptible muestra títulos normales del virus en sus células después de la infección. De este modo, la susceptibilidad se puede determinar mediante el establecimiento de la presencia de títulos normales (es decir, en relación con otras infecciones virales en plantas) de partículas virales o de ARN viral en las células de la planta y la presencia de síntomas normales de la enfermedad (es decir, en relación a los síntomas de la enfermedad, tal como se han descrito en el presente documento, para la planta de la que se aisló ToTV por primera vez) en dicha planta después de la exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de virus.

El término "sensible" refleja la reacción sintomática de una planta susceptible después de la infección por el virus. La reacción o los síntomas pueden ser más o menos graves dependiendo del nivel de sensibilidad de la planta. Si la planta está herida o incluso muerta por el virus, dicha planta se califica como "sensible".

Las plantas inoculadas artificialmente con cepas de virus atenuados están subsecuentemente protegidas de los virus virulentos estrechamente relacionados. Como virus protectores, se pueden utilizar cepas leves de origen natural o una cepa atenuada (un mutante leve inducido artificialmente). De manera preferente, a efectos de alcanzar la premunición de una planta contra ToTV, se puede utilizar una cepa atenuada de ToTV que sea asintomática o que muestre, como mínimo, la expresión reducida de los síntomas en una planta infectada, en relación a una cepa virulenta de ToTV. Los procedimientos de producción de virus atenuados pueden incluir, por ejemplo, la mutagénesis aleatoria del genoma de ToTV y el cribado de cepas con atenuación de los síntomas. Se hace referencia expresa a los procedimientos para la producción de virus de plantas atenuados dados a conocer en los artículos de Takeshita y otros, 2001; Lu y otros, 2001; Hagiwara, y otros, 2002; y Hirata y otros, 2003.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tomate" se refiere a cualquier planta, línea o población de *Lycopersicon* o *Solanum*, entre los que se incluyen, aunque sin limitación a los mismos, los que se presentan en la siguiente lista. Recientemente, se ha cambiado la nomenclatura de *Lycopersicon*.

5 La nueva nomenclatura para *Lycopersicon* se da a conocer en la siguiente lista (de: Peralta, Knapp y Spooner, monografía inédita (véase: <http://www.sgn.cornell.edu> "Guía para la nomenclatura de *Solanum* revisada" ("Guide to revised *Solanum* nomenclature"))).

Nombre en la monografía de tomate (Peralta y otros, en la preparación para la publicación en "Monografías de botánica sistemática" ("Systematic Botany Monographs"))	Equivalente de <i>Lycopersicon</i>
<i>Solanum juglandifolium</i> Dunal	<i>Lycopersicon juglandifolium</i> (Dunal) J.M.H. Shaw
<i>Solanum ochranthum</i> Dunal	<i>Lycopersicon ochranthum</i> (Dunal) J.M.H. Shaw
<i>Solanum sitiens</i> I.M. Johnst.	<i>Lycopersicon sitiens</i> (I.M. Johnst.) J.M.H. Shaw
<i>Solanum lycopersicooides</i> Dunal	<i>Lycopersicon lycopersicooides</i> (Dunal in DC.) A. Child ex J.M.H. Shaw
<i>Solanum pennellii</i> Correll	<i>Lycopersicon pennellii</i> (Correll) D'Arcy
<i>Solanum habrochaites</i> S. Knapp y D.M Spooner	<i>Lycopersicon hirsutum</i> Dunal
<i>Solanum "N peruvianum"</i> a describir por Peralta (4 razas geográficas: humifusum, lomas, Marathon, Chotano-Yamaluc)	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller (incluyendo las razas de variedad humifusum y Marathon)
<i>Solanum 'Callejon de Huaylas'</i> a describir por Peralta	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller (de Ancash, a lo largo Río Santa)
<i>Solanum neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>Lycopersicon parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle
<i>Solanum chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>Lycopersicon chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle
<i>Solanum corneliomuelleri</i> J.F. Macbr. (1 raza geográfica: Misti nr. Arequipa)	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller; también conocido como <i>Lycopersicon glandulosum</i> C.F. Mull.
<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller
<i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>Lycopersicon chilense</i> Dunal
<i>Solanum cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley (publicado como <i>cheesmanii</i> )
<i>Solanum galapagense</i> S. Darwin y Peralta	Parte de <i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley (conocido previamente como forma o variedad <i>minor</i> )
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller
<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (L.) Miller

10 Un "vector de expresión" se define como una molécula de ácido nucleico que contiene un gen, habitualmente un gen heterólogo, que se expresa en una célula huésped. Habitualmente, este gen comprende una secuencia que codifica la proteína. La expresión del gen siempre tiene lugar bajo el control de un promotor y se dice que dicho gen está "unido de manera operativa" al promotor. El término "heterólogo" se refiere a una molécula de ADN, o una población de moléculas de ADN, que no existe de forma natural dentro de una célula huésped determinada.

20 El término "polinucleótido", tal como se utiliza en el presente documento, es intercambiable con el término "ácido nucleico", y se refiere a un multímero de nucleótidos o forma polimérica de nucleótidos que tiene cualquier número de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos de manera sintética (por ejemplo, PNA, tal como se ha dado a conocer en la patente de Estados Unidos No. 5.948.902 y las referencias citadas en la misma) y pueden ser de doble cadena o de cadena simple. Un polinucleótido puede hibridarse con los polinucleótidos de origen natural de una manera específica de secuencia análoga a la de dos polinucleótidos de origen natural, por ejemplo, pueden participar en interacciones de apareamiento de bases Watson-Crick. El término incluye también formas modificadas, por ejemplo, mediante metilación y/o mediante bloqueo, y formas no modificadas del polinucleótido.

25 Los términos "ácido ribonucleico" y "ARN", tal como se utilizan en el presente documento, significan un polímero compuesto de ribonucleótidos.

30 Los términos "ácido desoxirribonucleico" y "ADN", tal como se utilizan en el presente documento, significan un polímero compuesto de desoxirribonucleótidos.

35 El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia corta de monómeros de nucleótidos (habitualmente de 6 a 100 nucleótidos) unidos por enlaces de fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, alquil fosfato y aril fosfato, fosforotioato), o enlaces que no son de fósforo (por ejemplo, péptido, sulfamato y otros). Un oligonucleótido puede contener

nucleótidos modificados que tienen bases modificadas (por ejemplo, 5-metil citosina) y grupos azúcar modificados (por ejemplo, 2'-O-metil ribosilo, 2'-O-metoxietil ribosilo, 2'-fluoro ribosilo, 2'-amino ribosilo y similares). Los oligonucleótidos pueden ser de origen natural o moléculas sintéticas de ADN de doble cadena y de cadena simple y ARN de doble cadena y de cadena simple con formas circulares, ramificadas o lineales y, de manera opcional, incluyendo dominios capaces de formar estructuras secundarias (por ejemplo, estructuras de tallo-bucle, pseudo nudos y bucle de tipo "kissing").

La expresión "homología de secuencia de nucleótidos", tal como se utiliza en el presente documento, indica la presencia de homología entre dos polinucleótidos. Los polinucleótidos tienen secuencias "homólogas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima. La comparación de secuencias entre dos o más polinucleótidos se realiza, en general, mediante la comparación de partes de las dos secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La ventana de comparación es, en general, de aproximadamente 20 a 200 nucleótidos contiguos. El "porcentaje de homología de secuencia" para polinucleótidos, tal como el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 por cien, de homología de secuencia se puede determinar mediante la comparación de dos secuencias alineadas, de manera óptima, sobre una ventana de comparación, en la que la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede incluir adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante: (a) la determinación del número de posiciones en las que se encuentra la misma base de ácido nucleico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes; (b) la división del número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación; y (c) la multiplicación del resultado por 100 para obtener el porcentaje de homología de secuencia. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede llevar a cabo mediante implementaciones computerizadas de algoritmos conocidos, o mediante inspección visual. Entre los algoritmos de comparación de secuencias y de alineación de secuencias múltiples fácilmente disponibles se encuentran, respectivamente, la "herramienta de búsqueda de alineación local básica" ("Basic Local Alignment Search Tool") (BLAST) (Altschul y otros, 1990; Altschul y otros, 1997) y los programas ClustalW, ambos disponibles en Internet. Entre otros programas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, GAP, BestFit, PlotSimilarity y FASTA en el paquete informático de genética de Wisconsin (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, Estados Unidos) (Devereux y otros, 1984).

Tal como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente complementaria" significa que dos secuencias de ácidos nucleicos tienen, como mínimo, aproximadamente el 65%, de manera preferente, aproximadamente el 70%, de manera más preferente, aproximadamente el 80%, de manera incluso más preferente, del 90% y, de la manera más preferente, aproximadamente del 98%, de complementariedad de secuencia entre sí. Esto significa que los cebadores y sondas deben mostrar una complementariedad suficiente con su plantilla y ácido nucleico diana, respectivamente, para hibridarse en condiciones rigurosas. Por lo tanto, las secuencias de cebador y sonda no necesitan reflejar la secuencia complementaria exacta de la región de unión en la plantilla y se pueden utilizar cebadores degenerados. Por ejemplo, se puede unir un fragmento de nucleótido no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementario a la cadena. De manera alternativa, se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, siempre que el cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de una de las cadenas a amplificar para hibridarse con la misma, y formar, de este modo, una estructura de dúplex que se puede extender mediante los medios de polimerización. Las secuencias de nucleótidos no complementarias de los cebadores pueden incluir sitios de enzimas de restricción. La adición de un sitio de enzima de restricción al extremo o extremos de la secuencia diana sería particularmente útil para la clonación de la secuencia diana. Una secuencia de cebador sustancialmente complementaria es aquella que tiene una complementariedad de secuencia suficiente con la plantilla de amplificación para dar lugar a la unión del cebador y la síntesis de la segunda cadena. El experto está familiarizado con los requisitos de los cebadores para que tengan una complementariedad de secuencia suficiente con la plantilla de amplificación.

El término "híbrido", en el contexto de ácidos nucleicos, se refiere a una molécula de ácido nucleico de doble cadena, o dúplex, formada mediante enlaces de hidrógeno entre bases de nucleótidos complementarias. El término "hibridar" se refiere al procedimiento por el cual las cadenas sencillas de secuencias de ácidos nucleicos forman segmentos de doble hélice a través de enlaces de hidrógeno entre bases complementarias.

El término "híbrido", en el contexto del cultivo de plantas, se refiere a una planta que es la planta vástago de plantas parentales genéticamente distintas producidas mediante el cruce de plantas de diferentes líneas o variedades o especies.

El término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótido de cadena simple que reconocerá y formará un dúplex con enlaces de hidrógeno con una secuencia complementaria en un analito de secuencia de ácidos nucleicos diana o su derivado de ADNc.

El término "cebador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con la diana de amplificación que permite la unión de una ADN polimerasa, sirviendo de este modo como un punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un

producto de extensión con cebador, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador (de amplificación) es, de manera preferente, de cadena simple para una máxima eficacia en la amplificación. De manera preferente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, entre los que se incluyen la temperatura y la composición (contenido de A/T y G/C) del cebador. Un par de cebadores bidireccionales consisten en un cebador directo y un cebador inverso, tal como se utilizan habitualmente en la técnica de la amplificación de ADN, tal como en la amplificación por PCR.

Se entenderá que "cebador", tal como se utiliza en el presente documento, puede referirse a más de un cebador, en particular en el caso en el que hay una cierta ambigüedad en la información son respecto a la secuencia o secuencias terminales de la región diana a amplificar. Por lo tanto, un "cebador" incluye una colección de oligonucleótidos cebadores que contienen secuencias que representan las posibles variaciones en la secuencia o incluye nucleótidos que permiten un apareamiento de bases habitual.

Los cebadores de oligonucleótidos se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado. Los procedimientos para preparar oligonucleótidos de secuencia específica son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Entre los procedimientos de síntesis química se pueden incluir, por ejemplo, el procedimiento de fosfodiéster o fosfotriéster, el procedimiento de dietilfosforamidato y el procedimiento de soporte sólido dados a conocer, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos. No. 4.458.066. Los cebadores se pueden marcar, si se desea, mediante la incorporación de medios detectables, por ejemplo, mediante medios espectroscópicos, fluorescencia, medios fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o químicos.

La extensión dependiente de la plantilla del cebador o cebadores de oligonucleótido es catalizada por un agente de polimerización en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, es decir, dNTP) o análogos, en un medio de reacción que está comprendido de las sales apropiadas, cationes metálicos y sistema de tamponamiento del pH. Los agentes de polimerización adecuados son enzimas conocidas por catalizar la síntesis de ADN dependiente de cebador y de plantilla. Entre las ADN polimerasas conocidas se incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de *E. coli* o su fragmento Klenow, T4 ADN polimerasa y Taq ADN polimerasa. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con estas ADN polimerasas son conocidas en la técnica.

Los productos de la síntesis son moléculas dúplex que consisten en las cadenas de plantilla y las cadenas de extensión del cebador, que incluyen la secuencia diana. Estos productos, a su vez, sirven como plantillas para otra ronda de replicación. En la segunda ronda de replicación, la cadena de extensión del cebador del primer ciclo se hibrida con su cebador complementario; la síntesis produce un producto "corto" que está unido en los extremos 5' y 3' por secuencias de cebadores o sus complementos. Los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación del cebador y extensión dan lugar a la acumulación exponencial de la región diana definida por los cebadores. Se desarrollan ciclos suficientes para lograr la cantidad deseada de polinucleótido que contiene la región diana de ácido nucleico. La cantidad deseada puede variar y se determina por la función que tendrá el polinucleótido producto.

El procedimiento PCR está bien descrito en manuales y es conocido por el experto en la materia.

Después de la amplificación mediante PCR, los polinucleótidos diana se pueden detectar mediante hibridación con un polinucleótido sonda que forma un híbrido estable con el de la secuencia diana en condiciones de hibridación y lavado de rigurosas a moderadamente rigurosas. Si se espera que las sondas sean esencialmente completamente complementarias (es decir, aproximadamente del 99% o más) con la secuencia diana, se utilizarán condiciones rigurosas. Si se espera algún desapareamiento, por ejemplo, si se esperan cepas variantes con el resultado de que la sonda no será completamente complementaria, puede disminuirse la rigurosidad de la hibridación. Sin embargo, se eligen las condiciones que descartan la unión no específica/accidental. Las condiciones que afectan a la hibridación y que se seleccionan contra la unión no específica son conocidas en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros, (2001). En general, una menor concentración de sal y una mayor temperatura aumentan la rigurosidad de la unión. Por ejemplo, en general, se considera que las condiciones rigurosas son incubaciones en soluciones que contienen aproximadamente 0,1 x SSS, SDS al 0,1%, a una temperatura de incubación/lavado de aproximadamente 65°C, y las condiciones moderadamente rigurosas son incubaciones en soluciones que contienen aproximadamente 1-2 x SSC, SDS al 0,1% y una temperatura de incubación/lavado de aproximadamente 50-65°C. Las condiciones de baja rigurosidad son 2 x SSC y aproximadamente 30°C-50°C.

Los términos "rigurosidad" o "condiciones de hibridación rigurosas" se refieren a las condiciones de hibridación que afectan la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, la temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica de cebador o sonda a su secuencia de ácidos nucleicos diana. Los términos utilizados incluyen la referencia a condiciones en las que una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana hasta un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, como mínimo, 2 veces sobre el valor base). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias.

Las secuencias más largas hibridan de manera específica a temperaturas más elevadas. En general, se seleccionan las condiciones rigurosas para sean aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmico ( $T_f$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La  $T_f$  es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda o cebador perfectamente apareados. Habitualmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion  $\text{Na}^+$ , habitualmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion  $\text{Na}^+$  (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es, como mínimo, de aproximadamente 30°C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y, como mínimo, de aproximadamente 60°C para sondas o cebadores largos (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Entre las condiciones rigurosas bajas o "condiciones de rigurosidad reducida" de ejemplo se incluyen hibridación con una solución tampón de formamida al 30%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 2 x SSC a 40°C. Entre las condiciones de rigurosidad elevada de ejemplo se incluyen formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1 x SSC a 60°C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, por Ausubel y otros, 1998 y Sambrook y otros, 2001.

El término "antígeno" se refiere a una sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un vertebrado, lo que da lugar a la producción de un anticuerpo como parte de la defensa contra dicha sustancia. Los antígenos pueden ser proteínas de virus que pueden provocar la producción de anticuerpos, por ejemplo, en los glóbulos rojos, las células de los nódulos linfáticos y el bazo de los vertebrados.

El término "anticuerpo" incluye la referencia a los péptidos de unión a antígeno y se refiere a anticuerpos, anticuerpos monoclonales, a una inmunoglobulina o anticuerpo completos o cualquier fragmento funcional de una molécula de inmunoglobulina. Entre los ejemplos de dichos péptidos se incluyen moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, regiones determinantes de la complementariedad (CDR), VL (región variable de cadena ligera), VH (región variable de cadena pesada), y cualquier combinación de éstas o cualquier otra parte funcional de un péptido de anticuerpo. El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se unen de manera específica y reconocen un analito (antígeno). Sin embargo, aunque varios fragmentos de anticuerpos se pueden definir en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la materia entenderá que dichos fragmentos se pueden sintetizar *de novo* químicamente o mediante la utilización de metodología de ADN recombinante. De este modo, el término anticuerpo, tal como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo, tales como Fv de cadena simple, anticuerpos quiméricos (es decir, que comprenden las regiones constantes y variables de diferentes especies), anticuerpos humanizados (es decir, que comprenden una región determinante de la complementariedad (CDR) de una fuente no humana) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

Los términos "sustancialmente puro" y "aislado", se utilizan indistintamente y describen una proteína, péptido o ácido nucleico que está sustancialmente separado de otros componentes (sub)celulares que los acompañan de forma natural. El término abarca un ácido nucleico o proteína que se ha extraído de su entorno natural e incluye aislados de ADN recombinante o clonado y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente mediante sistemas heterólogos. En general, el término se refiere a una proteína purificada y ácido nucleico que tienen una pureza, como mínimo, de aproximadamente el 75%, por ejemplo, el 85%, el 95% o el 98% en peso. Las variantes o modificaciones químicas menores comparten normalmente la misma secuencia de polipéptidos o nucleótidos. Un ácido nucleico o proteína sustancialmente puros comprenderán habitualmente aproximadamente del 85 al 100% (p/p) de una muestra de proteína o ácido nucleico, más habitualmente aproximadamente del 95% y, de manera preferente, tendrá más de aproximadamente el 99% de pureza. La pureza u homogeneidad de la proteína o el ácido nucleico se pueden indicar por un conjunto de medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de la visualización de una sola banda de polipéptido en un gel de poliacrilamida después de la tinción, o mediante electroforesis en gel de agarosa de una muestra de ácido nucleico, seguido de la visualización de una sola banda de polinucleótido en un gel de agarosa después de la tinción. El término "tinción" se puede referir a la utilización de colorantes específicos de péptido o de ácido nucleico, tales como los colorantes de plata y Coomassie, o los colorantes de bromuro de etidio y SYBR®, o se puede referir a la utilización de colorantes específicos de péptido o de ácido nucleico, tales como el contacto del péptido con un anticuerpo y la visualización del anticuerpo utilizando un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, conjugado a fosfatasa alcalina) en el caso de las proteínas o péptidos, o el contacto del ácido nucleico con una sonda complementaria marcada para la visualización de la presencia de la hibridación entre el ácido nucleico y la sonda. Para ciertos objetivos, se puede proporcionar una mayor resolución mediante la utilización de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o un medio similar para la purificación. Dichos procedimientos se encuentran en el área de conocimiento común general (véase, por ejemplo Katz, y otros, 1998).

#### Identificación y taxonomía

En el presente documento se da a conocer un virus aislado que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos según las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o, de manera preferente, del 65% a las

5 mismas. Tal como se ha indicado anteriormente, los polinucleótidos tienen secuencias "homólogas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima. Las búsquedas BLAST utilizando secuencias de nucleótidos obtenidas de aislados del virus ToTV no revelaron previamente homologías significativas con cualquiera de las secuencias virales o no virales conocidas en las bases de datos GenBank y EMBL. De este modo, el porcentaje más elevado de homología encontrado hasta ahora fue del 46,5% entre los motivos de helicasa en el ORF1 en la SEQ ID NO: 2 que corresponde a ARN1 de ToTV y los motivos de helicasa de otros virus de plantas. (Véanse los ejemplos a continuación).

10 ToMarV comparte las características de los viriones y su organización del genoma con ToTV-E01, pero basándose en los niveles de las identidades de secuencia de nucleótidos y aminoácidos, los dos virus están relacionados pero son distintos. Las búsquedas BLAST en las bases de datos GenBank y EMBL revelaron recientemente una homología significativa con otro virus recientemente aislado. Se observan niveles notablemente elevados de identidades entre ToMarV ARN1 y ARN2 y las secuencias parciales de ARN1 y ARN 2 de un virus del que se depositó la secuencia el 16 de octubre de 2006 en la base de datos NCBI bajo el nombre de virus de la necrosis apical del tomate (números de acceso de GenBank EF063641 y EF063642; en lo sucesivo ToANV). Este virus también parece obtenerse del área de Culiacán (Sinaloa, México). No hay datos adicionales disponibles sobre el virus del que proceden estas secuencias parciales. Sin embargo, los niveles relativamente bajos de las identidades de secuencia de nucleótidos (menos del 90%) en los 3'-NTR de ARN1 y ARN2 (88,5% y 85,6%, respectivamente), así como una identidad de aminoácidos inferior al 90% (89%) en la CP supuestamente más grande (Vp36) entre ToMarV y ToANV, sugiere que los dos virus no son idénticos y pueden ser cepas o aislados del mismo virus. Se necesitarán datos biológicos y moleculares adicionales sobre el virus del que derivaba la secuencia de ToANV para determinar su relación exacta con ToMarV.

25 Se realizaron análisis filogenéticos basados en la región de aminoácidos entre el motivo CG de proteasa [Bazan JF, Fletterick RJ (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7872-7876] y el sitio activo GDD de RdRp [Argos P (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 9909-9916] en el ARN1-ORF para determinar las relaciones entre los virus de la marchitez del tomate, ToTV y otros virus de los géneros *Sadwavirus*, *Cheravirus* y las familias *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Dicistroviridae* y *Picornaviridae*. Se propone que esta región es un buen predictor taxonómico para clasificar los virus de tipo picorna virus [Ikegami M, y otros (2002) *Taxonomía de especies reconocidas y posibles especies de la familia Comoviridae* ("Taxonomy of recognized and putative species in the family Comoviridae"). XII Encuentro de virología IUMS, París, Francia, 27 de julio - 12 agosto de 2002]. El dendrograma resultante (figura 13) muestra que el virus ToMarV se agrupa con ToTV y ToANV y confirma la posición taxonómica separada de estos virus del género *Cheravirus*. Un análisis filogenético similar basado en la región helicasa entre los motivos A y C [Gorbalenya AE, Koonin EV, Wolf YI (1990) *FEBS Lett* 262: 145-148] (aminoácidos 397-494) confirma las posiciones taxonómicas de ToMarV (figura 13). Para este motivo, estos virus parecen estar más estrechamente relacionados con los géneros *Waikavirus* y *Sequivirus*.

40 El virus de la marchitez del tomate (ToMarV) es un nuevo virus de planta del tipo picorna virus relacionado con el virus del torrado del tomate (ToTV), pero distinto del mismo. ToMarV y ToTV se separan claramente de otros virus de planta de tipo picorna virus, pero basándose en criterios virológicos estándar, pertenecen al mismo género. ToTV es la nueva especie tipo provisional de un nuevo género de virus de plantas: *torradovirus*.

45 Se debe entender que las homologías pueden ser grandes cuando dos secuencias se comparan sobre una pequeña ventana de comparación, ya que se pueden encontrar a menudo regiones locales de similitud de secuencia cuando se comparan dos secuencias largas de nucleótidos. Sin embargo, el experto en la materia es consciente de que la homología de secuencias requiere el establecimiento de motivos comunes entre las secuencias, entre las que la identidad de secuencia puede ser localmente tan elevada como del 35 al 100%, pero puede ser tan baja como del 10 al 20%, en otras partes de la secuencia genómica del mismo ORF.

50 Como indicación de la relación entre el aislado de virus ToTV recién identificado y otros virus (entre los que se incluyen los virus a comparar con el mismo), se puede realizar normalmente un análisis filogenético basándose en la información de la secuencia genómica (parte de la misma) de los virus.

55 Varios de estos análisis se presentan en los ejemplos a continuación. La información obtenida hasta el momento indica que ToTV muestra el nivel más elevado de homología con virus de los géneros *Sequivirus* y *Waikavirus* (*Sequiviridae*) y de los géneros *Cheravirus* y *Sadwavirus*. Los virus de estos géneros se distinguen basándose en el número de ARN virales, *Sequiviridae* tiene 1 ARN, mientras que los *Cheravirus* y *Sadwavirus* tienen dos ARN, y el número de proteínas de la cápside, los *Sadwavirus* tienen dos CP y los *Cheravirus* tienen tres CP. Estos criterios sugieren que el virus del torrado del tomate es más probable que esté en el grupo del género *Cheravirus*. Sin embargo, los análisis filogenéticos utilizando varios motivos diferentes de las posibles proteínas RdRp y helicasa, colocan ToTV claramente separado de los géneros *Cheravirus* y *Sadwavirus* y, de hecho, sugieren que está más estrechamente relacionada con los *Sequiviridae*. Desafortunadamente, las secuencias completas de solo un *Cheravirus* (CRLV) y dos *Sadwavirus* (SDV y SMOV) están disponibles actualmente. Los datos preliminares sobre la transmisión del vector sugieren que ToTV podría ser transmitido por la mosca blanca, mientras que los vectores naturales de CRLV y *Sadwavirus* son desconocidos. Basándose en la información actualmente disponible, entre la que se incluye la información de la secuencia, así como información taxonómica adicional, tal como se presenta en

la tabla 1 a continuación, el virus recién descubierto es muy probablemente un género nuevo.

Tabla 1: Descriptores taxonómicos para el virus ToTV recién descubierto (enumerados mediante los procedimientos internacionalmente aceptados del manual "Virología de plantas de Matthew" ("Matthew's Plant Virology") ("Virología de plantas de Matthew" ("Matthew's Plant Virology"), cuarta edición, Roger Hull (ed.) Academic Press, San Diego, pág. 15, tabla 2.1 en el mismo). La numeración de la tabla en el documento de Matthews se adhiere a la tabla 1 a continuación.

5

<b>I. Propiedades de viriones</b>
<i>A. Propiedades morfológicas de los viriones</i>
1. 28 nm de tamaño
2. Esféricos (icosaédricos) de tamaño
3. Envoltura ausente
<i>B. Propiedades físicas de los viriones</i> (no investigado)
<i>C. Propiedades del genoma</i>
1. Ácido nucleico de tipo ARN
2. ARN de cadena simple
3. ARN lineal
4. Codificación de sentido positivo
5. Como mínimo, 2 segmentos (ARN 2; SEQ ID NO: 1 y ARN 1; SEQ ID NO: 2)
6. 5,5 kb (más exactamente 5,2 kb o 5.389 nucleótidos, excluyendo la cola poli(A)) y 8 kb (más exactamente 7,7 kb o 7.793 nucleótidos, excluyendo la cola poli(A))
7. Bloqueo en el extremo 5' terminal desconocido
8. Polipéptido unido covalentemente al extremo 5' terminal desconocido
9. Tramo poli(A) presente en ambos segmentos
10. Comparaciones en las secuencias de nucleótidos:
- ARN 1 contiene un ORF1 con motivos típicos de helicasa (Hel), proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El nivel de homología con los motivos de helicasa y RdRp de otros virus se describe en detalle en los ejemplos.
- ARN 2 contiene dos ORF2, de los que uno tiene en su extremo N-terminal un motivo típico de una posible proteína de movimiento (MP) y que contiene en el extremo C-terminal las secuencias de las tres proteínas de la cápside (cubierta). El nivel de homología con las proteínas de la cápside de otros virus se describe en detalle en los ejemplos.
<i>D. Propiedades de las proteínas</i>
1. 3 x CP; Hel; RdRp; proteasa; posible MP
2. CP: 35, 26 y 23 kDa
3. (Para actividades funcionales, véase anteriormente y los ejemplos a continuación)
4. (Para la comparación de secuencias de aminoácidos, véanse los ejemplos a continuación)
<b>II. Organización genómica y replicación</b>
1. Organización genómica. Véase la figura 7
2. Citopatología: Como mínimo, la epidermis de las células mesófilas o las células acompañantes del floema
<b>III. Propiedades antigénicas</b>
1. No se conocen relaciones serológicas

<b>IV. Propiedades biológicas</b>	
1a. Gama de huéspedes naturales: tomate;	
1b. Gama de huéspedes experimentales:	
<b>Plantas huéspedes alternativas probadas</b>	<b>Síntomas locales/síntomas sistémicos</b>
Chenopodium quinoa	- / -
Gomphrena globosa	- / -
Nicotiana benthamiana	- / c
Nicotiana clevelandii	- / c
Nicotiana glutinosa	- / c
Nicotiana hesperis 67A	nl / c, n, mf
Nicotiana occidentalis P1	nl / c, n, mf
Nicotiana rustica	- / - (il)
Nicotiana tabacum "White Burley"	- / - (il)
Physalis floridana	nl / c, n, mf, d
<i>c = clorosis; n =necrosis; l =lesiones; mf =malformaciones; d =desaparición; il = infección latente; - = sin síntomas</i>	
2. Patogenicidad	
<u>Síntomas en la planta huésped natural:</u> lesiones necróticas que finalizan en lesiones de tipo quemadura, necrosis completa del material de la planta y muerte de la planta; anillos concéntricos de manchas necróticas en los frutos.	
<u>Asociación con la enfermedad:</u> Torrado, presumiblemente también la enfermedad de las manchas de chocolate"; presumiblemente también la enfermedad de la marchitez	
3. Trofismo del tejido: como mínimo, la epidermis de las células mesófilas o las células acompañantes del floema	
4. El modo de transmisión en la naturaleza es desconocido	
5. Relaciones de vectores: presumiblemente la mosca blanca	
6. Distribución geográfica: Mediterráneo; América (América Central, México, parte sur de Norteamérica)	

Los inventores de la presente invención han descubierto recientemente que las secuencias genómicas del virus asociado de una enfermedad del tomate conocida en América Central (por ejemplo, México y Guatemala) por el nombre de "enfermedad de la mancha de chocolate", "chocolate" o "marchitez" eran idénticas a las del ToTV dadas a conocer en el presente documento (véase el ejemplo 2).

A medida que están disponibles más secuencias virales, tanto de virus no ToTV que pueden estar o no directamente relacionados con el mismo, como de virus estrechamente relacionados con el virus ToTV, o que se parecen esencialmente al mismo, el análisis filogenético puede ser una herramienta valiosa para determinar la amplitud del taxón o clado de ToTV basándose en las relaciones filogenéticas entre los aislados.

La relación filogenética puede determinarse, por ejemplo, basándose en cualquiera o todas las secuencias de nucleótidos de ARN 1 y/o ARN 2 del genoma viral o en los datos de la secuencia de la proteína (gen) de la cápside. Los análisis filogenéticos son bien conocidos para el experto en la materia y pueden comprender, por ejemplo, el análisis mediante la reconstrucción en árbol basada en la distancia (por ejemplo, unión de vecinos), procedimientos de análisis de probabilidad máxima o parsimonia mediante la utilización de programas, tales como ClustalX (Thompson y otros, 1997), PAUP (Swofford, 2000) o PHYLIP (Felsenstein, 1989).

A efectos de realizar un análisis de la relación filogenética entre un nuevo aislado, la secuencia de ToTV, tal como se da a conocer en el presente documento, y las secuencias de referencia de cepas virales, por ejemplo, de las bases de datos GenBank, EMBL o DDBJ, se puede extraer ARN genómico de dicho nuevo aislado directamente de las plantas infectadas y se pueden amplificar las secuencias genómicas a partir del mismo. La transcripción inversa con procedimientos de amplificación por PCR (RT-PCR) se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando cebadores de oligonucleótidos degenerados, siendo dichos cebadores capaces, por ejemplo, de actuar como cebador de amplificación para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos de los genomas de aislados de ToTV divergentes, así como de los genomas de especies virales estrechamente relacionadas. De manera preferente, aunque no necesariamente, los productos de amplificación genómica de longitud completa se pueden obtener, por tanto, de cepas de referencia (por ejemplo, aislados divergentes), cepas de prueba (aislados sospechosos de contener ToTV) y especies estrechamente relacionadas. De manera preferente, se amplifican las regiones genéticas específicas de interés para la comparación. Los productos de amplificación (ADN) se pueden secuenciar, a continuación, por ejemplo, mediante la secuenciación directa de nucleótidos de doble cadena utilizando terminadores de didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Smith y otros, 1986) con los cebadores de oligonucleótidos degenerados utilizados para la RT-PCR. La edición de las secuencias de nucleótidos, el análisis, la predicción opcional de secuencias de aminoácidos y las alineaciones se pueden llevar a cabo con los paquetes informáticos disponibles, tales como con el paquete informático de análisis de secuencias LaserGene versión 5 (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) y GeneWorks de IntelliGenetics versión 2.5. 1 (IntelliGenetics, Mountain View,

California). Los análisis filogenéticos se pueden completar, a continuación, con el análisis filogenético utilizando, por ejemplo, el software de parsimonia (PAUP) con un algoritmo de unión de vecinos que utiliza distancias absolutas después de una búsqueda heurística y 1.000 repeticiones de arranque ("bootstrap"), y se puede generar un árbol filogenético mediante el análisis de parsimonia de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos contiguas alineadas, en el que en dichos árboles los números representan, en general, niveles de confianza de arranque. Después de 1.000 repeticiones, un nivel de confianza superior al 60%, de manera preferente, superior al 70%, de manera más preferente, superior al 80%, 90%, 95% o 98%, dentro de un árbol filogenético, se considera prueba suficiente de la una inferencia filogenética correcta (colocación de aislados en un clado determinado), siempre que el árbol esté suficientemente ramificado, por lo que, de manera opcional, se puede mejorar la ramificación mediante el enraizamiento a una especie de un grupo externo adecuado. De esta manera, se puede determinar qué aislados están más estrechamente relacionados con las secuencias de ToTV, tal como se dan a conocer en el presente documento. La relación se expresa, en general, en términos de porcentaje de similitud de secuencia, en el presente documento denominado homología de secuencia.

Aunque los análisis filogenéticos proporcionan un procedimiento conveniente de identificación de un virus en caso de suficiente homología de ácido nucleico, con virus conocidos también se proporcionan en el presente documento otros procedimientos posiblemente más sencillos, aunque algo más toscos, para la identificación de dicho virus o proteínas virales o ácidos nucleicos de dicho virus. Como regla general, un virus ToTV se puede identificar mediante los porcentajes de homología de las proteínas virales o ácidos nucleicos a identificar en comparación con las proteínas virales o ácidos nucleicos identificados en presente documento mediante la secuencia. En general, es conocido que las especies de virus, en especial las especies de virus de ARN, a menudo constituyen una cuasi especie, en la que un grupo de dichos virus muestra heterogeneidad entre sus miembros. De este modo, se espera que cada aislado pueda tener un porcentaje de homología algo diferente con las secuencias del aislado, tal como se dan a conocer en el presente documento. Por lo tanto, otros aislados virales que muestran una homología de secuencia suficiente con ToTV (por ejemplo, más del 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de homología de secuencia) se considera que pertenecen al mismo virus. Por lo tanto, el virus ToTV, tal como se ha descrito, es un virus que tiene, como mínimo, el 70%, de manera más preferente, como mínimo, el 80%, de manera aún más preferente, como mínimo, el 90%, de manera aún más preferente, como mínimo, el 95%, de manera aún más preferente, como mínimo, el 98% y, de la manera más preferente, como mínimo, el 99% de homología con las secuencias de proteína o ácidos nucleicos dadas a conocer en el presente documento y causa los síntomas de la enfermedad inducidos por ToTV en las solanáceas, más en particular, en *Solanum* y *Nicotiana*, cuyos síntomas de la enfermedad pueden ser similares o no a los descritos en el presente documento. En las cucurbitáceas el virus parece no causar síntomas visibles, aunque el virus es capaz de propagarse en las plantas.

Cuando se desea comparar un aislado de virus separado con las secuencias de proteína o ácidos nucleicos dadas a conocer en el presente documento, un virus aislado (ToTV) es identificable como filogenéticamente correspondiente a ToTV mediante la determinación de la secuencia de proteína o ácidos nucleicos de dicho aislado de virus separado y la determinación de que dicha secuencia de proteína o ácidos nucleicos tiene un porcentaje de homología de secuencia, como mínimo, del 70%, de manera más preferente, como mínimo, del 80%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 90%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 95%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 98% y, de la manera más preferente, como mínimo, del 99% con las secuencias que se enumeran en el presente documento.

Los aislados virales que tienen proteínas o ácidos nucleicos individuales con una homología mayor que estos valores mínimos mencionados se consideran como filogenéticamente correspondientes y, de este modo, son taxonómicamente correspondientes al virus ToTV, y, en general, las proteínas se codificarán por una secuencia de ácidos nucleicos estructuralmente correspondiente con una secuencia enumerada en el presente documento. En el presente documento se da a conocer un virus filogenéticamente correspondiente al virus aislado del que se enumeran las secuencias en el presente documento.

Debe señalarse que, de forma similar a otros virus, se puede esperar que haya un cierto grado de variación entre los virus ToTV aislados de diferentes fuentes.

Además, la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos del virus ToTV o fragmentos de la misma, tal como se da a conocer en el presente documento, muestra, por ejemplo, menos del 70% y, de la manera más preferente, menos del 60% de homología de secuencia de nucleótidos, o menos del 70% y, de la manera más preferente, menos del 60% de homología de secuencia de aminoácidos con las respectivas secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de cualquier virus no ToTV o especie más cercana.

La divergencia en las secuencias de cepas de ToTV en todo el mundo puede ser algo mayor, en analogía con otros virus de plantas.

En el presente documento se da a conocer un virus aislado (ToTV) identificable como filogenéticamente correspondiente al mismo mediante la determinación de una secuencia de ácidos nucleicos de un fragmento adecuado del genoma de dicho virus y su ensayo en análisis filogenéticos, en los que los árboles de máxima probabilidad se generan utilizando, por ejemplo, 1000 arranques, tal como se ha descrito anteriormente, y se halla

filogenéticamente más estrechamente relacionado con un aislado de virus que comprende las secuencias de SEQ ID No: 1 o SEQ ID No: 2, tal como se han enumerado en el presente documento, para ToTV que la relación con un aislado de virus de una cepa de referencia no ToTV o especie más cercana.

5 Los fragmentos del genoma de ácidos nucleicos adecuados útiles cada uno para dichos análisis filogenéticos son, por ejemplo, cualquier parte de las secuencias de ácidos nucleicos de los fragmentos de ARN de 5,5 kb o 8 kb (denominados en el presente documento, ARN2 y ARN1, respectivamente), tal como se ha descrito en el ejemplo.

10 Con la disposición de la información de la secuencia de este virus ToTV, se dan a conocer en el presente documento medios y métodos de diagnóstico para utilizar en la detección del virus ToTV en una muestra. De manera preferente, la detección del virus ToTV se lleva a cabo con reactivos que son más específicos para el virus ToTV. Esto, sin embargo, no excluye, de ninguna manera, la posibilidad de que se utilicen en cambio reactivos menos específicos, pero con suficiente reactividad cruzada, por ejemplo, porque son más fáciles de conseguir y resuelven de manera suficiente la tarea en cuestión.

15 También se da a conocer un procedimiento para detectar la presencia de ToTV en plantas, de manera preferente, en plantas de tomate, de manera más preferente, en plantas de *S. lycopersicum*. Dicho procedimiento puede comprender, por ejemplo, determinar en dicha muestra la presencia de un virus ToTV o componente del mismo mediante la reacción de dicha muestra con un ácido nucleico o anticuerpo específico de ToTV. No obstante, la infección por contacto de una planta indicadora también es un procedimiento adecuado para detectar la presencia de virus en una planta de prueba.

20 También se describe en el presente documento la secuencia parcial de nucleótidos de un nuevo virus aislado (en el presente documento también llamado virus ToTV) y componentes específicos del virus ToTV o análogos sintéticos de los mismos. Las secuencias genómicas adicionales del virus ToTV a aquellas dadas a conocer en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos de secuenciación conocidos para el experto en la materia. La determinación de la secuencia genómica se encuentra al alcance del experto en la materia ahora que el virus ToTV, así como las secuencias genómicas parciales del mismo, se dan a conocer en el presente documento. Estos procedimientos comprenden, por ejemplo, los descritos en el ejemplo siguiente. En general, ente dichos procedimientos de secuenciación se incluyen el aislamiento de los ácidos nucleicos del genoma viral mediante procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos y la determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico aislado, por ejemplo, mediante procedimientos de terminación de cadena con didesoxi (Sanger y otros, 1977), de manera opcional, precedidos por la transcripción inversa del ARN en ADN.

25 Entre otros, se da a conocer un ácido nucleico aislado o recombinante o un fragmento funcional del mismo específico del virus que puede obtenerse de un virus, tal como se ha dado a conocer. Los ácidos nucleicos aislados o recombinantes comprenden las secuencias, tal como se han enumerado en el presente documento. Se pueden desarrollar sondas y cebadores adicionales capaces de hibridarse a una secuencia de ácidos nucleicos del virus ToTV mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia.

40 Vectores de expresión y expresión de genes de codificación virales

Además, se da a conocer un vector de expresión que comprende un ácido nucleico. Para empezar, los vectores de expresión, tales como vectores plasmídicos que contienen una secuencia de doble cadena (o partes de la misma) del genoma viral de ToTV, vectores virales que contienen el genoma (o partes del mismo) de ToTV (por ejemplo, aunque sin limitarse a los mismos, virus vaccinia, retrovirus, baculovirus), o virus ToTV que contiene el genoma (o partes del mismo) de otros virus u otros agentes patógenos, tal como se dan a conocer en el presente documento.

50 El vector de expresión puede comprender una secuencia genómica de ToTV o parte de la misma que está bajo el control de, o unido de forma operativa, a un elemento regulador, tal como un promotor. El segmento de ADN referido como el promotor es responsable de la regulación de la transcripción de ADN en ARNm. El vector de expresión puede comprender uno o más promotores adecuados para la expresión del gen, de manera preferente, para la expresión del gen que codifica la proteína viral, en células vegetales, células fúngicas, células bacterianas, células de levadura, células de insectos u otras células eucariotas. Los vectores de expresión, tal como se han dado a conocer, son muy útiles para proporcionar antígenos del virus en sistemas de expresión de genes.

55 Además, se hace referencia a una célula huésped que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión. Los vectores plasmídicos o virales que contienen los ácidos nucleicos que codifican los componentes proteicos del virus ToTV pueden generarse en células procariotas para la expresión de los componentes en tipos de células pertinentes (células vegetales, células fúngicas, bacterias, células de insectos, células vegetales u otras células eucariotas). Los vectores plasmídicos o virales que contienen copias de longitud completa o copias parciales del genoma del virus ToTV pueden generarse en células procariotas para la expresión de ácidos nucleicos virales *in vitro* o *in vivo*.

60 Procedimientos para el aislamiento y purificación de ToTV

65 El virus ToTV puede aislarse de plantas infectadas o de otras fuentes mediante cualquier procedimiento disponible.

El aislamiento puede comprender purificar o purificar parcialmente partículas virales de ToTV de una fuente adecuada. Están disponibles una amplia gama de procedimientos para el aislamiento y la purificación del virus (por ejemplo, véase Dijkstra y De Jager, 1998). La purificación de ToTV puede realizarse, por ejemplo, mediante la utilización de procedimientos estándar, por ejemplo, para nepovirus o luteovirus (con la ayuda de disolventes orgánicos) (véase, por ejemplo, Walker, 2004). Aunque dichos protocolos pueden dar lugar a la pérdida de la capacidad de infección del virus, estos procedimientos todavía pueden ser útiles para obtener material de virus para otros fines.

De manera preferente, a efectos de mantener la integridad viral, se utiliza un procedimiento de purificación suave para purificar ToTV. Dicho procedimiento de purificación suave puede comprender, por ejemplo, la homogeneización de material infectado de una planta (por ejemplo, hojas) en un tampón de homogeneización (que comprende, por ejemplo, tampón Tris-HCl 0,1 M a un pH de aproximadamente 8, aproximadamente 20 mM de sulfato de sodio [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>], aproximadamente 10 mM de dietilditiocarbamato de sodio [Na-DIECA] y aproximadamente 5 mM de etilendiaminotetraacetato de sodio (Na-EDTA)), la separación de restos celulares mediante centrifugación (por ejemplo, durante 30 minutos a 49.000 g), la colocación del sobrenadante sobre un cojín de sacarosa adecuado (por ejemplo, 20%) y la granulación de las partículas virales (por ejemplo, mediante centrifugación durante 1,5 horas a 70.000 g). A partir de entonces, el gránulo que comprende las partículas virales puede resuspenderse en un tampón adecuado (por ejemplo, en TRIS-HCl, pH 8), y la fracción que contiene el virus puede separarse del resto de la suspensión mediante la utilización de centrifugación de densidad en un gradiente de sacarosa (por ejemplo, sacarosa del 10 al 40% en tampón de homogeneización centrifugada durante 2 horas a 110.000 g). La fracción que contiene el virus se puede determinar mediante la utilización de experimentos de infección. Se puede realizar una purificación adicional mediante la utilización de centrifugación de densidad en un gradiente de sulfato de cesio (por ejemplo, gradiente de sulfato de cesio del 10 al 40% en TRIS-HCl, pH 8, centrifugado durante 16 h a 125.000 g). A continuación, se pueden recoger del gradiente las bandas virales enriquecidas y concentrarse adicionalmente mediante centrifugación o diálisis (por ejemplo, contra Tris-HCl 0,1 M, pH 8).

La capacidad de infección de ToTV después de la purificación se puede comprobar mediante la inoculación sobre una planta sensible (por ejemplo, *N. hesperis* "67A").

### 30 Procedimientos para la purificación de proteínas asociadas a ToTV y secuenciación de aminoácidos

Después de haber preparado el virus ToTV purificado o parcialmente purificado, es posible obtener una preparación sustancialmente pura de una proteína asociada al virus (por ejemplo, proteínas codificadas por el virus). Aunque en la técnica se conocen numerosos procedimientos y estrategias para la purificación de proteínas, lo más conveniente será purificar las proteínas virales de ToTV, tales como proteínas de la cubierta viral, mediante electroforesis utilizando, por ejemplo, un gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) o mediante cromatografía de afinidad. Cada uno de estos procedimientos se describirá a continuación.

Las proteínas de interés de ToTV se pueden separar mediante electroforesis utilizando, por ejemplo, tricina-SDS-PAGE (Schagger y Von Jagow, 1987) o glicina-SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Naturalmente, se pueden utilizar otros sistemas de electroforesis que son capaces de separar las diversas proteínas comprendidas en el aislado del virus, o transcritas a partir de su genoma y expresadas en un sistema de expresión adecuado, tales como electroforesis en gel no desnaturalizante. El área del gel PAGE que incluye la proteína diana se puede escindir y se puede eluir los polipéptidos diana del mismo, por ejemplo, mediante la utilización de un dispositivo Elutrap® (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Una proteína diana se puede identificar por su movilidad en relación a un polipéptido de referencia en el gel. Para aumentar la pureza, la proteína eluida se puede desarrollar en un segundo gel de SDS-PAGE y se eluye una segunda vez. La proteína o péptido contenidos en el fragmento de gel escindido se pueden a continuación eluir de nuevo y son adecuados para utilizar en la inmunización o en la secuenciación de proteínas.

Las proteínas de interés de ToTV también se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une específicamente a una proteína de ToTV. El anticuerpo puede acoplarse covalentemente a soportes sólidos, tales como celulosas, poliestireno, poliácridamida, dextrano reticulado, agarosa en esferas o vidrio de poro controlado, utilizando agentes de acoplamiento bifuncionales que reaccionan con grupos funcionales sobre el soporte y grupos funcionales (es decir, cadenas laterales de aminoácidos reactivas) en la molécula de anticuerpo. Dichos procedimientos están fácilmente disponibles para el experto en la materia. La fase sólida resultante que contiene el anticuerpo se pone en contacto con el virus purificado o parcialmente purificado en condiciones reductoras utilizando un pH, fuerza iónica, temperatura y tiempos de residencia que permiten que la proteína de interés se una al anticuerpo inmovilizado. El virus o proteína se eluye de la columna haciendo pasar un eluyente que disocia los enlaces de hidrógeno a través del lecho. Los eluyentes utilizados habitualmente son tampones a un pH específico o soluciones de NaCl a una concentración superior a aproximadamente 2 M.

Los procedimientos para llevar a cabo la cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos, así como otros procedimientos para la purificación por inmunofinidad de proteínas (tales como las proteínas de la cápside viral) son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

Con las divulgaciones dadas a conocer en el presente documento, el experto en la materia es capaz de aislar una proteína específica del virus ToTV, determinar la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de la parte N-terminal de dicha proteína, diseñar un conjunto de sondas degeneradas (por la degeneración del código genético) para hibridarse con el ADN que codifica una región de dicha proteína, utilizar estas sondas en una serie de genes en una biblioteca genómica producida a partir del virus, obtener hibridaciones positivas y localizar los genes correspondientes. El experto en la materia es entonces capaz de identificar la región estructural del gen y, de manera opcional, las secuencias en dirección 5' y en dirección 3' de la misma. A continuación, el experto en la materia es capaz de establecer la secuencia correcta de los residuos de aminoácidos que forman la proteína.

#### Producción de anticuerpos

Se pueden generar anticuerpos, monoclonales o policlonales, para un fragmento de proteína o péptido purificado o parcialmente purificado del virus ToTV en una variedad de formas conocidas por los expertos en la materia, entre las que se incluyen la inyección de la proteína como un antígeno en animales, mediante fusión de hibridomas y mediante procedimientos recombinantes que implican sistemas de bacterias o fagos (véase Marks y otros, 1992a; Marks y otros, 1992b; Lowman y otros, 1991; Lerner y otros, 1992, cada una de cuyas referencias da a conocer procedimientos adecuados).

Los anticuerpos contra partículas virales, proteínas o péptidos del virus se pueden producir mediante la inmunización de un vertebrado adecuado, de manera preferente, un huésped mamífero, por ejemplo, conejos, cabras, ratas, pollos y ratones, con las partículas, proteínas o péptidos solos o en combinación con un adyuvante. Habitualmente, estarán implicadas dos o más inmunizaciones y se recogerá la sangre o el bazo pocos días después de la última inyección. Para el antisuero policlonal, las inmunoglobulinas se pueden precipitar, aislar y purificar (por afinidad). Para los anticuerpos monoclonales, normalmente se fusionarán esplenocitos con un linfocito inmortalizado, por ejemplo, una línea mielóide, en condiciones selectivas para hibridomas. Los hibridomas se pueden clonar, a continuación, en condiciones de dilución limitantes y se criban sus sobrenadantes para los anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Las técnicas para producir anticuerpos (monoclonales) y los procedimientos para su preparación y su utilización en diversos procedimientos son bien conocidos en la bibliografía (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos No. 4.381.292, 4.451.570, y 4.618.577; Harlow y Lane, 1988; Ausubel y otros, 1998; Rose y otros, 1997; Coligan y otros, 1997). Habitualmente, un anticuerpo dirigido contra una proteína asociada al virus tendrá una afinidad de unión, como mínimo, de  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>.

Como antígeno, es preferente una proteína recombinante derivada del virus ToTV, tal como se puede obtener mediante la expresión de una secuencia genómica que codifica la proteína del virus en un sistema de expresión adecuado. Sin embargo, también se pueden utilizar proteínas purificadas. Entre los antígenos adecuados para la detección de anticuerpos se incluyen cualquier proteína de ToTV que se combina con cualquier anticuerpo específico de ToTV de un mamífero expuesto a o infectado con el virus ToTV. Entre los antígenos preferentes se incluyen los que provocan la respuesta inmunitaria en mamíferos expuestos a ToTV, que, por lo tanto, son reconocidos habitualmente más fácilmente por los anticuerpos de un mamífero. Entre los antígenos particularmente preferentes se incluyen las proteínas de la cápside de ToTV. Las proteínas estructurales de los virus purificados son las más preferentes.

Los procedimientos para clonar secuencias genómicas, para manipular las secuencias genómicas en vectores de expresión y a partir de los mismos y para expresar la proteína codificada por la secuencia genómica en un huésped heterólogo son bien conocidos, y estas técnicas se pueden utilizar para proporcionar los vectores de expresión, células huésped y las secuencias genómicas clonadas que codifican antígenos, cuyas secuencias se expresan en un huésped para producir anticuerpos para utilizar en pruebas de diagnóstico (véase, por ejemplo, Sambrook y otros, 2001 y Ausubel, y otros, 1998).

Puede utilizarse una variedad de sistemas de expresión para producir antígenos de ToTV. Por ejemplo, se han descrito una variedad de vectores de expresión adecuados para producir proteínas en *E. coli*, *B. subtilis*, levadura, células de insecto, células vegetales y células de mamífero, cualquiera de los cuales podría utilizarse para producir un antígeno de ToTV adecuado para producir un anticuerpo contra ToTV o un fragmento del mismo. Naturalmente, el propio ToTV también puede utilizarse como vector de expresión para este propósito.

Una utilización de los anticuerpos es cribar bibliotecas de expresión de ADNc para la identificación de clones que contienen insertos de ADNc que codifican proteínas de interés o proteínas estructuralmente relacionadas con inmunoreactividad cruzada. Dicho cribado de bibliotecas de expresión de ADNc es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Young y Davis, 1983), a la que se hace referencia en este contexto, así como otras fuentes publicadas. Otra utilización de estos anticuerpos es para utilizar en cromatografía de afinidad para la purificación de proteínas de ToTV. Estos anticuerpos también son útiles para analizar la infección por ToTV.

También se da a conocer una proteína viral específica de ToTV o un fragmento de la misma, de aquí en adelante denominada molécula proteica. Las moléculas proteicas útiles derivan, por ejemplo, de cualquiera de las secuencias genómicas o fragmentos de las mismas derivable de un virus, tal como se ha descrito. Dichas moléculas proteicas, o

fragmentos antigénicos de las mismas, tal como se dan a conocer en el presente documento, son, por ejemplo, útiles en procedimientos de diagnóstico o kits y en composiciones de diagnóstico. Son particularmente útiles las moléculas proteicas que son codificadas por fragmentos de ácido nucleico recombinantes que se identifican para producir anticuerpos específicos del virus ToTV, ya sea *in vivo* (por ejemplo, para proporcionar anticuerpos de diagnóstico) o *in vitro* (por ejemplo, mediante la tecnología de expresión en fagos u otra técnica útil para la generación de anticuerpos sintéticos o partes de los mismos).

También se dan a conocer en el presente documento, anticuerpos, ya sean anticuerpos policlonales o monoclonales naturales, o sintéticos (por ejemplo, moléculas de unión derivadas de bibliotecas (de fagos)) que reaccionan de manera específica con un antígeno que comprende una molécula proteica o un fragmento funcional de la misma específico del virus ToTV, tal como una proteína de la cápside.

#### Procedimientos para identificar un aislado viral como un virus ToTV

Además de la detección del virus ToTV, que implica procedimientos de diagnóstico, se dan a conocer procedimientos para la identificación, es decir, la confirmación de que el aislado es ToTV. Dichos procedimientos se pueden basar en la inferencia filogenética, tal como se ha descrito anteriormente, y la determinación del nivel de homología de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos entre un aislado viral no identificado y una o más cepas de referencia del virus ToTV y de virus no ToTV confirmadas. Dichos procedimientos pueden comprender, por ejemplo, secuenciar el genoma (o parte del mismo) de un aislado viral o de una proteína de la cápside y comparar el nivel de homología de la secuencia con las secuencias, tal como se dan a conocer en el presente documento, para ToTV. Un aislado que tiene más del 50% de homología de secuencia con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, tal como se dan a conocer en el presente documento, se considera taxonómicamente correspondiente a ToTV o que pertenece al taxón viral ToTV.

A efectos de identificar un virus como el virus del torrado del tomate (ToTV), también se pueden utilizar descriptores taxonómicos, tal como se presentan en la tabla 1 anterior, y encontrar mediante comparación que un nuevo aislado pertenece al género presuntamente nuevo, del que la cepa de ToTV identificada por las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1 y 2 dadas a conocer en el presente documento, y depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, con el número de referencia del depositante ToTV-E01 (DSM 16999) se puede asignar como la especie tipo. De este modo, no es esencial realizar una comparación de secuencias a efectos de evaluar que un virus es ToTV. Más bien, un procedimiento de identificación de un virus como el virus del torrado del tomate (ToTV) puede comprender las etapas de evaluar la presencia de la combinación de descriptores taxonómicos seleccionados del grupo que comprende

- a) descriptores morfológicos, tales como partículas de viriones esféricos, sin envoltura, de aproximadamente 28 nm de diámetro;
- b) descriptores de propiedades del genoma, tales como el tener propiedades de virus de ARN de sentido positivo lineal de una cadena basadas en dos segmentos de ARN que comprenden colas poli(A), que codifican poliproteínas de 5,5 y 8 kDa, respectivamente, y que comprenden regiones codificantes o motivos para 3 proteínas de la cápside, helicasa, proteasa, RdRp y posible proteína de movimiento y cuyos segmentos de ARN y/o poliproteínas y/o motivos presentan homologías basándose en la comparación de secuencias, esencialmente tal como se ha descrito en el presente documento, y
- c) descriptores de propiedades biológicas, tales como la producción de lesiones necróticas y síntomas de tipo quemadura en el tomate, el tener una gama de huéspedes, una relación y/o distribución geográfica de los vectores, esencialmente tal como se ha descrito en el presente documento, y la asociación con las enfermedades de las plantas de tomate conocidas localmente bajo nombres, tales como torrado, marchitez y/o mancha de chocolate.

La combinación de descriptores taxonómicos que dan lugar a una identificación positiva de un aislado de virus como el virus del torrado de tomate (ToTV) es la combinación que muestra el aislado más estrechamente relacionado (basándose en procedimientos numéricamente taxonómicos bien conocidos por el experto en la materia) con ToTV, tal como se ha descrito en el presente documento, que con otros virus, y en la que dicho aislado produce, de manera preferente, los síntomas de la enfermedad en el tomate típicos del torrado, tal como se describen en el presente documento.

De este modo, un virus que, basándose en el análisis taxonómico numérico de descriptores taxonómicos, esencialmente tal como se ha definido en la tabla 1, muestra que está más estrechamente relacionado con el virus, tal como se define en la reivindicación 1 en el presente documento, que con cualquier otro virus conocido en el momento de la presentación de la presente solicitud, y cuyo virus está asociado con una enfermedad que causa lesiones necróticas en el tomate, se considera en el presente documento que es ToTV. Dependiendo de la relación filogenética, o la distinción con otros taxones viral, el taxón viral de ToTV puede ser un aislado, una especie, un género o incluso una familia de virus.

De manera alternativa, los procedimientos para la identificación de un aislado viral, tal como un virus ToTV, pueden basarse en la sintomatología, es decir, el reconocimiento del virus por sus síntomas de la enfermedad.

Sin embargo, de manera preferente, se utilizan anticuerpos en un procedimiento para identificar un aislado viral como un virus ToTV, siempre que la reactividad cruzada de estos anticuerpos con cepas no relacionadas con ToTV se haya descartado de manera eficaz. Dichos procedimientos comprenden la etapa de hacer reaccionar dicho aislado viral o un componente del mismo, con un anticuerpo, tal como se da a conocer en el presente documento. Hacer reaccionar se refiere en el presente documento a permitir la realización de la unión antígeno-anticuerpo. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la utilización del virus ToTV purificado o no purificado, o partes del mismo (proteínas, péptidos). De manera preferente, se utilizan células infectadas o cultivos de células para identificar antígenos virales utilizando cualquier procedimiento inmunológico adecuado. En este sentido, son especialmente útiles los anticuerpos desarrollados contra proteínas de la cápside viral de ToTV.

Otros procedimientos preferentes para la identificación de un aislado viral como un virus ToTV comprenden hacer reaccionar dicho aislado viral o un componente del mismo con un polinucleótido específico del virus, cuyo polinucleótido es capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 60% con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, y sus cadenas complementarias y fragmentos específicos de ToTV de las mismas. Dicha reacción de hibridación puede realizarse en cualquier formato disponible para el experto en la materia y, en general, implicará la impresión de tejidos, procedimientos de transferencia de puntos, transferencia o hibridación Southern/Northern, hibridación in situ, PCR, RT-PCR y similares.

#### Procedimientos inmunológicos de detección

Los procedimientos, tal como se han descrito, en los que se detectan antígenos se pueden llevar a cabo, en principio, mediante la utilización de cualquier procedimiento inmunológico, tal como, por ejemplo, inmunofluorescencia clásica (IF), técnicas inmunohistoquímicas o formatos de ensayos de detección de antígenos comparables. Los procedimientos de detección de ToTV preferentes basados en la detección de la proteína de la cubierta viral puede comprender, por ejemplo, procedimientos, tales como pruebas de precipitación y aglutinación, radioinmunoensayo (RIA), inmunomarcaje con oro, microscopía electrónica inmunoabsorbente (ISEM), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia Western e inmunotransferencia. Entre los ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos se encuentran inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Los anticuerpos se pueden utilizar en inmunoensayos en fase líquida o se pueden unir a un portador en fase sólida. Además, los anticuerpos en estos inmunoensayos se pueden marcar de forma detectable de varias maneras. Los expertos en la materia conocerán, o pueden discernir fácilmente, formatos de inmunoensayo adecuados sin una gran experimentación. Los formatos de ensayo son bien conocidos en la bibliografía y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988).

Se puede utilizar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido particular, tal como proteínas de la cubierta viral de ToTV. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan habitualmente para este propósito. Véase Harlow y Lane (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden utilizar para determinar la unión selectiva.

Los anticuerpos se pueden unir a muchos portadores diferentes y se pueden utilizar para detectar la presencia de las moléculas diana. De manera alternativa, los antígenos se pueden unir a muchos portadores diferentes y se pueden utilizar para detectar la presencia del anticuerpo. Entre los ejemplos de portadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos descritos. Los expertos en la materia conocerán otros portadores adecuados para unir anticuerpos, o serán capaces de determinarlos utilizando experimentación de rutina.

Los ensayos de transferencia Western se describen, en general, en Harlow y Lane (1988). Según este procedimiento, las proteínas virales (y otras proteínas en la preparación del virus) se separan mediante electroforesis en gel y se transfieren a una fase sólida (es decir, una membrana, tal como nitrocelulosa). El antígeno inmovilizado se hace reaccionar posteriormente con un sistema de anticuerpos y de detección (por ejemplo, un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina). Tal como será evidente para los expertos en la materia, será ventajoso incluir en el ensayo materiales de control positivos y negativos apropiados (tales como antígeno o virus ToTV sustancialmente purificados).

Los ensayos inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se describen, en general, en Harlow y Lane (1988). El ensayo implica la reacción de un componente viral (por ejemplo, una proteína de la cápside) con un anticuerpo. La muestra puede comprender un tejido de planta que se muele y se hace reaccionar con el anticuerpo que se ha recubierto sobre una fase sólida, tal como una placa de prueba. Si el virus está presente en la muestra, un anticuerpo específico marcado con enzima se unirá al complejo anticuerpo-virus, y se detectará mediante una reacción de sustrato de la enzima que produce una reacción de color. Los procedimientos preferentes de análisis de ELISA son ELISA directo de doble sándwich de anticuerpo (DAS) (Clark y Adams, 1977), ELISA DAS indirecto (Vela y otros 1986), o TAS-ELISA. Será evidente para los expertos en la materia que en un ELISA o cualquier otro tipo de

ensayo, a veces será deseable determinar la presencia de más de una proteína de la cápside viral en una única reacción, por ejemplo, mediante la mezcla de dos o más anticuerpos con diferentes especificidades y el análisis para cualquiera o todas las proteínas protectoras asociadas a la cápside.

## 5 Procedimientos de detección basados en ácidos nucleicos

ToTV está compuesto, como mínimo, de dos ácidos ribonucleicos (ARN). Hay fuertes indicios de la presencia de tres proteínas protectoras de la cápside. Los procedimientos descritos anteriormente se centran en la detección inmunológica de las proteínas virales para la detección del virus. Mediante tecnología de ADN recombinante, es posible producir sondas que se hibridan directa o indirectamente a los ARN virales (o sus complementos), o ADNc producido a partir de los mismos mediante transcripción inversa, y que se pueden utilizar en ensayos para la detección del virus. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos permiten la amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos virales que pueden estar presentes en cantidades muy bajas.

A efectos de desarrollar procedimientos de detección basados en ácidos nucleicos, deben determinarse las secuencias específicas del virus para las que pueden desarrollarse, a continuación, cebadores o sondas. Para detectar ToTV mediante amplificación de ácidos nucleicos y/o hibridación de sondas, se puede secuenciar la proteína de la cápside de ToTV o, de forma alternativa, se puede aislar el ARN genómico viral del virus purificado, realizar la transcripción inversa en ADNc y clonar y/o secuenciar directamente. La utilización del ácido nucleico clonado como sonda de hibridación, utilizando la información de secuencia derivada del clon, o mediante el diseño de cebadores degenerativos basados en la secuencia de aminoácidos de la proteína de ToTV, se pueden diseñar sondas de hibridación de ácidos nucleicos y/o cebadores de amplificación de ácidos nucleicos y utilizarse en un ensayo de detección para detectar la presencia del virus en una muestra, tal como se ha definido en el presente documento.

Los procedimientos, tal como han descrito en el presente documento, en los que se detectan ácidos nucleicos se pueden llevar a cabo, en principio, mediante cualquier procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y Faloona, 1987; patentes de Estados Unidos Nos. 4.683.195; 4.683.202; y 4.800.159) o mediante la utilización de reacciones de amplificación, tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Barany, 1991; EP 0320308), la replicación de secuencia autosostenida (3SR; Guatelli y otros, 1990), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; Walker y otros, 1992; patentes de Estados Unidos Nos. 5.270.184 y 5.455.166), sistema de amplificación de la transcripción (TAS; Kwoh y otros, 1989), Q-beta replicasa (Lizardi y otros, 1988), amplificación en círculo rodante (RCA; patente de Estados Unidos No. 5.871.921), amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA; Compton, 1991), polimorfismo en la longitud de fragmentos por cleavasa (patente de Estados Unidos No. 5.719.028), amplificación isotérmica y quimérica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores (ICAN), procedimiento de amplificación por extensión en ramificaciones (RAM; patentes de Estados Unidos Nos. 5.719.028 y 5.942.391) u otros procedimientos adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos.

Dado que el virus es un virus de ARN (es decir, las secuencias de las figuras 5 y 6 son el equivalente de ADN del genoma de ARN viral), un procedimiento de detección adecuado puede comprender aislar los ácidos nucleicos virales de una muestra, por ejemplo, de una planta infectada, mediante la utilización de procedimientos conocidos *per se* para el experto en la materia (por ejemplo, Chomczynski y Sacchi, 1987; Boom y otros, 1990) o sistemas disponibles comercialmente (por ejemplo, el kit de aislamiento de ARN total RNeasy o el kit de aislamiento de ARN de planta RNeasy de QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania, o el High-Pure-RNA-Isolation-Kit® (Roche Diagnostics, una división de F. Hoffmann-la Roche Ltd., Basilea, Suiza).

El ARN total se puede extraer, por ejemplo, de material de hojas o protoplastos de células vegetales y el ARN total, o específicamente el ARN genómico viral, o una parte del mismo, se puede transcribir de forma inversa en ADNc mediante la utilización, por ejemplo, de una transcriptasa del virus de mieloblastosis aviar (AMV) o la transcriptasa inversa del virus de leucemia murino Moloney (M-MuLV). Un procedimiento adecuado puede incluir, por ejemplo, mezclar en un sistema tampón acuoso adecuado (por ejemplo, un tampón RT disponible comercialmente) una cantidad adecuada de ARN total (por ejemplo, 1 a 5 µg), una cantidad adecuada (por ejemplo, 10 pmol) de un cebador de transcripción inversa, una cantidad adecuada de dNTP y la transcriptasa inversa, desnaturalizar los ácidos nucleicos mediante ebullición durante 1 min y enfriarlos en hielo, seguido de la transcripción inversa, por ejemplo, a 45°C durante 1 hora, tal como se recomienda para la transcriptasa inversa específica utilizado, para obtener copias de ADNc de las secuencias virales.

Como cebador de transcripción inversa de un polinucleótido se puede utilizar, por ejemplo, un oligonucleótido de 18 a 25 unidades que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia genómica de ToTV o, de manera preferente, como mínimo, capaz de hibridarse en condiciones rigurosas a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma específica de ToTV. De manera alternativa, se puede utilizar un cebador poliT específico de a (oligo cebador dT) a efectos de iniciar la transcripción inversa a partir de los motivos de ARN poliA.

Después de la etapa de RT, el ADNc obtenido se puede amplificar por PCR mediante la utilización, por ejemplo, de

Pfu y Taq ADN polimerasas y cebadores de amplificación específicos para las secuencias de ADNc genómicas virales. También se pueden utilizar sistemas completos disponibles comercialmente para la RT-PCR (por ejemplo, los sistemas de RT-PCR Access and AccessQuick® de Promega [Madison WI, Estados Unidos], o el sistema de RT-PCR de un tubo Titan® o los sistemas de RT-PCR de dos etapas proporcionados por Roche Diagnostics [una división de F. Hoffmann-la Roche Ltd, Basilea, Suiza]).

A efectos de amplificar un ácido nucleico con un pequeño número de desapareamientos en uno o más de los cebadores de amplificación, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación en condiciones de rigurosidad reducida (por ejemplo, una amplificación por PCR utilizando una temperatura de hibridación de 38°C, o la presencia de MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM). La persona experta en la materia será capaz de seleccionar las condiciones de rigurosidad adecuadas.

Los cebadores en el presente documento se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarios (es decir, como mínimo, el 65%, de manera más preferente, como mínimo, el 80% perfectamente complementarios) a sus regiones diana presentes en las diferentes cadenas de cada secuencia específica a amplificar. Es posible utilizar secuencias de cebadores que contienen por ejemplo, residuos de inositol o bases ambiguas o incluso cebadores que contienen uno o más desapareamientos cuando se comparan con la secuencia diana. En general, las secuencias que muestran como mínimo, el 65%, de manera más preferente, como mínimo, el 80% de homología con las secuencias de oligonucleótidos de ADN o ARN diana, se consideran adecuadas para utilizar en un procedimiento tal como se ha descrito. Los desapareamientos de secuencia tampoco son críticos cuando se utilizan condiciones de hibridación de baja rigurosidad.

La detección de los productos de amplificación se puede llevar a cabo, en principio, mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Los fragmentos amplificados se pueden teñir o marcar directamente con marcadores radiactivos, anticuerpos, colorantes luminiscentes, colorantes fluorescentes o reactivos enzimáticos. Entre las manchas de ADN directas se incluyen, por ejemplo, colorantes intercalantes, tales como naranja de acridina, bromuro de etidio, monoazida de etidio o colorantes Hoechst.

De manera alternativa, los fragmentos de ADN o de ARN se pueden detectar mediante la incorporación de bases dNTP marcadas en los fragmentos sintetizados. Entre los marcadores de detección que se pueden asociar con bases de nucleótidos se incluyen, por ejemplo, la fluoresceína, colorante de cianina, digoxigenina (DIG) o bromodesoxiuridina (BrdU).

Cuando se utiliza un sistema de detección basado en una sonda, un procedimiento de detección adecuado para utilizar puede comprender, por ejemplo, un formato de inmunoensayo enzimático (EIA) (Jacobs y otros, 1997). Para llevar a cabo una detección mediante el procedimiento de EIA, el cebador directo o el cebador inverso utilizados en la reacción de amplificación pueden comprender un grupo de captura, tal como un grupo biotina para la inmovilización de los amplicones de ADN por PCR diana, por ejemplo, en pocillos de placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina o Dynabeads® recubiertas con estreptavidina (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) para la posterior detección con EIA de los amplicones de ADN diana. El experto en la materia entenderá que se pueden utilizar otros grupos para la inmovilización de amplicones de ADN por PCR diana en un formato de EIA.

Las sondas útiles para la detección de las secuencias de ácidos nucleicos diana, tal como se han dado a conocer en el presente documento, se unen, de manera preferente, sólo a, como mínimo, una parte de la región de la secuencia de ácidos nucleicos amplificada mediante el procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos. Los expertos en la materia pueden preparar sondas adecuadas para la detección basándose en la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana sin gran experimentación, tal como se establece en el presente documento. Además, las secuencias de nucleótidos complementarias, ya sean ADN o ARN o análogos sintetizados químicamente, del ácido nucleico diana se pueden utilizar adecuadamente como sondas de detección específicas del tipo en un procedimiento, tal como se ha dado a conocer, siempre que dicha cadena complementaria se amplifique en la reacción de amplificación utilizada.

Los procedimientos de detección adecuados para utilizar en el presente documento pueden comprender, por ejemplo, la inmovilización de los amplicones y el sondeo de las secuencias de ácidos nucleicos de los mismos mediante, por ejemplo, transferencia Northern y Southern. Otros formatos pueden comprender un formato de EIA, tal como se ha descrito anteriormente. Para facilitar la detección de la unión, las sondas específicas de detección de amplicones pueden comprender un grupo marcador, tal como un fluoróforo, un cromóforo, una enzima o un marcador radioactivo, para facilitar el seguimiento de la unión de las sondas al producto de reacción de la amplificación reacción. Dichos marcadores son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), β-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, estreptavidina, biotina, digoxigenina, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P o <sup>125</sup>I. Otros ejemplos serán evidentes para los expertos en la materia.

La detección también se puede realizar mediante el llamado ensayo de transferencia de línea inversa (RLB), tal como ha descrito, por ejemplo, Van den Brule y otros (2002). Para este propósito, se sintetizan sondas RLB, de manera preferente, con un grupo amino 5' para la posterior inmovilización, por ejemplo, sobre membranas de nylon recubiertas de carboxilo. La ventaja de un formato RLB es la facilidad del sistema y su velocidad, lo que permite un

procesamiento de muestras con un alto rendimiento.

La utilización de sondas de ácido nucleico para la detección de fragmentos de ARN o ADN es bien conocida en la técnica. La mayoría de estos procedimientos comprenden la hibridación del ácido nucleico diana con la sonda, seguido de lavados después de la hibridación. La especificidad es habitualmente la función de los lavados después de la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ácidos nucleicos, la  $T_f$  se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984):  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ formamida}) - 500/L$ ; en la que M es la molaridad de cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos guanosina y citosina en el ácido nucleico, % formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La  $T_f$  es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida a una sonda perfectamente coincidente. La  $T_f$  se reduce en aproximadamente  $1^\circ\text{C}$  por cada 1% de desapareamiento; de este modo, se pueden ajustar las condiciones de hibridación y/o lavado para hibridarse a secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con más del 90% de identidad, la  $T_f$  se puede disminuir  $10^\circ\text{C}$ . En general, se seleccionan las condiciones rigurosas para que estén aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  por debajo del punto de fusión térmico ( $T_f$ ) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones severamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado  $1, 2, 3$  ó  $4^\circ\text{C}$  por debajo del punto de fusión térmico ( $T_f$ ); condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado  $6, 7, 8, 9$  ó  $10^\circ\text{C}$  por debajo del punto de fusión térmico ( $T_f$ ); condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o un lavado  $11, 12, 13, 14, 15$  ó  $20^\circ\text{C}$  por debajo del punto de fusión térmico ( $T_f$ ). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la  $T_f$  deseada, los expertos en la materia entenderán que se describen intrínsecamente variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de desapareamientos da lugar a una  $T_f$  inferior a  $45^\circ\text{C}$  (solución acuosa) o  $32^\circ\text{C}$  (solución de formamida), es preferente aumentar la concentración de SSC, de manera que se puede utilizar una temperatura más elevada. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, 1993; Ausubel y otros, 1998.

Se dan a conocer también sondas de oligonucleótidos para la detección de ARN o ADNc de ToTV. Las sondas de detección en el presente documento se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarias a una molécula de ARN de cadena simple, o a una de las cadenas de los ácidos nucleicos de doble cadena generadas mediante una reacción de amplificación. De manera preferente, las sondas son sustancialmente complementarias a las cadenas antisentido, de manera opcional, inmovilizadas (por ejemplo, marcadas con biotina), de los amplicones generados a partir del ARN o ADN diana.

Se permite que las sondas de detección contengan uno o más desapareamientos a su secuencia diana. En general, las secuencias que muestran, como mínimo, el 65%, de manera más preferente, como mínimo, el 80% de homología con las secuencias de oligonucleótidos diana se consideran adecuadas para utilizar en un procedimiento, tal como se ha descrito.

#### Plantas resistentes a ToTV

Se da a conocer también un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV, o parte de la misma. Existen varias posibilidades de identificar plantas resistentes a ToTV. Para esto, se pueden utilizar virus activos/infecciosos o clones infecciosos de longitud completa, mientras que en una alternativa, sólo se utilizan medios de detección de virus.

Una primera etapa de un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV utilizando virus activos/infecciosos comprende exponer una planta o parte de la planta, tal como una hoja o segmento del tallo, a una dosis infectiva de ToTV, el objetivo de lo cual es lograr una infección. La exposición puede implicar, en muchos casos, el establecimiento de contacto físico. Una dosis infecciosa puede variar entre plantas y entre aislados de ToTV probados. En teoría, una cantidad de aproximadamente 1 a 10 hasta una cantidad de aproximadamente 500 a 5000 partículas virales de dicho virus o los ácidos nucleicos del mismo será suficiente. De esta manera, se puede conseguir la infección mediante inoculación mecánica de partículas de virus o ácido nucleico del virus purificados en plantas sanas.

De manera alternativa, la infección se puede conseguir mediante, por ejemplo:

- el crecimiento de un esqueje sano en un patrón infectado con ToTV, o al revés;
- la exposición de una planta sana a vectores de transmisión que contienen el virus (incluyendo plantas infectadas, por ejemplo, plantas parásitas como *Cuscuta spp.*);
- la introducción en una planta sana de un vector de expresión que alberga una región de codificación del genoma del virus ToTV;
- la utilización de clones agroinfecciosos, tales como cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen un vector de expresión que alberga una región de codificación del genoma del virus ToTV.

Los procedimientos para la exposición de una planta o parte de la planta a una dosis infectiva de ToTV no están

limitados a ningún procedimiento particular.

Tal como se ha indicado, la infección puede comprender la inoculación mecánica del virus en plantas sanas. Por ejemplo, se puede frotar una parte de una hoja enferma directamente sobre una hoja de una planta que va a ser infectada. En un procedimiento alternativo, se puede preparar un inóculo, por ejemplo, mediante la molienda de tejido de planta que contiene el virus, de manera preferente, hojas jóvenes que muestran síntomas, con un mortero y una mano de mortero, o cualquier otro tipo adecuado de homogeneizador, por ejemplo, en un tampón adecuado para la inoculación (por ejemplo, un tampón fosfato 0,03 M, pH 7,7). Después de la molienda, el homogeneizado obtenido (la savia) se filtra, de manera preferente, por ejemplo, a través de tela de queso. A continuación, la savia se puede inocular, por ejemplo, mediante el contacto suave de las hojas con una cantidad de savia. De manera preferente, las hojas se tratan previamente a efectos de dañar la epidermis inferior y mejorar la entrada del virus. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante el empolvado previo de las hojas con polvo de carburo de silicio. De manera preferente, se evita una lesión excesiva. De manera preferente, se utiliza un polvo de carburo de silicio que tiene partículas angulares microscópicamente pequeñas de carburo de silicio (malla 400-500). El carburo de silicio también se puede añadir directamente a la savia, en cuyo caso se omite el tratamiento previo. La savia puede aplicarse, por ejemplo, mediante el dedo índice, una almohadilla de espuma o tela empapada de savia, o incluso con la mano del mortero utilizado para moler, una espátula de vidrio, un cepillo duro o una pistola de pulverización. Después de la inoculación, de manera preferente, las hojas se lavan inmediatamente con agua.

Una segunda etapa de un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV comprende identificar dicha planta como planta resistente a ToTV cuando, después de dicha exposición, i) los síntomas de la enfermedad en dicha planta o parte de la planta permanecen ausentes o se retrasan en la expresión o, como mínimo, se reducen en gravedad o se localizan en relación con una planta de control susceptible y/o sensible, y/o ii) el virus ToTV o las secuencias genómicas de ToTV no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia del virus ToTV se reduce, como mínimo, cuantitativamente en dicha planta con relación a una planta de control susceptible. Tal como se utiliza en el presente documento, el término localiza significa restringido a la hoja inoculada.

La determinación del desarrollo de los síntomas de la enfermedad inducidos por ToTV en plantas infectadas se puede llevar a cabo mediante procedimientos cuantitativos, por ejemplo, en el que se observa el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas de la enfermedad discernibles (por ejemplo, visibles), o mediante procedimientos cualitativos, en los que, después de que haya pasado un cierto tiempo, la planta es inspeccionada para la expresión de los síntomas y se indica la presencia o la gravedad de los síntomas.

Además de determinar el desarrollo de los síntomas de la enfermedad inducidos por ToTV o como una alternativa a la misma, dependiendo del tipo de resistencia a ToTV a detectar, se detecta la presencia del virus en la planta o parte de la planta. A efectos de detectar la ausencia del virus en las plantas de prueba, en principio, se puede utilizar cualquier procedimiento. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento en el que se utilizan un anticuerpo específico de ToTV, un grupo de cebadores o sonda. De manera alternativa, se puede poner en contacto una parte de la planta de prueba con una planta indicadora susceptible (por ejemplo, *N. hesperis* "67A") para determinar si el virus está presente o ausente en la planta de prueba. El experto en la materia entenderá que para dichos procedimientos es importante descontaminar la superficie de la planta de prueba, a efectos de distinguir entre un vector de transmisión, una planta de prueba tolerante y una planta de prueba resistente, ya que sólo necesita establecerse la presencia del virus en las células de la planta.

En la realización de la segunda etapa de un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV, se pueden obtener los siguientes resultados. Si, después de la inoculación con éxito (por ejemplo, después del establecimiento de un contacto del virus de la planta en condiciones que darían lugar a la infección en una planta de control susceptible y sensible):

- i) los síntomas de la enfermedad permanecen ausentes; o no se pueden detectar partículas virales o ARN viral: la planta es resistente;
- ii) los síntomas de la enfermedad se retrasan o reducen en gravedad; o se pueden detectar títulos bajos sistémicos de partículas virales o ARN viral: la planta es parcialmente resistente;
- iii) los síntomas de la enfermedad son graves, pero son de carácter local, limitados a la hoja inoculada y no se extienden sistémicamente más allá del tejido inoculado; o sólo se pueden detectar de forma local partículas virales o ARN viral: la planta es hipersensible;
- iv) si los síntomas de la enfermedad permanecen ausentes; y se pueden detectar partículas virales o ARN viral: la planta es tolerante;
- v) si la planta desarrolla síntomas de la enfermedad y tiene altos títulos de virus sistémicos, entonces la planta es susceptible y sensible. Entre los ejemplos de dichas plantas se encuentran las plantas de las que se aisló el virus. Estas plantas pueden servir como plantas de control adecuadas en los procedimientos tal como se han descrito.

Para el propósito de producir plantas resistentes, y desde un punto de vista de fitosanidad, sólo los resultados i), ii) y iii) se pueden considerar de interés. Para el propósito de obtener plantas adecuadas para la producción de cultivos y productos asintomáticos, el resultado iv) también puede ser de particular interés comercial.

En un procedimiento alternativo para la identificación de una planta resistente a ToTV sólo se utilizan medios de detección de virus. Por ejemplo, se puede identificar una planta resistente a ToTV en el campo mediante la observación o la identificación de una planta asintomática entre plantas sintomáticas y la determinación de la ausencia de virus en dicha planta mediante la realización de cualquiera de los procedimientos de detección de virus, tal como se han descrito. De hecho, esto corresponde a un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV, en el que la etapa a) de exposición de una planta o parte de la planta a una dosis infectiva de ToTV, se realiza de forma pasiva (por ejemplo, de forma natural). Cuando se realiza dicho procedimiento, es preferente utilizar un procedimiento para detectar la presencia de ToTV en una muestra, en el que la presencia de un virus ToTV o un componente del mismo se lleva a cabo mediante la reacción de dicha muestra con un polinucleótido o un anticuerpo. De manera preferente, un procedimiento de identificación de una planta resistente a ToTV requiere la utilización del virus o un polinucleótido o anticuerpo.

Se da a conocer también un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV, o parte de la misma. Una vez se ha identificado una planta resistente a ToTV, esta planta puede servir como planta donante de material genético que ha de transferirse desde dicha planta donante a una planta receptora a efectos de proporcionar el material genético a dicha planta receptora. La transferencia de material genético de una planta donante a una planta receptora se puede producir mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. El material genético, en la mayoría de los casos, será material genómico. Es importante, sin embargo, que se transfieran, como mínimo, las partes que confieren resistencia del genoma de la planta donante. En ausencia de procedimientos para determinar qué partes del genoma de la planta donante confieren la resistencia a ToTV, la transferencia puede producirse de manera adecuada mediante la transferencia de cromosomas completos. De manera preferente, la planta resistente a ToTV sirve como una planta parental macho o hembra en un cruzamiento para la producción de plantas vástago resistentes, recibiendo así la planta vástago el material genómico del donante resistente y actuando como planta receptora. Aunque una planta parental susceptible en los cruzamientos no es *sensu stricto* necesariamente una planta receptora, dicha planta parental susceptible también estará incluida en el presente documento en el término planta receptora.

En un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV, también se puede utilizar una fusión de protoplastos para la transferencia de material genómico que confiere resistencia desde una planta donante a una planta receptora, es decir, como una manera de cruzamiento de dichas plantas. La fusión de protoplastos es una unión inducida o espontánea, tal como una hibridación somática, entre dos o más protoplastos (células de las que se extraen las paredes celulares mediante tratamiento enzimático), para producir una sola célula binucleada o multinucleada. La célula fusionada, que incluso puede obtenerse con especies de plantas que no se puede entrecruzar en la naturaleza, es tejido que se cultiva en una planta híbrida que muestra la combinación deseable de rasgos. De manera más específica, se puede obtener un primer protoplasto de una planta de tomate u otra línea de plantas que muestra resistencia a la infección por ToTV. Por ejemplo, se puede utilizar un protoplasto de una línea resistente a ToTV (tomate, berenjena, pimiento, melón, sandía o pepino). Se puede obtener un segundo protoplasto a partir de una segunda línea de plantas susceptible, de manera opcional, de otra especie o variedad de planta, de manera preferente, de la misma especie o variedad de planta, que comprende las características comercialmente deseables, tales como, aunque sin limitarse a las mismas, la resistencia a enfermedades, la resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc. Los protoplastos se fusionan, a continuación, utilizando procedimientos de fusión de protoplastos tradicionales que son conocidos en la técnica para producir el cruzamiento.

De manera alternativa, se puede utilizar el rescate de embriones en la transferencia de material genómico que confiere resistencia desde una planta donante a una planta receptora, es decir, como una manera de cruzamiento de dichas plantas. El rescate de embriones se puede utilizar como un procedimiento para aislar embriones de cruzamientos en los que las plantas no producen semillas viables. En este proceso, el ovario fertilizado o la semilla inmadura de una planta es tejido cultivado para crear nuevas plantas (este procedimiento se describe en detalle en Pierik, 1999).

Un procedimiento de producción de una planta resistente a ToTV comprende, de este modo, las etapas de identificar una planta donante resistente a ToTV, tal como se ha descrito anteriormente, y cruzar dicha planta donante resistente a ToTV con una planta receptora, tal como se ha descrito anteriormente, produciendo de este modo plantas vástago resistentes.

Un procedimiento de producción de una planta resistente a ToTV comprende además la etapa de seleccionar a partir de plantas vástago una planta resistente mediante la realización de un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV, tal como se ha descrito anteriormente.

De manera preferente, dicha planta donante resistente a ToTV es una planta de la familia de las solanáceas o cucurbitáceas, de manera incluso más preferente, una planta de tomate, una planta de berenjena, una planta de pimiento, una planta de melón, una planta de sandía o una planta de pepino.

De manera preferente, dicha planta receptora es una planta de la familia de las solanáceas o cucurbitáceas, de manera incluso más preferente, una planta de tomate, una planta de berenjena, una planta de pimiento, una planta

de melón, una planta de sandía o una planta de pepino. De manera aún más preferente, dicha planta receptora es una planta de tomate de la especie *Solanum lycopersicum*, de manera más preferente, una planta de *S. lycopersicum* que posee características comercialmente deseables. La planta receptora puede ser una planta susceptible a ToTV, una planta sensible a ToTV o una planta receptora resistente a ToTV. Tal como se ha explicado anteriormente, la elección de la planta estará principalmente determinada por si el rasgo de resistencia es dominante o recesivo. El experto en la materia es consciente de las diversas metodologías disponibles para resolver estas cuestiones.

Tal como se ha indicado, un procedimiento preferente para producir una planta resistente a ToTV comprende la transferencia mediante la introgresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos que confiere resistencia desde una planta donante resistente a ToTV a una planta receptora mediante el cruzamiento de dichas plantas. Las plantas resistentes desarrolladas según este ejemplo preferente pueden derivar de manera ventajosa una mayoría de sus rasgos de la planta receptora y derivar la resistencia a ToTV de la planta donante.

En un procedimiento, al que se hace referencia como cultivo de selección de linaje, una planta donante que muestra resistencia a ToTV se cruza con una planta receptora que, de manera preferente, muestra características comercialmente deseables, tales como, aunque sin limitarse a las mismas, resistencia a las enfermedades, resistencia a los insectos, características valiosas del fruto, etc. La población de plantas resultantes (que representa los híbridos  $F_1$ ) a continuación, se autopoliniza y se deja que produzca semillas (semillas  $F_2$ ). A continuación, las plantas  $F_2$  cultivadas a partir de las semillas  $F_2$  se criban para la resistencia a ToTV. La población se puede cribar de varias maneras diferentes, de manera preferente, mediante la realización de una inspección visual.

Se dan a conocer también procedimientos para prevenir la propagación de la infección de ToTV en plantas de tomate mediante la disposición de plantas de tomate resistentes, así como mediante la eliminación de las plantas que llevan el virus ToTV. Estas medidas pueden formar parte de una estrategia general para mejorar la fitosanidad en relación con el virus ToTV. De este modo, las plantas tolerantes se pueden identificar y eliminar a efectos de eliminar dichas fuentes del virus ToTV.

En un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV, o parte de la misma, se da a conocer un procedimiento de producción de una planta tolerante a ToTV. Una planta tolerante puede proporcionar una cosecha, frutos y semillas valiosos, ya que, aunque la planta puede albergar el virus, no muestra síntomas de la enfermedad. Dicho procedimiento implicará la identificación de plantas tolerantes y la utilización de dichas plantas tolerantes como fuentes o donantes del material genético deseado. El objetivo no es proporcionar una planta capaz de resistir la entrada o la multiplicación del virus en sus células, sino el de proporcionar una planta que no tenga los síntomas.

De este modo, en el presente documento se da a conocer un procedimiento para identificar una planta tolerante a ToTV, que comprende las etapas de a) exponer una planta o parte de la planta a una dosis infectiva de ToTV, y b) identificar dicha planta como planta tolerante de ToTV cuando, después de dicha exposición, los síntomas de la enfermedad en dicha planta o parte de la planta permanecen ausentes, y ToTV está presente en dicha planta o parte de la planta.

La determinación del desarrollo de síntomas de la enfermedad inducidos por ToTV en plantas infectadas se puede llevar a cabo mediante procedimientos cuantitativos, por ejemplo, en el que se observa el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas de la enfermedad discernibles (por ejemplo, visibles), o mediante procedimientos cualitativos, en los que, después de que haya pasado un cierto tiempo, la planta es inspeccionada para la ausencia de la expresión de los síntomas y se indica la reducción de los síntomas.

La presencia de ToTV en dicha planta o parte de la planta se determina, de manera preferente, en la etapa b) mediante la realización de un procedimiento que comprende determinar en dicha planta o parte de la planta la presencia de un virus ToTV o componente del mismo mediante la reacción de dicha planta o parte de la planta con una polinucleótido o un anticuerpo.

#### Kits de diagnóstico

Los procedimientos y medios, tal como se han descrito en el presente documento, son particularmente útiles en un kit de diagnóstico para el diagnóstico de una infección por el virus ToTV mediante diagnóstico virológico. Dichos kits o ensayos pueden comprender, por ejemplo, un virus, un ácido nucleico, una molécula proteica o fragmento de los mismos, y/o un anticuerpo.

En el presente documento se da a conocer un kit de diagnóstico para el diagnóstico de una infección por ToTV que comprende un virus ToTV, un ácido nucleico específico del virus ToTV, una molécula proteica o fragmento de los mismos y/o un anticuerpo, y, de manera preferente, un medio para detectar dicho virus ToTV, ácido nucleico específico del virus ToTV, molécula proteica o fragmento de los mismos y/o anticuerpo, comprendiendo dichos medios, por ejemplo, un grupo excitable, tal como un fluoróforo o sistema de detección enzimática utilizados en la técnica (ejemplos de formatos de kit de diagnóstico adecuados comprenden IF, ELISA, ensayo de neutralización, ensayo de RT-PCR, ensayos de hibridación). Entre los ensayos de detección adecuados se incluyen ensayos

directos e indirectos, ensayos de sándwich, ensayos en fase sólida, tales como los que utilizan placas o esferas, entre otros, y ensayos en fase líquida. Entre los ensayos adecuados se incluyen los que utilizan anticuerpos primarios y secundarios, y los que utilizan reactivos de unión a anticuerpo, tal como la proteína A. Además, se puede utilizar una variedad de procedimientos de detección, entre los que se incluyen procedimientos colorimétricos, fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, luminiscentes y radiactivos.

Para determinar si un componente del virus todavía no identificado o análogo sintético del mismo, tal como un ácido nucleico, molécula proteica o fragmento de los mismos, se puede identificar como específico del virus ToTV, es suficiente analizar la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de dicho componente, por ejemplo, para un tramo de dicho ácido nucleico o aminoácido, de manera preferente, como mínimo, de 10, de manera más preferente, como mínimo, de 25, de manera más preferente, como mínimo, de 40 nucleótidos o aminoácidos (respectivamente), mediante comparación de la homología de secuencias con las secuencias virales de ToTV proporcionadas y con secuencias virales no de ToTV conocidas (de manera preferente, se utiliza el pariente filogenético más cercano de ToTV) utilizando, por ejemplo análisis filogenético, tal como se ha dado a conocer en el presente documento. Dependiendo del grado de relación con dichas secuencias virales de ToTV o no de ToTV, se pueden identificar el componente o análogo sintético.

Un kit para detectar un virus ToTV puede incluir, dependiendo del formato de ensayo, uno o más anticuerpos específicos para una proteína, de manera preferente, específicos, como mínimo, para una proteína de la cápside de ToTV y, de manera preferente, también incluye una proteína de ToTV o un anticuerpo antiidiotípico sustancialmente purificados para utilizar como control positivo.

#### Agentes antivirales

Se dan a conocer también procedimientos para obtener un agente antiviral útil en el tratamiento de la infección por ToTV en plantas que comprenden establecer un cultivo de células o planta experimental que comprende un virus, tal como se ha descrito, tratar dicho cultivo o planta con un agente antiviral candidato, y determinar el efecto de dicho agente sobre dicho virus o su infección de dicho cultivo o planta. Un ejemplo de dicho agente antiviral comprende un anticuerpo neutralizante de ToTV, o un componente funcional del mismo, tal como se da a conocer en el presente documento, pero también se pueden obtener agentes antivirales de otra naturaleza.

Existen diferentes agentes antivirales utilizados en plantas, tales como productos químicos, bacterias, hongos, insectos y virus. La mayoría de ellos están relacionados con la resistencia sistémica adquirida (SAR). En el presente documento se da a conocer la utilización del genoma de ToTV o una parte del mismo como un inductor de la resistencia sistémica adquirida en plantas. La resistencia sistémica adquirida se puede dirigir a ToTV o a otras enfermedades. ToTV, su genoma, o partes de los mismos que confieren resistencia se pueden utilizar como agente antiviral.

Se da a conocer también la utilización de un agente antiviral para la preparación de una composición de tratamiento, en particular para el tratamiento de una infección por ToTV en plantas, y una composición farmacéutica que comprende un agente antiviral, útil en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de una infección por el virus ToTV, comprendiendo dicho procedimiento proporcionar dicha composición de tratamiento a una planta individual.

Se da a conocer también un modelo de planta utilizable para probar procedimientos de tratamiento y/o composiciones. Se ha observado que varias especies de *Nicotiana* pueden infectarse con el virus ToTV, mostrando de este modo síntomas de la enfermedad diferentes a los encontrados en plantas de tomate que sufren del virus ToTV. Someter las plantas de *Nicotiana* a un tratamiento antiviral, ya sea antes o durante la infección con el virus, puede tener valor predictivo para la aplicación de dicho agente antiviral en plantas de tomate.

En el presente documento se da a conocer también la utilización de ToTV, o partes del genoma viral de ToTV, como vector de expresión, por ejemplo, para utilizar en el silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS). VIGS es una tecnología que explota un mecanismo de defensa antiviral mediado por ARN en las plantas. En las plantas infectadas con el virus sin modificar el mecanismo está dirigido específicamente contra el genoma viral. Mediante la utilización de vectores de expresión virales que llevan insertos derivados de genes del huésped, el mecanismo también se puede utilizar para dirigirse contra los ARN correspondientes de las plantas. VIGS se ha utilizado ampliamente en plantas para el análisis de la función génica y ha sido adaptado para la genómica funcional de alto rendimiento. Hasta ahora, la mayoría de las aplicaciones de VIGS han sido en *Nicotiana benthamiana*. Sin embargo, se da a conocer la utilización de ToTV como nuevos sistemas de vectores de expresión que permiten el análisis de la función génica en otras plantas, tales como el tomate y otras especies de la familia de las solanáceas, tales como la pimienta y la patata, y en especies de la familia de las cucurbitáceas.

**EJEMPLOS**

Ejemplo 1 Aislamiento y caracterización de ToTV de plantas de tomate.

5 Procedimientos

*Introducción*

10 Se recibieron muestras de plantas de tomate de España para la investigación diagnóstica. Los síntomas en las plantas de tomate consistían en manchas necróticas y clorosis en las hojas y anillos marrones en los frutos. Las pruebas serológicas (ELISA) señalaron la presencia del virus del mosaico del pepino (PepMV), pero, teniendo en cuenta los síntomas, era probable que otro agente, aún no definido, estuviera presente.

15 Se observaron partículas de virus esféricos en estudios de microscopía electrónica de tejido foliar infectada.

Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de infección y se encontraron que múltiples accesiones del tomate eran susceptibles para ToTV, varias de las cuales se hicieron reaccionar con síntomas claros (necrosis de las hojas, empezando en la base de los folíolos individuales (véase la figura 1).

20 *Transmisión y propagación del virus*

25 Se aisló ToTV, tal como se ha descrito a continuación, a partir de una planta enferma obtenida de España. ToTV era mecánicamente transmisible a varias especies de *Nicotiana*. Un tampón de inoculación estándar (por ejemplo, tampón fosfato 0,03 M, pH 7,7) resultó ser adecuado. A lo largo de este ejemplo, se inoculó mecánicamente ToTV en *N. glutinosa* o *N. benthamiana* y se propagó en las mismas. La purificación del virus se llevó a cabo aproximadamente 14 días después de la inoculación.

*Purificación del virus*

30 Se realizaron varios intentos para purificar ToTV según los protocolos estándar, por ejemplo, para nepovirus o luteovirus (con la ayuda de disolventes orgánicos). Estos protocolos dieron lugar siempre a la pérdida de la capacidad de infección del virus. Además, ToTV tendió a agregarse cuando se utilizaron bajas temperaturas en las etapas de centrifugación (por debajo de 5°C).

35 Finalmente, un procedimiento de purificación muy suave dio lugar a preparaciones de virus limpias razonables, en las que se podían llevar a cabo más experimentos.

40 Se utilizó el siguiente procedimiento para purificar ToTV (todas las etapas de centrifugación se realizaron a 6°C). Las hojas infectadas de *N. glutinosa* o *N. benthamiana* se homogeneizaron en 5 partes de TRIS-HCl 0,1 M (pH 8) más Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 20 mM, Na-DIECA 10 mM en Na-EDTA 5 mM (tampón de homogeneización) y el homogeneizado se centrifugó durante 30 minutos a 49.000 x g. El sobrenadante se colocó en un cojín de sacarosa al 20% y se centrifugó durante 1,5 horas a 70.000 x g. El sedimento se resuspendió en 2 ml de TRIS-HCl, pH 8, y la suspensión se colocó en un gradiente de sacarosa (sacarosa del 10 al 40% en tampón de homogeneización) y se centrifugó durante 2 horas a 110.000 x g. Dado que una banda del virus no era visible, el gradiente se dividió en alícuotas en fracciones discretas y se determinó la presencia del virus en cada fracción mediante la inoculación de una parte de dicha fracción en las hojas de *N. hesperis* "67A", tal como se ha descrito en el presente documento, y la observación de la aparición de la infección. La fracción que contenía el virus se colocó sobre un gradiente de sulfato de cesio al 10-40% (en TRIS-HCl, pH 8) y se centrifugó durante 16 h a 125.000 x g. Las bandas de virus se recogieron y se concentraron mediante centrifugación o se dializaron frente a TRIS-HCl 0,1 M, pH 8.

50 Se verificó la capacidad de infección de ToTV después de cada etapa de purificación mediante la inoculación en *N. hesperis* "67A" (las fracciones de gradiente de sulfato de cesio se dializaron frente a TRIS-HCl, pH 8, antes de la inoculación).

55 *Microscopía electrónica*

Las suspensiones de virus se "montaron" en una rejilla recubierta de Formvar®, también conocido como polivinilformal, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y se examinaron en un microscopio electrónico Philips CM12.

60 *Análisis por PAGE*

Las proteínas virales se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante al 12% (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) y se tiñeron con plata.

65 *Aislamiento y evaluación de ácidos nucleicos*

Se concentró el virus purificado mediante centrifugación (2 horas a 115 000 g). Los sedimentos se sometieron a la extracción de ARN según el procedimiento RNeasy MinElute Cleanup de Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania). Se determinó la concentración de ARN en un espectrofotómetro UV (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Estados Unidos).

- 5 Se verificó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa. Después de la electroforesis durante 2 horas a 60 V, se tiñó el ARN utilizando azul de orto-toluidina.

*Síntesis y clonación de ADNc*

- 10 Se sintetizó ADNc utilizando el sistema Invitrogen Superscript Choice (Invitrogen, Breda, Países Bajos) para la síntesis de ADNc según las instrucciones del fabricante. Se cebó la primera cadena de ADNc utilizando oligo-d (T) o cebadores hexámeros aleatorios. Después de la síntesis de la segunda cadena, se ligaron adaptadores EcoRI para facilitar la clonación. Después de la fosforilación del ADNc adaptado a EcoRI, se extrajeron los enlazadores no ligados mediante cromatografía en columna. El ADNc resultante se ligó en el vector de expresión predigerido con EcoRI pBluescript II (Stratagene, La Jolla, Estados Unidos) y la mezcla de ligación se transformó en células competentes Top10 (Invitrogen).

- 15 Se determinó el extremo terminal 5' de la secuencia de ToTV utilizando el sistema 5'RACE para la amplificación rápida de extremos de ADNc (Life Technologies) utilizando dCTP según las instrucciones del fabricante.

20 *Análisis de ADNc*

- Después de la transformación, se analizaron clones recombinantes por la presencia de insertos mediante PCR utilizando cebadores específicos T3 y T7. Los productos de PCR se analizaron por el tamaño en un gel de agarosa al 1%. Los clones que contenían insertos de aproximadamente 1500 nucleótidos se utilizaron para su posterior análisis de secuencia. Los datos de secuencia resultantes se analizaron utilizando el paquete de programas DNASTAR.

25 *Determinación de las secuencias de aminoácidos de las tres proteínas de la cápside de ToTV.*

- 30 Se cargaron partículas de ToTV purificadas en un gel de PAGE desnaturizante y se separaron las proteínas de la cápside. Se aislaron las bandas de proteínas de la cápside del gel, se trataron con tripsina y los digestos se analizaron utilizando un espectrómetro de masas en tándem (MSMS) utilizando esencialmente el procedimiento descrito por Kinter y Sherman, 2000. Esto dio lugar a secuencias de aminoácidos (AA) de péptidos pequeños, cada una de las cuales mostró homología con la secuencia de aminoácidos predicha a partir de la secuencia de nucleótidos de ARN2 de ToTV. La comparación con los datos de las secuencias de otros virus se realizó con el paquete de programas PHYLIP.

35 Resultados

40 *Transmisión y propagación del virus*

- Para la propagación de ToTV, se podían utilizar *N. glutinosa* y *N. benthamina*. Las especies del tabaco *N. glauca* "67A" y *N. occidentalis* "P1" son muy susceptibles a ToTV y mostraron síntomas después de 3-4 días. Estas especies del tabaco se volvieron muy necróticas en poco tiempo y, por lo tanto, se consideraron más adecuadas como plantas indicadoras que como huéspedes de propagación. *N. glutinosa* y *N. benthamiana* reaccionan con lesiones cloróticas locales y una clorosis sistémica y deformación leve de las hojas.

45 *Purificación del virus*

- 50 La purificación de los viriones de tejido de hoja infectado resultó ser bastante difícil. El ToTV no puede resistir los disolventes orgánicos y tiende a agregarse cuando se centrifugaba a bajas temperaturas. El protocolo de purificación utilizado (véase 1.2.) dio lugar a dos bandas visibles que contenían el virus en el gradiente de sulfato de cesio. Las bandas aparecieron en la parte inferior del gradiente, lo que indica una densidad flotante bastante elevada en  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  igual o superior a 1,4 g/cm<sup>2</sup>.

- 55 La capacidad de infección de ToTV se ve afectado por el sulfato de cesio, pero no se pierde completamente cuando la concentración del virus en el material de partida era elevada. Las fracciones del gradiente de sulfato de cesio que contenían ambas bandas de virus eran infecciosas. No se determinó la capacidad de infección de las bandas individuales.

60 *Microscopía electrónica*

- Las dos bandas se examinaron mediante microscopía electrónica y ambas contenían partículas de virus de aproximadamente 28 nm de diámetro (figura 2).

65

*Análisis por PAGE*

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de las fracciones de virus purificadas, seguido de la tinción con plata del gel mostraron tres proteínas de la cápside (CP) de aproximadamente 23, 26 y 35 kDa (véase la figura 3 que indica fracciones de la parte superior (TAgV-T) y de la parte inferior (TAgV-B) del virus purificado).

*Aislamiento de ácidos nucleicos y análisis de ADNc*

El aislamiento de ARN de ambas bandas de virus juntas reveló dos ARN: aproximadamente 5,5 kb y 8 kb (véase la figura 4). El aislamiento del ARN de la banda superior dio lugar a sólo un fragmento de ARN de 5,5 kb.

El ARN de 5,5 kb de la banda superior se utilizó como molde para la síntesis y clonación de ADNc. Se realizaron reacciones de secuencia utilizando cebadores de secuencia directos e inversos (T3/T7 o M13F/M13R) sobre diferentes clones. Se realizó una amplificación rápida 5' de los extremos de ADN-c (RACE) para determinar el extremo 5' exacto del ARN. El análisis de los datos de secuencia resultantes, utilizando el paquete informático Lasergene® (DNASTAR, Inc., Madison, WI, Estados Unidos), dio lugar a la secuencia completa de ARN2 del virus (SEQ ID NO: 1; véase la figura 5). El tamaño del ARN es de 5.389 nucleótidos, excluyendo la cola poli A. En el ARN se encuentran dos marcos de lectura abierta (ORF). ORF1 se encuentra desde el nucleótido 182 hasta el 742, tiene 561 nucleótidos de longitud y codifica una proteína de 187 aminoácidos. No se encontraron homologías para esta secuencia en las bases de datos NCBI a nivel de proteína y de nucleótidos.

ORF2 se extiende desde el nucleótido 702 hasta el 4.298, tiene 3597 nucleótidos de longitud y codifica una proteína de 1.199 aminoácidos. Después de una búsqueda BLAST en la base de datos NCBI, se encontraron bajas homologías con varias poliproteínas virales. Para las homologías encontradas, los números de acceso de la base de datos NCBI se proporcionan junto con el nombre del virus y el tipo de proteína. Tanto las secuencias de ácidos nucleicos como las secuencias de aminoácidos derivadas en los tres marcos de lectura se utilizaron en un análisis BLAST. Se utilizó MAPDRAW del paquete informático Lasergene® para identificar los ORF.

*Mapas de ORF de ambos ARN:*

ARN1

ARN1 contiene un ORF (ORF1) con motivos típicos de helicasa, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Además, se observó un nivel bajo de homología de la secuencia de aminoácidos (aa) con un cofactor de proteasa (Pro-Co) del virus del mosaico leve de pachulí (PatMMV) (NP647592.1), para las posiciones de aminoácidos 106-338, con una identidad del 22%.

Se identificaron los motivos típicos de helicasa A (GKS), B (D), C (N) en las posiciones de aminoácidos 398 a 400, 444 y 495 del posible polipéptido.

Para la región de helicasa se encontraron las identidades más cercanas con el virus esférico del tungro del arroz (RTSV; 42% de identidad en un solapamiento de 140 aminoácidos), virus del enanismo clorótico del maíz (MCDV; 43% de identidad en un solapamiento de 137 aminoácidos), virus del moteado de la fresa (SMoV; 42% de identidad en un solapamiento de 135 aminoácidos) y virus de salpicado amarillo de chirivía (PYFV; 42% en un solapamiento de 138 aminoácidos). En la posible región VPG no se encontró ninguna similitud de secuencia con otros virus.

La mayor similitud de la proteasa se encuentra para los aminoácidos 1.000-1.100, se encuentra el 25% de identidad con el virus de la patata V (PW; Nla proteasa en un solapamiento de 86 aminoácidos).

La región RdRp entre los motivos I (KDE) a VII (FLSR) se encontró entre los aminoácidos 1.303-1.554 (Koonin 1991).

Las identidades más cercanas de la secuencia de poliproteína se encontraron con: virus esférico del tungro del arroz (RTSV) con una identidad del 29% en un solapamiento de 751 aminoácidos, virus del enanismo clorótico del maíz (MCDV) con una identidad del 28% en un solapamiento de 742 aminoácidos, virus de salpicado amarillo de chirivía (PYFV) con una identidad del 33% en 501 aminoácidos, virus esférico latente de manzana (ALSV) con una identidad del 32% en 472 aminoácidos, virus del moteado de la fresa (SMoV) con una identidad del 30% en 680 aminoácidos y virus de la hoja rasposa de la cereza (CRLV) con el 33% en 465 aminoácidos.

Tabla 2. Niveles globales de homología (en %) entre los motivos **RdRp** en el ORF1 en ARN1 de ToTV con los motivos RdRp de otros virus de plantas

	NIMV	PYFV	RTSV	SDV	SmoV	ToTV	ALSV	CRLV	MCDV
NIMV	100	32,7	33,9	88,6	49,4	33,1	39,6	39,6	35,1
PYFV		100	43,7	33,2	32,0	35,2	36,4	36,0	42,9
RTSV			100	34,3	32,7	35,1	37,5	35,1	69,4

	NIMV	PYFV	RTSV	SDV	SmoV	ToTV	ALSV	CRLV	MCDV
SDV				100	50,2	33,1	38,4	38,4	36,7
SMoV					100	35,7	40,6	38,5	38,5
ToTV						100	38,1	38,1	33,7
ALSV							100	79,5	35,5
CRLV								100	35,1
MCDV									100

*NIMV = virus infeccioso del moteado de naranja navel (Sadwa); PYFV = virus de salpicado amarillo de chirivía (Sequivirus); RTSV = virus esférico del tungro del arroz (Waikavirus); SDV = Virus del enanismo satsumae (Sadwavirus); SMoV = Virus del moteado de fresa (Sadwavirus); ToTV-virus del torrado de tomate (género propuesto); ALSV = virus esférico latente de la manzana (Cheravirus); CRLV = virus de la hoja rasposa del cerezo (Cheravirus); MCDV = virus del enanismo clorótico del maíz (Waikavirus)*

Tabla 3. Niveles globales de homología (en %) entre los motivos de **helicasa** en el ORF1 en ARN1 de ToTV con motivos de helicasa de otros virus de plantas

	SDV	SmoV	ToTV	ALSV	CRLV	MCDV	PYFV	RTSV
SDV	100	42,5	37,2	31,9	33,6	39,8	39,8	38,1
SMoV		100	42,5	31,0	31,9	32,7	33,6	32,7
ToTV			100	36,0	34,2	46,5	40,4	44,7
ALSV				100	86,7	34,5	31,0	30,1
CRLV					100	34,5	30,1	31,0
MCDV						100	39,8	69,0
PYFV							100	42,5
RTSV								100

*PYFV = virus de salpicado amarillo de chirivía (Sequivirus); RTSV = virus esférico del tungro del arroz (Waikavirus); SDV = Virus del enanismo satsumae (Sadwavirus); SMoV = Virus del moteado de fresa (Sadwavirus); ToTV-virus del torrado de tomate (género propuesto); ALSV = virus esférico latente de la manzana (Cheravirus); CRLV = virus de la hoja rasposa del cerezo (Cheravirus); MCDV = virus del enanismo clorótico del maíz (Waikavirus)*

5 ARN2:

ARN2 contiene dos ORF potenciales (figura 7). ORF1 codifica una proteína predicha de 187 aminoácidos con un peso molecular de 20 kDa. El análisis de secuencia no reveló homología con ninguna proteína de la base de datos EMBL. No se sabe si este ORF codifica una proteína real.

10 El segundo ORF que se solapa parcialmente con ORF1 comienza con tres codones de inicio ATG en el marco. Codifica una posible proteína de 1.198 aminoácidos con un peso molecular predicho de 134 kDa. La identificación de proteínas mediante espectrometría de masas de las proteínas de la cubierta aislados mapea claramente los tres cistrones de la proteína de cubierta en el extremo C-terminal de ARN2-ORF2.

15 La región N-terminal de la poliproteína ARN2-ORF2 codifica muy probablemente la posible proteína de movimiento (MP), dado que se descubrió un motivo LRVPM muy similar a la secuencia consenso de la proteína de movimiento propuesta LxxPxL (Mushegian, 1994) en la posición de aminoácido 262-267. No se hallaron otras homologías de secuencias en el extremo N-terminal de la ARN2 ORF2.

20 ORF2 codifica supuestamente cuatro proteínas que se deben escindir del precursor de la poliproteína mediante escisión proteolítica. Sin embargo, no se pudieron identificar homologías claras con sitios de escisión conocidos de la poliproteína. Las posiciones exactas de estos sitios de escisión todavía deben determinarse.

25 Para la secuencia de la poliproteína CP1, sólo se encontró alguna homología con parechovirus humano (HPeV) con una identidad del 21% en 103 aminoácidos.

30 Se encontraron identidades más cercanas de la secuencia de poliproteína CP2 con: virus de *Rhopalosiphum padi* (RhPV) con una identidad del 25% en 168 aminoácidos, virus de encefalomielititis aviar (AEV) con el 33% en 74 aminoácidos, virus celular de la reina negra (BQCV) con una identidad del 43% en 37 aminoácidos y virus de *Solenopsis invicta* (SINV-1) con una identidad del 30% en 51 aminoácidos. Con la secuencia de la poliproteína CP3 no se encontraron homologías.

35 *Regiones no traducidas (UTR)*

Las 3'UTR de ARN1 y ARN2 son de 1.210 nucleótidos y 1.092 nucleótidos, respectivamente. Existe una identidad del 98% en los últimos 988 nucleótidos de ambos ARN. Para confirmar que las regiones 3' de las UTR de ambos ARN son idénticas, se realizaron RT-PCR sobre el ARN viral total con un cebador inverso derivado de la región 3'-UTR idéntica y dos cebadores directos específicos de ARN. Se secuenciaron los productos de la PCR resultantes.

40

A partir de estos resultados, se concluyó lo siguiente: El virus aislado de plantas de tomate y provisionalmente llamado virus del torrado del tomate (ToTV) tiene partículas esféricas (icosaédricas) de aproximadamente 28 nm de diámetro. Después de la purificación, el virus muestra, como mínimo, dos bandas en un gradiente de sulfato de cesio. Ambas bandas combinadas son infecciosas cuando se inoculan en plantas del tabaco. Las partículas del virus parecen consistir, como mínimo, en tres proteínas de la cápside de aproximadamente 23, 26 y 35 kDa.

La fracción superior del gradiente de sulfato de cesio del virus contiene una molécula de ARN de aproximadamente 5,5 kb (ARN 2; SEQ ID NO: 1) y la fracción inferior una molécula de ARN de aproximadamente 8 kb (ARN 1; SEQ ID NO: 2)

La síntesis y clonación de ADNc, utilizando el ARN de 5,5 kb de la fracción superior viral, y el posterior análisis de información de la secuencia, dieron lugar a la recopilación de varios cóntigos en la SEQ ID NO: 1. Dos cóntigos contenían claramente una cola poli-A, lo que sugiere que el ARN viral tiene una cola poli-A. El análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos y de la secuencia de aminoácidos derivada no reveló ninguna homología significativa con ningún virus conocido de la base de datos EMBL.

La información anterior indica que el ToTV es un virus nuevo y hasta ahora no descrito. La información obtenida hasta ahora aún no permite una agrupación del virus en una familia o género particular de virus.

Para los propósitos del virus de detección e identificación del virus, se han diseñado dos conjuntos de cebadores de RT-PCR (tabla 4) basándose en la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 4: Cebadores de RT-PCR para la detección de ToTV

Grupo de cebadores A	longitud/ temperatura	Secuencia	SEQ ID No.
cebador directo	17 unidades	5'-GAGAGCCGGCATTACACA-3'	SEQ ID No.: 3
cebador inverso	17 unidades	5'-GCACAGCTTGGCGACAC-3'	SEQ ID No.: 4
Longitud del producto	493 pb		
Temperatura óptima de hibridación	54,8°C		
Grupo de cebadores B			
cebador directo	24 unidades	5'-CCCATCATCACCCCTCCTCTTCGTA-3'	SEQ ID No.: 5
cebador inverso	22 unidades	5'-TTCCAGTAATGATCCAACCAAT-3'	SEQ ID No.: 6
Longitud del producto	585 pb		
Temperatura óptima de hibridación	54,9°C		

Un protocolo de RT-PCR adecuado comprendería lo siguiente. Se aísla y purifica el ARN total a partir de aproximadamente 100 µg de material de hoja infectada utilizando un kit de purificación de ARN, tal como, por ejemplo, RNA-Easy de Qiagen. De este ARN total, se utiliza una cantidad de aproximadamente 1 µg en una mezcla de reacción de 50 µl de la reacción de RT-PCR Superscript One-Step (Invitrogen), cuya mezcla de reacción comprende además 25 µl de 2 x mezcla de reacción, 1 µl (100 ng) de cebador superior y cebador inferior, 1 µl de mezcla de RT/Taq y 22 µl de agua MilliQ. A efectos de transcribir de forma inversa del ARN en ADNc y amplificar este ADNc, se puede utilizar el siguiente programa de RT-PCR: etapa 1: 30 min a 50°C (reacción de transcripción inversa); etapa 2: 3 min a 94°C (activación de la Taq polimerasa); etapa 3: 30 segundos a 94°C; etapa 4: 30 segundos a 55°C; etapa 5: 1 min a 72°C; etapa 6: repetir las etapas (3 a 5) 40x; etapa 7: 10 min a 72°C; etapa 8: 10°C mientras sea necesario. Los productos de la PCR se pueden analizar en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE o TBE.

2.6. Determinación de las secuencias de aminoácidos de las tres proteínas de la cápside de ToTV.

Los fragmentos de la proteína de la cubierta más grande (CP1: aproximadamente 35 kDa) podían alinearse con partes de un área en el ORF2 de ARN2 (aminoácidos 487 a 729). Los fragmentos de la banda intermedia de la proteína de la cubierta (CP2: aproximadamente 26 kDa) podían alinearse con un área de ORF2 de ARN2 entre los aminoácidos 730 y 983.

Los fragmentos de la proteína de cubierta más pequeña (CP3: aproximadamente 23 kDa) podían alinearse con el extremo C-terminal de ORF2 de ARN2 (aminoácidos 984 a 1.195). A partir de estos resultados se puede concluir que las secuencias de codificación de las tres proteínas de la cápside se encuentran en el ORF2 de ARN2 (5,5 kb) de ToTV y, de este modo, las moléculas de ARN virales aisladas son parte de las partículas del virus ToTV.

Ejemplo 2. Aislamiento y caracterización del agente causal de marchitez.

En 2003, se encontraron plantas de tomate cultivadas en América Central (México y Guatemala) con síntomas similares a los síntomas del ToTV. El agente causal era sospechoso de ser viral. La enfermedad es conocida localmente con los nombres de "chocolate", "marchitez (virus)" o "enfermedad de las manchas de chocolate". Las plantas susceptibles cultivadas en el campo se infectaron de forma importante a partir de 2003.

El objetivo de la presente investigación fue comparar la secuencia del virus desconocido hasta ahora que causa la "enfermedad de las manchas de chocolate" con la secuencia de ToTV, tal como se ha aislado en el ejemplo 1.

5 Procedimientos

Se aisló el ARN de aproximadamente 100 µg de material de hoja infectada con la "enfermedad de las manchas de chocolate" utilizando el sistema de aislamiento de ARN total (Promega SV 96). Se utilizaron dos µl del ARN total en una mezcla de reacción de 50 µl de la reacción de RT-PCR Superscript One-Step (Invitrogen), cuya mezcla de reacción comprende además 25 µl de 2 x mezcla de reacción, 1 µl (100 ng) de cebador directo y cebador inverso, 1 µl de mezcla de RT/Taq y 22 µl de agua MilliQ. A efectos de transcribir de forma inversa del ARN en ADNc y amplificar este ADNc, se utilizó el siguiente programa de RT-PCR: etapa 1: 30 min a 50°C (reacción de transcripción inversa); etapa 2: 3 min a 94°C (activación de la Taq polimerasa); etapa 3: 30 segundos a 94°C; etapa 4: 30 segundos a 55°C; etapa 5: 1 min a 72°C; etapa 6: repetir las etapas (3 a 5) 40x; etapa 7: 10 min a 72°C; etapa 8: 10°C mientras sea necesario. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE o TBE.

Se utilizaron diferentes grupos de cebadores en la RT-PCR, que se sabía que se hibridaban a diferentes lugares con el ARN1 o ARN2 del genoma de ToTV.

20 Tabla 5: Cebadores de RT-PCT basados en la secuencia de ARN-2 de ToTV utilizados para la caracterización del virus causal de la enfermedad de la mancha de chocolate, tal como se utiliza en el ejemplo 2 y tal como se indica en la figura 7.

Grupo de cebadores P1048/1049:	Secuencia	SEQ ID No.
cebador directo	5'-CAAGCCATCACGGAACCTAC-3'	SEQ ID No.: 7
cebador inverso	5'-AGCATCTTCTTCCCTCCGCT-3'	SEQ ID No.: 8
Longitud del producto	Desde la base 36 – 544 = 508 bases	
Grupo de cebadores P1056/1057:		
cebador directo	5'-TGCTGAGGTGCTATCACTGG-3'	SEQ ID No.: 9
cebador inverso	5'-CACACTTCCACGATTTCCA-3'	SEQ ID No.: 10
Longitud del producto	Desde la base 2422 – 2955 = 533 bases	
Grupo de cebadores P1060/1061:		
cebador directo	5'-AAAGGAAAGAAGCAGCCACA-3'	SEQ ID No.: 11
cebador inverso	5'-GGAAATCTTGGTCAAGCCAG-3'	SEQ ID No.: 12
Longitud del producto	Desde la base 3599 – 4170 = 571 bases	
Grupo de cebadores P1064/1065:		
cebador directo	5'-GCAATGCCAGTGGTTCAGAG-3'	SEQ ID No.: 13
cebador inverso	5'-GGTCAAATGGATACTCGGGA-3'	SEQ ID No.: 14
Longitud del producto	Desde la base 4820 – 5327 = 507 bases	

25 Resultados

Los conjuntos de cebadores utilizados promovieron la amplificación de parte de la secuencia ToTV tal como se esperaba, pero la utilización de cuatro conjuntos de cebadores diferentes basados en la secuencia de ARN-2 (P1048/1049, P1056/1057, P1060/1061 y P1064/1065) en la RT-PCR también dieron lugar a la amplificación de parte del genoma de la "enfermedad de las manchas de chocolate". El sitio de hibridación de estos conjuntos de cebadores se ilustra en la figura 1.

Se secuenció el producto de la RT-PCR de los cuatro conjuntos de cebadores que amplificaban fragmentos de "enfermedad de las manchas de chocolate" y mostró una identidad del 100% con las partes correspondientes de la secuencia del genoma viral del virus, tal como se ha descrito en el ejemplo 1.

Ejemplo 3. Aislamiento y caracterización del agente causal de marchitez.

Después de los experimentos descritos en el ejemplo 2, se investigó material adicional de la planta enferma de la misma localización en México (Sinaloa). La enfermedad a la que se hace referencia se conoce localmente como "marchitez", lo que significa marchitado o debilitado. Debido a la semejanza en los síntomas de las hojas, se asumió que la enfermedad de la marchitez era causada por ToTV y los experimentos iniciales descritos en el ejemplo 2 confirmaron esta idea. Sin embargo, en las pruebas sobre material adicional, no pudo detectarse ToTV utilizando PCR con cebadores específicos de ToTV. En el material de prueba adicional, se encontró un virus esférico que compartía características con ToTV. En este ejemplo, se describe y caracteriza este nuevo virus, relacionado pero diferente de ToTV. Este nuevo virus se llama provisionalmente virus de la marchitez del tomate (ToMarV).

**Material y procedimientos***Transmisión y propagación del virus*

- 5 Se aisló ToMarV en 2005 a partir de una planta de tomate de Culiacán, Sinaloa, México, que mostró una necrosis severa. El aislado se designó como PRI-TMarV0601. Utilizando un tampón de fosfato de sodio/potasio 0,03 M, pH 7,7, el virus se inoculó mecánicamente y se mantuvo en *Nicotiana glutinosa* "PRI", *Physalis floridana* o *N. benthamiana*.

10 *Purificación del virus*

- Todas las etapas de centrifugación se llevaron a cabo a 6°C. Se recogieron hojas infectadas sistémicamente de *N. benthamiana* aproximadamente 14 días después de la inoculación y se homogeneizaron en 5 volúmenes (p/v) de tampón de extracción (Tris-HCl 0,1 M, pH 8 + Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 20 mM, Na-DIECA 10 mM en Na-EDTA 5 mM) y se apretaron  
15 través de una tela de queso. Se añadieron tres volúmenes de una mezcla 1:1 de cloroformo/butanol y después de la mezcla, la suspensión se centrifugó a 16.500 g durante 10 min. Se añadió Triton X-100 al 1% a la fase acuosa y se agitó durante 30 min. Se añadieron PEG 6000 al 5% y NaCl al 2,3% y la suspensión se agitó durante 1 hora. La suspensión se dejó reposar durante 1 hora y se centrifugó durante 15 minutos a 21.500 g. Los sedimentos se  
20 resuspendieron en un total de 80 ml de tampón de extracción, se centrifugaron durante 10 min a 15.000 g y el sobrenadante se colocó sobre un cojín de sacarosa al 30%. Después de la centrifugación durante 3 horas a 70.500 g, los sedimentos se resuspendieron en un total de 2 ml de tampón Tris pH 8,0 y se centrifugaron durante 2 min a 14.000 g. La suspensión de virus se cargó sobre un gradiente de sulfato de cesio al 10-40% y se centrifugó durante 16 h a 126.000 g. Se recogieron las bandas de virus y se dializaron frente a Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0.

25 *Microscopía electrónica*

Las suspensiones de virus se montaron en rejillas recubiertas de carbono-formvar, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y se examinaron en un microscopio electrónico Philips CM12.

30 *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

Las proteínas virales se separaron sometiendo las partículas del virus purificadas a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% (SDS-PAGE) [Laemmli UK (1970), Nature 277: 680-685] y se visualizaron mediante tinción con plata.

35 *Aislamiento y evaluación de ácidos nucleicos*

El virus purificado se concentró mediante centrifugación (a 115.000 g durante 2 h). Se extrajo ARN de las partículas de virus sedimentadas utilizando un kit RNeasy de Qiagen (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

- 40 La concentración de ARN se determinó en un espectrofotómetro UV-Beckmann. La integridad y el tamaño del ARN viral se verificaron en un gel de agarosa al 1% utilizando un sistema de formaldehído/formamida/tampón HEPES. Después de la electroforesis, el ARN se tiñó utilizando azul de orto-toluidina. El ARN total para RT-PCR se aisló con el mini kit de plantas RNeasy (Qiagen) de las plantas de *Nicotiana occidentalis* "P1" infectadas con ToMarV.

45 *RT-PCR y 5' RACE*

- Se obtuvieron fragmentos de PCR mediante RT-PCR de un tubo (sistema RT-PCR de acceso, Promega). Las RT-PCR se iniciaron utilizando un cebador de oligo dT universal [Van der Vlugt y otros (1999). *Phytopathology* 89: 148-155] y varios cebadores derivados de las secuencias de ARN 1 y ARN 2 de ToTV (respectivamente, números de acceso de GenBank DQ388879 y DQ388880). The regiones 5' de los ARN de ToMarV se determinaron dirigiéndose hacia el extremo 5' del genoma viral a través de la utilización repetida de un kit 5' RACE (Roche) en combinación con el sistema de PCR de alta fidelidad Expand (Roche), esencialmente tal como se ha descrito anteriormente [Ongus JR, y otros (2004) *J Gen Virol* 85: 3.747-3.755, Valles SM, y otros (2004) *Virology* 328: 151-157]. Los cebadores de ADNc para la estrategia con 5'-RACE y los conjuntos de cebadores para las reacciones de RT-PCR adicionales se basaron en los datos de la secuencia de ToMarV recién obtenidos.

*Secuenciación de nucleótidos y análisis de la secuencia*

- 60 Todos los productos de PCR de 5' RACE se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se secuenciaron directamente.

- El análisis de secuencia se realizó con un analizador genético Applied Biosystems 3100, utilizando el kit de secuenciación de ciclos con terminador ET DYEnamic (Amersham) y los cebadores que se utilizaron para la amplificación. Para fragmentos de PCR más largos, se utilizaron cebadores específicos de ToMarV para la secuenciación dirigida de cebadores.

Se analizaron los datos de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos y se ensamblaron utilizando el paquete DNASTAR (Lasergene).

5 Las comparaciones de secuencias con otros virus se realizaron con programas del paquete PHYLIP. Se realizaron múltiples alineamientos y filogenias con el programa CLUSTAL X después del arranque en 1.000 réplicas. Se observaron filogenias de consenso de unión de vecinos mediante el programa NJplot [Thompson JD, y otros (1997) *Nucleic Acids Res* 25: 4.876-4.882] y se imprimieron utilizando TreeView [Página RDM (1996) *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358].

10

## Resultados y discusión

### *Caracterización del virus*

15 ToMarV se transmitió fácilmente a un número de plantas indicadoras mediante inoculación mecánica. En la tabla 1, se proporciona una visión general de las plantas indicadoras utilizadas y sus reacciones a ToMarV y ToTV. La mayoría de los síntomas de ToMarV y ToTV en plantas indicadoras se parecen entre sí, a excepción de las reacciones en *P. floridana* y *Chenopodium quinoa*. ToTV causa una necrosis severa y desaparecen en *P. floridana*, en la que ToMarV induce sólo ocasionalmente necrosis en las hojas infectadas locales y un moteado sistémico. *C. quinoa* no muestra ninguna reacción cuando se inocula con ToTV, pero ToMarV induce lesiones necróticas precisas en las hojas inoculadas.

20

Los estudios de microscopía electrónica en tomates que muestran síntomas de marchitez y en hojas sistémicamente infectadas de *Nicotiana occidentalis* "P1" revelaron la presencia de partículas de virus esféricas con un diámetro de 28-30 nm. Las partículas de ToMarV se asemejan claramente a las partículas de ToTV en forma y tamaño.

25

En los intentos iniciales para purificar ToMarV se utilizó el protocolo de purificación diseñado para ToTV (véase el ejemplo 1). Este protocolo no condujo a bandas de virus visibles en el gradiente de sulfato de cesio (CsSO<sub>4</sub>) final. El análisis con microscópico electrónico de las fracciones del gradiente reveló que estaban presentes partículas de virus en la parte inferior del gradiente. Sin embargo, esta parte del gradiente contenía también componentes de la planta, ocultando las bandas del virus. Por lo tanto, se diseñó otro protocolo de purificación, en el que la separación del virus de los componentes de la planta se vio favorecido por la utilización de una mezcla de cloroformo-butanol. Este protocolo dio lugar a una banda difusa en el gradiente de CsSO<sub>4</sub>. Este resultado está de acuerdo con el obtenido para las purificaciones de ToTV, que siempre produjeron dos bandas distintas en la centrifugación con gradiente de CsSO<sub>4</sub>. La banda de ToMarV se recogió del gradiente y se verificó mediante microscopía electrónica. Los viriones del tamaño esperado de 28 nm estaban presentes en la banda recogida y eran infecciosas cuando se transmitían mecánicamente a las plantas de prueba. Los viriones purificados también se transmitieron mecánicamente a las plantas de tomate, que mostraron síntomas característicos de la enfermedad de la marchitez dos semanas después de la inoculación. La presencia de ToMarV en estas plantas se confirmó mediante microscopía electrónica y RT-PCR.

30

35

40

Los viriones purificados se sometieron a SDS-PAGE y se detectaron tres proteínas virales con tamaños estimados de 35, 26 y 24 kDa, llamadas respectivamente Vp35, Vp26 y Vp24 (figura 11A). El número y tamaños moleculares estimados de las proteínas de la cubierta viral de ToMarV son los mismos que se encontraron previamente para ToTV (véase el ejemplo 1).

45

Las preparaciones de virus purificadas del virus de la marchitez del tomate mostraron dos moléculas de ARN en un gel de ARN desnaturalizante: ARN1 de un tamaño estimado de 7,5 kb y ARN2 con un tamaño estimado de 4 kb (figura 11B.). El número de ARN que se encuentran está de acuerdo con ToTV, pero sus tamaños estimados son más pequeños (8,5 y 5,5 kb para ARN1 y ARN2 de ToTV, respectivamente).

50

### *Análisis de ARN viral*

Basándose en los datos biológicos y estructurales, como los síntomas de plantas indicadoras, tamaños y morfología de partícula, número y tamaños de las proteínas de la cubierta, y el número de ARN obtenidos para ToMarV, se sospechó una posible relación con ToTV. Por lo tanto, se utilizaron diferentes cebadores en dirección 5' basados en las secuencias de ARN1 y ARN2 de ToTV (DQ388879 y DQ388880) en combinación con un cebador oligo-dT general, para llevar a cabo reacciones de RT-PCR. Esto dio lugar a un número limitado de fragmentos de PCR, lo que indica las posibles diferencias en las secuencias de ARN entre los dos virus. El análisis de secuencias de estos fragmentos reveló bajos niveles de homología con los ARN 1 y 2 de ToTV. Basándose en la información de secuencia obtenida, se generaron nuevos cebadores de ADNc y se utilizaron para obtener información de la secuencia adicional en una estrategia de direccionamiento de secuencia 5'-RACE.

60

Se utilizaron cebadores específicos de ToMarV para las RT-PCR para confirmar las secuencias de ambos ARN en dos orientaciones.

65

ARN1

5 El ARN1 (figura 8) consiste en 7221 nucleótidos (nts), sin cola poli(A) y contiene un marco abierto de lectura (ARN1-ORF1) de 6453 nts que codifica una poliproteína predicha de 2.151 aminoácidos (aa) con una masa molecular de 237 kDa (figura 12). El primer AUG en el marco se encuentra en las posiciones de nucleótidos 141-143. El ORF tiene un codón de parada UGA en las posiciones 6.594-6.596. La posible secuencia de poliproteína contiene varias regiones conservadas con motivos típicos para un cofactor de proteasa, helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp).

10 Se identificaron los motivos típicos de helicasa A (GKS), B (D), C (N) en las posiciones de aminoácidos 397-399, 443 y 494 del posible polipéptido. La región de RdRp se pudo identificar entre el aminoácido 1.305 y 1.553 mediante la presencia de los motivos típicos I (KDE) a VII (FLSR) [Koonin EV (1991). *J Gen Virol* 72: 2197].

15 La región de codificación de ORF1 muestra una identidad global del 65% con el ARN1 de ToTV (DQ388879), tanto a nivel de nucleótidos (6.474 nucleótidos) como a nivel de aminoácidos (2.158 aminoácidos).

20 La región de helicasa entre los motivos A y C [Gorbalenya AE, y otros (1990). *FEBS Lett* 262: 145-148] en la parte C-terminal de ARN1-ORF1 mostró una identidad de aminoácidos del 95,6% con la región correspondiente de ToTV y niveles de identidad significativamente más bajos con otros virus que van desde el 46,9% en el virus del enanismo clorótico del maíz (MCDV, género *Waikavirus*, AAV86083) hasta el 25,4% para el virus de la parálisis aguda de la abeja (ABPV, especies no asignados en la familia *Dicistroviridae*, NP\_066241).

25 Los niveles de identidad de aminoácidos para el motivo RdRp en ORF1 de ARN1 fueron relativamente elevados con ToTV (78,2%) y significativamente inferiores con otros virus, variando desde el 15,3% para el virus de la encefalomiелitis aviar (AEV, género *Hepatovirus*, NP\_653151) hasta el 25,9% para el virus latente de los anillos de la fresa (SLRSV, género *Sadwavirus*, NC\_006764). Estos niveles de identidad indican un nivel cercano de la relación entre ToMarV y ToTV.

30 Una búsqueda BLAST con los datos disponibles por los inventores también reveló un nivel notablemente elevado de homología de secuencia global (95%) con una secuencia parcial en la base de datos NCBI del virus de la necrosis apical del tomate (ToANV, número de acceso de GenBank EF063641) que sólo estuvo disponible durante el transcurso del trabajo de los inventores. En la región de codificación de ARN1, el nivel global de identidad entre ToMarV y ToANV es del 96% a nivel de nucleótidos y del 99% a nivel de proteínas con los niveles de identidad de aminoácidos del 99,3 y 100% para los motivos de RdRp y helicasa, respectivamente. Estos porcentajes sugieren un nivel cercano de la relación entre ToMarV y la secuencia parcial del virus presentado con el nombre de virus de la necrosis apical (ToANV).

ARN2

40 ARN2 (figura 9) consiste en 4.906 nucleótidos, y en analogía con ToTV, contiene dos marcos abiertos de lectura (ARN2-ORF1 y ARN2-ORF2) que codifican dos poliproteínas predichas (figura 12). El nivel global de identidad de secuencia entre ARN2-ORF1 de ToMarV y ToTV es del 62,1%.

45 La identidad de secuencia más elevada (80%) se encontró con la secuencia parcial publicada de ToANV-ARN2 (No. de acceso de Genbank EF063642). En la región de codificación, la identidad es del 78% a nivel nucleótidos y del 90% a nivel de proteínas.

50 En analogía con ToTV, la región N-terminal de la poliproteína ARN2-ORF1 codifica muy probablemente la posible MP, ya que se encontró un motivo LRVPT muy similar a la secuencia consenso de la proteína de movimiento propuesta LxxPxL [Mushegian AR (1994). *Arch Virol* 135: 437-441].

La secuencia de la posible región de la proteína de movimiento de ToANV no está disponible.

55 El orden relativo de las tres posibles proteínas de la cubierta del virus de la marchitez del tomate en el ARN2-ORF1 derivaba de las comparaciones directas de secuencias con las CP de ToTV. No se pudieron identificar homología obvias con las regiones que se identificaron anteriormente como posibles sitios de escisión de CP para CP de ToTV [Verbeek M, y otros (2007). *Arch Virol* 152: 881-890].

60 Para ToTV, se secuenciaron las proteínas de la cubierta para localizar los genes de las proteínas de la cubierta en la secuencia de ARN2. Se comparan las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cubierta individuales de ToMarV, ToTV y ToANV.

ToMarV-Vp35 muestra una identidad del 89% y el 72% con ToANV y ToTV.

ToMarV-Vp26 muestra una identidad del 98% y el 86% con ToANV y ToTV.

ToMarV-Vp24 muestra una identidad del 94% y el 71% con ToANV y ToTV.

65

*Regiones no traducidas 5' y 3' (UTR)*

El tamaño de 5'-UTR de ARN1 es de 140 nucleótidos. La de ARN2, sin embargo, no se pudo determinar con fiabilidad. Las 3'-UTR de ARN1 y ARN2 tienen 628 nucleótidos y 655 nucleótidos, respectivamente, de longitud y comparten un nivel global de identidad del 91%. Los 553 nucleótidos más 3'-terminales de ambos ARN están casi perfectamente conservados (99% de identidad). Las regiones idénticas próximas en la parte 3' de ambas 3'-UTR es una característica que el virus de la marchitez del tomate comparte con ToTV. Sin embargo, las comparaciones directas de secuencias entre las 3'-UTR totales de ARN1 y ARN2 de ToMarV y ToTV revela sólo una identidad de secuencia del 49,0% y el 48,9%, respectivamente, entre los dos virus.

Una comparación con las 3'-UTR de ToANV con longitudes respectivas de 630 nucleótidos y 650 nucleótidos de ARN1 y ARN2, muestra una identidad de secuencia del 88,5% y el 85,6% con ARN1 y ARN2 de ToMarV. Esto es significativamente inferior a los niveles de identidad observados en las regiones de helicasa y CG-GDD que se encuentran en el ORF codificado en ARN1.

*Posición taxonómica de ToMarV*

El virus de la marchitez del tomate comparte características de viriones y su organización del genoma con ToTV, pero basándose en los niveles de identidad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los dos virus, están relacionados, pero son distintos. Se observan altos niveles de identidades destacablemente elevados entre ARN1 y ARN2 de ToMarV y una secuencia depositada en la base de datos NCBI con el nombre de virus de la necrosis apical del tomate (ToANV). No hay datos adicionales disponibles sobre el virus del que proceden estas secuencias parciales. Sin embargo, los niveles relativos bajos de las identidades de secuencia de nucleótidos (menos del 90%) en las 3'-NTR de ARN1 y ARN2 (88,5% y 85,6%, respectivamente), así como menos del 90% de identidad de aminoácidos (89%) en la posible CP más grande (Vp36) entre los dos virus, sugiere que los dos virus no son idénticos y pueden ser cepas o aislados del mismo virus. Se necesitarán datos biológicos y moleculares adicionales sobre el virus del que procede la secuencia de ToANV para determinar su relación precisa con ToMarV.

Se realizaron análisis filogenéticos basados en la región de aminoácidos entre el motivo CG de la proteasa [Bazan JF, Fletterick RJ (1988). *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7872-7876] y el sitio activo GDD de RdRp [Argos P (1988). *Nucleic Acids Res* 16: 9909-9916] en el ARN1-ORF para determinar las relaciones entre el virus de la marchitez del tomate, ToTV y otros virus de los géneros *Sadwavirus*, *Cheravirus* y las familias *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Dicistroviridae* y *Picornaviridae*. Se propone que esta región es un buen predictor taxonómico para clasificar los virus similares a picorna virus [Ikegami M y otros (2002) "Taxonomía de especies reconocidas y posibles especies en la familia Comoviridae" ("Taxonomy of recognized and putative species in the family Comoviridae"). XII IUMS Reunión de virología, París, Francia, 27 de julio - 12 agosto de 2002]. El dendrograma resultante (figura 13A) muestra que el virus ToMarV se agrupa con ToTV y ToANV y confirma la posición taxonómica separada de estos virus del género *Cheravirus*. Un análisis filogenético similar basándose en la región de helicasa entre los motivos A y C [Gorbalenya AE, y otros (1990). *FEBS Lett* 262: 145-148] (aminoácidos 397-494) confirma las posiciones taxonómicas de ToMarV, ToTV y ToANV (figura 13B). Para este motivo, estos virus parecen estar más estrechamente relacionados con los géneros *Waikavirus* y *Sequivirus*.

Los datos que se presentan en este ejemplo describen el virus de la marchitez del tomate (ToMarV) como un nuevo virus de planta de tipo picorna virus, relacionado, pero diferente, del virus del torrado del tomate (ToTV) [Verbeek M, y otros (2007) *Arch Virol* 152: 881-890]. ToMarV y ToTV se separan claramente de otros virus de tipo picorna virus de plantas y es probable que pertenezcan al mismo nuevo género nuevo, aún sin nombre.

## LEYENDA DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra una fotografía de los síntomas de la enfermedad de ToTV en las hojas de una planta de tomate causada por ToTV-E01.

La figura 2 muestra una micrografía electrónica de partículas de ToTV-E01 purificadas. Las partículas tienen aproximadamente 28 nm de diámetro.

La figura 3 muestra el resultado de un gel PAGE teñido con plata de fracciones de la parte superior (TAgV-T) y de la parte inferior (TAgV-B) del virus ToTV-E01 purificado, indicando las tres proteínas de la cápside de aproximadamente 23, 26 y 35 kDa.

La figura 4 muestra el resultado de una electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. Los tamaños de los segmentos están indicados en kilobases (kb). El gel se tiñó utilizando azul de orto-toluidina. M: patrón de tamaño molecular. TAgV: 1 µg de ARN de ToTV-E01 aislado.

La figura 5 muestra la secuencia completa de la molécula de ARN 2 de ToTV-E01 (SEQ ID NO: 1).

La figura 6 muestra la secuencia completa de la molécula de ARN 1 de ToTV-E01 (SEQ ID NO: 2).

La figura 7 muestra la estructura general del virus ToTV-E01, indicado el sitio de hibridación de los diversos conjuntos de cebadores utilizados en el ejemplo 2 a ARN 2.

La figura 8 muestra la secuencia completa de la molécula de ARN 1 PRI-TMarV0601 (SEQ ID NO: 15).

La figura 9 muestra la secuencia completa de la molécula de ARN2 de PRI-TMarV0601 (SEQ ID NO: 16).

La figura 10 muestra los síntomas típicos del virus de la marchitez del tomate en **A**) hojas de tomate: necrosis

rodeada por un área amarilla o verde brillante, que comienza en la base de los folíolos, y **B**): frutos del tomate: anillos y parches necróticos.

La figura 11 muestra en el panel A) el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) de las proteínas de la cápside de ToMarV. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. 1) marcadores de peso molecular (Bio-Rad Protein Precision Plus Protein Standards (nota: los patrones preteñidos de 37 kDa y 50 kDa no se tiñen en el procedimiento de tinción con plata utilizado), 2) viriones de ToMarV purificados después de la centrifugación con gradiente de densidad flotante de Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; en el panel B) el resultado de electroforesis en gel de agarosa desnaturante de ARN extraído de viriones de ToMarV y teñidos con azul de orto-toluidina. 1: patrón de tamaño molecular (escalera de ARN de 0,24 - 9,5 kb de Invitrogen); 2: ARN purificado a partir de viriones de ToMarV. Las flechas indican las posiciones de las bandas de ARN de ~ 3,5 kb y ~ 7,5 kb.

La figura 12 muestra la organización del genoma de ToMarV.

La figura 13 muestra un análisis filogenético de ToMarV (PRI-TMarV0601) y los virus relacionados (por ejemplo, ToTV-E01) basándose en la alineación de A) la región entre el motivo CG de proteasa y el motivo GDD de RdRp de ARN1; y B) la región de helicasa entre los motivos A y C de ARN1.

## REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990). "Herramienta básica de búsqueda de alineaciones locales" ("Basic local alignment search tool"). *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997). "BLAST con huecos y PSI-BLAST: Una nueva generación de programas de búsqueda en bases de datos de proteínas" ("Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs"). *Nucl. Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** eds. (1998) "Protocolos actuales en biología molecular" ("Current protocols in molecular biology"). V.B. Chanda, series ed. New York: John Wiley & Sons.
- Barany, F.** (1991) "Detección de enfermedad genética y amplificación de ADN utilizando ligasa termoestable clonada" ("Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Noordaa, van der J.** (1990) "Procedimiento rápido y simple para la purificación de ácidos nucleicos" ("Rapid and simple method for purification of nucleic acids"). *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.
- Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987) "Procedimiento de una etapa de aislamiento de ARN mediante la extracción ácida con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo" ("Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction"). *Anal. Bio.* 162:156- 159.
- Clark, M.F., Adams A.N.** (1977) "Características del procedimiento con microplacas de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la detección de virus de plantas" ("Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection plant viruses"). *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. Strober, W.** (Eds.) (1997) "Protocolos actuales en inmunología" ("Current Protocols in Immunology"). John Wiley & Sons Inc. Baltimore.
- Compton, J.** (1991) "Amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos" ("Nucleic acid sequence-based amplification"). *Nature* 1991, 350:91-92.
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O.** (1984) "Grupo completo de programas de análisis de secuencias para el VAX" ("A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX"). *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395.
- Dijkstra, J., de Jager, C.** (Eds.) (1998) "Virología practica de plantas – protocolos y ejercicios" ("Practical Plant Virology - Protocols and Exercises"), Springer
- Duffus, J.E., Liu, H.Y., Wisler, G.C.** (1996) "Virus de la clorosis infecciosa del tomate – un nuevo virus del tipo clostero transmitido por *Trialeurodes vaporariorum*" ("Tomato infectious chlorosis virus - a new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*"). *European Journal of Plant Pathology*, 102(3), 219-226.
- Felsenstein, J.** 1989. "PHYLIP – paquete de deducción de filogenia (versión 3.2)" ("PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2)"). *Cladistics* 5: 164-166.
- Guatelli, J.C., Whitfield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D., Gingeras, T.R.** (1990) "Amplificación is térmica in vitro de ácidos nucleicos mediante reacción multienzimática modelada después de replicación retroviral" ("Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a mutienzyme reaction modeled after retroviral replication"). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878.
- Hagiwara, K., Ichiki, T. U., Ogawa, Y., Omura, T., Tsuda, S.** (2002). "Una única sustitución de aminoácido en la proteína de 126 kDa del virus moteado suave del pimiento se asocia con la atenuación de síntomas en el pimiento; la secuencia de nucleótidos completa de una cepa atenuada, C-1421" ("A single amino acid substitution in 126-kDa protein of Pepper mild mottle virus associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421"). *Arch Virol* 147:833-340.
- Harlow, E. and Lane, D.** (1988) "Anticuerpos: un manual de laboratorio" ("Antibodies: A Laboratory Manual"). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Hirata, H., Lu, X., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M. Namba, S.** (2003) "Una única sustitución silenciosa en el genoma del virus de la muesca del tallo de la manzana provoca la atenuación de síntomas" ("A single silent substitution in the genome of Apple stem grooving virus causes symptom attenuation"). *J Gen Virol* 84:2579-2583.
- Jacobs M.V., Snijders P.J., van der Brule A.J.** (1997) "Un procedimiento de inmunoensayo enzimático por PCR mediado por el cebador general (GP5+/GP6+) para la rápida detección de 14 genotipos de alto riesgo y 8 genotipos

- de bajo riesgo del virus del papiloma humano en raspado cervical" ("A general primer (GP5+/GP6+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 8 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings"). *J Clin Microbiol* 35:791-795.
- 5 **Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P., Miller, N.** (eds.) (1998) "Manual de HPLC" ("Handbook of HPLC"). Marcel Dekker, New York.
- Kinter, M., Sherman, N.E.** (2000) "Secuenciación e identificación de proteínas utilizando espectrometría de masas en tándem" ("Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry"). Wiley Interscience.
- Koonin, E.V.** (1991) "La filogenia de ARN polimerasas dependientes de ARN de virus de ARN de cadena positiva" ("The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses"). *J Gen Virol* 72:2197-2206.
- 10 **Kwoh, D.Y., Davis, G.R., Whitefield, K.M., Chappelle, H.L., DiMichele, L.J., Gingeras, T.R.** (1989) "Sistema de amplificación basado en la transcripción y detección de virus de inmunodeficiencia humano tipo I amplificado con un formato de hibridación en sándwich basado en esferas" ("Transcription-Based Amplification System and Detection of Amplified Human Immunodeficiency Virus Type 1 with a Bead-Based Sandwich Hybridization Format"). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 1173-1177.
- 15 **Laemmli, U. K.** (1970) "Escisión de proteínas estructurales durante el ensamblamiento de la cabeza del bacteriófago T4" ("Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4"). *Nature* 227, 680-685.
- Lerner, R.A., Kang, A.S., Bain, J.D., Burton, D.R., Barbas, C.F.** (1992) "Anticuerpos sin inmunización" ("Antibodies without immunization. *Science* 258:1313-1314.
- Lizardi, P.M., Guerra, C.E., Lomeli, H., Tussie-Luna, I, Kramer, F. R.** (1988) "Amplificación exponencial de sondas de hibridación de ADN recombinantes" ("Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes"). *Biotechnology* 6, 1197-1202.
- Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N., Wells, J.A.** (1991) "Selección de proteínas de unión de alta afinidad mediante la expresión en fagos monovalentes" ("Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display"). *Biochem.* 30(45): 10832-8.
- 25 **Lu, X., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M., Namaba, S.** (2001). "Mutagénesis aleatoria en un genoma viral de planta utilizando una cepa de Escherichia coli mutante deficiente en la reparación de ADN" ("Random mutagenesis in a plant viral genome using a DNA repair-deficient mutator Escherichia coli strain"). *J Virol Methods* 94:37-43.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G.** (1992a) "Evolución molecular de proteínas en fagos filamentosos" ("Molecular evolution of proteins on filamentous phage"). *Journal of Biological Chemistry*, 267, 16007-16010.
- 30 **Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M. Winter, G.** (1992b). "Derivación de la inmunización: construcción de anticuerpos humanos de alta afinidad mediante barajado de cadenas" ("By passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling"). *Biotechnology* 10: 779:783.
- Meinkoth J., Wahl G.** (1984) "Hibridación de ácidos nucleicos inmovilizados sobre soportes sólidos" ("Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports"). *Anal Biochem*, 138(2):267-284.
- 35 **Mullis, K.B., Faloona, F.A.** (1987) "Síntesis específica de ADN in vitro a través de una reacción en cadena catalizada por polimerasa" ("Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction"). *Meth. Enzymol.* 155:335-350.
- Pierik, R.L.M.** (1999) "Cultivo in vitro de plantas superiores" ("In vitro Culture of Higher Plants"), 4ª edición, 360 páginas, ISBN: 0-7923-5267-X.
- 40 **Rose, N., DeMacrió, E., Fahey, J., Friedman, H., Penn, G.** (1997) "Manual de inmunología en laboratorio clínico" ("Manual of Clinical Laboratory Immunology"). American Soc. Microbiology Press, Washington, D.C
- Sambrook, J., Russell D.W., Sambrook, J.** (2001) "Clonación molecular: un manual de laboratorio" ("Molecular Cloning: a Laboratory Manual"). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- 45 **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) "Secuenciación de ADN con inhibidores de terminación de la cadena" ("DNA sequencing with chain-terminating inhibitors"). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74; 5463-5467.
- Schagger H., von Jagow, G.** (1987) "Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio-tricina para la separación de proteínas en el intervalo de 1 a 100 kDa" ("Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa"). *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- 50 **Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughs, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heins, C., Kent, S.B.H., Hood, L.E.** (1986) "Detección fluorescente en análisis automatizado de secuencias de AND" ("Fluorescent detection in automated DNA sequence analysis"). *Nature* 321:673-681.
- Swofford, D. L.** (2000). "PAUP\*: análisis filogenético utilizando parsimonia (\*y otros procedimientos)" ("PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)"). 4ª edición. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- 55 **Takeshita, M., Suzuki, M., Takanami, Y.** (2001). "La combinación de aminoácidos en la proteína 3a y la proteína de cubierta del virus del mosaico del pepino determina la expresión de los síntomas y la propagación viral en calabacino" ("Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of Cucumber mosaic virus determines symptom expression and viral spread in bottle gourd"). *Arch Virol* 146:697-711.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.** (1997) "La interfase de ventana ClustalX; estrategias flexibles para la alineación de secuencias múltiples ayudada por herramientas de análisis de la calidad" ("The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools"). *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.
- 60 **Thompson, J.R., Perry, K.L., De Jong, W.** (2004a) "Un nuevo virus de la patata en un nuevo linaje de virus de tipo picorna virus" ("A new potato virus in a new lineage of picorna-like viruses"). *Arch Virol.* 149:2141-2154.
- 65 **Thompson, J.R., Perry, K.L., De Jong, W.** (2004b) "La caracterización de un nuevo virus de tipo picorna virus que infecta el tomate" ("The characterization of a new picorna-like virus infecting tomato"). Libro resumen de la 23ª

reunión anual de la American Society for Virology, Montreal, Canada, Julio 2004.

**Tijssen, P.** 1993. "Técnicas de laboratorio en bioquímica e hibridación en biología molecular con sondas de ácidos nucleicos" ("Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes"), parte I, capítulo 2 "Visión general de principios de hibridación y la estrategia de ensayos con sondas de ácidos nucleicos" ("Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays"), Elsevier. New York.

**Van den Brule, A.J.C., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L.M., Meijer, C.J.L.M., Snijders, P.J.F.** (2002) "PCR con GP5+/6+ seguido de análisis de transferencia de línea inversa permite la identificación rápida y con alto rendimiento de genotipos del virus del papiloma humano" ("GP5+/6+ PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes"). *J. Clin. Microbiol.* 40:779-787.

**Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguét, J.G., Pérez de San Román, C., Sanz, A.** (1986) "Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos para el virus de la tristeza de los cítricos y sus utilidades para el diagnóstico" ("Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis"). *J. Gen. Virol.* 67:91-96.

**Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., Malinowski, D.P.** (1992) "Amplificación del desplazamiento de cadenas – una técnica de amplificación de ADN in vitro, isotérmica" ("Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique"). *Nucleic Acids Res* 20:1691-1696.

**Walker, J.M.** 2004. "Protocolos de PCR en CD" ("PCR Protocols on CD"). Humana Press.

**Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H.Y., Lowry, D.S., Duffus, J.E.** (1998) "Virus de la clorosis del tomate: un nuevo closterovirus bipartito, limitado a floemas, transmitido por la mosca blanca, del tomate" ("Tomato chlorosis virus: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato"). *Phytopathology*, 88(5), 402-409.

**Young R.A., Davis, R.W.** (1983) "Aislamiento eficaz de genes utilizando sondas de anticuerpos" ("Efficient isolation of genes using antibody probes"). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1194-1198.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la figura 8 y la figura 9, secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la figura 8 y la figura 9, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, y sus cadenas complementarias.
- 10 2. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico, según la reivindicación 1.
- 15 3. Polipéptido aislado o recombinante que se puede obtener a partir de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o a partir de un virus que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9 y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, en el que dicho polipéptido se selecciona del grupo que comprende las proteínas de la cápside de 23, 26 y 35 kDa, la helicasa, la ARN polimerasa dependiente de ARN y la posible proteína de movimiento (MP) de ToMarV, tal como se indica en la figura 12.
- 20 4. Antígeno que comprende un polipéptido, según la reivindicación 3.
- 25 5. Anticuerpo dirigido de manera específica contra el antígeno, según la reivindicación 4, de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o contra un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo.
- 30 6. Procedimiento para la producción de un anticuerpo contra un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o contra un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, que comprende las etapas de:
- 35 45 a) proporcionar el virus, o una proteína o fragmento de péptido del mismo;  
b) inmunizar un huésped vertebrado apropiado con dicho virus, proteína o fragmento de péptido, y  
c) recoger de la sangre o esplenocitos de dichos huéspedes vertebrado, anticuerpos contra dicho virus, proteína o fragmento de péptido.
- 50 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, que comprende además las etapas de seleccionar un esplenocito productor de anticuerpos, fusionar dicho esplenocito a una línea celular de hibridoma inmortalizado y permitir la fusión de dicho hibridoma para producto anticuerpo monoclonales.
- 55 8. Procedimiento para identificar un aislado viral como un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o como un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, que comprende hacer reaccionar dicho aislado viral o un componente del mismo con un cebador específico de ToMarV o un anticuerpo, según la reivindicación 5.
- 60 9. Procedimiento para detectar la presencia de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung

- 5 von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o de un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, en una muestra que comprende determinar en dicha muestra la presencia del virus o un componente del mismo mediante la reacción de dicha muestra con un cebador específico de ToMarV o un anticuerpo, según la reivindicación 5.
- 10 10. Procedimiento para identificar una planta que es resistente a un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o a un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, que comprende las etapas de:
- 15 a) exponer una planta o parte de una planta a una dosis infecciosa del virus, e  
b) identificar dicha planta como una planta resistente cuando, después de dicha exposición,
- 20 - los síntomas de la enfermedad en dicha planta o parte de la planta permanecen ausentes o se retrasan en la expresión o, como mínimo, se reducen en su gravedad o se localizan en relación con una planta de control susceptible, y/o  
- el virus o las secuencias genómicas del mismo no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia del virus se reduce, como mínimo, cuantitativamente, en relación a una planta de control susceptible.
- 25 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que en la etapa b) la presencia del virus en dicha planta o parte de la planta se determina mediante la realización de un procedimiento, según la reivindicación 9.
- 30 12. Utilización de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o de un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, su genoma o partes del mismo que confieren resistencia, como agente antiviral.
- 35 13. Utilización de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o de un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, su genoma o partes del mismo, como vector de expresión.
- 40 14. Utilización de un virus de planta llamado virus de la marchitez del tomate (ToMarV), depositado con la referencia de los depositantes PRI-TMarV0601 el 10 de julio de 2007 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en Braunschweig, Alemania, recibiendo el material depositado el número de acceso DSM 19656, o de un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la figura 8 y la figura 9, y las secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 98% a las mismas, en las que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos del virus de la marchitez del tomate, tal como se determina mediante el análisis de secuencia del genoma viral completo, su genoma o partes del mismo, para la premunición de una planta.
- 45 50 55

Figura 1



Figura 2

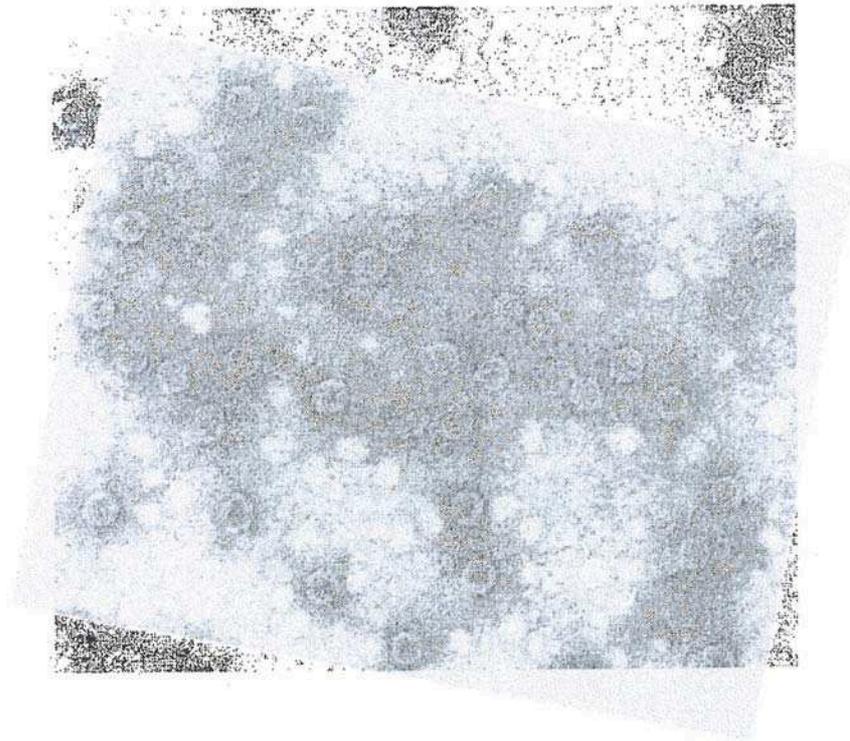


Figura 3

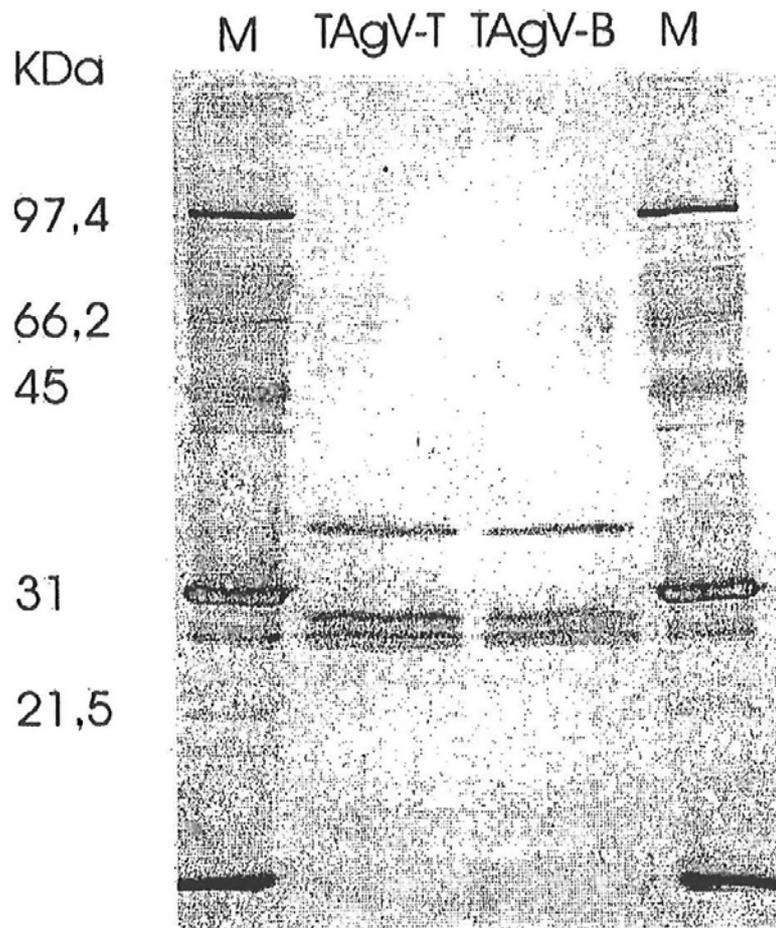


Figura 4

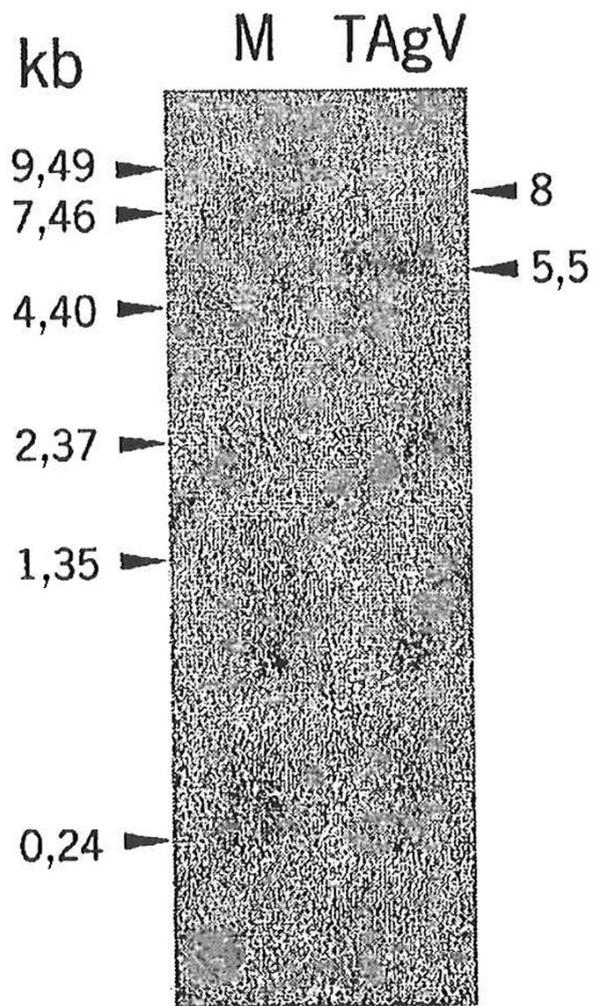


Figura 5

SEQ ID NO: 1

(Secuencia completa de ARN 2)

TTTAAAAGAATAATTTTATACAATATTTATGTGATCCAAGCCATCACGGAACCTACGTCGTTCCCTA  
 AGATATTGTATCAATTATCTTTGCTGTTACCATTTTGAGTGCACCGTCAACTGAAGGAACCTACGC  
 CGTTTCCAAGGACAGTGTATCTTTGTTATTTATTTGGTTACATCTCTATGTCATTTATTTCTCG  
 TTTGAATACATCTCTTGAAGAGGAGGCATTTCAACAAGCAAGTTGCAGACTCTCAGTGGGTGTGTTT  
 GGTGATACAGGCTCTGGCaTAATAAACAGTGATCCAACCTCTAGACTTCAAGATTTGTCCCAAGAC  
 AGGTGGAGCAATTTCTGTTCTATCTGTTTTCGTGGCAAAACAATAGCCCTCAACTGGTTCCTGGTCA  
 TTATTTACTGCGAAGTGGAACTTGGCCAATTACTGGCGTTAAGCTATCTGGCTTACTAGTTCATAG  
 ATCAATTCGTTTGGAAACCACCAGAAAACCTCTAGAAGCTCAGAGGATTTCTGTATCCCAGCAAGC  
 ATCTTCTTCCCTCGCTGCTGGTGCAGGAAAACAACCACAAGTAACGCTTACACAATTACAAGA  
 GGAGCTTGACGAGGCCAAAACCTCGCTTAGCTCTCAAAGAGAAAGAGTTACTTGAAGCTCTATCCGA  
 AATATCCAAATTAAGATTGCAATTGTCCAACCAACTAAGTAATGATGATGTCCTTCAGTGGCTGGAC  
 AGAGGAAGGGCCCAAGTGATAAAAGTGCAGCTGTATCTGAGCAATTAATGCTCAGATTACAGCTG  
 CAGTTGAAGCAGGCAACAAAACCTGCTTCGCAAACTGGGCATGGGTTTCATATGGGATTTCTATG  
 GCGCCCAAGAGAAGAAAGCCATGGAACCTTTGACCCTGAGGATGTACATAATAAACCTCATTGT  
 GGTCTTCATTTAAGAAAACCTTCACTTCTCGAGGGATCATGGAAATCTATTTCCATTTGTATG  
 GAGTTATGTTTTTTCATGTTCTCATGTACATGGTGGGAAGGTAGTGTAATAATTAGTTTATGTT  
 CCAGTAATGATCCAACCAATCCTGTTCTGCAGGAGAAGGTTTTGTATTTTCCGGGGGGGCACAGG  
 CAGTGTAAATGAGTCCGACCATTACACTACCTTTTGTAAAAGAGGCCCCATGTTCTACTACACAA  
 TGGAGTGCCTTGGCACTCGGGCTCAAATTCCTTGCTCAGTAGTGGCCATTTGGAAACAAAAGATTG  
 ATATCCGTAGTGCCATTTACTCAAAGCAGGAAACAATGTCTTGGGCTATTGAGGCTCTTCACCGAC  
 CTCAATTTTCCAGGATAGACAGGAGGCAGCACAGTACATATCATCAGTATATTCTAATGCTACCT  
 CCTCAGCAACTGATTCAGTGTCTCCGTTTGTGGGAGCACAGCTTGGCGACACAAAGATGAATGTGC  
 CAAGCGAAGCAAGAATGATCCGGTCTCCTCGCTCCGGGTGCCCATGCTCAAGGTGCAGAGTAAGC  
 GGTTTTCTCAATGGAAATACCATCTACCTCAACTGCACACCTCCTTGGCACAACGCGTGATGAAA  
 CTGTAATACAGGAGGAAAGTAGGTACGAAGAGGAGGGTGATGATGGGGTTTTGTTCCCGTTAAAA  
 AGGCTCAAGGTCTGAACTATTTCCCATGTGTGGGATAATCTTGGTATTGAGTCCTTTGTAGATGTTG  
 AGCTGCCCAGAACTGGGATGAGCTGTCCGGTGGAGCAGCAAGTTGCTGCAGCAATGATAGCATTTG  
 CAAACAAGGGTGTGTTGCTTCCCAAACATATAATCAACCGGACAAAGCACAATATCCACTTGG  
 AGAATATCACCGAGCACAACCTACTTGGTGATACTGGAAAGGTACGGCATTGTGAATGCCGGCTCTC  
 TGGCCAGAACTGAAAACCTGTTACAATCTTACCTTGGCACAGAGAGTGGAAGAGCTAATTTATCAA  
 GGGACGATGCATATTTTCATGTTTGGTGATAACACCAACCCATATCCTCCCTTTGATTGTTATGATG  
 GCTTAACGCTCAAAGTTCGCAGTGTAGCTAGAGCGTGTGGCAAAGGAGCAGGCGGCCAAAGATTTT  
 ACAAGGAGGCGGCCAGGGCTCAGGTGAAAACAAGTGGCCAAACTAGTGTGGAAGAAATACCAT  
 CCACCTCATTGCCCACAAAGTTGCCATGGAGAGTGGCAGTGTGGATAGCATGAAAATTGCTATTC  
 AAGCTGAAGCTGCCAATGAAGCTGTAAGGCCAATGAAGTTATGTTTGAATTTGGGCAAGAAATGA  
 ATAATGAAGGTGCGACAGAGCTGGAATTACAACAACCAGCCTGCGTGGCCAGTAACTCCTTCTTCA  
 ATGTTGGAGTTTTTTGAGTTTGCATGGAAGAAAAGCAGTTCTGTTGCTGCTGAGGTGCTATCACTGG  
 CGCTCCCTGCGGCTCTCTTTGGTAAATCCAAGGAGATGTCAATGGGATCGCAAATGCTAAGGTATT  
 ATGATGCCGCATTAATTATGTACAAGGTCACTTGTATATTTCCGGCATGGGTGCAATTTCCGGGTC  
 AGCTGGCCCTGGTTTGGGATGAGTGCAATGTGCTCAACAGAAAGAAGGAGTTCATCAACATTTGCC  
 CTCTGTATGCCAGCAAACATAGGCTGGTTTCAGCATCTGAACAGAGTAGTGGGGAATTTTGTTTTA  
 CACCTACGGGTATCGGCAAATTCGTTCCACTTGATCCAGCCTCGGGGGCTTATGATCTGGGTAGCA  
 TACGGGTGTTTGTGACGCACCCCTTGGCTAGTGTACTGAATTGGAGAGCATACTTGTACATCC  
 ATCTGCAGTGTAAGTGTGTGCGACCAACATCATGCAGCCTCCTCGTTTGGCAGCACAGGCACAAT  
 TTGGTATGAAACCAGACCAGACACTTTCCACGATTTCCAACAAATCAGGTACTGTTACTACTACA

Figura 5  
(continuación de la codificación)

SEQ ID NO:1 (continuación)

ATTGGGGAGTGGCTGCTAGCATGGGTACTACCTTAGTTAGCATCTTCTCTCCGTCAGGCATATATG  
AAAGTGACGGTACGCTGCAACCATCCTTGCTTGAAACATAGCACGCAATTGCAAATGGTGGACTG  
GCACTTGCGTGTGGAGATTTGTATTGAGAAAGACTCAGTTCCATTCTGGTAGTTTGGCCATTGGAC  
TGGGTACACTGAACACAAGCATGTCCACCCCTCATGACATTTTAAATATGCCGCATGTTATTTGTA  
ACCTTGAGATGGGACGAAAGTTCTATTTTCAGGTGTACGATAACCAATTGGAATGGGAAAAATCTTT  
TGACCACTGGTTCGGAAGAGTTCTTACCGCGGCCCAAGCATATGTCTCACATGAGGTTGTTTGCTA  
CAGTCTTGAAACCCCTGGTATCAACTTCAATACATCTAGATACGGTCGGGGTAACAGTGCAGCTTA  
AATGCATAGAAGATTTGGTTCCTTGGGGGCACTGTGTCTGTTAAACCCATTTACGGACACTGGACTA  
AAGGAAAGAATGCTGTGGACTTCCTATTCTCTGAGATGGACTTGTCTCAGCGCAAAGAAATGAGA  
AATTACGCAAGGAAAACGTTGAGACATTTGATGAGAAAGGAAAGAAGCAGCCACAGGTACAAGTGC  
CGCTCAGAGACAAGTTTTCATATGGGGCTGTACAATATTTTGTGATGAATTGGAAGGACGAAGAGC  
GACTGTTGGTTTTACCATGCGCACCCCTGGTCCGTAAGATTCCCTCAGGGGGCACTGGTACAGGAGG  
CCATCACATGCCCATTCATTGATTGGTGTCTTCCCTTCTGTTATTGGTCTGGAAGTCTTGAATACA  
CCATTATTGTACATAGAGTGCAGACTTCCAATAACATAGGAGGAGTGTGAACATCACCTTAGATT  
CATCAGGGTACCCTTTTCCCTTGGAAATCTCAAAGGCACTATGTTGTCTCTGCTGGTGGAGGAG  
CAAAATGGGCTTTCACTTATGGTATGAGCGCAACATCTTTTCTTTTGTGGTGCATGATGATGAGT  
TTTTTCctAGaCGCCATACCAAAGCCAGAGCAATAGATCCAATGCTTCAAGAATAATGACTCTGC  
AAGATCGACTAGGAAATCTCATAATAAAATTTACCAGCCAAAGATGTGATAAGCTCTCTGGAAATCT  
TGGTCAAGCCAGGACCTGATTTCAAATTGCAACTGGCTCAAGCTCCTTCAGCAAATCATGAGAAGC  
ATTTGGGTGATATGCAAACGCATACCTACCTTTATACTCCTGATTTTTTCAGAATAAGGAGTTTTTG  
AAAATTAACATCCTGTACGTGATATAGGAGCCGTGAGTCCGGCATGTGACTCATCATGTGCAGTT  
AACATGTGTACTGTGAATAATGTTAACTGTAAGGATAGTTAATTTTAACGGAGAGTACTGACTTTA  
ACTAGTTGGGAGTCCGGCTCCATTTGGAGTACCAATGAATCTACATTGGTTAAAGAGATTTGCACG  
CCTCTCTTTAAATATGGATCGTGTACCCTGCTTGGTTAGAAAGTACCTTTACTTAGGTTTACAAG  
TACGGGGAGCACTCCCTGGTTAACATAGTGCAGGTGCTATCCCATGATAGTCTTTAACTCAAGGG  
TTGAGTTCGGTTTTGCATCTTTTGCCGTGATGAAAGATGAGGTAGCTTCCCCCTTATTGGGAGGCTG  
AAACTACACATATGTAGTGGGTTTGACTGAGTCTTATAATCAGTCCGTTTTGAAATTCGATAATTTT  
CCGTAGCTTGCCTCAAGCTGCTCACGTTAGGGCGTGAGTGAAGATGCGCCGTACCACGCCTTCCC  
CGGCAATGCCAGTGGTTCAGAGCGGGCCCTCAGAATAGAGGTTAAAAC TAGTGTGATGGTGTATAT  
CACGATAAAAAGTGACACCCGGGTTGTGCTGCGCCTAGTTAACACGAGCACAGGTCCCACCCTATA  
GTGGAAGAACTTGGTTGAGTTTTAAAGAACAACCCGTTTGGAGCGACGACAAAGTTCGGTAGCTTG  
CGACAAGCTGTTTGTGTTAGGGGCACAAATGAAGTTATAGCACACCCTTCTTCCCTAGGTTTCGTC  
CAGTGGTTTTACAGTGCATCCTCAGAAAAGAGGTTAAATCTAGTGTGATGGTGTATATCACGATA  
AAGAATGACACCCGGGATGTGCTTCTCCTAGTTAACTCGAGCACGGTTTTTCACACCACAGTGAAAC  
TATCTTACTGCTTTAAATGTTGTTTGTGTTTTACTTGTGTTTTATTGAGTGTGTTAATATCATGCAT  
ATTTGCTGTTGAAGGTTCTGTGATGAGGTCAAATGGATACTCGGGAACACAGTAACTTTGCATT  
TGAATTGTTTTCAATTCAGTGTGTGAGTTTGAATATGATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 6

SEQ ID NO:2

(Secuencia completa de ARN 1)

TTAAAAGAGTTATTTTGAGAATATAACCTACGTCGTTATTCACAGACCAAGTCTCTGTTAATCAAA  
 ATCTCCCTTAAAACTCATTCTACTTTTACATTTGGCAACATGTCTTTTTCCAAGATGTTCCCCGG  
 TTTCAACTCAGTTACTGAAAAGTGGCTACCAGCTCCTCTGGTTCTTTCTTTTCAGAGCTTACTGC  
 TAGTATTAGTAATTTCTCCCGCACTCTGTCCAATGTTACCAAGGTTTCATCTCAAATTTCTTCTCA  
 CATTGAAGATTTGAAGCCTTCAGTTACAGATGCTGCTTCTCCTTTACCAGCACCTGTAACCTCTGT  
 TACTAAATTTGTTAGATAAGATAATGACTTTAATTGAACCCTTCATCAAGGCTTACTCTTTTGTGCG  
 ATCCATGTACAAATCAATTTGTGATATGGTTGCAAAGATTGTTGCAAGCATCAAAGATAAGTTAC  
 ACTTGGTTTAACTGGGTGTTGGACAAATCTGAGGATGTGGATGTTTTAGTTATAGCTTTTCTTAT  
 TTTTGCAATTTCTATGTTAATAATTGTTTTCAATTTGTCCAAGTAGTGTACTAGATGGAGTTGTACA  
 GATGACTCACATAGTTTTTAATACAGTAGGTAACCTCTTTTCAGCTTTGTACAAATTAGACTGGTT  
 ACCGACATGGTCCCAAAGTTTTCAATGATGGCACAAGCCAATGTTCTACCAGGGGAATCCATGTC  
 ACACTCACCCTTTTACAAGTGGTAGCATCCCTCATAGCCTTTGGGATTTCTACCCTTGTGTTTCGT  
 GGCTGTACCTGGTAGACCAATGGTCTATCCAACCCGCTATCAAAAATTCTGTACTCAGCGGGAAG  
 TGGTGTCAACAGTGCAATCAATTGTTTACCCTGTTTCAGGAATATGAAAGATTGTACTTCCCAGGC  
 CTTTTCTGGGTTCTGGAAATAATAGTAGACATTTTTGGTTTTAAGAATCCAGTTTTGTCTGCTAT  
 TAGTGCCACATTGTCTACGGACTTATTCACGTGGATGGAAGAGGTGGATGCAGTGTGTGATCCAGC  
 ACATCGCTTGGAAAATTTTGCAAACCCTGCATTCACATCAAGCTCCAACATCTAAGGGAGCAGGC  
 TCTTAAAATCTCTGCTTACATGCTACACATCCTGTAGCAGCCTTTATGAGCCACAGGGTAACGGC  
 AGCAATARCCCATCTTGATAAGATATATGGGGAGAAGTCCAGCACACTGGCGTGGGCCAATACAG  
 GGCAGAACCCTTTTATGGTTCAATGGTATGGTGCCAGTGGTTGTGGGAAATCCACCAGCATGCGGCT  
 GTTCATCAATGATGTTTTGGACCGCATGGAAGAGCCAAAGTTGAACAGGCTCTATGCTGTGAGTAA  
 GCGAGATGCTTACTGGTCAAATTATGCCCATCAAACGCTATCCTGATGGATGACATGGGCGCTCT  
 GAGAGATGGGGCAGGGCAATGCCAGGACATTAAGGATTTGATAGATATCAAGTCCACTCAACCAGC  
 CCCCTTGCCCATGGCAGCAGTGGAGGATAAAGGCCGCCACTTTACCTCCCGATATATATTTGCCAC  
 ATCCAACCTTATCTCAGCTCCTGCTCAGTGTGGTCTAACCTACCCCGATGCTTTTTGAGAGAAGACG  
 GGATGTTCTTGTGGAGTGCAGGAAGGTGGGTGAGTTTAACTGATGCTCCCCTTCTCACCTTGA  
 ATTTGATGTGGTTGAGAGCAAAAGACCCCATGCAATAACACACAGGGGTTGAGCTATGATGATTT  
 GCTGGAATATGTGGTTGCCAAGTGCAAGTTTCATGCAGAAATCTCAGGAAAACGTATGGCGCCAC  
 ATCAGGCAAGGTGGCACAGGTTGATGTGTACCTGAGGAAATAATAGCATCCATGGATATGTTGAA  
 TATCCAAGATACCAAGCAGGATGCTAAGCTTCCCGTGGTTGTTGTAAGTGAAGAGGATAGGGTGGC  
 CTACTCYCAGGAGTTGACAGTGGAAAGCTTTGAAAATAGCTTATCAGGGTAGTCTGAATCCCGCAGC  
 ATATTTCCCTCATGACATGCACAAACAGGCCATATTTGATGTGCTAAGTGAATCCGCCaAAGAAAC  
 ATTCACCAGGTGGGTTAATGACATGCTGTATCAAGGTTGCTGTAATGAGAATATCGCTGGCTGAT  
 AAAGAATATCCCAGCTGATTATATCATGCACTTAAAGAGCTTCATCTACGCTTCCACAATCAATGA  
 GCGTAGCTTTGACGTTTCAAGAGCAGCTGCCTGATGGAATGGCGCACCGTGCCATAGATGCTGATGT  
 GGACACACTGATATGCGTGGAGCAGATGCCTGCCACGTACAATCTTGTACACAGCATTTGTGAG  
 GTATTGGTGGCGCAGAAAGATGGAACAGCCTAGGCAATCCTGGGTGGTAGTTTGTACCACAGTAT  
 TGTGGATTATATCAAGAATGCTTGGTATGATTTACCCTACATCTTGTGAGGTTCTGATTAAGGCTGG  
 CCTTATTTAATTGCACTCAATGGTGCATTTGGGGCTGTACAGCATTCTGTGCTTGTGGCAATC  
 CAACACTTCCCTTACAGCAGAAGGAAGAGGGATTACCAACGAGTCAAATAGCATCTCCAGCCG  
 GAAGAACAAGGGAAAGAGCATCTTTGCTCGATCTTTGCTGGCACAAGCCAAGGGTGATATGCTGGA  
 GAAATGGGCAAGTGTATGATGGCTTCATCAATGAAGGATTGAAGAAAACCTAGTCGCTTGTGAGACT  
 AGGTGAAGGTGTCTACTTACAGAGGCACCTATGCTGCTCGGGCTGGGTGATGACAGTGGCTCATGC  
 TTTTCAAGCCTCCGTGATGGCACAACCTTCTCAATAATACATGCCAGTCAATTTCCAAGGTGCA  
 ATACAATGCCAAAACCTGCACGGTCTTGAAGGAGCAAGATATTGCTCTGCTCAATGTTGGAAAACCC  
 CGATGGTCCCAAGCCTGATATTCGCAAAACACTTTCCTGTACGGGATGGTGTtGTTTTTCTAAGGG

Figura 6

(continuación de la codificación a)

SEQ ID NO:2 (continuación)

CACTCAAGGGGTATGTGTGAGAGCAGTAGCATCAAAGGATGCTTCGCAAGGAAATCTTGAGTACTT  
 GCGTTTTAATGTGATGATGTCCAAGGGTTACCTTGAAAAGGTAACGTACCAGATGGACTCTAGTTC  
 CTTTAAACTGGAGTCTCAAGCATCTTATGAGTATCACATGAATGGTGAAAATGGTGATTGTGGTAC  
 TCTTCTTCTTTTGCCCAACGTGCAAGACAAACAACCATGCATTGTGGGTATTCATTGTGCTTCTTA  
 TGATGAAGAAGCTGCGCACAAAGGGTTTGTAGCATCCAATGCTACAGCTATTTCCGAGATCAGTT  
 GGAAGATCTTCCGACTGGTCCGGTTAAAGTAGCAATGGTAAGGTGCCAGCTCCTTAAGGATCTACG  
 AGCCAGGGATGCGGCTCTTTTGAAGAAAAACAGGTGGCTTTTGTGGCACATGGCCAGCTGAACA  
 AGCAGCCACGGTCCCCACAAACAACGCTGCGAAGGAGTGGCTTGTGGTGAAGCTTTTGGGCCTGC  
 AGAAACTGCTCCATCTATCATTTAGCTTCAGACAAACGTGGGGAAGGTTTtGATCCGTACGTGGC  
 TGGCATACAAAAATACAATGAAACAGCACAAAATTTTATGATGAGGACATTGCGAGGCTAGCCTATGA  
 AGGGCTACGTCAAGCAATTTGCCTGTGCTGCACTCCAGCGAGTTCCTTTTGGAAAGCCCGTCAC  
 ACAGAATGAAGATGTGGTGTCAATGGTGTGATGGGTTTACTATTTTACGGGATGGAGTTGAG  
 TACCTCTGCGGGTATCCGTACAACAAGTTGGGTATGGGCACTAGCAAGAGAGAGTTTGTGGAGCC  
 AAGTGGAGATGGAGATCGAGTCCAACCTCAAAGGACCCTCCAATTTTATGATGACTGGGAGGCTTT  
 GGATGTGAAATTCGCAAAGGAACTTTGTGGAACCTGGTCACCACCCAATGTGCCAAAGATGAGCG  
 CTTGCCGTTGGAAAAGGtTTTTGGGAAGCGGAAAACCCGTTTGTGGTGAATTCCTCCCTTCCATTA  
 CAATATGTTGGTTAGGAAGTATTTCCCTGGATTTTCCGCCAGTCTGATGGCATCCCACAATGCTCT  
 GCCATGCCAAAGTGGGCATTAATCCTGGAGGTATTGAATGGACTCTGTTGGCTAATGGCTTCAGAGC  
 AGTCTCTGATACAGGATTTCTGCTGACTATTCCAGTTTGTGATGGGAGAGCTCCCATCTTTGCCTT  
 TCAATGGTTTTGTGATCTTGTGGATGACTACTATGGATCACCTCCTGGTTCTCCAGACTCCAATGC  
 CAGACATGTGCTTCTTATGATGGCTTCATGCCATTATACTATTTGTGAGAACAAGGTTTTTAGGTT  
 GGTGGGAGGTATGCCTTCAGGATTTGCACTCACCGTTATCTTCAACTCTCTCTCAATGAGTTTTA  
 TATGCGTTATGCATTTATTTCTCTATTGAGAAGACCACATATAGCAGCTCAAGCTATAGGGTGCAA  
 ACCCTCTGATTTCAACAAGCTATTTGTGGCAGTCTATGGTGTGACAATCTAGTTGCAGTTCCCAT  
 GGAATGCAATGGTATACTCTGCCAGCTATTGCCAAGAATTGGAGATGGTGAATGTTATTATAAAA  
 GAATGGCATCGACAAGAACATGGATGTTAGCAGTCCAAAATGCTAGACTTGTCTGAGCTAACATT  
 TCTAAGCAGAGTTTTAAGAGGCACCGTCTAGGATACGTTCAAGCTCCTCTGAAATGGGTATCTAT  
 CATAGAACCAATGACTGGATAAGGCCtCTGTGTTGGTTGCCGATGCTCTCGTATGTTGGAAAA  
 CATAGACACGGGAGTTAGAGAGGCATTTACCATGGGCCTCAGGTTTTTGAAGTTGGTGACAGA  
 TGTTCAAACGCTCTCAAGGAGCGGTGTTTTCCAGCCACCACATTTCTACATATTTTGAATTGGA  
 GCAGGACTGGCTGGTGGAGGTTACAGGAAATCCAGCCATTGGGCTCATCAAGGAACTTCATATTGC  
 AGCTTCAGCTTTTGTGCCTTTGCCCCAGGCAATACTGTTCTGAATTTTCTGATGGAGTGCATAC  
 TTTTGTGCTGACCGAGTGAGTTTCTGCTCCTCGCGAACAGCTGCTGCACAGCAGTGGGACACCACCAC  
 TGTTTTGGTGAACCTGCACTGGGGCAAAGAGACCCACATGGGTAAGAGGGCCACCACATGGAGGGA  
 CTTTGAAGGGCTTATTTGGCCTTACACAATGGCTGCAATCAAGGACCACATCTGCAGCATTGTAAC  
 CAAAGGGGTGACCAAACCACATGTGGTTTTTGTGTTGGCAATGGGTATGCTATTGGTCCAGTGTG  
 CGCTGCATTGTACTGTCTGTCCACTGGCCAATATTTCTTCTCAGGATGTTGTGTTGAGATTGAGAAC  
 CATAGCAGATGTTACAGATCTCAGTCAATATCCAGGAGGTTGTGCCAAGTATCTTCTGAAATGTGC  
 TGATACAAGAGAAGAAGAGCTTGCAGATACATGTAATAATGCACAAGCCAAGGGTGAGACACCAGC  
 ATACATACCTCAAGGAGGATTTTCCCTTGGTAATTTTAGAATTGTGCAAGGGAGAATTGATCTACA  
 GTTGGCCAGCGCTTGCCTTTTACAGTGGGACCTTATGGGGGATGGGGTCAACACACTACTAGAGA  
 GCTTAAGTTGCTGCTCAAGGACATGGAGAAGATATATCAAATTTTAGTCCAAAGAGAGAGCTTCAT  
 CACTCTACTTTGACTATCTCAGTTCAGAGCAGGTGATGTTGTTGGTTGACTTTCTTAGGCTCCA  
 AGGGTTTTTCCYCGCCAAAATGATGTGGATTACTTGCTTAAAGCCTTTAAGCTGAGCAAGCAGAG  
 GCACAATAAGGAAACTGTCATACGGTTACTTTAGAAAGCCTTTTCTCTCAAGGAAATGACCAT

Figura 6

(continuación de la codificación b)

SEQ ID NO:2 (continuación)

GGGGTCCAAAGAAATTCTGTCCGCAACAGCTGCTGAGTCATTGTTTGGTATGGATGTTTCCGCTAA  
TGTGCTCAAGAGTAGGCTACTTCATCTTCAGAAGCCCATAAAGTGTTTCATCCATGGAGTTGGCCTT  
TAAAATTTATTGTGTTCATCCAGGGCCACCTGAGCAAGGAAGTTGTAACCTCACTTCCAACGCATGTA  
CCAACAAGATCTGACAGAAGGGATCATAGAGAAAGTGATATTGTGGTTAACCGCCACACTGTCCGA  
GAGCTTCCAGTGGATCTTGTGATGTACCTTTAGGCTTGGATAACATAGAGATCCAGGATAAAGG  
TTTTTCCCTAAATCCAAATAATAAATATGAATGCATGTGATGCCATCTTGTTCAACTCACTGA  
GTGTTACAACCGATCAACAAAGAAACATGTGTTCTGTGCGCTACACGACTGCATCCTCTCTTGTGTTGT  
TGCCTATGTGCTTGCACATAGACATCAGACAATTGATGAGTTGCCGTCCTTCTATGCAACACACCC  
AGATGTGTTGCTTTTGACACCAATCCTAACAGGCTACAAAGCGCCTTGAGTCGGGCTAAATGACTC  
AGCTTGTACATGCAATATGTGTACTGTGAATAATATTGCATGAGGATTAACGGAGAGTACTGACTT  
TTGCTAGTCGGGAGTCCGACCCACTATATGGGTACCTGTGAATCTACACGGGTTAGGAGATTTGCA  
CGCCTCTCATAAATATGGTTCGTGTGCCCTGCCCTGGTTAGACAGCCTTCCATGCCGGAAGTAAA  
TGGCCTATAACGGAGAGTACTGACTTTAACTAGTTGGGAGTCCGGCTCCATTTGGAGTACCAATGA  
ATTTACATGGTTAAAGAGATTTGCACGCCTCTCTTAAATATGGATCGTGTACCCTGCTTGGTTA  
GAAAGTTCCTTTACTTAGGTTTACAAAGTACGGGGAGCCTCCCTGGTTAACATAGTGCAGGTGCT  
ATCCCATGATAGTCCTTTAACTCAAGGGTTGAGTTCGGTTTGCATCTTTTGGCGTGATGAAAGATG  
AGGTAGCTTCCCCCTTATTGGGAGGCTGAAACTACACATATGTAGTGGGTTTACTGAGTCCTATA  
ATCAGTCCGTTTCAAATTCGATAATTTTCCGTAGCTTGCCTCAAGCTGCTCACGTTAGGGGTGTGA  
GTGAAGATGCGCCGTACCACGCTTCCCCGGCAATGCCAGTGGTTCAGAGCGGGCCCTCAGAATAG  
AGGTTAAAAGTGTGATGGTGTATATCACGATAAAAGTGACACCCGGGTTGTGCTGCGCCTAGT  
TAACACGAGCACAGGTCCCACCCTATAGTGGAAAGAACTTGGTTGAGTTTAAAAGAACAACCCGT  
TTGAGCGACGACAAAGTTCCGTAGCTTGCAGCAGCTGTTTGTGTTAGGGGCACAAATGAAGTTAT  
AGCACACCACTTCTTCCCTAGGTTTCGTCCAGATGGTTTCACAGTGCTATCCTCAGAAAAGAGGTTA  
AATCTAGTGTGATGGTGTATATCACGATAAAGAATGACACCCGGGTTGTGCTTCTCCTAGTTAACT  
CGAGCACGGTTTTACACCACAGTAAACTATCTTATTGCTTTAAATGTTGTTGTTTGTGTTTACT  
TGTTTTATTGTGTGTTTAAATATCATGCATATTTGCTGTTGAAGGTTCTGTGATGAGGTCAAATGG  
ATACTCGGGAACACAGTAACTTTGCATTTGAATGTTTTCAATTCAGTGTGTGAGTTTGAATATG  
TATTTTAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 7

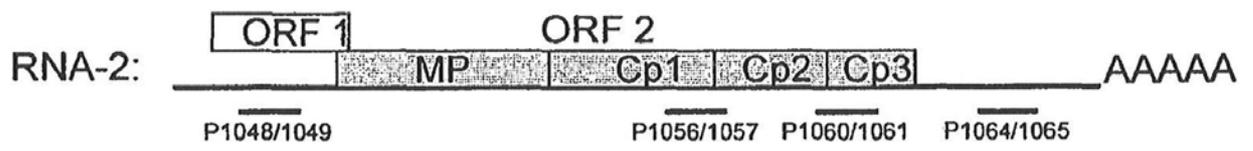


Figura 8

SEQ ID NO: 15

(Secuencia completa de ARN 1 de ToMarV)

AAAGAATTATATATCAAGATTGCAACCTACGTCGTTGTTACAGACTACG	50
CCTCTGTTAATTGATATTTGATTCTTGTAACCTTTTCCAACATCTTCTTC	100
TCTTCTTACTCGACCATTATTTAAACTCCTCAATTTTCCAATGGCTTTTT	150
CAAAGATGTTCTCCAAGGTTGCTGGTGTGATGACGCCAGTTCTTCTTCC	200
ACCACTTCATTCTTTGGTGAACCTTCAAATTCATTTCCAATTTTCAA	250
AGCGGTTAGTAATATTACCCTATGTACAGAAAGATTTAGATCATCTTG	300
AGGATCTGAAACCATCTGTGACTGATGTGTCCACATCTTTTGTGGCCACT	350
TGTAGTTCACCTAATAAAGTTTTGGACAAAATTGGTGCACCTATAGATCC	400
ATTTCTTAAAGCGTACTCTTTCTTGTCCACAATGTACAAATCTATCAAGG	450
ATATGGTTTTAAAATGTTTTGAGAGTTTTGTCCAATAAAGTTAAATTAGGA	500
TTTGCTTGGGTGTTAAATAAAGTGAAGATGTAGATATAGTTGTATATGG	550
TTTTCTTGTATTTGCTATAACATTGTAGTGTCTTCTATTTGTTTGTCTA	600
GTGATATTGTTGAGGGTGTCTTAACACTGTCAAAAATATCTTTTGTGATA	650
GTCGGAAACATGTTTTCAAGTCTATACAATTTAGATTGGTTTTCAAATG	700
GGCCGAACGATTACCATGGTGGCCCAAGCTAGTATGCTTCTGGGGAAAT	750
CAGTTTTACATACACCAACGTCTCAGTTGATGTCCACAATATTGGCTTTT	800
GGGATTTGACGTTGGTGTTCATTGCAGTGCCTGGTAGACCAAATGGCTT	850
GAGCAACCCATTGTCCAAAATCTCTATTTCGACAGGAAGTGGTGTCTCAG	900
AGTGCAATCAACTATTCACCTTTTACCGTAATATGAAAGATTGCACCTCC	950
CAGGCTTTCTCATGGGTTCTTGAATAAATAGTCGGCACCTTTGGATTCAA	1000
AAATCCTGTGTTGTGCTAGCTATAAGTGCAACGCTGTCCACTGATCTGTTG	1050
AGTGGATGCAGGAGGTTGATGCAGTGTGTGATCCTGCAACGCGCCTTGAG	1100
AACTTTGGCAATAAGGCTTTCCCTACCAAATGAAACCATCTGAGGGAAGA	1150
AGCTCTCAAGATCTCAGCTTACATTGCAACCCATCCAGTTGCGGCCTTCA	1200
TGAGCCACAGGGTTAGTGTGCTGCCATTGCGCAGTTAGAAAAAGTTTATGCT	1250
GAAAGTTGTAGGCACATGGGCGTGGGCCAGTATCGTATTGAACTTTTAT	1300
GGTACAATGGTTCGGGTCCAGTGGGTGTGGTAAATCTACATCCATGCGCT	1350
TATTTATTAATGATGTGTTGGACAGAATGGGTGAGCCAAAACCTCAATCGG	1400
CTATATGCAGTAAGTAAGAGGGATGCATATTGGTCCAACCTATGCTCACCA	1450
AACCTGCTATCCTGATGGATGACATGGGAGCATTGCGAGATGGGGCTGGGC	1500
AGTGCCAAGATATTAAGATCTGATTGATATCAAATCAACACAACCAGCA	1550
CCCTTACCAATGGCCGAGTTGAGGACAAAGGCAGGCATTTACCTCCAA	1600
GTATATATTTGCCACATCCAATCTGATCTCAGCTCCTGCCCAATGTGGTC	1650
TTACATATCCAGATGCTTTTGTAGCGGAGAAGGGACATCCTGGTGGAGTGT	1700
ATGAAGGAGGGCGAGTTTTTCCACTGAAGATCTACGGGACATCTCAGATT	1750
TAACATAGTGGAGAGCAGAAGACCTCATGCTATCACTCACAGGAATTTGA	1800
CCTATAGTGATCTTTTGGAGTATGTGGTAGCCAAATGTGAGGTACATGCA	1850
GAAGTATCAAAGCAATTTGTTGAAGCTGAATCTGGCATAAGTCTTAAGAT	1900
AGCTCAGGTTCAAGTTTCTGCAGATGATGTGATAGCGTCTGTGGATGGGG	1950
CTAGATTGCGACCAAGCAAGATGAACCAATATTGGTGCCCACTGTTGTG	2000
AGTGAAAATGATAGAGTATCTATGCAAGAGAGCTCACGGTAGAGGCATT	2050
GAAATATGCATACCAGGGCAGTTTTGGACCTGAGGAACTTTTCTCTCATG	2100
ACCATCATAAGCAGGCCATGTATGATTTCTTTGATGATGAACATAAAGAG	2150
ATTTTCAACAAATGGAGAGTCAACATGTTGTATAGAGGAGCAGATGCTGA	2200
ACAGTATCGATGGTTGGTACAAAACATTCCTGATGACTATATAATGCACT	2250
TTAAGAGTTTCATTTATGCATCAACCATCTCTGAGAAGAACTAGCAGTG	2300
CAGACAGAGATGAGGACTGGATTTGCACATTTCTTGCATTGATGCAGATGT	2350
TGACACCCTCATATGTATCGAGCAGATGCCACCCTTTGTTTCAAGTTTTAT	2400
ATACAGCATTTGTGAGATACTGGTGCAAACAAGTATCAAAAAGAGCCAAAG	2450
GAATCATGGATCAAAATTTGCTACCATAAAATCGTTGAATATATCAAGGA	2500

Figura 8

(continuación de la codificación a)

SEQ ID NO:15 (continuación)

TACATGGTGGAGCCTTCCCTATGCACTGAGATTGCTCATCAAAGCAGGTC	2550
TGATTATAATGGCTCTTAATGGAGTTTTTGGAGGCATTACAGCATTTTTG	2600
GCGTGTGGCAGAGTAACTCTTTCCCAATGCATCGGGCAGAGGAGGTGT	2650
GACCAATGAATCCAACAGTATATCCAGTAAGAAGAACAAGGGTAATAAGC	2700
TCAGAAATCTTCTCGTTGGTCAAAGTTCTCAATCATTGGCACAAGATTGG	2750
GCTGCTGAAGATGGATTTGTAAATCAGAGCCTCAAGAAAAATTTGGTGGT	2800
GTTAAGACTTGGTGAAGGAGTGTACTTTAGAGGCACCTACGTGTGTTCTG	2850
GTTGGATAATGACCGTAGCTCATGCATTCCACAATGCTCGAGATGGTACT	2900
CCATTTACAATCATCCATGCCAATTCTCGATCTAAAGTTCAATACAACGC	2950
CAGAGAATCAAGGATTATTGAGGGCCAAGACATCATTCTGTTGCGCGTTG	3000
GTGATCCAGATGGTCCAAAGCCTGACATCCGTAAACACTTCCCAAGAAGG	3050
GATGAGGTGTGCTTCACAAAGGGCTCACAAGGATTGTGCTGTAGAGCTGT	3100
TGCGTCTACAGATCCACGTCTTGGCAATTTAGAGTTTCTCAAGATGCCAG	3150
TGATGATGTCAAAGGGATACACAGTTAAAGTGGAATATGAACTGAACTCC	3200
TCCAGTTTTAAGATTTGCTCTCAACAATCTTATGAATACCACATAAATGG	3250
GGAAAATGGTGACTGTGGCACGTTGCTACTGTTACCAAGTGTTCAGAATA	3300
AGCAACCTGTGATCGTTGGCATCCACTGTGCATCATATGATGGCGTAGCA	3350
GCTGAACGTGGATTTATCTCTTCAAATGCTACAGCTATCTACAGGGAACA	3400
ACTAGAGGATTTGCCAAGTGGCCCGGTCAAAGCAGCAATGGTACGTTGTG	3450
ATATTCTGAAGTCAATTAGAAGCAGAGAAAACACAGCTTTTTGAGGAAAAC	3500
CAAGTGTACTACCTTGGAACAGTTCACAGGAGTTGGCCGCCACAGTTCC	3550
CCACAAGACCCTCTGCGGAAAAGCCAATGTTTGAAGCATTCCGACCTG	3600
CAGAGACAGCACCATCCATTCTAACAGTTCATGACAAAAGAGGTGATGGT	3650
TTTGACCCCTATGTGGCTGGGGTAATGAAAATACAATGAAACAGCTTGTGG	3700
ATTTGATGATGACATTGCCAAACTAGCATTCGAAAATCTCAAGTGCTCGC	3750
TGCTACCTATCATGCGTAGCCAGAAGATCCCTGGGGGACGTCATGTGAA	3800
AGGGATGAGGATGTAGTGTCTCAATGGAATAGATGGATGTGATTACTATGA	3850
TGGCATGGAGCTGAGCACATCTTGGGATATCCCTTCAACAAGATGGGGA	3900
TGGGGATGAACAAGAGAGAATTTGTGCAATCCACTGGCGAAGGAGAGAGA	3950
GTGGAACCTCAAAGAGACACTCCTGTATTTGAAGCATGGGAAGAGCTAGA	4000
TGTGCAGATTAGGAAAGGCATCCATGTGGATCTGGTCACCACCCAATGCG	4050
CCAAAGATGAACGCCCTCCCACTTGAGAAAATCTATGGCAAGAGAAAGACC	4100
AGGCTCTTTGAGATACTTCCCTTCCATTACAACATGTTGGTCAGGAAGTA	4150
TTTTCTTGATTTCTCAGCCACATTGATGGCTTTGCACAATGCTATAACCAT	4200
GCAAAGTTGGTATTGATCCTACAAGTTCTGAGTGGACATTGTTGGCAAAT	4250
GGGTTTAGAGCTGTGTGTCAGACGTGGGATTTTCAGCTGATTATTCCAGCTT	4300
TGATGGAAGAGCACCTGTTTTGCTTTTCAGTGGTTTTGTGATTTGGTGG	4350
ATGAATACTACGGATCAAAGCCTGGCAGTCCCTGATTCCAATGCTCGACAT	4400
GCACTTTTAATGATGGCATCTTGTCAATACACTGTGCGAGGATAAAGT	4450
GTTTAGGTTGGTTGGGGGCATGCCATCAGGATTTGCACTAACGGTCATCT	4500
TCAATCTCTCCTCAATGAGTTTTATATGCGATATGCCTTTATATCATTG	4550
TTAAGAAGACCCCATATTGCTGCCAGGGCTATAGGAGTTAAACCAAGTGA	4600
TTTCAATCAGCTATTCATAGCTGTTTATGGAGATGACAATCTTGTGTGCTG	4650
TACCATTACATCTCCAGTGGTATTCTCTGCCAAATATAGCACATGAGTTA	4700
GAACTGGTCAATGTAATCATTAAGAATGGTCTTGACAAATCGATGGATGT	4750
TAATGAGGTACAATTTCAAGATTTGTCTGAGCTAACTTTTCTGAGTAGAG	4800
GTTTTAAACGACATGCTCTTGGATACCACATGGCTCCTCTCAAGTGGTT	4850
TCAATCATTGAGCCCATGTATTGGATAAGACCTGCCCCAGGTTGTCCCTGA	4900
CACTCAGGCCATGATGGAAAATGTGGAAACAGGAATACGTGAAGCTTTCC	4950
ATCACGGTCGTGTGGCTTATGACAAGCTTGTCTTAGATGTTTCAGACGGCG	5000

Figura 8

(continuación de la codificación b)

SEQ ID NO:15 (continuación)

TTGGATGAAAGGGGTTTCAGAGCTGTGATCTTTCCTTCCTATTTGGAAGT	5050
GGAACAGGAATGGATTGCAAAGGTAaCAGGGGATTCAAGTGCCCTGACAA	5100
TTTGTGAAATGGCAAAGCAGCTATTTCCCTATACGCCATTGGACGCAGGT	5150
GAGAAGATCACAAATTTTGAGCGTGATCTGAATTGGTTTGCACCAAACAT	5200
TGGTTTTTGTTCAGCACGTACTGCAGCCACTACACGTGGGATGAAGGGT	5250
ACATTATTGTCAACTGTACAGGTGCAaGAAGTCCAATTGGGTTAGAGGT	5300
CCAGCCAACTGGAAGGACTTTGAAGGGAAAATGTGGCCGTACACTATGTC	5350
AGCTATAATGGATGCCCAAAGAATGTGTTGGCAGGAGGACATGTAGCAA	5400
CCAATGTCGTTTTTGTGTGTGGAAATGGATATGCTGTCGGCCCAATTTGT	5450
GCAGCGCTGATGGCCTTAGCAACAAGGCAATATTGTGTGGAGGACATAAT	5500
AGTTAGATTGCGCACAATTGGAAATGTGCTTGACCTCAATACCTATCCTG	5550
GAGGCTGTGTGCAGTATTTTCTTCAATGTGTGCCTCATGGAGACAAAGTG	5600
GCTCAAAGTGGTGCATCGCTCCACAGTAGTTTTATGCACCAAGGGTTTGA	5650
ATTGGGCAACCTCCGCATTATACATGGTATTTAGCAAACAGACAGCAA	5700
TGCGGATGCCATATGTGGTAGGACCACATGGAGGATGGGGAAATTTTCC	5750
ACACAGGATCTTGAGAGTTTGCTACACTATTTGGAGCAGGGATATGCAGA	5800
GTTAATTCAAAGAATAACAAACTAACTCTGTATTTCAAAGAGCTGAGTA	5850
TGGAAAATGTGCAACAACCTGATAGATTTTGTAAAGCTTCAGGGGTTTTTC	5900
CCAAAAGAAAACACCATTCCAGAAGCTCAAAAATTTTGTGATGCTGAATG	5950
TCTAACATTCAAAGCAAGGAGCTTTAGGCACGTAGTTTTCAAAGAAGAAC	6000
TTTTGAGTTCCACATGGAAAATGTGTGGTGAAGTATTGTTGCTTCAAGG	6050
TCTGCAGAGAGTCTATTCCTGGCAATTTGTCTGCTTCCGTATTGAAAAC	6100
ATTATTGGAAAGACACACAAGAAGCATGAGTTGTCAGAGTATGGAGCTTG	6150
CTCTGAAAATATATCTATTAAACTTCCAAGTAATAACAAGTGAGATATTA	6200
AAGAAGTTTGAAGATATATTTCCAGGAGAAAGATATCCACCACCCTACTAAT	6250
CAAAGTATTCTTGTGGCTCCAGAGGATAAACTCCAGAAAATTCAGAGTGCAGGAA	6300
GGTGGTTTTTATTTGCATCCTGAAGGAATCAACATGAATGCCGTAGATGC	6350
AATAATATTTTCTCTGTGGGAGTCCTATAGCCGAGATAGTAACTCCTATT	6400
CTGTGTCAACTCCCATCAAACCTGGGGTGTTCATTTTCTTGTGCTGCTA	6450
GATAGTCAAGGCAAGGAAGATCATCCTGTTCCGAGGTTTTTCAACGGTTTTT	6500
CCTTAAAAACTGTGAAACCATTCTTACAAATTACAAGGAGCCTTGAGTCA	6550
GGCATTATGACTCAATTTGTGCGATATGCATGTGTACTGTTAGTAATGTA	6600
TATCGTTAGGATGGTTTTGTTAAGGGAGAGTACTGTCTTTTAATAGATGG	6650
GAGTCCCCTCCACTTTATGGAGACCAATGAATCTACATTGGTATAGAGGT	6700
TTGCACGCTCCTCTTTAATAAGTTTTCGTGTGCCCTGCTTGGTTAGAAAG	6750
CATGTGGTGATTAACACTACTCGTTTGGAGTATAAGCAATAGACCTCATG	6800
ATGTCTAACTCATGCGTGATTGCTCATGTACGAAATAAATGAGCCGTTTTG	6850
GAACCTCGATAATTTCCCTTAGCTGCTGCACAGCTGTCACTATTAGGGGTA	6900
GTGGCGAAGTCCGTGAGTCCCCTCTTCCCTCCCTAGGTTCCGTCCAGAGGGTT	6950
CAAAGATTCACCTTCTTTGTCAAGAAGCAATGAATGACACGTGTTGCGTC	7000
GACAAAGCACCGTTCTACGTGGTTAGTAGAAAGTTATATTATATTAGATT	7050
TGTTAGTCAATTGTGTGATTTCTTTCTTAGATTAGGAAGTTTTCCGTGGC	7100
GATAGGAAGGGTTTGTCTTTTACCTTCTTTGCTATGCTGGACACAAAAA	7150
GATTTTCTTTTCTTTTATTTTAAAAAAA	7200

Figura 9

SEQ ID NO: 16  
(Secuencia completa de ARN 2 de ToMarV)

AAAGAAATTTAATATATATCTGTTCATGCAACCTACGTCGTTGTGCGATCTACGTCATCGCTCGCAG  
ATATAAAATTAATCCTTTTAGCTTGAGAACTACGTCCTTCTCATTTTCTTTTCCTTTGTTTTGTTG  
TTCTTTATGTCATTCATTGGGCGTTTGAATACATCTGTAGACGAACAAGCTTTTCATCATCAAGTT  
GCCACCTCGAATTGGATTTGTTCTGTTGATGTTGGCACCAGTTTGTATAAATAGCAATCCTACCCTT  
GACTTCAAAGTTGTTCCCTCCATCAGGTGGTGTCTGCTCAGTTTTAACCGTTTCTTGGGAGAATTCA  
ACGCCACAATTAGTGCCTGGACACTATTTGTTGCTAGTGGTAATTGGCCCATTAAGAACGTAAAG  
CTTTCTGGTTTACTTGTCCATCGTTCAGTGCCTTTGAAACAACCAGAAAGGTCCTAGAGGAAAAC  
AAGGTTTCTATTTTCAGCATCATCTTCATCTTCTCTTCTTCTTCTGACAGTAAAGGCAAGAGTAAA  
GTAGAGCAACCCACACGAGAGGATCTCATTAAGAAGTTGAGGTTCTCAAACGTGAGTTAGAGAGA  
TTTCAGAAAGAGTTGGCAAGTCAAAAATCTGAAAATCAGAACTACAACCTCAACTCTCCAATCAA  
GTTAGTAATAATGACATCTTCTCAGGTTGGACTGAAAGTGGGCCCCAGTAATCACCAGCAGGAGGA  
AGCCTCCGAGAGGTTGATATCACAATAACAGCTGCTGTGGAGGCCGGAACAAAATTTGCTCAG  
AAAGCTTGGCATGGGTTCTACGGGGTTCTTTATGGTTCCCAAGAGAAGAGAGCAATGGAGTTRTT  
TGACCCAGATGATGATCAAAGATCACATCCCTTTGGTCAACATTCAAACATAAGTTTGTGAGTC  
TAAGGACCATGCAAACCTGTTTTTTCATCTGTATGGTGTCTTTTCTTTCATGGTCCACATGTTCA  
TAGTGGGGAGGGAAGGGTTAAGATAAGTCTTTGTTCAGTAATGATCCCTCTCACCGGTAATACA  
AGAAAAGACACTGTCCTTGGCCGATGGAGCGCAGGCAGTTCTCATGAGCCCCAGCATAACATTGCC  
CTTTCTCAAAGAGGGGCCATGTTTTACTACACCCTGGAGTGCCAAAATACCAGGGCACAGATTCC  
GTGTTCCGTGGTTGCCATATGGAACAAAAGATTGACACAAGGAGTGCAGTTTATTACAGCAAGA  
AACAATGTCTTGGGCCATAGAAGCACTCAATCGTCCGCAATTTTTCCAGGATAGACAGGAGGCTGC  
TCAATATATAGCTTCTGTTTATTCGAGTGGGCAAAGTACTCAAATGGCTCTTGAACAAAAGCCTT  
TGTTGGAGAACAGCTTGGGGGCACAAGAATGGACGTCATGAATGAAAGCACTATGATCCGGAGTTC  
ATCTTTGAGAGTCCCAACTCTCAAAGTGCAGAGCAAGCGCTTCCCGTCCATGGAAGTCCGGCTGT  
AAGTACATCATCTTACTCAGCACACGTGAAGAAACAGTTTATGATGAGGATGATTGTGGGGGATT  
GTTTCCAGCACCAAGAAAAGGGCCAAGCCTTCAACATGGGTGCCATTTGGGATAATTTGGGCAT  
GGAGTCGTTCCGACACATTGATTTCCAGATGATTGGACAGAACGAACAATAGCTCAGCAGGTACA  
ATTTATCCTCTTTAGTGAGGCTAAAAGAGGAAACGTTATTGTGCCAAGACATGTTGCAAAGCGGCA  
TCTGCATAATATCAATAGGGAGCACATAACCGAGGACAATTATGTAGAAAATACCTGAAGGTTATGG  
TGTTACCAATATCCAAGGCTTGACTCGCACTTTCAATTGGTATGCTATGTCCTCAAGGAGAGAGT  
TGTGGAGCTCGTCCATCAAAGAGATCATTCTTCTATATTCAAGGGCAGACTAACAATCCAATGCC  
GAATTTGACTGCTATGATGGATTAACCTTGAAGAGCGTCAAGTTGATGTTGGAGGAGCAAGTGGC  
CCAAAGAAGGTCTGAAAGACAAGCACAGGTGACAGCAAGGGGCATAGCTGAAAGTCAAGCTGAAGA  
CAGAGTGAAGTATTCCTTTGTGTCAACTACCACGATGGAAGATCCCACCAAGCCAGATAAGATAGA  
AATTGTTGCAGAGGGAGCAGAAGAAGAACTCAACTGGTGTATGTTATTTTACTTTGGACCAGA  
AATGGACACATCCATGGCAGTTGAACTGGATATGCAGCAACCGGTGTGTGTAGCTAGCAATGATTT  
CTTCAATGTTGGAGTTTTTGAATTCGTTTGGGAGAAGTCCGCTAATGTGCTGAGCAAGTAATGAG  
CTTGGCTTTGCCCGCTGCCCTATTCTCAAAAAGCAAAGAACTTCAATGGGTGCGCAAATGCTTAA  
GTATTACGATGCAGCTCTAATCATGTACAAAATAATACTTTATGTTTCTGGAGTTGGAGCTATCTC  
TGGTCAACTGGCTTTGGTGTGGGATGAATGTAATGTGCTTAATCGAAAGAAGGAATTCATCAACAT  
CGCCACATTGTATGCCAGTAAGCACACATTTGGTTTTCAGCTTCAACAACAGAACAGTGGAGGTTTTG  
CTTTACCCCAACAGGGATAGGCAAGTACGTGCCCTTGGATGAAGGTACAGGAGCCACTGATTTAGG  
TAGTGTGAGAGTGTGTTGTGACACACCCTTATCTAGTGAAGTGAAGTGAATAGTACCATGCCA  
TTTGCACCTACAGTGCAAAGTGTATCAACCAATATACTTCAACCTCCACGAATGATAGCACAGGC  
TCAATATGGCATGAAGGCGGGGCAGACATATTTTCCAAGGTTTCCAACATAATCAGGTTTTGTTACA  
TTATAATTGGGGGACATCATCCCAATGGGAACTACATTGGTAAGCATATTTTACCATCAGGAAT

Figura 9  
(continuación de la codificación)

SEQ ID NO:16 (continuación)

ATATGAGAGTGATGGCACCTTGCAGCCGTCTTTGCTTGGTAACATAGCCAGGAATTGCAAGTGGTG  
GACTGGAACTTGTGTTTTTGAATTTGCATTGAGAAAACCTTGTTTCATTCAGGTAGTCTGGCAAT  
TGGACTTGGAACTCTGAACACCAAATGACCAATGCTCATGATATATTTAACATGCCACATGTGGT  
ATGCAATCTTGAATGGGTCGAAAATTTCCGGTCCGGTGTCTATTACAAATTGGAATGGAAAAA  
TTTGCTTCCACAGGGCGAAAGAGTTCCTTGCCAAGACCACAGCACTTTCCCACTTGCCTTGT  
TGCAACGGTAATGAAGCCACTCGTTTTCAACGTCCATACATCTGGATTCCGTTGGTGTACAGTGCA  
GTTGAAGTGCCTTGAATCTTACTTTGGGTGGCACAGTATCTGTGAAACCAATATATGGGCATTG  
GACAAAAGGCAAAGCTCAGTTGATTTCTTTTTCTGAAATGGATTTATCACAGCGTAAGGAAAT  
TGAAAAGTTGAGAAAGGACAACATTGAGGAGTACCAGGAGAAAGGCAAAGATCCGCCCAAGAAGGC  
TCAAAGTATTCTGTCCATAAGAGAGAAATTTTCCATGGTGTGTACAATATTTCTGCATGGGTTG  
GAAGGATGACGAAAGATTGTTGGTAATTCCTTGTGCACCATGGTCCATAAGTTTTGAAGGGCACAG  
TCCTGTTAAGGAGGCAATCACTTGTCCATTTATAGATTGGTGTACATCATTTTGTATTGGTCAGG  
TAGTTTGAATTATTCAATTGTGATACACAGAGTACAATCCAGTCCTAATGTTGGAGGTGACTAAA  
TGTTGCTTTTGATGCCTCAGGCTATCCTTTCCAGCTGGGCTTAATAAAGGAAATTATGTGGTATC  
AGCAGGTGGAGGCACAAAATGGGATTTTTTCATACGGTGTGGCAAÇAAAATACGTTCTCATTCACTGT  
GCAAGATGATGAGTTTTTCCCAAGGCGGCATACAAGGATGAGGGAAATTCCTCAAGCAAGCAATCCCG  
CATCATGTCCTACAGGATAGGCTTGGAAATCTGATCATAAATTTGCCTCCTTCCGCCATAGTGAG  
TTCCATTGAGATACTTATATCTCCTGGACTTGATTTCAAGTTGGAGTTGGCCCAACCTCCTTCTGC  
CAACCATGAAAAATATCTTGGCAATATGCAAACCTCACACCTATCAGTATACCTCAGATTTTTCTGA  
GCTACGTGATTTTGCATTTGAAAAGTACCATGCTACTGGGTATATAGTAGCCAAATACACTTAT  
CTACGTGACTGTTAGTAGTAGCTAAGTGGTGTGTTGTTTGCAATGATAAGGGAGAGTTAAGGGAGA  
GTACTGTCTTTAATAGATGGGAGTCCCCTCCACTTCATGGAGACCAATGAATCTACATTGGTATA  
GAGGTTGCACGCTCCTCTTAAATAAGTTTCGTGTGCCCTGCTTGGTTAGAAAGCATGTGGTGAT  
TAACACTACTCGTTTGGAGTATAAGCAATAGACCTCATGATGTCTAACTCATGCGTGATTGCTCAT  
GTACGAAATAAATGAGCCGTTTGGAACTCGATAATTTCCTTTAGCTGCTGTACAGCTGCTCACTATT  
AGGGGTAGTGGCGAAGTTGTGAGTCCCCTCCTCCTCCTAGGTTTCGTCCAGAGGGTTCAAAGATTC  
ACCTTCTTTGTCAAGAAGCGATGAATGACACGTTGTCGTCGACAAAGCACCGTTCTACGTGGTTA  
GTAGAAAGTTATATTATATTAGATTTGTTAGTCAATTGTGTGATTTCTTCCCTAGATTAGGAAGTT  
TTCCGTGGCGATAGGAAGGTTTGTCTTTTACCTTCTTTGCTATGCTGGACACAAAAGATTTTC  
TTTTCTTTATTTTAAAAAAA

Figura 10

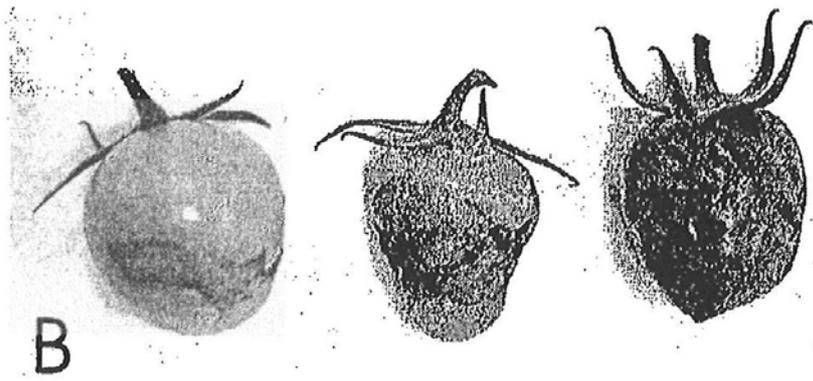
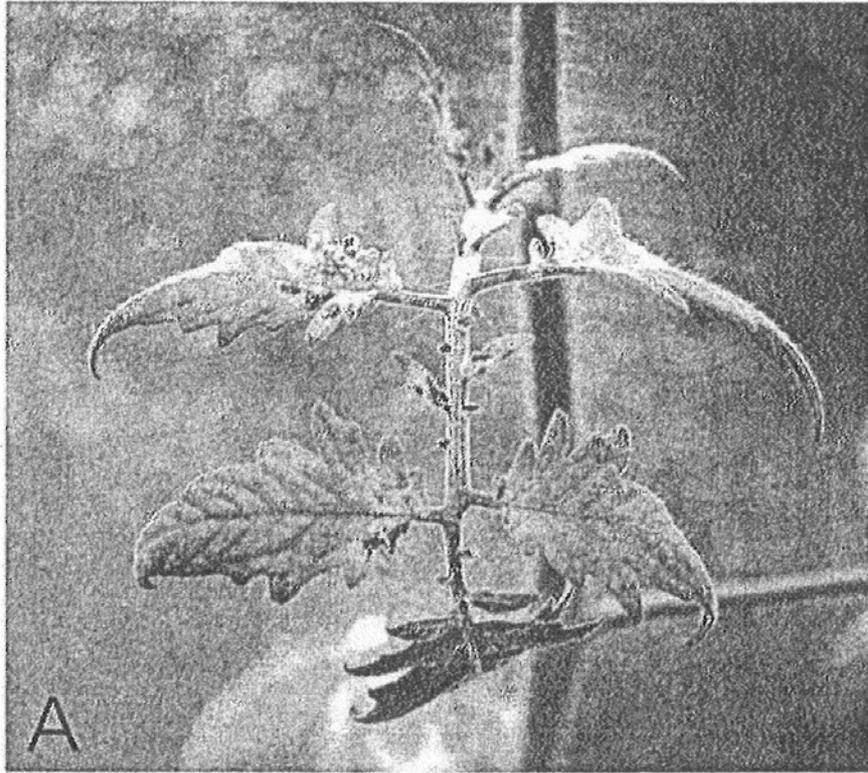


Figura 11

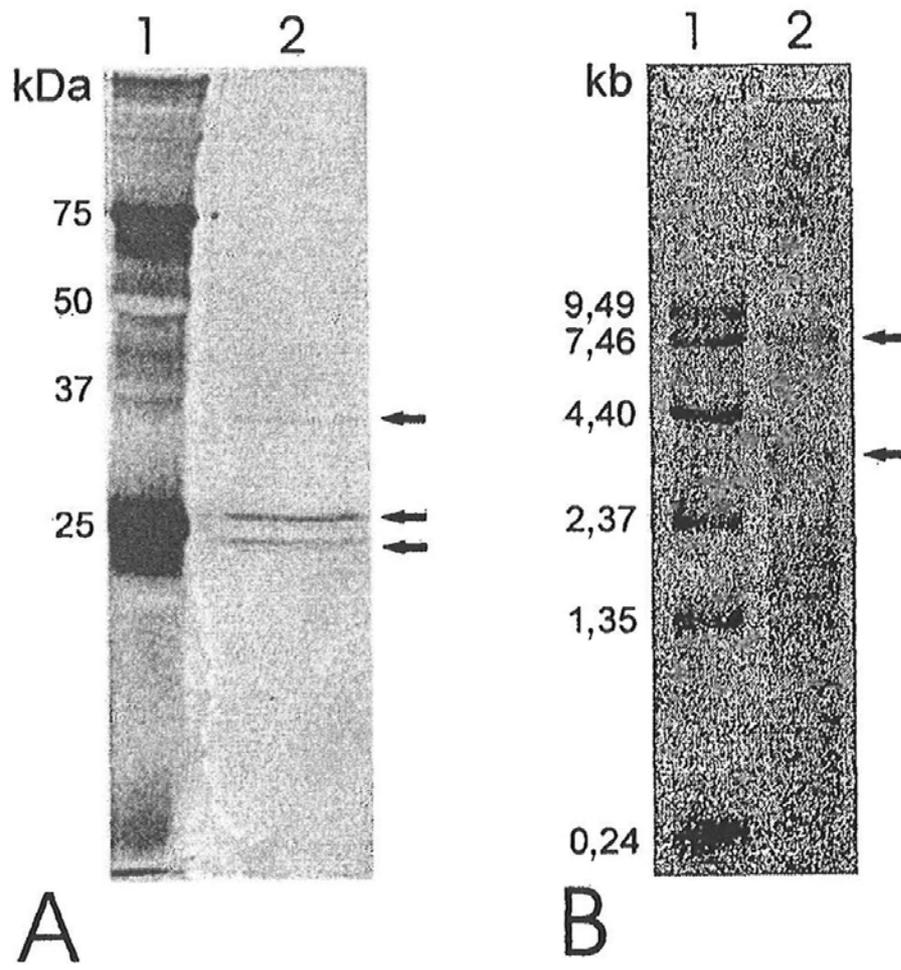


Figura 12

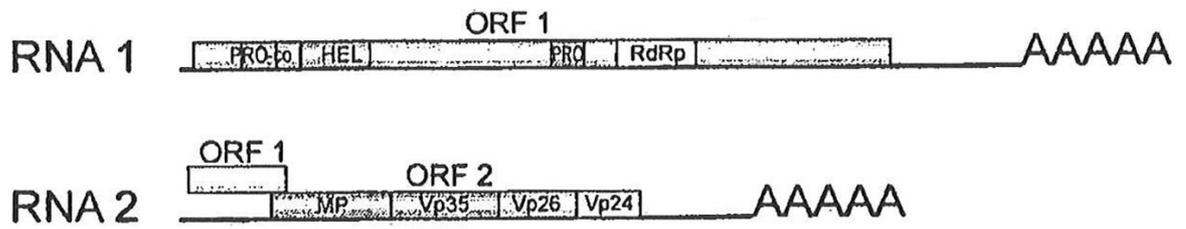


Figura 13

