

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 128**

21 Número de solicitud: 201530824

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/08** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**12.06.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**16.01.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070442**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (80.0%)**

**C/ Serrano, 117**

**28006 Madrid ES y**

**ABIOPEP, S.L. (20.0%)**

72 Inventor/es:

**ARANDA REGULES, Miguel Ángel;**

**NAVARRO SEMPERE, Raquel;**

**GÓMEZ LÓPEZ, Pedro;**

**AGÜERO GONZÁLEZ, Jesús y**

**MÉNDEZ-COLMENERO, Antonio**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **USO DE DOS AISLADOS DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE PARA CONFERIR PROTECCIÓN FRENTE A UNA INFECCIÓN DEL MISMO VIRUS**

57 Resumen:

Uso de dos aislados del virus del mosaico del pepino dulce para conferir protección frente a una infección del mismo virus.

La presente invención se refiere al uso de dos aislados de cepas distintas del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV, en el que ambos aislados (i) pertenecen a distintas cepas, (ii) interactúan de forma antagonista entre ellos, y (iii) el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES). También se describe el método para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV así como el kit que comprende los componentes necesarios para poner en práctica la presente invención.

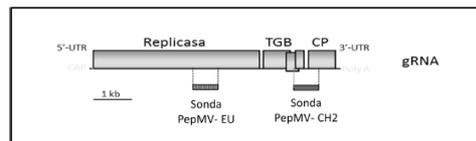


FIG. 3

ES 2 597 128 A1

**USO DE DOS AISLADOS DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE PARA  
CONFERIR PROTECCIÓN FRENTE A UNA INFECCIÓN DEL MISMO VIRUS**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere al uso de dos aislados del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV, en el que dichos aislados pertenecen a cepas distintas entre sí, interactúan de forma antagonista entre ellos y el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES). Así, la presente invención se engloba dentro del campo de la agricultura, concretamente, al sector dirigido al control de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos.

15

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los virus de plantas son responsables de la mayoría de las alarmas sanitarias en agricultura, no solo por causar grandes pérdidas económicas al sector productivo, sino por las escasas e ineficaces medidas de control disponibles para combatir a estos patógenos en los cultivos agrícolas. Los métodos de control de las enfermedades inducidas por virus incluyen la prevención de su transmisión, la aplicación de medidas higiénicas durante la propagación de material vegetal y durante el cultivo, el uso de variedades resistentes y la protección cruzada.

25

Uno de los virus que está causando problemas más graves en el cultivo del tomate es el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus* o PepMV). PepMV pertenece al género *Potexvirus* y fue aislado por primera vez de plantas de *Solanum muricatum* en Perú en 1974. PepMV se reconoció como patógeno de tomate en Holanda en 1999 y a partir de entonces, y en un periodo de 4 años, aparecieron focos de la enfermedad causada por PepMV en las principales zonas productoras de tomate de Europa y América. PepMV puede inducir en tomate una gama de síntomas que comprenden mosaicos verdes suaves, mosaicos amarillos brillantes, abullonados pronunciados junto con otras distorsiones de las hojas y estriaduras verdes en los tallos. PepMV afecta críticamente al rendimiento y a la calidad de los frutos, por lo que hoy en día está considerado como un virus de gran importancia para la agricultura,

35

estando incluido en la lista de alertas de la Organización Europea de Protección de Cultivos (EPPO, 2011). En Europa su presencia está descrita en 19 países y supone una grave amenaza para la producción de tomate en Holanda, Bélgica, Polonia, Francia y España, al menos.

5

La epidemiología molecular de las poblaciones naturales de PepMV en España ha sido estudiada por Gómez y col., 2009 (Journal of Virology, 83(23):12378-12387). Estos autores mostraron que las poblaciones de este virus en las zonas productoras de tomate en invernadero en la región de Murcia, estaban compuestas por aislados de dos cepas del virus, la cepa denominada chilena (CH2) y la cepa europea (EU) que co-circulaban. Determinaron que en plantas de tomate infectadas con un aislado representativo de la cepa CH2, o con un aislado representativo de la cepa EU, el aislado CH2 se acumulaba en mayor proporción que el aislado EU. Sin embargo, cuando los dos aislados co-infectaban la misma planta se producía un antagonismo asimétrico entre los aislados de ambas cepas, de tal manera que el aislado CH2 pasaba a acumularse a niveles inferiores que el EU, mientras que los niveles de acumulación de este último permanecían inalterados. Asimismo, demostraron que la co-infección con ambas cepas incrementaba el rango de huéspedes de PepMV y que las plantas co-infectadas se mantenían sin síntomas varias semanas tras la inoculación. Estos autores apuntaban que dicha falta de síntomas podría representar un problema grave para la prevención y gestión de la enfermedad por los agricultores, debido a la imposibilidad de distinguir plantas sanas de las co-infectadas actuando aquellas como reservorios de la enfermedad.

10

15

20

25

30

Los métodos de control de las enfermedades inducidas por PepMV incluyen esencialmente la destrucción de plantas infectadas y la prevención de la transmisión del virus mediante medidas higiénicas durante el cultivo y propagación de material vegetal. Sería muy deseable poder contar con variedades comerciales de tomate resistentes a PepMV, pero de momento no existe en el mercado ninguna de estas variedades, y lo previsible es que éstas no lleguen a estar disponibles a corto plazo, ya que las escasas fuentes de resistencia identificadas manifiestan resistencia parcial, específica de cepa viral y que se hereda como un carácter poligénico.

35

Otra alternativa para el control de la enfermedad podría ser la protección cruzada. La protección cruzada en virus de plantas se describió hace varias décadas (Hull, 2014. Plant Virology, Academic Press), y se ha usado en casos de emergencias

fitosanitarias como, por ejemplo, la causada por el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus Tristeza Virus*, CTV) en Brasil (Moreno y col., 2008. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251-268). La protección cruzada (también denominada pre-inmunización) se basa en la infección con un aislado atenuado del virus que causa sólo síntomas leves en el cultivo y evita la infección por un aislado más virulento del mismo virus, lo que entraña teóricamente algunos riesgos fitopatológicos, pero se ha utilizado con éxito y debe ser contemplada para su uso cuando no existan medios de control eficientes frente a problemas graves (Hull, 2014, citado *ad supra*).

10 La posibilidad de utilizar protección cruzada frente a las infecciones por PepMV ha sido estudiada por algunos autores. Hanssen y col., 2010 (*Plant Pathology*, 59:13-21) encontraron que la protección frente a la cepa CH2 solo era efectiva pre-inoculando las plantas con un aislado atenuado de la misma cepa dado que de otro modo los síntomas de la enfermedad se acentuaban. Asimismo, concluyeron que una estrategia de control de la enfermedad basada en protección cruzada puede ser viable únicamente en áreas donde sólo predomine una cepa de PepMV siempre y cuando la población del virus sea monitorizada intensamente y se implementen medidas estrictas de higiene durante el cultivo y entre los diferentes ciclos de cultivo. Por su parte Schenk y col., 2010 (*Eur J Plant Pathol*, 127:246-261) estudiaron el potencial de uso de aislados atenuados de PepMV para la protección cruzada de tomate frente a infección con aislados virulentos de genotipos Europeos (EU) y Peruanos (PE). Estos autores concluyeron que la protección con aislados atenuados podría funcionar solamente bajo condiciones muy definidas y controladas. Además, dado que los experimentos se realizaron en condiciones de invernadero experimental, apuntaron que la protección cruzada en campo puede no ser efectiva debido a la presencia de numerosas variantes del virus y que ésta funcionaba bien únicamente cuando existía una proximidad genética elevada entre el aislado atenuado y el agresivo.

30 Por todo ello, los diferentes abordajes para protección cruzada contra PepMV no han funcionado hasta la fecha y es necesario el desarrollo de métodos de protección cruzada frente a PepMV que permitan una protección de amplio espectro, impidan la sobreinfección con aislados más agresivos del virus, aseguren protección en condiciones de cultivo comercial, sean fiables, seguros y de fácil aplicación.

35 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Los inventores de la presente invención han descubierto que la inoculación sobre una planta de tomate de dos aislados de cepas distintas del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) que interaccionan de forma antagonista entre ellos, impide la infección de la planta por aislados agresivos de PepMV, lo que asegura la protección frente a las poblaciones de PepMV en el campo, proporcionando un método de protección fiable, seguro y de fácil aplicación. Como se muestra en el Ejemplo 2, los inventores administraron a plantas de tomate un inóculo obtenido a partir de la combinación de aislados de dos cepas de PepMV, cepa chilena (CH2) y la cepa europea (EU), y observaron que las plantas tratadas con este inóculo mostraron un vigor superior al mostrado por las plantas no tratadas, tanto en las plantas infectadas posteriormente con el aislado agresivo de PepMV (PepMV-P5) como en las no infectadas (Figuras 5A y 5B). Posteriormente, estos resultados fueron corroborados por ensayos en campos de cultivo comerciales de tomate (Ejemplos 3 y 4).

A la vista de este hecho, los inventores han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

*Uso de aislados de cepas de PepMV para conferir protección frente a infecciones por PepMV*

La presente invención se basa en el hecho de que la infección de una planta por dos aislados de cepas distintas de PepMV que interaccionan de forma antagonista confiere protección a dicha planta frente a infecciones por aislados más agresivos de PepMV. Para ello, los aislados de PepMV deben cumplir dos características: (1) pertenecer a cepas distintas y (2) interactuar de manera antagonista uno frente al otro. Como sabe el experto en la materia, esta forma de conferir protección se denomina "protección cruzada" y se refiere a la inoculación de una planta con un virus con la finalidad de conferir protección a dicha planta contra una infección posterior del mismo virus, también conocido como exclusión de la sobreinfección (*superinfection exclusion*). De esta manera, la inoculación de estos dos aislados sobre la planta previene la infección de un aislado virulento de una u otra cepa que ataque posteriormente a dicha planta. En general, se dice que existe "protección cruzada" (en inglés "*cross protection*" o "*cross protecting*") cuando más del 50% de las plantas inoculadas con los aislados virales se muestran resistentes a una infección posterior del mismo virus (tal como se describe en Lecoq, H. (1998) "*Control of plant virus diseases by cross protection*" en Hadidi A., Khetarpal R. K. y Koganezawa H.eds.,

*Plant Virus Disease Control*, APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 33-40).

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un aislado de una primera cepa del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) y un aislado de una segunda cepa de PepMV para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV, en el que dichos aislados:

- (i) pertenecen a distintas cepas,
- (ii) interactúan de forma antagonista entre ellos, y
- (iii) el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES).

En la presente invención, se entiende que una planta está protegida frente a, o es resistente a, una infección de PepMV cuando la planta tras ser inoculada con aislados de PepMV no presenta síntomas o presenta una reducción/disminución de los síntomas habituales de una infección por PepMV, es decir, mosaicos verdes suaves, mosaicos amarillos brillantes, abullonados pronunciados junto con otras distorsiones de las hojas y estriaduras verdes en los tallos, así como distribución irregular de pigmentos en frutos y otras distorsiones en los frutos que pueden hacer que éstos pierdan su valor comercial. Puesto que la inoculación de ambos aislados en una planta confiere protección frente a una infección posterior de PepMV, a dicha combinación de aislados también se la puede denominar vacuna o pre-inóculo.

En el contexto de la presente invención se entiende que dos aislados cualesquiera pertenecen a distintas cepas de PepMV cuando la identidad de secuencia entre sus genomas está comprendida entre un 80% y un 92% (sin incluir el 92%). Por el contrario, se entiende que dos aislados cualesquiera pertenecen a la misma cepa de PepMV cuando la identidad de secuencia entre sus genomas está comprendida entre un 92% y un 100% (incluyendo el 92%).

En la presente invención se entiende por "identidad" o "identidad de secuencia al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos calculado mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se calculará un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede

determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, son de dominio público en la página web de The National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Por otro lado, otra de las características de los aislados empleados en la presente invención es que tiene que existir una interacción antagonista entre ellos. Las interacciones entre virus de plantas en infecciones mixtas se clasifican generalmente como sinérgicas o antagonistas. Una interacción sinérgica tiene un efecto facilitador en ambos virus que se suele manifestar como un incremento de la replicación viral en la planta huésped. Mientras que en una interacción antagonista generalmente uno de los virus sale beneficiado (o no se altera) por la interacción, y su presencia disminuye la tasa de replicación y la acumulación del otro virus (Syller, 2012. Molecular Plant Pathology, 13(2)204-216). Típicamente, el ensayo que se realiza para determinar cómo interaccionan dos aislados consiste en co-inocular ambos en plantas, muestrear esas plantas a distintos tiempos post-inoculación, y determinar en esas muestras la acumulación de los dos aislados mediante ensayos cuantitativos como por ejemplo la transcripción reversa seguida por PCR cuantitativa en tiempo real.

En la presente invención, las cepas pertenecen al virus del mosaico del pepino dulce o PepMV del inglés *Pepino mosaic virus*. PepMV es un virus que pertenece al género *Potexvirus* y está formado por una sola cadena de ARN de sentido positivo con un tamaño de 6,4kb. Utilizando el criterio mencionado más arriba, se han descrito 4 cepas de PepMV, la que engloba a los genotipos europeo (EU) y peruano original (PE), la chilena (CH2), la americana (US) y la Sur-peruana (PES) (Moreno-Pérez y col., 2014, citado *ad supra*) (Figura 1). Cada una de estas cepas está constituida por un conjunto de individuos denominados aislados. En la presente invención, el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES). En una realización particular, el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2) y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU).

Ejemplos de aislados de la cepa CH2 incluyen, sin limitar a, PepMV-PS5, PepMV-KLP2 y PepMV-P5.

Ejemplos de aislados de la cepa EU incluyen, sin limitar a, PepMV-Sp13, PepMV-LP2001 y PepMV LI2000.

5 Ejemplos de aislados de la cepa US incluyen, sin limitar a, PepMV-US1.

Ejemplos de aislados de la cepa PES incluyen, sin limitar a, PepMV-Chi2.9, PepMV-Yur1.5 y PepMV-Tor9.

10 En una realización particular, el aislado de la primera cepa de PepMV del genotipo chileno es el aislado PepMV-PS5 y/o el aislado de la segunda cepa de PepMV del genotipo europeo es el aislado PepMV-Sp13.

15 El aislado PepMV-PS5 fue depositado bajo el tratado de Budapest en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, GERMANY) el 4 de junio de 2015. El número de depósito asignado fue el DSM32070.

20 El aislado PepMV-Sp13 fue depositado bajo el tratado de Budapest en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, GERMANY) el 4 de junio de 2015. El número de depósito asignado fue el DSM32069.

25 En consonancia con la presente invención, estos aislados tienen entre sus genomas una identidad inferior al 92% y se comportan de forma antagonista una frente a la otra, tal como se demuestra en Gómez y col, 2009. *Journal of Virology*, 83(23):12378-12387.

30 Tal como se ha explicado al comienzo de la presente descripción, la aplicación a las plantas de los aislados de dos cepas distintas de PepMV y que interactúan de forma antagonista entre ellos confiere protección frente a infecciones posteriores de PepMV. En el contexto de la presente invención, los términos “aplicación”, “administración” e “inoculación” son equivalentes y todos ellos implican la puesta en contacto de los  
35 aislados de las cepas con las plantas a proteger o vacunar frente a una infección de PepMV.

La inoculación de los aislados de las cepas puede hacerse por cualquier método de los conocidos en el estado de la técnica. Ejemplos de estos métodos de inoculación incluyen, sin limitarse a, pulverización, empapamiento, inmersión prolongada, etc.

5

El uso de abrasivos es una práctica común en la inoculación. Los tres tipos comunes de abrasivos que se utilizan son carburo de silicio (carborundum), óxido de aluminio (Corundum) y tierra de diatomacia (Celite). El abrasivo puede ser fino (tamizado con malla de trama 300 a 600 hilos por pulgada (118/cm)) y puede agregarse al inóculo o espolvorearse sobre las hojas de la planta. La frotación de las hojas debe ser suave para no producir lesiones de frotación visibles en las hojas. La infección puede a veces incrementarse frotando la misma superficie 3 ó 4 veces en vez de una sola.

10

Uno de los factores que predispone a las plantas a la infección viral es el estadio en que se encuentre la planta. En general, la hora del día más apropiada para proceder con la inoculación es aquella que coincide con la mayor turgencia de las células, preferiblemente, poco después de la irrigación.

15

Como sabe el experto en la materia, cuando el número de plantas a inocular es relativamente bajo, la técnica de inoculación más habitual es frotar un jugo proveniente de alguna planta infectada sobre hojas de plantas sanas. En un ensayo típico de transmisión mecánica, las plantas a inocular se espolvorean con un abrasivo y los tejidos de una planta infectada se maceran con un mortero y pistilo en una solución tampón, usando de 1 a 10 mL de la solución por cada gramo de tejido. A continuación, con una almohadilla de gasa, hisopo de algodón, pincel, pistilo de mortero, espátula, estaquita de maceta, etc., se sumerge en el inóculo, y se frota suavemente la superficie de las hojas de la planta que se va a inocular. Se puede enjuagar con agua las hojas después de la inoculación pero esto puede aumentar, disminuir o tener efecto nulo sobre la infección, dependiendo de la combinación virus-hospedante e inóculo. Tras esto, se colocan las plantas en las condiciones apropiadas (e.g. invernadero) para que el inóculo colonice la planta. Esta técnica fundamental tiene muchas alternativas de modificación.

20

25

30

Alternativamente, la inoculación mediante pulverización a presión alta es la técnica de elección cuando se necesita inocular un gran número de plantas con un virus dado. La pistola pulverizadora es útil para inocular plantas individuales; con este método se

35

incorpora alrededor de 1% de Carborundum fino (u otro abrasivo) al inóculo y se agita para mantenerlo en suspensión durante la inoculación. Se aplica la pulverización a una presión entre 60 y 80 lbs/pulg<sup>2</sup> (psi) [413,6855 y 551,5807 KPa], y se mantiene la boquillas a 1-2 cm de la superficie de la hoja. Otros tipos de pulverizadores también se han usado con éxito para inoculaciones masivas en el campo.

Como entiende el experto en la materia, un virus es un agente infeccioso microscópico acelular que solo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos. Por lo tanto, en la presente invención, los aislados de las cepas se administrarán dentro de una célula denominada "portadora" que, preferiblemente, será un extracto del material vegetal donde se ha multiplicado el virus previamente. El extracto de material vegetal portador de inóculo infectivo de los aislados de cada una de las cepas en cuestión pueden utilizarse para la inoculación de las plantas en diferentes proporciones uno respecto al otro. Así, los aislados de las cepas pueden utilizarse en una proporción 1:1, 1:2, 1:3, u otras, un aislado frente al otro. No obstante, en una realización particular, la inoculación de los aislados de las cepas a la planta se lleva a cabo en una proporción de 1:1 uno frente al otro, es decir, se inocular la misma cantidad de material vegetal infectivo portador de cada aislado de cada cepa. No obstante, los inventores han observado que, cuando los aislados pertenecen a la cepa CH2 y a la cepa EU, respectivamente, la proporción 1:2 confiere una mejor protección frente a PepMV. Así, en una realización particular, la proporción del aislado de la cepa CH2 de PepMV (por ejemplo, PepMV-PS5) frente al aislado de la cepa EU de PepMV (por ejemplo, PepMV-Sp13) es 1:2.

La administración de los aislados a las plantas puede hacerse de manera simultánea (al mismo tiempo) o de manera secuencial (primero uno y luego el otro). Por lo tanto, los aislados pueden estar en la misma composición o en composiciones separadas para su administración simultánea o secuencial respectivamente. Así, en una realización particular, los aislados están comprendidos dentro de la misma composición o en composiciones separadas.

Como entiende el experto en la materia, la concentración de los aislados en la composición puede variar en un amplio intervalo, pero siempre en una concentración mínima necesaria, o cantidad eficaz, para producir infección. Dicha concentración mínima necesaria depende del número de copias del genoma viral de cada aislado. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad eficaz" se refiere a la

cantidad suficiente para obtener los resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una sola vez o en varias administraciones. En términos de tratamiento y protección, una "cantidad suficiente" es la cantidad necesaria para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, impedir, retardar o retrasar la infección por PepMV de las plantas. Es práctica de rutina para el experto en la materia determinar cuál es la concentración mínima necesaria en función del virus, del estado fisiológico de la planta, etc.

Así, en una realización particular, la concentración de los aislados de cada cepa de PepMV en la composición es de entre  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ . Cualquier concentración de los aislados comprendida dentro de este intervalo se considera una cantidad eficaz para producir el efecto deseado, es decir, conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV.

En otra realización más particular, la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo chileno en la composición es de entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo europeo en la composición es de entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ . En otra realización todavía más particular, la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo chileno en la composición es  $1 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo europeo en la composición es  $2 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .

Adicionalmente a los aislados virales, la composición puede comprender otros componentes o constituyentes que faciliten la administración de los aislados a las plantas, y/o que faciliten la infección, tales como, pero no limitadas a, el extracto de material vegetal infectivo portador de los aislados de las cepas, un vehículo agrícolamente aceptable, tampones, abrasivos, solventes, reguladores del crecimiento, etc. siempre y cuando todos ellos permitan o no perjudiquen ni comprometan la viabilidad de las cepas de PepMV.

La concentración del extracto de material vegetal infectivo portador de los aislados de las cepas que garantiza la cantidad mínima necesaria en la composición para conferir protección a las plantas es de entre 8 y 25 g/L, preferiblemente, una concentración de de entre 10 y 20 g/L, más preferiblemente a un concentración de 20 g/L.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "vehículo agrícolamente aceptable" se utiliza para indicar que dicho vehículo comprende una sustancia o combinación de sustancias que puede(n) ser utilizada(s) en el sector agrícola, e incluye cualquier material líquido o sólido agrícolamente aceptable que pueda  
5 añadirse y/o mezclarse con los aislados de las cepas de PepMV (o con el extracto del material vegetal portador de los aislados de las cepas) para ponerlas en una forma de aplicación más sencilla o mejorada, o bien con una intensidad de activación aplicable o deseable. Debido a la naturaleza del ingrediente activo de la composición (los aislados de PepMV), dicho vehículo agrícolamente aceptable tiene que permitir o no  
10 perjudicar ni comprometer la viabilidad de dicho microorganismo.

En una realización particular, la composición comprende un abrasivo. La función del abrasivo y ejemplos de abrasivos han sido explicados en párrafos anteriores.

15 La clase de tampón a usarse en el inóculo (fosfato, borato, citrato, etc.) depende de la combinación virus-hospedante. Las soluciones tampón son comúnmente empleadas a concentraciones de 0,01 M a 0,1 M y a pH 6 a 9. Algunos virus requieren un agente reductor en el inóculo para una buena transmisión. El sulfito de sodio, ascorbato de sodio y mercaptoetanol a concentraciones de 0,1 a 1% pueden agregarse a la  
20 solución tampón para determinar si esto mejora la transmisión. Las enzimas oxidativas inhibitoras, tales como dietilditiocarbamato de sodio a concentraciones de 0,001 a 0,01 M han incrementado la transmisión en algunos casos. Algunas plantas contienen inhibidores de la infección y la transmisión puede ser mejorada diluyendo el inóculo. La transmisión de virus a partir de plantas con un alto contenido de taninos por lo  
25 general es difícil, e.g. en el caso de plantas arbóreas; comúnmente se puede mejorar la transmisión triturando el tejido infectado en nicotina al 2%, bentonita al 1% o la combinación de ambos materiales.

La composición de la invención puede emplearse bien en forma sólida o bien en forma  
30 líquida, por ejemplo, en forma de un polvo humectable o de un concentrado emulsionable que incorpora los diluyentes convencionales. Dichas composiciones pueden obtenerse de manera tradicional, por ejemplo, mezclando los aislados de las cepas de PepMV con un diluyente y opcionalmente con otros ingredientes de formulación, como los conocidos por el experto en la materia. La composición de la  
35 invención puede formularse de manera que resulte apta para su administración por

pulverización, espolvoreo, o cualquier otro procedimiento de administración agrícola conocido en el estado de la técnica.

5 Cualquier planta puede ser objeto de la presente invención, tanto mono- como dicotiledónea. En la presente invención, dentro del término planta se incluyen plantas completas, antecesores y progenies de las plantas y partes de las plantas incluyendo brotes, tallos, hojas, raíces (incluyendo tubérculos), flores y tejidos y órganos, que pueden ser susceptibles a una infección viral.

10 Las plantas incluidas en la presente invención pertenecen a la superfamilia Viridiplantae. Ejemplos de plantas incluyen, sin limitar a, *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Abelmoschus spp.*, *Agave sisalana*, *Agropyron spp.*, *Agrostis stolonifera*, *Allium spp.*, *Amaranthus spp.*, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona spp.*, *Apium graveolens*, *Arachis spp.*, *Artocarpus spp.*, *Asparagus officinalis*, *Avena spp.* (e.g. *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua var. sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa sp.*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica spp.* (e.g. *Brassica napus*, *Brassica rapa ssp. [canola, oilseed rape, turnip rape]*), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum spp.*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya spp.*, *Carthamus tinctorius*, *Castanea spp.*, *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum spp.*, *Citrullus lanatus*, *Citrus spp.*, *Cocos spp.*, *Coffea spp.*, *Colocasia esculenta*, *Cola spp.*, *Corchorus sp.*, *Coriandrum sativum*, *Corylus spp.*, *Crataegus spp.*, *Crocus sativus*, *Cucurbita spp.*, *Cucumis spp.*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Desmodium spp.*, *Dimocarpus longan*, *Dioscorea spp.*, *Diospyros spp.*, *Echinochloa spp.*, *Elaeis* (e.g. *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus sp.*, *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus sp.*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum spp.*, *Fagus spp.*, *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella spp.*, *Fragaria spp.*, *Ginkgo biloba*, *Glycine spp.* (e.g. *Glycine max*, *Soja hispida or Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus spp.* (e.g. *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus spp.*, *Hordeum spp.* (e.g. *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans spp.*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus spp.*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus spp.*, *Luffa acutangula*, *Lupinus spp.*, *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon spp.* (e.g. *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma spp.*, *Malus spp.*, *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot spp.*, *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus spp.*, *Mentha spp.*, *Miscanthus sinensis*, *Momordica spp.*, *Morus nigra*, *Musa spp.*, *Nicotiana spp.*, *Olea spp.*, *Opuntia*

spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (e.g. *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*,  
 5 *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (e.g. *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* or *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*,  
 10 *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsac[upsilon]m dactyloides*, *Triticosecale rimpau*, *Triticum* spp. (e.g. *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* or *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp.,  
 15 *Zea mays*, *Zizania palustris* y *Ziziphus* spp., entre otras.

Preferiblemente, ejemplos de plantas objeto de la presente invención incluyen, sin limitar a, plantas de interés agronómico, tales como plantas de cereales (trigo, centeno, cebada, etc), árboles frutales, plantas forrajeras (por ejemplo, las  
 20 leguminosas, berenjenas, pimientos, melones, sandías, pepinos, calabacines, judías, guisantes, habas, cebollas, col china, perejil, rabanito, etc.), y plantas ornamentales.

En una realización particular, la planta de la presente invención pertenece al género *Solanum* sp., en particular es una tomatera. La tomatera de la presente invención  
 25 puede ser, por ejemplo, *Solanum lycopersicum*, *Solanum peruvianum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicoides*, *Solanum sitiens*, *Solanum juglandifolium*, *Solanum ochranthum*, *Solanum cheesmaniae* o *Solanum galapagense*. Preferiblemente la tomatera es de la especie *Solanum lycopersicum*, o sus sinónimos *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon esculentum*  
 30 var. *esculentum*, *Solanum esculentum*, *Solanum esculentum* Dunal. Variedades de tomatera incluyen, sin limitarse a, Anna Russian, Applause, Aussie, Baladre, Bella rosa, Black cherry, Black russian, Blondkopfchen, Brandywine, Carbon, Ceylan, Cherokee purple, Cherry, Cherry Redondo, Tomate Cherry Pera Amarillo, Comanche, Costoluto genovese, Ditmarcher, Eros, Gallician, Glacier, Gartenperle, Green  
 35 sausage, Grushovka, Harzfeuer, Hugh, Japanesse black, Jersey devil, Kosovo, Krim black, Kumato, Liguria, Limachino, Lime green salad, Manitoba, Marvel stripe,

5 Moneymaker, Muxamiel, Estrella, Opalka, RAF, Black Pear, Piña Hawaiana, Rio grande, San marzano, Siberian, Sprite, Sugary, Sun sugar, Tigerella, White Queen, Raf Claudia, Roma, Valenciano, Pera de Girona, Montserrat, Corazón de Buey, Angela, Colgar en Rama, Ciruela Negro, Optima, Pata Negra, Copia, Velasco, 10 Montenegro, Vertyco, Ventero, Ramyle, Pitenza, Paladium, Mayoral, Razymo, Motto, Caniles, Byelsa, Royalty, Trujillo, Delizia, Dumas Duratom, Larguero, Torry, Tovistar, Pintón, Grueso, Larga Vida, Marenza, Window box Roma, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Jawara, Velasco, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Intense, Pera Fitto, Vernal, Cecilio, Cherry Kumato, Cherry 15 Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar, Cherry Guindos, Cherry Marinica y Cherry Angel.

15 En una realización particular, la planta es una planta de tomate, preferiblemente, la planta de tomate pertenece a una variedad de tomate seleccionada del grupo que consiste en la variedades Caniles, Ventero, Intense, Pera Fitto, Ventero, Angele, Pitenza, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Velasco, Jawara, Muxamiel, Montenegro, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Vernal, Cecilio, Kumato, Cherry Kumato, Cherry Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar, 20 Cherry Guindos, Cherry Marinica y Cherry Angel.

20

*Método para conferir protección frente a infecciones por PepMV*

25 Como se deriva del uso descrito en el aspecto inventivo anterior, la presente invención también se relaciona con un método para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV.

30 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV, de aquí en adelante "método de la invención", que comprende inocular a dicha planta con un aislado de una primera cepa de PepMV y un aislado de una segunda cepa de PepMV, en el que dichos aislados:

- (i) pertenecen a distintas cepas,
- (ii) interactúan de forma antagonista entre ellos, Y
- (iii) el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al 35

genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES).

5 Los términos y expresiones empleados en el método de la invención han sido descritos y explicados en párrafos anteriores y son aplicables al presente aspecto inventivo.

10 En una realización particular, el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2) y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU).

En otra realización más particular, el aislado de la primera cepa de PepMV del genotipo chileno es el aislado PepMV-PS5 y/o el aislado de la segunda cepa de PepMV del genotipo europeo es el aislado PepMV-Sp13.

15 En una primera etapa, el método de la invención comprende inocular a una planta con un aislado de una primera cepa de PepMV y un aislado de una segunda cepa de PepMV en el que dichos aislados (i) pertenecen a cepas distintas, e (ii) interactúan de forma antagonista entre ellas. Técnicas de inoculación de las cepas a las plantas han sido explicadas en el anterior aspecto inventivo (uso de las cepas).

20 En una realización particular, la inoculación de los aislados a la planta se lleva a cabo en una proporción 1:1 uno frente a otro que, en otra realización más particular, la inoculación a la planta de un aislado del genotipo CH2 frente a un aislado del genotipo EU se lleva a cabo en una proporción 1:2.

25 Por otro lado, la inoculación puede llevarse de manera simultánea o secuencial. En la presente invención se entiende por inoculación simultánea, a la inoculación de los dos aislados al mismo tiempo, es decir, ambos aislados forman parte de la misma composición que va a ser administrada a la planta, o aunque formen parte de composiciones separadas, la inoculación se realiza al mismo tiempo. En la presente  
30 invención se entiende por inoculación secuencial, a la inoculación de las plantas por un aislado y a continuación la inoculación del otro. Como entiende el experto en la materia, en este caso ambos aislados irán formulados en composiciones separadas. En otra realización particular, los aislados están comprendidos dentro de la misma  
35 composición o en composiciones separadas.

En una realización particular, la concentración de los aislados de cada cepa de PepMV en la composición es de entre  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ . Cualquier concentración de los aislados comprendida dentro de este intervalo se considera una cantidad eficaz para producir el efecto deseado, es decir, conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV.

En otra realización más particular, la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo chileno en la composición es de entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo europeo en la composición es de entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ . En otra realización todavía más particular, la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo chileno en la composición es  $1 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de la cepa de PepMV del genotipo europeo en la composición es  $2 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .

En otra realización particular, la composición comprende un abrasivo.

En una realización particular, la planta es una planta de tomate, preferiblemente, la planta de tomate pertenece a una variedad de tomate seleccionada del grupo que consiste en la variedades Caniles, Ventero, Intense, Pera Fitto, Ventero, Angele, Pitenza, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Velasco, Jawara, Muxamiel, Montenegro, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Vernal, Cecilio, Kumato, Cherry Kumato, Cherry Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar, Cherry Guindos, Cherry Marinica y Cherry Angel.

*Kit para conferir protección frente a infecciones por PepMV y su uso*

Como entiende el experto en la materia, los elementos necesarios para la puesta en práctica de la invención estén disponibles al experto en la materia, por ejemplo, en forma de kit.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante “kit de la invención”, que comprende:

- Un extracto vegetal que comprende un inóculo puro de un aislado de una primera cepa de PepMV, y
- Un extracto vegetal que comprende un inóculo puro de un aislado de una

segunda cepa de PepMV,  
en el que ambos aislados (i) pertenecen a distintas cepas, (ii) interactúan de forma  
antagonista entre ellos, y (iii) el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al  
genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al  
5 genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE)  
o al genotipo sur peruano (PES).

A partir del kit de la invención, el experto en la materia puede preparar los inóculos (o  
composiciones), necesarios para la puesta en práctica del método de la invención y  
10 conferir protección a plantas frente a una infección de PepMV. La preparación de  
dichos inóculos o composiciones para su administración a las plantas es práctica de  
rutina para el experto en la materia. Por otro lado, la forma de administración de  
dichos inóculos o composiciones a las plantas ha sido explicada en la presente  
descripción para otros aspectos inventivos. El kit de la invención contempla todas las  
15 realizaciones particulares descritas para anteriores aspectos inventivos.

En una realización particular, el kit de la invención comprende, además, un abrasivo.  
Ejemplos de abrasivos han sido descritos previamente en la presente descripción.

20 En una realización particular, el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al  
genotipo chileno (CH2) y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al  
genotipo europeo (EU).

En otra realización más particular, el aislado de la primera cepa de PepMV del  
25 genotipo chileno es el aislado PepMV-PS5 y/o el aislado de la segunda cepa de  
PepMV del genotipo europeo es el aislado PepMV-Sp13

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit para conferir protección  
a una planta frente a una infección por PepMV.

30 En una realización particular, la planta es una planta de tomate, preferiblemente, la  
planta de tomate pertenece a una variedad de tomate seleccionada del grupo que  
consiste en la variedades Caniles, Ventero, Intense, Pera Fitto, Ventero, Angele,  
Pitenza, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Velasco,  
35 Jawara, Muxamiel, Montenegro, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Vernal,  
Cecilio, Kumato, Cherry Kumato, Cherry Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar,

Cherry Guindos, Cherry Marinica y Cherry Angel, o cualquier otra variedad de tomate comercial.

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

10

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Reconstrucción de la relación filogenética entre aislados de PepMV. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia nucleotídica del genoma completo de 30 aislados de las cepas de PepMV de los 4 genotipos descritos (CH2, US1, EU, LP) y tres aislados (Yur1.5, Tor9y Ch2.9) de la cepa del genotipo PES. Éstos últimos se muestran subrayados en el árbol. El soporte estadístico de cada nodo se determinó con un análisis de bootstrap con 1.000 repeticiones. Tomado de Moreno-Pérez y col. 2014, Journal of Virology, 88(6):3359-3368.

20

**Figura 2.** Muestra el estado fenológico de una planta de tomate en el momento de su trasplante desde el semillero al invernadero comercial.

**Figura 3.** Muestra el genoma de PepMV. Se indican los fragmentos de genoma utilizados como sondas para distinguir entre aislados de las cepas EU y CH2.

25

**Figura 4.** Muestra el efecto de las pre-inmunizaciones en tomate con inóculos de la cepa EU (PepMV-Sp13), CH2 (PepMV-PS5) y el producto objeto de la presente invención en la sobreinfección con el aislado virulento PepMV-P5. Panel izquierdo: A. Control sano, B: inoculado con el aislado de la cepa Europea (EU) (PepMV-Sp13), C: inoculado con el aislado de la cepa Chilena (CH2) (PepMV-PS5) y D: inoculado con el producto objeto de la presente invención mezcla de aislados de la cepa Europea (EU) (PepMV-Sp13) y de la cepa Chilena (CH2) (PepMV-PS5). Panel derecho los mismos tratamientos sobreinfectados con el aislado agresivo de la cepa CH2, PepMV-P5.

35

**Figura 5A y 5B.** Muestran la cuantificación del efecto de los tratamientos de pre-inmunización con aislados de las cepas EU (PepMV-Sp13), CH2 (PepMV-PS5) y el producto de la invención en la sobreinfección con el aislado virulento PepMV-P5. Figura 5A, efecto en vigor y producción en tomates de la variedad pera y 5B efecto en vigor y producción en tomates de la variedad Kumato. A. Control sano, B: inoculado con el aislado de la cepa europea (EU) (PepMV-Sp13), C: inoculado con el aislado de la cepa Chilena (CH2) (PepMV-PS5). D: inoculado con el producto objeto de la presente invención mezcla de aislados de la cepa Europea (EU) (PepMV-Sp13) y de la cepa Chilena (CH2) (PepMV-PS5). P5 planta sana sobreinfectada con el aislado agresivo de la cepa CH2 PepMV-P5, B+P5, C+P5 y D+P5 son los tratamientos A, B, C y D sobreinfectados con el aislado agresivo de la cepa CH2 PepMV-P5.

**Figura 6.** Muestra el resultado de la pre-inmunización con el producto de la invención en condiciones de producción en invernadero comercial.

**Figura 7.** Gráfico de barras que muestra la eficiencia de la inoculación de los aislados de las cepas EU (PepMV-Sp13) y CH2 (PepMV-PS5) a la hora de conferir protección a plantas de tomate frente a una infección de PepMV más agresiva (PepMV-KLP2). Leyenda: (a) control de plantas sanas, (b) aislado de la cepa EU (PepMV-Sp13); (c) aislado de la cepa CH2 (PepMV-PS5); (d) es la inoculación con el producto objeto de la presente invención; V agresv en el panel de la izquierda es que las plantas han sido pre-inoculadas con un virus agresivo (PepMV-KLP2) como control a la vez que se pre-inoculaban con las otras cepas del ensayo; en el panel de la derecha es la inoculación de las plantas con el virus agresivo PepMV-KLP2 como reto del funcionamiento de los diferentes tratamientos dos semanas después de la pre-inoculación anterior. P. Comercial: producto (tomate) de calidad comercial, P. Destruído: producto (tomate) de destruido (desechado) inespecífico y P. Destruído por virus: producto de destruido (desechado) por síntomas de virus.

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de la invención aquí reivindicada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **1. Cepas, aislados virales y material vegetal**

Los aislados de las cepas virales empleadas en la presente infección, la cepa europea (EU) aislado PepMV-Sp13 y la cepa chilena (CH2) aislado PepMV-PS5, y los aislados virales PepMV-P5, PepMV-CS10 y PepMV-KLP2 de la cepa CH2 se mantienen sobre material infectado y liofilizado de *Nicotiana benthamiana* (hojas con síntomas) que se conserva a 4°C (Aguilar y col., 2002. Archives of Virology, 147(10), 2009-2015).

Las semillas de *N. benthamiana* se someten a un tratamiento con giberelinas 10 mg/mL una noche en oscuridad a temperatura ambiente, a continuación se siembran en bandejas de semillero de 294 alveolos y se mantienen en invernadero con unas condiciones de día y noche de 16 horas a 25-26°C y 8 horas a 19°C, respectivamente, a los 10 días se trasplantan a bandejas de 24 macetas y se mantienen en invernadero, a los 25-26 días tras la siembra (4-5 hojas verdaderas) se inoculan con el aislado de la cepa correspondiente del virus y se mantienen en invernadero hasta la recolección de las hojas con síntomas. Las hojas con síntomas se recolectan, cortan en tiras, se introducen en sobres de papel debidamente etiquetados y se liofilizan.

La plantas de tomate utilizadas en la presente invención son proporcionadas por semilleros comerciales con 5-6 hojas verdaderas (Figura 2), siguiendo procedimientos habituales en el sector.

### **2. Preparación de sondas e hibridación *tissue-print***

Las sondas utilizadas para comprobar la pureza de los inóculos de cada uno de los aislados de las cepas de PepMV de la presente invención (de la cepa europea PepMV-Sp13 y de la cepa chilena PepMV-PS5) se obtuvieron por transcripción *in vitro* del ADN insertado en plásmidos descritos en el estado de la técnica (Sempere y col. 2011, Plant Methods 2011,7:6 y patente española ES2351917B1).

La preparación de las sondas se realizó mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica que emplean DIG-11-UTP para marcar las secuencias aisladas tal como se describe en (Sempere y col. 2011, Plant Methods 2011,7:6 y patente española ES2351917B1) y procedimientos habituales de biología molecular.

El análisis de las muestras por *tissue-print* se efectuó sobre improntas de pecíolo de hoja en membranas de nailon cargadas positivamente (Roche). El proceso de hibridación y detección por quimioluminiscencia se llevó a cabo esencialmente

siguiendo el protocolo propuesto por Roche (*RNA labeling and detection kit*) tal como se describe en la patente española ES2351917B1.

### **Ejemplo 1. Preparación de inóculos**

5 Los aislados de las cepas EU (PepMV-Sp13) y CH2 (PepMV-PS5) fueron inicialmente obtenidos por los inventores en muestreos realizados en invernaderos de cultivo comercial de tomate en 2 áreas de la provincia de Murcia (Mazarrón y Águilas) durante los años 2000 a 2008 (Aguilar y Col 2002, Archives in Virology 147: 2009-2015; Gómez y col., 2009. Journal of Virology 83(23) 12378-12387). A partir de ese  
10 momento se mantienen cultivos puros de los aislados de cada una de las dos cepas en material vegetal liofilizado.

Para la preparación de los inóculos puros se siguieron los siguientes pasos:

1. Generación de los inóculos puros de los aislados de cada cepa del virus
2. Multiplicación del inóculo puro de los aislados de cada cepa del virus

15

1. Generación de los inóculos puros de los aislados de cada cepa del virus a partir de los cultivos puros. Todo el proceso de generación de los inóculos puros se hizo por separado para cada una de las dos cepas. El cultivo puro de los aislados de cada una de las dos cepas se homogeneizó en presencia de un tampón que permita estabilizar  
20 las partículas virales, como por ejemplo tampón fosfato 30 mM a pH=8 en un mortero de porcelana en una proporción 50 mg de material vegetal por 2 mL de tampón. Este homogeneizado se utilizó para inocular hojas de *N. benthamiana* de unos 25-26 días (4-5-hojas verdaderas). Para ello, las hojas a inocular en primer lugar se espolvorearon con un material abrasivo, como por ejemplo carborundo y a  
25 continuación se frotaron con el homogeneizado manualmente. Las plantas así inoculadas con el aislado de cada una de las cepas virales se mantuvieron por separado en un invernadero confinado en condiciones controladas. Transcurridos entre 10 y 15 días las hojas que mostraron síntomas evidentes de infección por PepMV se recolectaron y se obtuvo el inóculo puro de los aislados de cada una de las  
30 dos cepas EU y CH2. Estos inóculos puros que consisten en hojas de *N. benthamiana* infectadas y con síntomas se conservaron por separado a 4°C hasta 4 días para su procesado.

2. Multiplicación. Los inóculos puros de los aislados de cada cepa viral recién  
35 preparados se utilizaron para producir una mayor cantidad de inóculo y generar stocks, en todo momento se manejó el aislado de cada cepa por separado. Para ello

se trituraron en presencia de un tampón con el fin de estabilizar las partículas virales, como por ejemplo tampón fosfato 30 mM a pH=8 a una concentración de 10 g/L. A continuación se inoculó un número de plantas de *N. benthamiana* (25-26 días) acorde con la cantidad de inóculo necesaria. La inoculación se realizó en masa mediante aplicación de presión como por ejemplo mediante aerógrafo (*airbrush*). El aerógrafo consiste en pulverizar a presión el inóculo sobre las plantas a una distancia adecuada y suficiente, como por ejemplo unos 20-30 centímetros, utilizando una fuente de generación de presión como por ejemplo un compresor y un sistema de aplicación como por ejemplo una pistola de aerografía por gravedad. La presión de salida de la pistola se regula a la presión adecuada y suficiente, como por ejemplo a 60-80 psi [413,6855 y 551,5807 KPa], en particular, a 75 psi [517,1069 KPa]. Para asegurar una mayor eficacia de la inoculación se añadió un agente abrasivo como por ejemplo carborundo (carburo de silicio) al depósito de la pistola y se homogeneizó con el inóculo.

Las plantas inoculadas con los aislados de cada una de las cepas virales se mantuvieron por separado en un invernadero. Transcurridos de 10 a 14 días post-inoculación se recolectaron las hojas infectadas cortando por encima de las hojas inoculadas. El inóculo puro amplificado se obtuvo triturando por separado las hojas infectadas con cada cepa viral en tampón que permita la estabilización de las partículas virales, como por ejemplo tampón fosfato 30 mM a pH=8, a una concentración de 160 g/L y se conservó congelado a -80°C.

En función de las cantidades de producto necesarias es posible realizar un segundo pase de multiplicación de las dos cepas virales en *N. benthamiana* a partir de la multiplicación inicial del inóculo puro congelada a -80°C. Este segundo pase de multiplicación se realiza por separado para cada una de las dos cepas y se parte del inóculo obtenido en el primer pase de multiplicación descongelando a 4°C, procediendo tal como se ha descrito en el epígrafe 2 Multiplicación.

La pureza de los inóculos se comprobó mediante hibridación *tissue-print* utilizando sondas específicas para la cepa EU y la CH2 (Figura 3).

El producto de protección cruzada objeto de la presente invención se preparó mezclando cantidades equivalentes de los inóculos de cada uno de los aislados de las cepas EU y CH2, obtenidos a partir de un segundo pase de multiplicación a una

concentración de 20 g/L en tampón que estabilice las partículas virales, como por ejemplo tampón fosfato a 30 mM a pH 8.

## **Ejemplo 2. Verificación de la efectividad del producto objeto de la presente invención**

5

La verificación de la efectividad del producto objeto de la presente invención en protección cruzada frente a aislados de PepMV agresivos se realizó en un invernadero en condiciones controladas. Para ello se utilizó como aislado agresivo PepMV-P5 que induce amarilleos brillantes en hojas y marmolado de frutos. Se aplicaron tres tratamientos de pre-inmunización diferentes:

10

- (1) inóculo preparado a partir del aislado de la cepa EU (PepMV-Sp13)
- (2) inóculo preparado a partir del aislado de la cepa CH2 (PepMV-PS5)
- (3) inóculo preparado a partir del aislado de la cepa CH2 (PepMV-PS5) y la cepa EU (PepMV-Sp13) (de aquí en adelante, “producto objeto de la invención”)

15

Se utilizaron dos variedades comerciales de tomate (Pera y Kumato). Para ello plántulas de cada una de estas dos variedades inmediatamente después del trasplante del semillero (5-6 hojas verdaderas, Figura 2) se inocularon manualmente con cada uno de los tratamientos de pre-inmunización indicados a una concentración de 20 g/L, con ayuda de un agente abrasivo como por ejemplo carborundo (carburo de silicio). Cada tratamiento se aplicó sobre dos lotes de 6 plantas de cada variedad y se dejaron dos lotes de otras 6 plantas sin tratar como control de cada variedad.

20

Transcurridas cinco semanas de la aplicación de los tratamientos, se realizó sobre uno de los lotes de plantas de cada uno de los tratamientos (pre-inmunizados) una inoculación mecánica con el aislado PepMV-P5, preparado tal como se ha indicado en el epígrafe 1 del Ejemplo 1. Como control positivo fueron inoculadas con este aislado plantas sanas en el mismo estado fenológico que las previamente tratadas de uno de los dos lotes por variedad que no se trataron, dejando el segundo lote como control. Todas las plantas se mantuvieron en el invernadero por un período de tres meses y se anotaron síntomas cada 7 días.

25

30

Transcurrido un mes tras la inoculación con PepMV-P5, cuando las plantas habían producido ya 4 racimos, se les eliminó la parte apical inmediatamente por encima del cuarto racimo de tomate, y se midió el peso fresco de la hoja inmediatamente superior a dicho racimo. El peso fresco de dicha hoja se utilizó como indicador del vigor

35

vegetativo de la planta. Una vez que las plantas entraron en producción, dos meses tras la inoculación con PepMV-P5, se inició la recogida y caracterización de los frutos. Esta recolección se alargó durante un mes tras la entrada en producción.

- 5 Ninguna planta tratada con el inóculo obtenido mediante mezcla de los inóculos de cada una de las dos cepas, mostró síntomas de amarillos brillantes en sus hojas (Figura 4), independientemente de la variedad de tomate. Las plantas no pre-inmunizadas y las plantas tratadas sólo con el aislado de la cepa EU o de la cepa CH2 mostraron síntomas evidentes de infección por PepMV-P5 (Figura 4 panel derecho).
- 10 Cabe destacar que, a pesar de que las variedades estudiadas (Pera y Kumato) respondieron de un modo diferente a los tratamientos realizados (Figura 5A y Figura 5B), en ambos casos el tratamiento con el producto de la invención no ejerció ningún efecto negativo, en términos de vigorosidad o producción.
- 15 La variedad Pera se mostró más susceptible a la infección por PepMV, desarrollando síntomas de PepMV más intensos tanto en hoja como en fruto dependiendo del tratamiento con el aislado de la cepa EU, o de la CH2 o con el aislado más virulento PepMV-P5. No obstante las plantas pre-inmunizadas con el tratamiento objeto de la presente invención no mostraron síntomas ni en hojas ni en frutos. Además, es
- 20 destacable que las plantas pre-inmunizadas con el tratamiento objeto de la presente invención mostraron un vigor superior al mostrado en las plantas control, tanto las sobre-infectadas con el aislado más virulento PepMV-P5 como las no sobre-infectadas (Figuras 5A y 5B).
- 25 Por su parte, la variedad Kumato resultó ser más tolerante a los tratamientos realizados, mostró menos síntomas que la variedad pera, tanto en hojas como en frutos y no se apreciaron diferencias significativas respecto de las plantas no pre-inmunizadas. No obstante, en esta variedad las plantas pre-inmunizadas con el tratamiento objeto de la presente invención tanto el lote sobre-infectado con el aislado
- 30 más virulento como el no sobre-infectado, presentaron un vigor similar a lote de plantas control, que fue superior a cualquiera de los otros tratamientos, y un nivel de producción en número de frutos equivalente a las plantas control (Figuras 5A y 5B).

35 **Ejemplo 3. Evaluación de la eficacia del producto de la invención en cultivo comercial**

La evaluación de la capacidad del producto objeto de la presente invención de proteger frente a cepas de PepMV presentes en zonas de cultivo de tomate se realizó en un invernadero comercial de 2 Ha ubicado en Mazarrón (Murcia), zona especialmente castigada por las infecciones por PepMV.

5

La variedad de tomate utilizada fue Pitenza, variedad descrita como muy susceptible a PepMV. La aplicación del producto de la presente invención se realizó en las plántulas de tomate recién salidas de semillero (5-6 hojas verdaderas, Figura 2) en el momento de la plantación definitiva en el invernadero de cultivo.

10

La aplicación del producto sobre las plántulas de tomate se realizó a una concentración de 20 g/L por *aerógrafo (airbrush)* utilizando compresor y pistola de aerografía por gravedad, la presión de salida de la pistola se reguló a 75 psi, en una cantidad aproximada de 5-7 litros por cada 10.000 plantas de tomate tratadas, mediante este método se inocularon 12.000 plantas/hora. Como control se utilizó un invernadero de tomate Pitenza sin tratar situado justo enfrente del tratado.

15

Transcurrido un mes de la aplicación de producto de la presente invención se realizaron muestreos con el fin de determinar el porcentaje de plantas pre-inmunizadas verificándose que el método de aplicación es eficiente consiguiendo un 100% de plantas pre-inmunizadas. Asimismo, se evaluaron los síntomas de PepMV en frutos en ambos invernaderos. Evaluación que permitió verificar que los frutos de tomate en el invernadero no tratado mostraron síntomas en una proporción entre el 80-90% mientras que los situados en el invernadero tratado sólo mostraron síntomas entre el 20-30%, lo que supone una reducción del porcentaje de frutos afectados en un 60% (Figura 6). Finalmente, pero no menos importante, se verificó que el tratamiento con el producto de la invención no afecta de un modo negativo en términos de vigor de las plantas y producción de frutos del tomate (Figura 6).

20

25

30

Experimentos similares al descrito para la variedad Pitenza se han realizado con un número muy significativo de variedades comerciales de tomate con resultados iguales a los obtenidos con dicha variedad. En la Tabla 1 se indica las variedades de tomate ensayadas.

Tabla 1. Variedades de tomates ensayadas.

Variedades de tomate				
Tipo Canario	Ensalada	Pera	Otros	Cherry
Ninette	Guarapo	Caniles	Vernal	Cherry Kumato
Retinto	Atago	Intense	Cecilio	Cherry Amarillo
Boludo	Velasco	Pera Fitto	Kumato	Cherry redondo
Anairis	Jawara			Cherry ministar
Tobi Star	Muxamiel			Cherry Guindos
Myla	Montenegro			Cherry Marinica
Pitenza	Manitu			Cherry Angel
	Colbi			
	Duraton			
	Patriarca			
	Ventero			
	Danubio			

Los experimentos del presente ejemplo permiten concluir que en condiciones de campo de cultivo comercial de tomate (i) el procedimiento de inoculación desarrollado es muy eficiente (12.000 plantas/hora) y (ii) La protección contra sobreinfecciones de PepMV del producto objeto de la presente invención también es muy eficiente (el 100% en los casos analizados cuantitativamente).

#### **Ejemplo 4. Ensayo de eficacia del producto objeto de la presente invención a gran escala**

10

Una vez verificada la efectividad del producto en un invernadero de investigación en condiciones controladas y para completar la información obtenida en los ensayos de evaluación en cultivo comercial, se planteó un ensayo para evaluar la eficacia del producto objeto de la invención en condiciones de producción a gran escala frente a sobreinfección con aislados agresivos de PepMV. La eficacia del producto se ensayó sobre cultivos de tomate de 3 variedades comerciales, como aislados agresivos se utilizaron los aislados PepMV-CS10 y PepMV-KLP2, respectivamente, que fueron aislados en 2014 por los inventores. Las variedades de tomate comerciales utilizadas fueron Angelle (Syngenta), Ventero (Monsanto) y Caniles (Zeraim Ibérica) y un total de 1.848 plantas, en un invernadero multitunel de 2.400 m<sup>2</sup>.

15

Se establecieron 3 grupos con los siguientes tratamientos aplicados en el momento del trasplante: (a) control sin pre-inocular, (b) pre-inoculación con aislado de la cepa europea PepMV-EU, (c) pre-inoculación con aislado de la cepa chilena PepMV-CH2 y (d) pre-inoculación con el producto objeto de la invención. Dos semanas después de

20

pre-inocularlas, dos de los grupos (2 y 3) se inocularon con los aislados agresivos de la cepa CH2, PepMV-CS10, que induce amarilleos y abullonados en los frutos de las plantas infectadas, y PepMV-KLP2, que induce amarilleos, venas muy marcadas y necrosis en los frutos, respectivamente y el grupo 1 quedó como control con los 4  
5 tratamientos de pre-inoculación. Además se realizó una pre-inoculación con el aislado agresivo PepMV-KLP2 en el momento del trasplante. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento y 8 plantas por repetición.

La evaluación de los síntomas en las plantas se realizó a 16, 35, 68 y 103 días  
10 después de la inoculación con los aislados agresivos indicados, observando un mosaico amarillo brillante en todas las plantas de los tratamientos (a) (control sin inocular) y (b) (inoculado con la cepa PepMV-EU), mientras que en el tratamiento (c) (cepa PepMV-CH2) y en las plantas tratadas con el producto objeto de la invención (d), no se observaron síntomas.

15 La producción de tomate se evaluó recopilando datos de las diferentes recolecciones, la primera de ellas se realizó a los 3 meses del inicio del ensayo, y se realizaron recolecciones sucesivas cada 2-3 semanas al principio y en la fase final del ensayo cada semana. Se tomaron datos de producción, tamaño, número y características de  
20 los frutos. Tanto del producto comercial (tomate apto para el mercado), producto de destrío (descartado) por síntomas de PepMV en fruto (maduración irregular, necrosis, manchado), así como el producto de destrío (descartado por baja calidad inespecífica, no atribuible claramente a síntomas de virus). Los resultados mostraron que las plantas del grupo 1, tratamientos (a), (b), (c) y (d) no mostraron diferencias  
25 significativas en la producción de tomate comercial (Figura 7 panel izquierdo,) mientras que las plantas de los grupos 2 y 3 los tratamientos (a), (b) y (c), no sólo mostraron síntomas sino que la cantidad de producto comercial fue muy inferior a las del grupo 1, una parte importante del producto presentó síntomas de PepMV y se incrementó el destrío (Figura 7, panel derecho).

30 Además, el tratamiento con el producto objeto de la invención (d) no supone ninguna merma en la productividad de la planta, pues la producción con los 3 tratamientos (b), (c) y (d) es similar a la planta control. Sin embargo el virus agresivo si induce pérdidas del orden del 50 % en la plantación, de manera que el cultivo pierde su rentabilidad  
35 (Figura 7 panel izquierdo). Sin embargo, cuando las plantas son infectadas artificialmente, en condiciones controladas, con el virus agresivo, únicamente las

plantas tratadas con el producto objeto de la invención (d) mantienen un nivel de producción en los márgenes de rentabilidad del cultivo, ya que la producción se encuentra en torno al 75% de las plantas sanas y sin tratamiento alguno (Figura 7 panel derecho). En el estudio estadístico las diferencias son significativas con una  $p < 0,001$ . Los datos para cada tratamiento fueron transformados en  $\log_{10}$  para obtener una distribución normal. Las medias de cada tratamiento fueron comparadas por pares mediante la prueba t-Student con un nivel de significación del 5%.

Los resultados del presente ensayo permiten concluir que en condiciones de campo de cultivo comercial de tomate la protección del producto objeto de la presente invención contra sobreinfecciones con aislados agresivos de PepMV es muy eficiente y permite recuperar la producción a niveles cercanos al control sano.

Los ejemplos anteriores demuestran que el producto objeto de la presente invención asegura una protección de amplio espectro, impide la sobreinfección con aislados más agresivos del virus, asegura protección en condiciones de cultivo comercial, es fiable, seguro y de fácil aplicación.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un aislado de una primera cepa del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) y un aislado de una segunda cepa de PepMV para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV, en el que dichos aislados:
- 5 (i) pertenecen a distintas cepas,  
(ii) interactúan de forma antagonista entre ellos, y  
(iii) el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES).
- 10
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el aislado de la primera cepa de PepMV del genotipo chileno (CH2) es el aislado PepMV-PS5.
- 15
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el aislado de la segunda cepa de PepMV del genotipo europeo (EU) es el aislado PepMV-Sp13.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la inoculación de los aislados de las cepas a la planta en una proporción de 1:1 uno frente al otro.
- 20
5. Uso según la reivindicación 1 a 3, que comprende la inoculación a la planta de un aislado del genotipo chileno (CH2) frente a un aislado del genotipo europeo (EU) en una proporción 1:2.
- 25
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los aislados están comprendidos dentro de una misma composición o en composiciones separadas.
- 30
7. Uso según la reivindicación 6, en el que la concentración de los aislados de cada cepa de PepMV en la composición es de entre  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .
- 35
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la concentración del aislado de PepMV del genotipo chileno (CH2) en la composición es de entre  $5 \times 10^5$  y

$5 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de PepMV del genotipo europeo (EU) en la composición es de entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .

- 5            9. Uso según la reivindicación 8, en el que la concentración del aislado de PepMV del genotipo chileno (CH2) en la composición es  $1 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de PepMV del genotipo europeo (EU) en la composición es  $2 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .
- 10           10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la composición comprende un abrasivo.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la planta es una planta de tomate.
- 15           12. Uso según la reivindicación 11, en el que la planta de tomate pertenece a una variedad de tomate seleccionada del grupo que consiste en la variedades Caniles, Intense, Pera Fitto, Ventero, Angele, Pitenza, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Velasco, Jawara, Muxamiel, Montenegro, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Vernal, Cecilio, Kumato, Cherry Kumato, Cherry Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar, Cherry Guindos, Cherry Marinica y Cherry Angel.
- 20           13. Método para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV que comprende inocular a dicha planta con un aislado de una primera cepa de PepMV y un aislado de una segunda cepa de PepMV, en el que dichos aislados:
- 25                (i) pertenecen a distintas cepas,
- (ii) interactúan de forma antagonista entre ellos, y
- 30                (iii) el aislado de la primera cepa de PepMV pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES).
- 35           14. Método según la reivindicación 13, en el que el aislado de la primera cepa de PepMV del genotipo chileno (CH2) es el aislado PepMV-PS5.

15. Método según las reivindicaciones 13 o 14 en el que el aislado de la segunda cepa de PepMV del genotipo europeo (EU) es el aislado PepMV-Sp13.
- 5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la inoculación de los aislados de las cepas a la planta se lleva a cabo en una proporción 1:1 uno frente al otro.
- 10 17. Método según la reivindicación 13 a 16, en el que la inoculación a la planta de un aislado del genotipo chileno (CH2) frente a un aislado del genotipo europeo (EU) se lleva a cabo en una proporción 1:2.
- 15 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la inoculación de los aislados a la planta se lleva a cabo de forma simultánea o de forma secuencial.
- 20 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que los aislados están comprendidos dentro de la misma composición o en composiciones separadas.
- 25 20. Método según la reivindicación 19, en el que la concentración de los aislados de cada cepa de PepMV en la composición es de entre  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .
- 30 21. Método según la reivindicación 20, en el que la concentración del aislado de PepMV del genotipo chileno (CH2) en la composición es de entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de PepMV del genotipo europeo (EU) en la composición es de entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .
- 35 22. Método según la reivindicación 21, en el que la concentración del aislado de PepMV del genotipo chileno (CH2) en la composición es  $1 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ , y/o la concentración del aislado de PepMV del genotipo europeo (EU) en la composición es  $2 \times 10^6$  copias del genoma viral/ $\mu\text{L}$ .
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que la composición comprende un abrasivo.

24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, en el que la planta es una planta de tomate.
- 5 25. Método según la reivindicación 24, en el que la planta de tomate pertenece a una variedad de tomate seleccionada del grupo que consiste en la variedades Caniles, Intense, Pera Fitto, Ventero, Angele, Pitenza, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Velasco, Jawara, Muxamiel, Montenegro, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Vernal, Cecilio,
- 10 Kumato, Cherry Kumato, Cherry Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar, Cherry Guindos, Cherry Marinica y Cherry Angel.
26. Un kit que comprende:
- Un extracto vegetal que comprende un inóculo puro de un aislado de una
  - 15 primera cepa de PepMV, y
  - Un extracto vegetal que comprende un inóculo puro de un aislado de una segunda cepa de PepMV,
- en el que ambos aislados (i) pertenecen a distintas cepas, (ii) interactúan de forma antagonista entre ellos, y (iii) el aislado de la primera cepa de PepMV
- 20 pertenece al genotipo chileno (CH2), y el aislado de la segunda cepa de PepMV pertenece al genotipo europeo (EU), al genotipo americano (US), al genotipo peruano original (PE) o al genotipo sur peruano (PES).
27. Kit según la reivindicación 26, que comprende, además, un abrasivo.
- 25
28. Kit según la reivindicación 26 o 27, en el que el aislado de la primera cepa de PepMV del genotipo chileno (CH2) es el aislado PepMV-PS5.
29. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que el aislado de la
- 30 segunda cepa de PepMV del genotipo europeo (EU) es el aislado PepMV-Sp13.
30. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29 para conferir protección a una planta frente a una infección por PepMV.
- 35
31. Uso según la reivindicación 30, en el que la planta es una planta de tomate.

- 5 32. Uso según la reivindicación 31, en el que la planta de tomate pertenece a una variedad de tomate seleccionada del grupo que consiste en la variedades Caniles, Intense, Pera Fitto, Ventero, Angele, Pitenza, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Velasco, Jawara, Muxamiel, Montenegro, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Vernal, Cecilio, Kumato, Cherry Kumato, Cherry Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar, Cherry Guindos, Cherry Marinica y Cherry Angel.

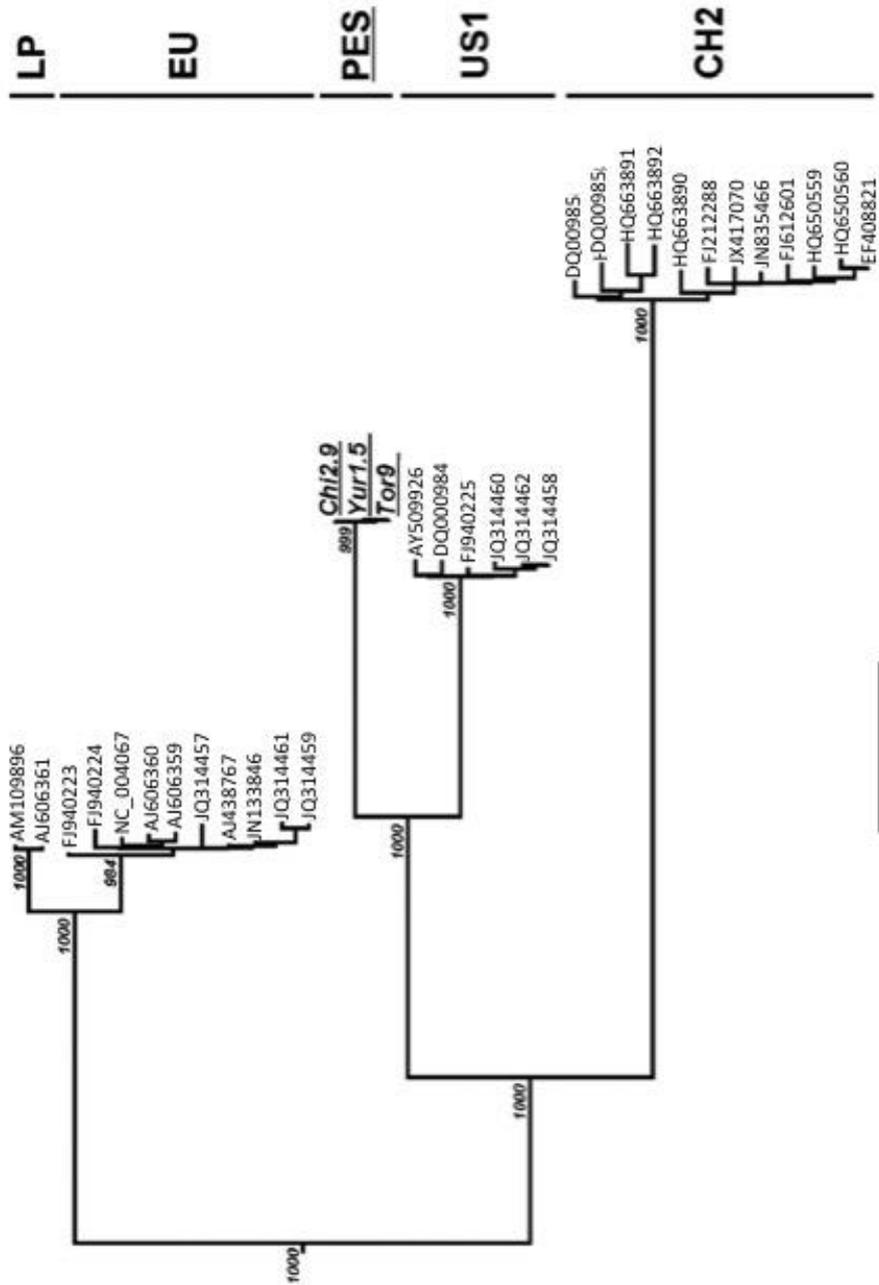


FIG. 1



FIG. 2

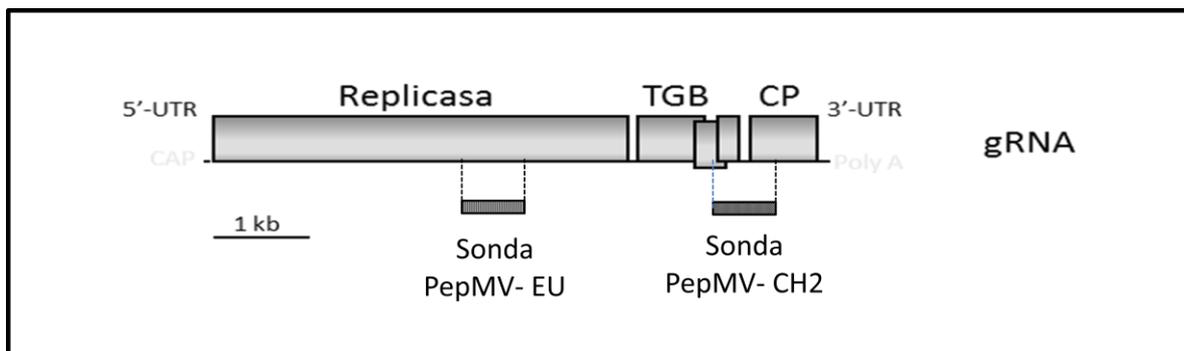


FIG. 3

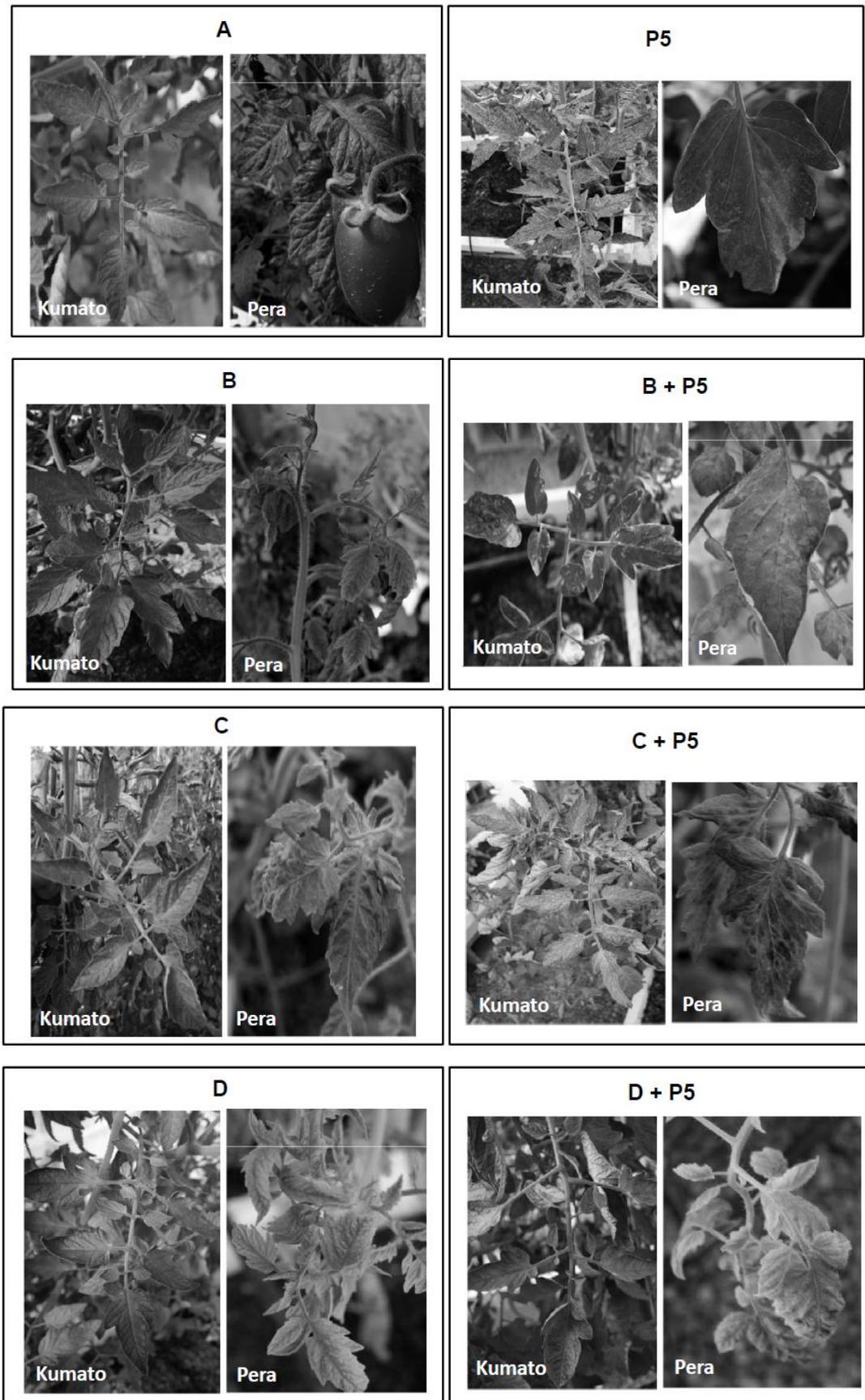
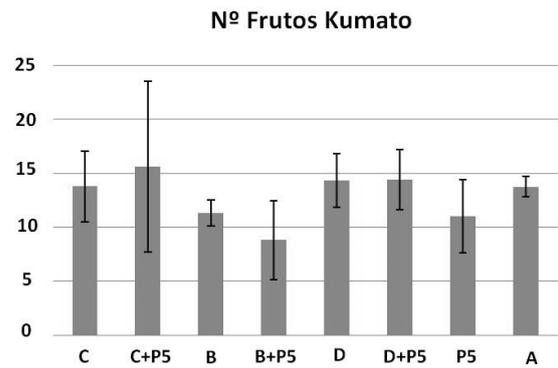
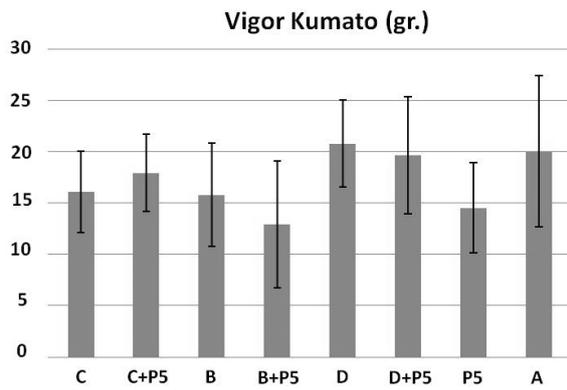
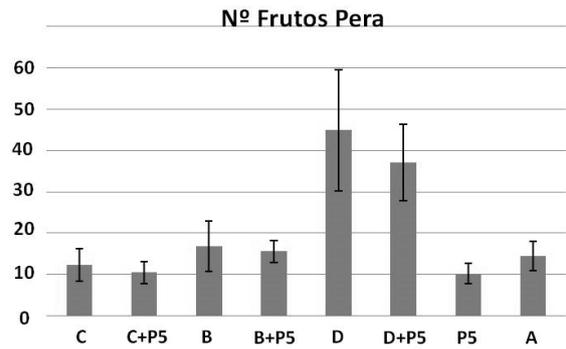
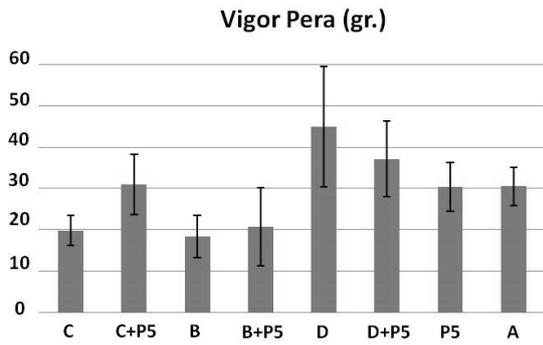


FIG. 4



**FIG.5A**

**FIG.5B**



**FIG. 6**

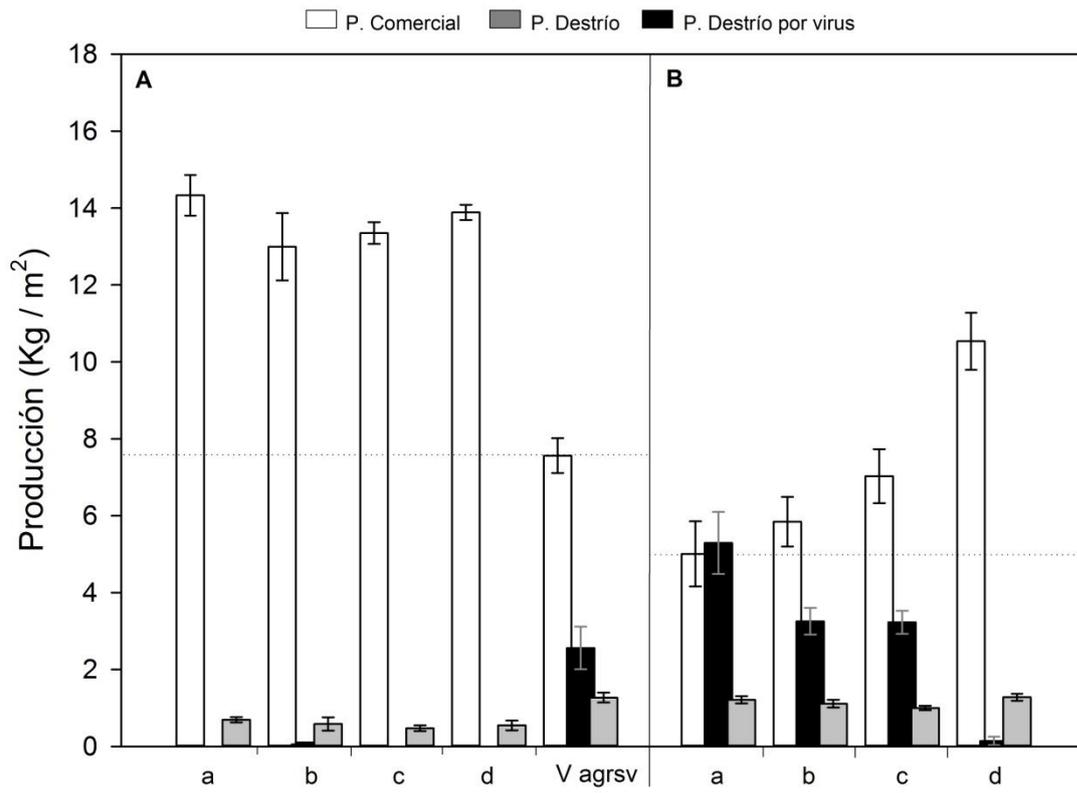


FIG. 7