

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 077**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/EP2012/061436**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12728499 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2723873**

54 Título: **Construcciones de silenciamiento del gen de P0 y su uso**

30 Prioridad:

23.06.2011 EP 11171196

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

19.12.2017

73 Titular/es:

**SESVANDERHAVE N.V. (100.0%)
Industriepark 15 Soldatenplein Z2
3300 Tienen, BE**

72 Inventor/es:

**KLEIN, ELODIE;
GRAFF, VÉRONIQUE;
GILMER, DAVID;
BRAULT, VÉRONIQUE;
WEYENS, GUY y
LEFEBVRE, MARC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 077 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Construcciones de silenciamiento del gen de P0 y su uso

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para transmitir resistencia o tolerancia viral a uno o más virus, en particular al virus de la amarillez de la remolacha (BMV, por sus siglas en inglés) y al virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha (BNYVV, por sus siglas en inglés), o al BMV en solitario, en una planta, en particular en una planta de remolacha azucarera. Además, la presente invención se refiere a una planta resistente o tolerante al virus obtenida según este método, así como también a las semillas y a la progenie obtenida a partir de ellas.
- 10 La presente invención también se refiere a construcciones de silenciamiento génico, especialmente a construcciones en horquilla que median el silenciamiento del ARN de BMV, o de BMV y BNYVV, y a su uso.

Antecedentes de la invención

Los virus de las plantas son un serio problema para muchos de los principales cultivos agrícolas dado que las infecciones por virus causan grandes pérdidas en las cosechas.

- 15 En la remolacha azucarera, las causas principales de enfermedades son: (i) la amarillez causada por un *Polerovirus*, el virus de la amarillez suave de la remolacha azucarera (BMV), transmitido por su vector principal *Myzus persicae* de forma persistente; (ii) la rizomanía de la remolacha azucarera provocada por un *Benyvirus*, el virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha (BNYVV), transmitido por la *Polymyxa betae*. El uso extensivo de resistencia a BNYVV permitió mantener los rendimientos; no obstante, están apareciendo aislados virales con resistencia resentida y hay necesidad urgente de obtener nuevas variedades resistentes.
- 20

- Los virus transmitidos por hongos, tal como el BNYVV, pueden quedar retenidos en esporas en reposo en el suelo durante años una vez infectado el campo. Dado que no existe ningún método químico o físico eficaz para eliminar los virus, ni en las plantas ni en el suelo, la única opción para el productor de remolacha azucarera es el uso de cultivos genéticamente resistentes. Varias empresas han proporcionado cierta cantidad de variedades tolerantes, incluso parcialmente resistentes, mediante una mejora genética. Sin embargo, se trata de un proceso muy tedioso y prolongado que generalmente lleva un largo tiempo antes de obtener plantas resistentes y útiles.
- 25

- La rápida revolución en los ámbitos de la ingeniería botánica ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias para conferir resistencia genética a los virus. La resistencia a las enfermedades virales mediante la introducción de porciones de secuencias genómicas virales a través de las cuales la secuencia viral (construcción) es transformada en una célula vegetal y una planta, ha pasado a ser una nueva fuente de resistencia.
- 30

Se sabe que la remolacha azucarera es una especie recalcitrante en ingeniería genética, lo que complica la posible inducción exitosa de resistencia viral.

- Se han publicado unos pocos ejemplos de tolerancia de ingeniería, por ejemplo a BNYVV, transformando y expresando la secuencia de proteína de cápside de BNYVV en el genoma de la remolacha azucarera (WO91/13159), aunque solo hay informes esporádicos sobre plantas enteras de remolacha azucarera transgénicas funcionales, tales como las descritas en el documento EP 1.169.463 B1. En particular, los informes muestran datos limitados sobre el nivel de resistencia observado en condiciones infectadas con plantas de remolacha azucarera transgénicas transformadas con un gen codificante de una secuencia de proteína de cápside de BNYVV.
- 35

- El genoma del Furovirus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha (BNYVV) consiste en cinco ARNs de sentido positivo, dos de los cuales (ARNs 1 y 2) codifican funciones esenciales para la infección de todas las plantas mientras que los otros tres (ARNs 3, 4 y 5) están involucrados en la infección mediada por vectores de las raíces de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). El movimiento de célula a célula de el BNYVV está regido por un grupo de tres genes virales sucesivos, ligeramente superpuestos, en el ARN 2 conocido como triple bloque de genes (TGB, por sus siglas en inglés), que codifican, en orden, las proteínas virales P42, P13 y P15 (los productos génicos son designados por su Mr calculada en kilodalton).
- 40
- 45

El genoma del BMV consiste en un ARN de sentido positivo lineal con seis marcos abiertos de lectura principales (ORFs, por sus siglas en inglés, 0-5). Los ORFs 1 y 2 codifican proteínas involucradas en la replicación viral, mientras que cada uno de los otros tres ORFs (ORFs 3, 4 y 5) codifica las proteínas estructurales (proteínas de cápside mayores y menores) y una proteína con función motora putativa.

- 50 Se ha demostrado que la proteína P0 del BMV tiene una expresión deficiente, una consecuencia del contexto del codón de inicio desfavorable del AUG de P0 y una fuerte tendencia a mantener una baja expresión. Además, esta parte del genoma es altamente variable, y esta diversidad de secuencias ha sido explotada para discriminar las diferentes especies.

Se demostró que las enfermedades provocadas por el BNYVV se extienden geográficamente a una velocidad que

depende de la combinación de numerosos factores agrícolas y ambientales locales. Por lo tanto, existe una necesidad de mejorar los mecanismos de resistencia genética que pueden conferir, solos o en combinación, una resistencia estable y duradera de las plantas de remolacha azucarera cultivadas para uso industrial.

Estado de la técnica

- 5 La solicitud de patente WO 2007/128.755 describe una secuencia de TGB-3 usada para reducir y/o suprimir los efectos nocivos de TGB-3 de tipo salvaje en las plantas, para generar plantas transgénicas resistentes a los virus, especialmente remolachas azucareras resistentes al virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha.
- 10 Carmen Simon-Mateo *et al.*, "Biochimica et Biophysica Acta", 1809 N° 11-12, páginas 722-731, 2011, describe diferentes estrategias antivirales usadas para obtener plantas resistentes a los virus en los últimos 25 años.
- A. Kozłowska-Makulska *et al.*, "Journal of General Virology", Vol. 91, N° 4, páginas 1082-1091, 2010, describe la actividad supresora del silenciamiento del ARN en proteínas P0 de diferentes aislados de polerovirus en remolachas infectadas, virus de la clorosis de la remolacha y virus de la amarillez de la remolacha.
- 15 Pu Yan *et al.*, "Journal of Virological Methods", Vol. 166, N° 1-2, páginas 101-105, 2010, describe construcciones de silenciamiento de ARN para desarrollar plantas resistentes a los virus mediante la expresión de ARNs en horquilla derivados de virus.

Compendio de la invención

20 La presente invención proporciona métodos y medios para conferir tolerancia o resistencia viral sin presentar las desventajas del estado de la técnica, preferiblemente métodos y medios que confieren tolerancia, resistencia, preferiblemente resistencia extrema o total, especialmente tolerancia o resistencia viral al BMVYV (virus de la amarillez de la remolacha azucarera) (incluso resistencia extrema o total al BMVYV) o preferiblemente tolerancia o resistencia al BMVYV (virus de la amarillez de la remolacha azucarera) y al BNYVV (virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha) combinados (incluso resistencia extrema o total al BMVYV y al BNYVV) en una célula vegetal o en una planta, particularmente en una célula vegetal de remolacha azucarera o en una planta de remolacha azucarera (posiblemente generada a partir de esta célula vegetal).

25 La presente invención proporciona, además, células vegetales genéticamente modificadas o transformadas que pueden obtenerse como tales, u obtenidas a partir de este método, y que pueden ser generadas en las plantas que muestran esta mayor tolerancia o resistencia a los virus de plantas mencionados.

30 Asimismo, la invención proporciona progenie, es decir, progenie, semillas u otros órganos o estructuras reproducibles resistentes a los virus o tolerantes a los virus que se originan a partir de estas células vegetales o plantas transformadas.

35 Un primer aspecto de la presente invención es una construcción de ARN que comprende una secuencia de segmentos sentido y una secuencia de segmentos antisentido con secuencias deducidas a partir del gen de P0 (o a partir del gen codificante de la proteína B0) del genoma del BMVYV o a partir de un gen ortólogo, en donde dichas secuencias de segmentos sentido y dichas secuencias de segmentos antisentido comprenden, ambas, un fragmento de nucleótidos en donde la secuencia comparte al menos el 85% de identidad de secuencia con el gen de P0 del genoma del BMVYV o de un gen ortólogo.

40 Preferiblemente, en esta construcción de ARN, la o las secuencias de segmentos sentido y/o antisentido comprende(n), además, un fragmento de nucleótidos en donde la o las secuencias comparte(n) al menos el 85% de identidad de secuencia con la secuencia no traducida del extremo 5' (5'UTR) adyacente a la secuencia de nucleótidos del gen de P0.

Más preferiblemente en esta construcción de ARN, las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden un fragmento de nucleótidos en donde las secuencias comparten al menos el 85% de identidad de secuencia con el gen de P0 del genoma del BMVYV.

45 Ventajosamente, en esta construcción de ARN, las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, además, un fragmento de nucleótidos en el que las secuencias comparten al menos el 85% de identidad de secuencia con el gen de P1 del genoma del BMVYV.

Posiblemente, en estas construcciones de ARN, el segmento sentido comprende o consiste en la secuencia SEQ. ID. NO: 1 y/o el segmento antisentido comprende o consiste en la secuencia SEQ. ID. NO: 3.

50 Ventajosamente, en estas construcciones de ARN, las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, ambas, además, un fragmento de nucleótidos que comparte al menos el 85% de la identidad de secuencia con el genoma del BNYVV.

Un aspecto relacionado de la presente invención es una construcción de ADN con capacidad de transcribirse en

esta/estas construcción(es) de ARN.

Otro aspecto relacionado es un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de estas construcciones de ácido nucleico (ADN).

5 Otro aspecto relacionado es una molécula de ARN autocomplementaria de doble cadena expresada por este vector o construcción de ADN.

10 La presente invención también se refiere a un método para inducir tolerancia o resistencia, preferiblemente resistencia total a al menos el virus BMV y posiblemente a otros virus, en una planta o en una célula vegetal, método que comprende las etapas de: preparar la construcción de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, que comprende una secuencia deducida del gen de P0 y/o del genoma del BMV), operativamente unido a una o más secuencias reguladoras activas en la planta o la célula vegetal, y transformar la célula vegetal con la construcción de ácido nucleico, lo que induce resistencia a al menos el virus BMV en la planta o en la célula vegetal.

15 Ventajosamente, este método induce, además, tolerancia a otro virus, que se selecciona del grupo que consiste en el virus del mosaico amarillo del nabo, el virus de la amarillez de las cucurbitáceas transmitido por pulgones, el virus del enrollamiento de la hoja de la patata, el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, el virus del mosaico del guisante, el virus de la amarillez de la remolacha occidental (EE. UU.), el virus de la clorosis de la remolacha, el virus de enanismo amarillo del cereal y el virus del BNYVV, preferiblemente el virus BNYVV.

20 Un aspecto relacionado es un método para inducir la tolerancia a al menos el virus del BMV que comprende la etapa de preparar una construcción de ácido nucleico que comprende segmentos sentido y antisentido deducidos de la secuencia de nucleótidos del BNYVV, que preferiblemente se deducen del gen codificante de la proteína P15 de dicha BNYVV.

25 Otro aspecto relacionado es el uso de una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia deducida del gen de P0 y/o del genoma del BMV y/o del ARN, ADN o del vector de la presente invención para inducir la tolerancia o la resistencia, preferiblemente la resistencia total al virus del BMV y/o al virus BNYVV, en una planta o en una célula vegetal.

30 Otro aspecto es una planta transgénica o una célula vegetal transgénica tolerante o resistente, preferiblemente completamente resistente a al menos el virus BMV y posiblemente, a uno o más de otros virus y que comprende una construcción de ácido nucleico capaz de expresar la secuencia de nucleótidos de la presente invención (que comprende una secuencia deducida del gen de P0 y/o del genoma del BMV), operativamente unida a una o más secuencias reguladoras activas en la planta o en la célula vegetal, que comprende el vector de la presente invención, o que comprende una molécula de ARN autocomplementaria de doble cadena de la presente invención.

35 Preferiblemente, esta planta transgénica o célula vegetal transgénica es resistente a otro virus, que se selecciona del grupo que consiste en el virus del mosaico amarillo del nabo, el virus de la amarillez de las cucurbitáceas transmitido por pulgones, el virus del enrollamiento de la hoja de la patata, el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, el virus del mosaico del guisante, el virus de la amarillez de la remolacha occidental (EE. UU.), el virus clorosis de la remolacha, el virus de enanismo amarillo del cereal y el virus BNYVV, preferiblemente el virus BNYVV.

Preferiblemente, esta planta transgénica o célula vegetal transgénica se selecciona del grupo que consiste en lechuga, pepino, patata, caña de azúcar, guisante, cebada y remolacha azucarera, prefiriéndose una remolacha azucarera o una célula de remolacha azucarera.

40 Un aspecto relacionado es un tejido vegetal transgénico y/o estructura reproducible obtenida a partir de esta célula vegetal transgénica (según la presente invención), en el que dicho tejido se selecciona del grupo que consiste en fruto, tallo, raíz, tubérculo y semilla o en el que dicha estructura reproducible se selecciona del grupo que consiste en callos, yemas o embriones.

Breve descripción de los dibujos

45 Las Figuras 1A y 1B representan un fragmento de la secuencia de P0 viral según la invención (las Figuras 1A y 1B; SEQ. ID. NO: 13) con una secuencia de nucleótidos de P0 sentido (SEQ. ID. NO: 1, más corta que toda la secuencia de P0 SEQ. ID. NO: 17) y una secuencia de nucleótidos de P0 antisentido homóloga correspondiente (en negrilla, SEQ. ID. NO: 3) intercalada con una secuencia intrón de petunia de 1.352 pb (en negrilla, subrayada, SEQ. ID. NO: 11). Unos pocos nucleótidos de la Figura 1B se indican en negrilla y bastardilla. Estos corresponden a la 5'UTR del genoma del BMV viral. Otros pocos nucleótidos en bastardilla y subrayados de la Figura 1B que no pertenecen al P0 ni al intrón pero que aún están presentes como tales son los restos de la estrategia de clonación. Una construcción que comprende la horquilla completa (SEQ. ID. NO: 13) también se designa como construcción hpP0 1.

55 La Figura 2 (A y B) representa otro fragmento de la secuencia de P0 viral según la invención (Figuras 2A y 2B; SEQ. ID. NO: 14) con una secuencia de nucleótidos de P0 sentido y una secuencia de nucleótidos de P0 antisentido (en negrilla) intercalada con una secuencia de intrón de remolacha de 91 pb (en negrilla, subrayada, SEQ. ID. NO: 12).

- Unos pocos nucleótidos de la Figura 2B se indican en negrilla y bastardilla. Estos corresponden a la 5'UTR del genoma del virus BMV. Otros pocos nucleótidos en bastardilla y subrayados de la Figura 2B que ni pertenecen al P0 ni pertenecen al intrón pero que aún están presentes como tales son los restos de la estrategia de clonación. Las secuencias de nucleótidos de P0 sentido y antisentido de la presente memoria son las mismas que las dadas en la
- 5 Figura 1B. Una construcción que comprende la horquilla completa (SEQ. ID. NO: 14) también es mencionado como construcción hpP0 2.
- La Figura 3 destaca las diferencias en el extremo 5' de la SEQ. ID. NO:1 comparado con el extremo 5' de la secuencia de codificación del BMV del P0 representada por la SEQ. ID. NO: 17. La secuencia subrayada de la Figura 3 corresponde a la secuencia líder 5' no funcional de la SEQ. ID. NO: 1.
- 10 La Figura 4 (A y B) es una representación esquemática del vector pFGC5941 en el que se introdujo un fragmento del gen de P0 en orientación sentido (SEQ. ID. NO: 1) y antisentido (SEQ. ID. NO: 3), intercalado con una secuencia intrónica del gen chalcona sintasa A de petunia (CHSA; SEQ. ID. NO: 11) (Figura 4A, pFGC5941, construcción 1; SEQ. ID. NO:13) o intercalado con una secuencia intrónica de remolacha (SEQ. ID. NO:12) de 91 nt (Figura 4B, pFGC5941, construcción 2; SEQ. ID. NO: 14). Promotor CaMV 35S: promotor 35S de CaMV; OCS 3': señal de poliadenilación del gen de octopina sintasa; promotor de MAS: promotor del gen de manopina sintasa; MAS 3': señal de poliadenilación del gen de manopina sintasa; BAR: gen de resistencia al herbicida Basta; pVS1: origen de replicación de pVS1; NPTII: gen de resistencia a la kanamicina; LB, RB: límites izquierdo y derecho del ADN de transferencia.
- 15 La Figura 5 es un análisis estadístico del ensayo de resistencia obtenido con la construcción 1 (hpP0u con el intrón de petunia). Cada histograma representa el título medio del BMV con error típico en 10 plantas inoculadas con BMV (Y). hp: horquilla; Inf: infectado. En el eje Y: densidad óptica (A_{405}) obtenida por ELISA 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2. En el eje X, de izquierda a derecha: líneas transgénicas: hpP0-7, hpP0-8, hpP0-9, hpP0-10, hpP0-11 y hpP0-12; control infectado por BMV: Col0 Inf; Col0 saludable.
- 20 La Figura 6 es un análisis estadístico del ensayo de resistencia obtenido con la construcción 2 (hpP0u con el intrón de remolacha). Cada histograma representa el título medio del BMV con error típico en 10 plantas inoculadas con BMV (Y). hp: horquilla; hpP0: construcción 1; hpP0remolacha: construcción 2; Inf: infectado. En el eje Y: densidad óptica (A_{405}) obtenida por ELISA 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3. En el eje X, de izquierda a derecha: líneas transgénicas: hpP0-12 (construcción 1), hpP0remolacha-1 (construcción 2), hpP0remolacha-2, hpP0remolacha-3, hpP0remolacha-4, hpP0remolacha-5, hpP0remolacha-6, hpP0remolacha-7 y hpP0remolacha-8, control infectado con BMV: Col0 Inf; Col0 saludable.
- 25 La Figura 7 es un análisis estadístico del ensayo de resistencia obtenido con las construcciones 1 y 2, respectivamente. Cada histograma representa el título medio del virus con error típico en 10 plantas inoculadas (Y). Los histogramas de color gris oscuro representan la infección con clon de BMV-EK y los histogramas en gris claro, la infección por aislado de BMV-2itb con el método de transmisión de pulgones, respectivamente. hp: horquilla; hpP0: construcción 1; hpP0remolacha: construcción 2; Inf: infectado. En el eje X: densidad óptica (A_{405}) obtenida por ELISA 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5. En el eje X, de izquierda a derecha: líneas transgénicas: hpP0-9 (construcción 1), hpP0-10, hpP0-12, hpP0remolacha-2 (construcción 2), hpP0remolacha-7 y hpP0remolacha-8; control infectado: Col0 Inf; Col0 saludable.
- 30 La Figura 8 representa la secuencia de WT P0 (SEQ. ID. NO: 17 y 18).
- 35 La Figura 9 (A y B) representa la secuencia de la construcción en horquilla hpP15A4-P0 según la invención (Figuras 9A y 9B, SEQ. ID. NO: 15) con una secuencia de nucleótidos P15A4-P0 sentido (SEQ. ID. NO: 7, nucleótidos en bastardilla para la secuencia P15A4 con las 3 mutaciones subrayadas y nucleótidos usuales para la secuencia de P0; comparado con WT P15: A es reemplazado con C y AG con GC) y SEQ. ID. NO: 8 correspondiente a una secuencia de nucleótidos P15A-4-P0 antisentido (en negrilla y bastardilla para P15A4 y en negrilla para P0) intercalada con una secuencia intrón de remolacha de 91 pb (en negrilla, subrayada, SEQ. ID. NO: 12). Unos pocos nucleótidos de la Figura 9B se indican en negrilla, bastardilla y subrayados. Estos corresponden a la 5'UTR del genoma del BMV viral. Otros pocos nucleótidos subrayados de la Figura 9B que ni pertenecen al P15A4-P0 ni pertenecen al intrón pero que aún están presentes como tales son los restos de la estrategia de clonación. Una construcción que comprende la horquilla completa (SEQ. ID. NO: 15) también es mencionado como construcción 1
- 40 hpP15A4-P0.
- 45 La Figura 10 (A y B) representa la secuencia de las construcciones en horquilla hpP0-P15A4-A y hpP0-P15A4-B según la invención (Figuras 10A y 10B, SEQ. ID. NO: 16) con una secuencia de nucleótidos P0-P15A4 sentido (SEQ. ID. NO: 9 nucleótidos usuales para la secuencia de P0 y nucleótidos en bastardilla para la secuencia de P15A4 con las 3 mutaciones subrayadas) y SEQ. ID. NO: 10 correspondiente a una secuencia de nucleótidos P0-P15A4 antisentido (en negrilla para P0 y en negrilla y bastardilla para P15A4) intercalada con una secuencia intrón de la remolacha de 91 pb (en negrilla, subrayado, SEQ. ID. NO: 12). La diferencia entre las dos construcciones en horquilla es la presencia de dos nucleótidos adicionales en la secuencia de P15A4 (nucleótidos en los recuadros) para la construcción hpP0-P15A4-B. Unos pocos nucleótidos de la Figura 10B se indican en negrilla, bastardilla y subrayado. Estos corresponden a la 5'UTR del genoma del BMV viral. Otros pocos nucleótidos subrayados de la
- 50
- 55

Figura 10B que ni pertenecen al P0-P15A4 ni pertenecen al intrón pero que aún están presentes como tales son los restos de la estrategia de clonación. Una construcción que comprende la horquilla completa (SEQ. ID. NO: 16) también es mencionado como construcción 2 hpP0-P15A4-A y como construcción 3 hpP0-P15A4-B.

5 La Figura 11 (A y B) es una representación esquemática del vector pFGC5941 en el que se introdujo una secuencia de P15A4-P0 o una secuencia de P0-P15A4 en orientación sentido y antisentido, intercalada con una secuencia intrónica de la remolacha de 91 nt (Figura 11A, pFGChpP15A4-P0, construcción 1, y Figura 11B, pFGChpP0-P15A-4 y pFGChpP0-P15A4-B, construcción 2 y 3, respectivamente). Promotor CaMV 35S: promotor 35S de CaMV; OCS 3': señal de poliadenilación del gen octopina sintasa; promotor de MAS: promotor del gen manopina sintasa; MAS 3': señal de poliadenilación del gen manopina sintasa; BAR: gen de resistencia al herbicida Basta; pVS1: origen de replicación de pVS1; NPTII: gen de resistencia a la kanamicina; LB, RB: Límites izquierdo y derecho del ADN de transferencia.

Descripción detallada de la invención

15 Considerando la presencia de ambos virus dentro de las zonas de crecimiento de la remolacha azucarera, los inventores han desarrollado plantas transgénicas resistentes a uno o a ambos virus (BMVY y/o BNYVV), o incluso a virus adicionales capaces de infectar la misma planta.

De hecho, el BNYVV es la principal preocupación y los inventores anticipan que la prevalencia del BMVY también corre el riesgo de aumentar.

20 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una construcción de ARN (tal como un ARN en horquilla preferiblemente descrita más adelante como hpP0) que comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) (ambos) que tienen secuencias deducidas (es decir, que comparten al menos el 85% de la identidad de secuencia) del gen de P0 (o secuencia de nucleótidos) o del gen (secuencia de nucleótidos que codifica la proteína B0) del genoma del BMVY o de genes ortólogos o que tienen secuencias deducidas (es decir, que comparten al menos el 85% de la identidad de secuencia) del genoma del BNYVV.

25 Ventajosamente, esta construcción de ARN (en horquilla, hpP0) comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) (ambos) que comprenden, además, fragmentos (sentido y/o antisentido) (ARN) deducidos (es decir, que comparten al menos el 85% de identidad) de la región 5' no traducida (5'UTR) del BNYVV (adyacente a este gen codificante de P0 de BNYVV o genes ortólogos) y/o esta construcción de ARN (horquilla) comprende un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido con secuencias deducidas tanto de un fragmento de nucleótidos de 5'UTR como de un fragmento de nucleótidos (adyacente) de la secuencia de nucleótidos de P0 del BNYVV o de genes ortólogos.

30 Preferiblemente, estos fragmentos de la 5'UTR y de la secuencia de nucleótidos de P0 son adyacentes en el genoma del BNYVV.

Esta horquilla de ARN, cuando comprende un fragmento de la 5'UTR y del P0, es preferiblemente mencionada en la presente invención como secuencia de nucleótidos hpP0u.

35 Posiblemente (pero menos preferiblemente), esta/estas construcción(es) (horquilla/s de hpP0 y/o hpP0u (ARN)) según la invención no comprende(n) un fragmento con una secuencia deducida de otro virus, tal como el genoma del BNYVV.

40 Ventajosamente, esta/estas construcción(es) de ARN (horquilla; hpP0 y/o hpP0u) según la invención comprende(n) un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido que tiene, además, (un fragmento que son) secuencias deducidas del genoma del BNYVV, preferiblemente además de la secuencia de 5'UTR del genoma del BNYVV (adyacente al P0) y/o esta/estas construcción(es) de ARN (horquilla; hpP0 y/o hpP0u) comprende(n) un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido (que comprenden un fragmento con una secuencia deducida del gen de P0) en los que ambos comprenden un fragmento de nucleótidos que comparte al menos el 85% de la identidad de secuencia con (una parte) del genoma del BNYVV.

45 Más preferiblemente, estos segmentos de ARN sentido y antisentido deducidos del genoma de la BNYV son secuencias sentido y/o antisentido correspondientes a (una parte de) la secuencia P15 del genoma del BNYVV (cuando es una horquilla, son mencionados en la presente más abajo como hpP0-P15 o hpP0u-P15, donde este último contiene, además, un fragmento de nucleótidos deducido de la secuencia de 5'UTR del genoma del BNYVV).

50 Ventajosamente, esta/estas construcción(es) del ARN de hpP0 y/o hpP0u (horquilla) también comprende(n) fragmentos de nucleótidos sentido y antisentido (ARN) con secuencias deducidas de la secuencia de nucleótidos P1 del BNYVV.

En el contexto de la presente invención, el término "ortólogos" hace referencia a genes de diferentes especies que mantienen la misma función (por ejemplo, en el curso de la evolución). La Tabla 1 proporciona un ejemplo de genes ortólogos del gen de P0 (o secuencia de nucleótidos) del genoma del BNYVV.

Tabla 1. Lista no taxativa de ortólogos de secuencia de P0 identificados

Virus	Tamaño de P0	Huésped
Virus del mosaico amarillo del nabo (anteriormente BWYV-FL1)	27,5 kDa	lechuga
Virus de la amarillez de las cucurbitáceas transmitido por pulgones	26,4 kDa	pepino
Virus del enrollamiento de la hoja de la patata	27,2 kDa	patata
Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar	28,3 kDa	caña de azúcar
Virus del mosaico del guisante	34 kDa	guisante
Virus de la amarillez de la remolacha occidental (EE. UU.)	26,3 kDa	remolacha azucarera
Virus clorosis de la remolacha	27,4 kDa	remolacha azucarera
Virus de enanismo amarillo del cereal	28,3 kDa	cebada

- 5 En el contexto de la presente invención, el término "segmento" hace referencia a una/s secuencia/s de nucleótidos sentido y/o antisentido de nucleótido (ARN) capaz/capaces de ser usada/s en el silenciamiento génico. Por lo tanto, un segmento puede ser tan corto como de 10 (preferiblemente de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 o 40) nucleótidos, pero también puede abarcar varios genes y/o genes y regiones no traducidas adyacentes (5') (5'UTR). El segmento preferido abarca (la parte 5' del) gen de P0 (o secuencia de nucleótidos) y la 5'UTR adyacente.
- 10 En el contexto de la presente invención, el término "fragmento" hace referencia a una secuencia de nucleótidos sentido y/o antisentido de nucleótidos (ARN) con una secuencia deducida de una secuencia de nucleótidos viral diana. Por lo tanto, un fragmento puede ser tan corto como de 10 (preferiblemente de al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 o 40) nucleótidos, pero también puede abarcar más de un gen.
- En el contexto de la presente invención, posiblemente, se asocian varios fragmentos para formar segmento/s sentido y/o antisentido (ARN).
- 15 Posiblemente (en especial en el caso de dos fragmentos deducidos del genoma de diferentes virus asociados), los fragmentos se asocian mediante una secuencia enlazante o espaciadora (que no deriva de la secuencia viral diana) para formar un segmento sentido (ARN) y/o un/os segmento/s antisentido (ARN).
- Preferiblemente, en la presente invención, el fragmento de la 5'UTR y el fragmento de P0 adyacente se asocian sin una secuencia enlazante o espaciadora.
- 20 Estas construcciones pueden comprender secuencias modificadas (secuencias mutadas).
- Por lo tanto, la expresión "secuencia deducida" hace referencia a secuencias de nucleótidos con al menos el 85% (más preferiblemente al menos el 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso el 100%) de la identidad de secuencia con el gen mencionado. Por ejemplo, una secuencia deducida del gen de P0 (o secuencia) del genoma del BMV hace referencia, preferiblemente, a una secuencia de nucleótidos con al menos el 85% de la identidad de secuencia con la secuencia SEQ. ID. NO: 17.
- 25

Preferiblemente, estas construcciones no contienen más del 15% de restos mutados en comparación con la secuencia de tipo silvestre (SEQ. ID. NO: 17) y/o con la secuencia SEQ. ID. NO: 1 o la secuencia SEQ. ID. NO: 3.

5 Ventajosamente, estas construcciones (ARN) (incluso los segmentos y, más preferiblemente, los fragmentos) tienen un tamaño mayor que aproximadamente 25 nucleótidos, preferiblemente mayor que aproximadamente 50 nucleótidos.

Posiblemente, estas construcciones (ARN) (en forma de segmento sentido y/o de segmento antisentido) tienen un tamaño menor a aproximadamente 10.000 nucleótidos, posiblemente menor a aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000 o aproximadamente 1.000 nucleótidos.

10 Preferiblemente, el segmento sentido (ARN) y/o el segmento antisentido (ARN) (con una secuencia deducida de la 5'UTR del P0) comprenden uno o más fragmentos que abarcan al menos 5 nucleótidos, más preferiblemente al menos 10 nucleótidos, más preferiblemente aún al menos 20 nucleótidos de la 5'UTR (adyacente al gen de P0), pero posiblemente menos de 40 nucleótidos y preferiblemente menos de 30 nucleótidos de esta 5'UTR (adyacente al gen de P0).

15 La caracterización molecular del material vegetal demostró la presencia de pequeñas moléculas de ARN complementarias tanto a la secuencia sentido como antisentido del P0 del BMV, indicando que se obtuvo el mecanismo de silenciamiento y que se disparó la degradación del ARN genómico.

Estas construcciones de ARN (horquilla) disparan eficazmente el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés), disparando la degradación del ARN transcrito del BMV (o tanto del BMV como de el BNYVV).

20 Los inventores descubrieron, de hecho, una inhibición más potente del BMV (y de el BNYVV) mediante las construcciones que albergan una 5'UTR del BMV, además del P0 (posiblemente además de secuencias (fragmentos) deducidas del genoma de el BNYVV).

25 Por ejemplo, al usar la construcción de nucleótido hpP0-P15, los inventores advirtieron la producción de ARNs dirigidos la secuencia del BMV, pero también la secuencia de ARN2 del BNYVV, dando lugar a una inhibición muy eficaz e inesperada de ambas infecciones virales.

En el caso de esta construcción doble, los inventores advirtieron una reducción más pronunciada de ambas infecciones virales (BMV y/o BNYVV) que si se usara una construcción comparable dirigido exclusivamente al BNYVV o al BMV.

30 Un aspecto relacionado es una construcción de ARN (tal como un ARN en horquilla) que comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) (ambos) con secuencias deducidas (es decir, que comparten al menos el 85% de la identidad de secuencia) del genoma del BMV (o su secuencia de nucleótidos).

35 Preferiblemente, la construcción de ARN (tal como un ARN en horquilla) deducida del genoma del BMV que comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) tiene una secuencia sentido deducida (es decir, que comparten al menos el 85% de la identidad de secuencia) de la mitad 5' del genoma del BMV y/o del grupo que consiste en nucleótidos del genoma del BMV que codifica las proteínas P0, P1, P2, P3, P4 y P5, más preferiblemente de los nucleótidos del genoma del BMV que codifica las proteínas P1 o P2.

Ventajosamente, estas construcciones (ARN) deducidas del genoma del BMV (incluso los segmentos y, más preferiblemente los fragmentos) tienen un tamaño mayor que aproximadamente 25 nucleótidos, preferiblemente mayor que aproximadamente 50 nucleótidos.

40 Posiblemente, estas construcciones (ARN) deducidas del genoma del BMV (en forma de segmento sentido y/o de segmento antisentido) tienen un tamaño menor a aproximadamente 10.000 nucleótidos, posiblemente menor a aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000 o aproximadamente 1.000 nucleótidos.

45 Por el contrario, los inventores realizaron ensayos sobre el efecto de las construcciones de ARN (en forma de horquillas) con una secuencia deducida exclusivamente del genoma del BMV (tal como la secuencia codificante de la proteína p15) o del genoma del BMV.

Estas construcciones de P15 en horquilla deducidas de el BNYVV dieron lugar a una infección de BNYVV reducida en plantas infectadas con ambos virus (en comparación con las construcciones control), pero también indujeron cierta reducción de los síntomas del BMV (en comparación con las construcciones control).

50 Estas construcciones hpP0 y especialmente hpP0u en horquilla deducidas del BMV dieron lugar a una infección de BMV reducida en plantas infectadas con ambos virus (en comparación con las construcciones control), pero también indujeron una reducción de los síntomas del BNYVV (en comparación con las construcciones control).

Se realizaron ensayos sobre dos secuencias de nucleótidos del BMV como construcción de nucleótido hpP0u (secuencia SEQ. ID. NO: 13 o 14).

La secuencia de nucleótidos de SEQ. ID. NO: 1, 13 o 14 puede ser comparada con la secuencia SEQ. ID. NO: 17, que es la secuencia del nucleótido del P0 de tipo silvestre (véase Figura 8). La longitud de la secuencia SEQ. ID. NO: 1 es más corta que la secuencia de nucleótidos de la secuencia SEQ. ID. NO: 17 (659 nt frente a 720 nt) y consiste en la 5'UTR del genoma viral (nucleótidos subrayados) salvo el primer nucleótido del extremo 5'.

5 Ventajosamente, las secuencias de nucleótidos del P0 sentido y antisentido están comprendidas en una molécula, y/o el segmento de ARN del P0 sentido y el segmento de ARN del P0 antisentido están comprendidos en una sola molécula de ARN. Ventajosamente, la molécula de ARN según la invención es capaz de plegarse de manera que dichos segmentos de ARN comprendidos en ella formen una molécula de ARN en horquilla de doble cadena.

10 Como se emplea en esta memoria, la expresión "ARN en horquilla" hace referencia a cualquier molécula de ARN de doble cadena de autohibridación. En su representación más simple, un ARN en horquilla consiste en un cuerpo de doble cadena formado por hebras de ARN de hibridación, conectadas a un bucle de ARN de cadena simple. Sin embargo, la expresión "ARN en horquilla" también pretende abarcar estructuras de ARN secundarias más complejas que comprenden secuencias de ARN de doble cadena de autohibridación, pero también bucles y protuberancias internas. La estructura secundaria específica adaptada será determinada por la energía libre de la molécula de ARN, y puede predecirse para diferentes situaciones usando los programas informáticos apropiados, tales como FOLDRNA.

15 Alternativamente, las secuencias de nucleótidos del P0 sentido y antisentido pueden estar presentes (o codificadas) en o sobre dos moléculas o secuencias de nucleótidos separadas, que pueden administrarse o proporcionarse a una célula vegetal simultáneamente y/o en forma consecutiva, de forma que, al transcribirla, pueda formarse una molécula de ARN de doble cadena mediante apareamiento de bases.

20 La presente invención también se refiere a una construcción de ADN con capacidad de transcribirse en la/las construcción(es) de ARN de la invención y a un vector que comprende esta construcción de ADN, en particular un vector de expresión (y/o vector autorreplicante (tal como un plásmido o un vector viral)) o un casete (o sistema) de expresión, preferiblemente codificando un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido con secuencias deducidas de la o las secuencias del P0, unidas operativamente con una o más secuencias reguladoras (secuencia operadora o promotora, inclusive una secuencia poliA), activas en una planta o en una célula vegetal, preferiblemente en un tejido específico (preferiblemente la raíz) de la planta.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una planta o a una célula vegetal transgénica, tal como *Arabidopsis thaliana* o una planta de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) que es transformada con la construcción (ADN) de nucleótido, el vector y/o la molécula de ARN según la invención.

Ventajosamente, hay una amplificación viral baja o incluso nula en la planta inoculada transformada con el o los fragmentos de la o las secuencias de nucleótidos del P0 según la invención.

30 Preferiblemente, las secuencias de ADN según la invención son integradas en forma estable en el genoma de la célula vegetal que está siendo transformada con las secuencias virales del P0 genéticamente modificado según la invención y/o con un vector que comprende estas secuencias.

Alternativamente, el transgén que comprende una secuencia de nucleótidos del P0 genéticamente modificado según la invención puede ser ubicado sobre un episoma o un vector autorreplicante. Ejemplos de vectores autorreplicantes son los virus, en particular los virus *Geminiviridae* o plásmidos.

40 Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de transformación disponibles para la transformación de plantas, y pueden usarse las construcciones de nucleótidos o ADN según la presente invención (que comprenden la secuencia viral del P0 genéticamente modificada) junto con cualquiera de dichos vectores. La selección del vector depende de la técnica de transformación preferida.

Se pueden modificar los componentes del sistema de expresión, por ejemplo, para aumentar la expresión de los segmentos de ARN sentido y antisentido.

45 El promotor operativamente unido a las secuencias de nucleótidos sentido y/o antisentido según la invención puede ser un promotor nativo de la célula a transformar. Alternativamente, el promotor puede ser un promotor heterólogo, por ejemplo, un promotor de tejido específico, un promotor de desarrollo regulado, un promotor constitutivo o un promotor inducible. Los expertos en la técnica conocen bien los promotores apropiados. En la presente invención, se prefieren los promotores heterólogos fuertes activos en tejidos de raíz o principalmente activos en los mismos (cuando no se desea una expresión en otros tejidos).

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

55 Las secuencias (segmentos) de nucleótidos sentido y antisentido en la secuencia viral del P0 (genéticamente

5 modificada) según la invención, preferiblemente están bajo el control de un solo promotor, especialmente cuando ambos segmentos están comprendidos en una sola secuencia de nucleótidos (horquilla). Sin embargo, también pueden estar, cada uno, bajo el control de un promotor diferente (por ejemplo, cuando la construcción de ARN está formado por segmentos que son 2 moléculas diferentes). Esto es que la secuencia de ADN sentido puede estar operativamente unida a un primer promotor y la secuencia de ADN antisentido, operativamente unida a un segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor pueden ser el mismo promotor o pueden ser promotores diferentes. El promotor puede ser un promotor divergente o bidireccional capaz de iniciar la transcripción de secuencias de ADN (en los dos segmentos de ARN) a cada lado del promotor.

10 La secuencia o construcción de ARN o de ADN según la invención, además de una secuencia de nucleótidos (fragmentos) virales (P0) modificados sentido y antisentido, ventajosamente comprende, además, una secuencia de nucleótidos enlazante o espaciadora entre las secuencias de ADN que codifican los segmentos de ARN sentido y antisentido.

15 Se espera que no haya límites de longitud o requisitos de secuencia asociados con la región espaciadora, siempre que estos parámetros no interfieran con la capacidad de las regiones de ARN con la secuencia de nucleótidos (segmento) sentido y antisentido para formar un ARN de doble cadena. Preferiblemente, la secuencia o región espaciadora varía en longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 pb, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 pb, más preferiblemente aún de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 pb.

20 Una secuencia de nucleótidos enlazante o espaciadora preferida es una secuencia intrón, preferiblemente de orientación sentido, que mejora la eficacia de la reducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos diana. El mejoramiento en la eficacia puede ser expresado como un aumento en la frecuencia de las plantas en las que se produce el silenciamiento o como un aumento en el nivel de reducción de la expresión viral.

25 Las secuencias preferidas de nucleótidos de intrones (o intrones) derivan de genes vegetales, como los genes de ARN ribosomal presuntos o genes vegetales altamente transcritos. Estos intrones pueden derivar de cualquier gen vegetal, prefiriéndose los derivados de genes vegetales de dicotiledóneas, por ejemplo, genes de petunia, siendo los más preferidos los derivados de genes de remolacha (azucarera). También es posible emplear solo parte de estos intrones (planta), por ejemplo, al menos los bordes que contienen señales de unión (véase más abajo). La totalidad de estos intrones y sus partes en el contexto de la invención son mencionados como "fragmentos de intrones" o "secuencias de intrones".

30 Una longitud preferiblemente para dichas secuencias de nucleótidos de intrones está comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 1.000 pb, preferiblemente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 600 pb, más preferiblemente entre aproximadamente 90 y aproximadamente 550 pb. Las secuencias de intrones preferidas comprenden la secuencia SEQ. ID. NO: 11 o 12, o inclusive más preferiblemente consisten en la secuencia SEQ. ID. NO: 11 o 12.

35 La construcción de ARN, que comprende las secuencias de nucleótidos (segmento) sentido y antisentido capaces de formar, por ejemplo, una estructura en horquilla, que son producidas por la transcripción del ADN recombinante correspondiente, también puede ser introducido directamente en una célula vegetal.

Podrían producirse dichas moléculas de ARN, por ejemplo, mediante:

40 - clonación de la región de ADN capaz de ser transcrita en una molécula de ARN con una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos (segmento) sentido de al menos 10 (preferiblemente al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más) nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de entre 75% y 100% con (al menos parte de) la secuencia de nucleótidos de interés y un (segmento) nucleótido antisentido con al menos 10 nucleótidos, (preferiblemente al menos aproximadamente 15 nt, 20 nt, particularmente al menos aproximadamente 50 nt, más especialmente al menos aproximadamente 100 nt, especialmente al menos aproximadamente 150 nt, más especialmente al menos aproximadamente 200 nt, 250 nt, 300 nt, bastante especialmente al menos aproximadamente 350 nt o aproximadamente 400 nt), y con entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% de una identidad de secuencia con el complemento de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos sentido (y con el ARNm diana), por el cual esta construcción de ARN (que comprende un segmento sentido y un segmento antisentido) es capaz de formar un ARN de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, dando lugar, por ejemplo, a una estructura de ARN en horquilla;

- realización de una reacción de transcripción *in vitro* agregando *inter alia* la polimerasa de ARN que depende del ADN adecuado así como los reactivos requeridos para generar las moléculas de ARN; y

- aislamiento de las moléculas de ARN.

55 La invención también proporciona una planta resistente o tolerante al BMYV y/o al BNYVV que comprende en el genoma de al menos parte de sus células, preferiblemente en sustancialmente todas sus células, una secuencia de P0 (sentido y/o antisentido y/o en horquilla; genéticamente modificada) (y posiblemente también una secuencia sentido y/o antisentido y/o en horquilla deducida del genoma del BNYVV) según la invención y/o un vector que la

comprende, que, al transcribirse, da una molécula de ARN que dispara el PTGS del BMV y posiblemente del BNYVV. Asimismo, se proporciona una planta resistente o tolerante al BMV y/o al BNYVV que comprende, en al menos parte de sus células, preferiblemente en sustancialmente todas sus células, una molécula de ARN según la invención para lograr el efecto descrito más arriba.

5 El término "planta" hace referencia a cualquier planta o parte de una planta en cualquier etapa de su desarrollo. En él también se incluyen esquejes, cultivos de células o tejidos y semillas. Tal como se la emplea junto con la presente invención, la expresión "tejido vegetal" incluye, sin limitaciones, plantas enteras, células vegetales, órganos de plantas, semillas de plantas, protoplastos, callos, cultivos celulares y cualquier otro grupo de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. Estas últimas son también mencionadas como estructuras
10 (vegetativamente) reproducibles, lo que significa que pueden ser regeneradas en una planta completa.

El material vegetal, la planta y los tejidos vegetales transformados que se obtienen pueden ser usados en una mejora genética convencional y en multiplicación de plantas o proyectos de regeneración para producir más plantas transformadas con las mismas características (resistencia o tolerancia a los virus) o para introducir la construcción de ADN según la presente invención en otras variedades de la misma especie vegetal o de especies vegetales
15 relacionadas.

La expresión "resistencia o tolerancia a los virus" significa en la presente memoria que una célula o una planta resistente o tolerante no es susceptible ni tiene una susceptibilidad reducida a uno o más virus comparado con una célula o una planta sensible. En este caso, se contempla la resistencia y preferiblemente la resistencia extrema a infecciones por BMV y/o BNYVV. El término "tolerancia", por ejemplo, significa que hay una ausencia de síntomas
20 usuales de una infección viral o una presencia reducida de los mismos, o que se evita o reduce la acumulación o replicación del virus en la célula, o que se evita o reduce el movimiento del virus, por ejemplo de célula a célula.

Ahora, se describirá la invención adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos detallados (no excluyentes).

Ejemplos

25 Para estudiar la funcionalidad de la secuencia del P0 que induce el PTGS, se construyó un vector binario de *Agrobacterium*, por ejemplo, según las Figuras 4A y 4B.

Se crearon las construcciones de ADN según la invención y la clonación de estas construcciones en *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3010 (desarmada)) según los métodos y técnicas conocidos en la técnica. Los fragmentos sentido y antisentido (P0) y los intrones fueron generados por amplificación genética (reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés) que incluye sitios de restricciones específicas en los extremos.
30 Mezclados junto con el esqueleto del vector, fue posible solo una recombinación/inserción de los fragmentos en base a la compatibilidad de estos sitios específicos en el extremo de los fragmentos.

Se usó la cepa GV3010 de *Agrobacterium tumefaciens* que porta una construcción en horquilla para mediar la transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión floral.

35 Se infectó material foliar de *Arabidopsis thaliana* transgénica con aislado natural de BMV-2itb usando transmisión por pulgones o por cepa de BMV-EK obtenida de un clon infeccioso y transmitida por pulgones.

En los experimentos de transmisión por pulgones: para adquirir el virus, se les dio a los pulgones un período de acceso y adquisición (AAP, por sus siglas en inglés) de 48 horas sobre una suspensión purificada de aislado de BMV-2itb o clon de BMV-EK. Después del AAP, se transfirieron los pulgones con un pincel de punta fina sobre
40 hojas de *Arabidopsis thaliana* transgénica (10 pulgones por planta) por un período de acceso e inoculación (IAP, por sus siglas en inglés) de 96 horas. Luego, se mataron los pulgones mediante un tratamiento insecticida y se realizó una detección de virus por ELISA 3 semanas después en las hojas sistémicas.

Para todos los experimentos siguientes, los datos de ELISA fueron evaluados mediante el programa informático SAS 9.1 (método ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. El valor P <0,05 indicó una diferencia significativa.

45 Ejemplo 1

El mecanismo silenciador de ARN se dirigió a las secuencias conservadas e indujo su degradación. Las secuencias más conservadas dentro de los *Polyovirus* residen en la mitad 3' del ARN.

Se supone que la expresión de las construcciones en horquilla con secuencias deducidas de partes conservadas del genoma viral da lugar (*in planta*) a la formación de ARNs que es reconocido y cortado en bicatenarios de
50 aproximadamente 21-24 nt (ARNsi) por la enzima Dicer. Los ARNs específicos serán cargados en un complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) que a su vez, dirigirá el ARN genómico viral homólogo e inducirá la degradación de este último. Como tal, el metabolismo del virus se verá gravemente perjudicado, y se reducirán los síntomas de la infección viral. En los casos más favorables, se obtendrá una resistencia total.

En primer lugar, los inventores generaron dos secuencias en horquilla derivadas del extremo 3' viral del genoma viral

(BMYV).

La primera construcción albergó la secuencia CP (proteína de cápside) denominada hpCP y el segundo, el extremo 3' de la secuencia RT (proteína *readthrough*) con la secuencia sin codificar del extremo 3' del genoma del BMYV denominado hpRT+Nc.

- 5 Se emplearon ambas construcciones para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* y para cada uno, se obtuvieron diez líneas transgénicas independientes y se las sometió a ensayo para comprobar su resistencia con la BMYV.

Las plantas que expresan ARNs específicos del extremo 3' del genoma viral fueron inoculadas con el virus. Ninguna de las plantas transgénicas fue resistente al BMYV sea cual fuera la horquilla usada, hoCP o hpRT+Nc.

10 Ejemplo 2

Las construcciones hpP0(u) según la invención que codifican *Arabidopsis thaliana* transgénica fueron luego inoculadas con aislado de BMYV-2itb.

- 15 Se crearon seis líneas independientes de *Arabidopsis thaliana* transgénica que expresaron el ARNm de hpP0 (o hp0u). Los resultados obtenidos con la construcción 1 (Figura 4A) están resumidos en la Figura 5. El análisis estadístico ANOVA realizado reveló diferencias existentes dentro de los valores de ELISA de plantas transgénicas y de tipo silvestre ($p < 0,0001$). La prueba de Tukey reveló la ausencia de una diferencia significativa entre líneas transgénicas mientras que todas las líneas fueron significativamente diferentes de Col0 Inf ($p < 0,05$) revelando la resistencia de las líneas transgénicas respecto de la inoculación de BMYV.

- 20 Se detectaron moléculas de ARNs de P0 específicos en seis líneas pero en niveles más elevados en tres líneas resistentes (hpP0-9, -10 y -12). No se detectó ARNs en las plantas susceptibles (Col0).

Estos resultados destacan que las construcciones hpP0(u) son adecuadas para inducir el PTGS en plantas de *Arabidopsis thaliana* y pueden inducir la resistencia al BMYV.

Ejemplo 3

- 25 Se repitieron los experimentos del Ejemplo 2 con la construcción 2 (Figura 4B) y con un número mayor (ocho) de líneas de *Arabidopsis thaliana* transgénica inoculadas con aislado de BMYV-2itb.

- 30 Los resultados son compilados en la Figura 6. Para esta construcción, salvo la línea hpP0remolacha-3, todas las líneas fueron resistentes al BMYV tal como lo confirmó el análisis estadístico de Tukey y ANOVA ($p < 0,05$). No se observó ninguna diferencia significativa entre las líneas hpP0-12 y hpP0remolacha resistente. Se descubrió que los niveles de moléculas de ARNs de P0 específicos fueron significativamente mayores en las líneas resistentes (hpP0remolacha-1, -2, -5, -7 y -8) que en las otras líneas.

Ejemplo 4

Se repitieron los resultados descritos en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo 3 con ambos tipos de líneas de *Arabidopsis thaliana* transgénica (hpP0-9, -10, -12, hpP0remolacha-2, -7, y -8) y dos fuentes de inóculo (BMYV-EK o BMYV-2itb).

- 35 Los resultados son representados en la Figura 7. Se descubrió que todas las líneas de *Arabidopsis thaliana* transgénica eran resistentes al inóculo de BMYV-EK ($p < 0,05$). Las líneas transgénicas responden de manera diferente respecto del aislado de BMYV-2itb.

Considerados juntos, estos resultados indican una mejor protección frente al BMYV cuando el transgén contiene el intrón de remolacha.

- 40 La inducción del PTGS mediante una construcción en horquilla parece ser, así, una buena fuente de resistencia frente a una infección viral, y en particular frente al BMYV.

A partir de los ejemplos precedentes, parece que la resistencia de hpP0(u) derivado de patógeno según la invención es altamente eficaz.

- 45 Las construcciones de hpP0 de la invención indujeron exitosamente la resistencia de la planta derivada del patógeno. Todas las construcciones de hpP0 sometidos a ensayo indujeron una degradación del ARN genómico a través del PTGS, dando plantas resistentes al BMYV.

Ejemplo 5

- 50 Los inventores realizaron ensayos de la eficacia de otras estrategias usando la construcción hpCP que comprende un gen codificante de la proteína de cápside del genoma del BMYV y la secuencia distal 3' (construcción hpRT + NC del gen del BMYV codificante de la proteína RT seguido por la extremidad no codificante del ARN del BMYV viral). Los inventores descubrieron inesperadamente que estas dos construcciones adicionales eran ineficaces para inducir

una resistencia viral en una planta.

Listado de secuencias

5 <110> SES
 <120> Construcciones en horquilla P0 y uso
 <130> BPESS009BWO
 10 <160> 18
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 15 <211> 659
 <212> ADN
 <213> Virus de la amarillez de la remolacha
 <220>
 20 <221> gene
 <222> (1)..(659)
 <223> BMYV 5'UTR & P0
 <220>
 25 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(30)
 <220>
 <221> CDS
 30 <222> (31)..(657)
 <400> 1
 caaaagaaac cagcagggat cttagcagtct atg caa ttt cag ctt aaa aca aac 54
 Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn
 1 5
 agt ttc act tgt tcg ttg aac cga ccg cta aca gct aca gag cga gtt 102
 Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val
 10 15 20
 tta aac acc gcg tat ttt ctt acg aat cat tta ccg ctc gta act ttt 150
 Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe
 25 30 35 40
 gag aat gaa aac tgt att cgt tct ctt ctc gct gct ctg cct ttg ctg 198
 Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu
 45 50 55
 ctc agt aag cag ctc gac ccc ggg agc ttt att tac gct ccc ggg aaa 246
 Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly Ser Phe Ile Tyr Ala Pro Gly Lys
 60 65 70
 cgc cag tct tta cga ctg gcc agg ttc tac aat tac tgc gga gcc gtg 294
 Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val
 75 80 85
 tta ccc agc act cgc aac att gac tta cga gtg ccc ccc aga aaa gac 342
 Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp
 90 95 100
 gtt aaa aga ttt tac ctt gcc cga aat tca ggc aga gat ctg ggg gag 390
 Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu
 105 110 115 120
 agg cta caa cgc cgc aga gaa att ttc tct cgc ggt gaa gca gag ttt 438
 Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe
 125 130 135
 aaa aag ttc ctt tca gta tgg tgt gct gaa agc gag aga aag cta cgg 486
 Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg

35

ES 2 647 077 T3

140 145 150
gag agt cct aaa atc gat att aga atg gac cat att att atg gtc tta 534
Glu Ser Pro 155 Lys Ile Asp Ile Arg 160 Met Asp His Ile Ile Met Val Leu
cgc gat atg ggc act ctc ttg cac cgt ctg gta ctt gtt gaa gaa cta 582
Arg Asp Met 170 Gly Thr Leu Leu 175 His Arg Leu Val Leu 180 Val Glu Glu Leu
tac cat aga aat act tat gct gag ctc gct ttt tgc gtt cac cac ctt 630
Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu Leu Ala Phe Cys Val His His Leu 200
185 190 195 200
ttt ggt gaa gct cgt ggt atg gat ttt tg 659
Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp Phe
205

<210> 2
<211> 209
5 <212> PRT
<213> Virus de la amarillez de la remolacha

<400> 2

Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg
1 5 10 15
Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr
20 25 30
Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser
35 40 45
Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly
50 55 60
Ser Phe Ile Tyr Ala Pro Gly Lys Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg
65 70 75 80
Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp
85 90 95
Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg
100 105 110
Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile
115 120 125
Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys
130 135 140
Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg
145 150 155 160
10 Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His
165 170 175
Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu
180 185 190
Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp
195 200 205
Phe

ES 2 647 077 T3

```

<210> 3
<211> 659
<212> ADN
5 <213> Virus de la amarillez de la remolacha

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(659)
10 <223> PO&5'UTR antisentido

<400> 3

caaaaatcca taccacgagc ttcaccaaaa aggtggtgaa cgcaaaaagc gagctcagca 60
taagtatttc tatggtatag ttcttcaaca agtaccagac ggtgcaagag agtgcccata 120
tcgcgtaaga ccataataat atggtccatt ctaatatcga ttttaggact ctcccgtagc 180
tttctctcgc tttcagcaca ccatactgaa aggaactttt taaactctgc ttcaccgcca 240
gagaaaaatt ctctgcggcg ttgtagctc tccccagat ctctgcctga atttcgggca 300
aggtaaaatc ttttaacgct ttttctgggg ggcactcgta agtcaatggt gcgagtgctg 360
ggtaacacgg ctccgcagta attgtagaac ctggccagtc gtaaagactg gcgtttcccg 420
ggagcgtaaa taaagctccc ggggtcgagc tgcttactga gcagcaaagg cagagcagcg 480
agaagagaac gaatacagtt ttcattctca aaagttacga gcggtaaatg attcgtaaga 540
aaatacgcg tgtttaaaac tcgctctgta gctgttagcg gtcggttcaa cgaacaagtg 600
aaactgtttg ttttaagctg aaattgcata gactgctaga tcctcgctgg tttcttttg 659
15

<210> 4
<211> 5722
<212> ADN
20 <213> Virus de la amarillez de la remolacha

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(5722)
25 <223> genoma BMV

<400> 4

acaaaagaaa ccagcgagga tctagcagtc tatgcaattt cagcttaaaa caaacagttt 60
cacttgttcg ttgaaccgac cgctaacagc tacagagcga gttttaaaca ccgcgtattt 120
tcttacgaat cathttaccg tcgtaacttt tgagaatgaa aactgtattc gttctcttct 180
cgctgctctg cctttgctgc tcagtaagca gctcgacccc gggagcttca tttactctcc 240
cgggaaacgc cagtctttac gactggccag gttctacaat tactgcggag ccgtgttacc 300
cagcactcgc aacattgact tacgagtgcc cccagaaaa gacgttaaaa gattttacct 360

```

ES 2 647 077 T3

tgcccgaat tcaggcagag atctggggga gaggctacaa cgccgcagag aaatthttctc 420
 tcgCGgtgaa gcagagttta aaaagttcct ttcagtatgg tgtgctgaaa gcgagagaaa 480
 gctacgggag agtcctaaaa tcgatattag aatggacat attattatgg tcttacgcga 540
 tatgggcact ctcttgacc gtctgtact tgttgaagaa ctataccata gaaatactta 600
 tgctgagctc gctthtttgcg ttcaccacct thttggtgaa gctcgtggta tggatthttg 660
 gcggttggct aacttcctcg gtaaattggt tatttgctct cacgaaatgt atthttgaaaa 720
 ctctttcatc cagaaagagc tacgthttgt agcgatctgt aaaagthttt ctcaccttta 780
 ccatcaaaca aagcccgcg cgtaattgca thcttcaaat acaacacgca gacggttccc 840
 atgcccgtta tgcaacatgc gtaaccttat tcgacgggac aaacggattg ttgactgcgc 900
 aacatgtagt tgacgattht tacgaaggag acccgagaaa gactctaaaa gtcgtctcca 960
 cccgcaatgg aaacaaaatc ccccttgatg aattcagagt gacgtacaca tctgagaaaa 1020
 gggatcagtt gttgatgcat gggccccca actgggaagg agthcttgcc tgcaaggcag 1080
 ttcacatgat tccggcatcg agtgthtcaa aatcgaaagc aactthctth gctctgtcgg 1140
 atggtgaatg gcattcctct aatgccgagc tcgthggcac atccaagtgc ggaaaattca 1200
 thctgtact cagtgcaca aagagtggtc attcgggcac tccctatthc aatggttaaga 1260
 gththcttg agthcacata ggctctccga aagaatthga gtcggaaaaat gthtaactaca 1320
 thgtctctat accacgthtt cctggattaa ccagcccga ctacatatht gaaaccacag 1380
 ccttgctgg aaaatthttc agccaagagg aagtcgaaga gctaatggaa gactthctctc 1440
 tccaagagat thattctata gcgacggcac gthgggaagta cataaaatath gaggcttgct 1500
 caggthgaaga gacattccat gatgthgctaa cagagthctc cccgatgcag ggggaaggaa 1560
 gggcggtcc gaccgcccga acaaccggaa acgcaagcac ccacgagaga tccgcaggaa 1620
 atggaaaaag cctcgtgct gthctthtca caccgcccga acccttggtg aaaactgcac 1680
 cgcaagccac gthacattgta cctcaaaaaga ggaatathgac gaatggccga gatgctggth 1740
 ccaaatthga ggccacgact gccactaccg atcaaatctc agagataaag aaggctctga 1800
 thagacaaaat ggatthgaaa tcgatcgaga gacaagthgt agagacacta thgtcgatgg 1860
 ccatgaagaa gccccgctca agagggcggga gaagatccaa gaacaagcaa acaatthtg 1920
 acgctthctc aaaaccagth accactggga aagagcccga gaggthctgcc ccggtthcat 1980
 caaagthggt gagthcccc aghththact ctctaaacaa aaagghatgct cggatthggg 2040
 cacgaagctc accagctcc acccagaatt ggaggagaaa acccgaggct thgggtggcc 2100
 caagthcggg ccagcggcgg aactgaaatc cthgcccga caagccgcaa gatggctcga 2160
 acgcccag caagthaaaa thctthcaac thaggaaagg gagcgcgthc thaggaaatg 2220
 thtggaagca thctcgccta ctcaaacacg agthcccatg gccacgagag gaaacaaact 2280
 gthctggaac aatthctthg aagatthtaa aacggcagth thctctctc agctcgaagc 2340
 cggcgtaggc gthcccgtat thgctthacg thgacgcac cacagaggct ggatthgaaga 2400
 thccagatctg thgcccgtth thgctgtht cacctthgat cgattacaga agththcgg 2460

ES 2 647 077 T3

ggtgaaatth gagcatatga gccctgaaca attggttcag gaaggtctgt gtgaccaat 2520
 acggttattc gtaaaaggcg agccacacaa acaatccaaa cttgatgaag gacgctaccg 2580
 cctcatcatg agtgtctcat tggttgatca actggttagcc cgggttctgt ttcaaaatca 2640
 gaacaagcgc gagatcgcgc tttggagggc gattccctca aaaccggat tcggattgtc 2700
 cacagacgga caagtcgtcg atttcatgca agcattatcg gcgcaggtgg gagtgaacac 2760
 tgctgaatta ctccaaaatt ggaaatccca ccttattcct acagattgct ctggttttga 2820
 ctggagcgtt tcggactggc ttctagagga tgaatggaa gtccggaaca ggctcacggt 2880
 ggacataaat gatctaacca ggcgctcgcg agctggatgg cttaaatgcc tcgcaaatag 2940
 tgttctctgt ctatcagatg gaacattgct ctcgcagcaa gtgcctgggtg taaaaagag 3000
 tggcagctac aacacctcct cgtctaactc tagaattcga gtgatggccg cttaccactc 3060
 cggagcctcc tgggccatcg ccatgggtga tgatgccctt gaactctgtag atgcagacct 3120
 aagtcgatac tcatecttag gcttcaaagt cgaggtttct tcacaactgg aattctgctc 3180
 tcacatthtt gaggaggaga acctcggcgt tccggtaaac aaagctaaaa tgctttataa 3240
 attgatacat ggttatgaac cggaatgtgg caacctgaa gttctgacga actatcttgc 3300
 agcttgthtt tcaatthtaa acgagctgag atccgatcaa gaactcgttg cctccctcta 3360
 tcagtggtctg gtccttccag tgcagccaca aaagatataa cgagggacaa tataaacagc 3420
 cgggtaaaaa tcagttgcaa acgccggaag thtaagtct gattacataa caagcaaaa 3480
 tagatthcaa gthtttagca ggatthtcaa gtggtctatg tcagcaatac ctgtaacggt 3540
 agttggcttg tathctgtct accttaagat thctcaccac gtcagatcaa ttgttaatga 3600
 atacggtcgt gggtaggaga acgatcaatg gaagaagacg accacgtagg caaacacgac 3660
 gcgctcagcg ctctcagcca gtggttggtg tccaagcctc tcggacaaca caacccgac 3720
 ctagacgacg acgaagaggc aacaaccgga caagaagaac tgthttctacc agaggaacag 3780
 gthctgagcga gacattcgtt thctcaaaag acaatctcgc ggggaagthc agcggagcaa 3840
 tcacgttccg gccgagtcta tcagactgcc cggcattcgc tgatggaatg ctcaaggcct 3900
 accatgagta thaaatctca atggtcattt tggagthctg ctccgaggcc thttccaaa 3960
 attccgtht cactcgttac gagctggacc cacactgtaa actcagthcc thttcatcaa 4020
 ccattaacaa gthctgggac acaaaaccg gcaggaggc atthgcagcg thttcatca 4080
 acggggcgga ctggcatgac gthgccaagg accaattcag gatcctctac aaaggcaatg 4140
 gththctatc gatagctggt ththtttagaa tcaccatgaa gtgcccagth cacaatccga 4200
 aataggtaga caaggaacct gccctagcc cagggccttc thcctctcca caaccacac 4260
 cthcaagaa atatcgttht atcgtctata ctggtgthcc thtgacctg ataatggccc 4320
 aatccactga tgacgccatc thctgttacg acatgccttc ccaacgtht cgctacatag 4380
 aagacgagaa tatgaactgg acaaacctc atthctgatg gthttcccag aathctthga 4440
 aagccatccc aatgataata gtaccagthc thcaaggthg thggactgth gaaatthca 4500
 thgaggggta tcaaccaacc tcaagcaca cagatctha taaggacaaa caagatgthc 4560

ES 2 647 077 T3

ttattgcata taatgatgac ctcaaggagg gttggaatgt aggggtttat aacaatgtgg 4620
 agataaccaa caataaggct gataacactt tgaagtacgg ccatccagac atggagctca 4680
 atagttgtca ttttaatcaa ggacaatggt tggaaagaga tggagatttg acttgtcacg 4740
 ttaaaacaac tggtgacaat gcctccttct ttgttgttg tcccgtgtc cagaagcaat 4800
 ccaaatacaa ttatgccgtt tcatacggag cctggacaga tcggatgatg gagatagga 4860
 tgatagccat agcacttgat gaacaaggct catccggttc cgcaaagata gaaagaccaa 4920
 agagagtcgg gcactccatg gcagtctcaa cctgggagac tataaactta cgggagaagg 4980
 aaaactccgg tgaattcaaa accgatcaaa gacaagatct caaaactcct cccacatctg 5040
 gtgggagttc cgatatgccg gatatcgttc aaggaggctt accccttccc attgaagaag 5100
 acattcctga tttcatcagg gatgaccctt ggtccaacat accggccaag acttcgctgg 5160
 aagacgaggc tgcgtcatca aagagtgggt ttaaacccca attgaagcct cctggcttgc 5220
 caaagccaca accggtcaga acgatccgaa acttcgatcc agaacctgac ttggttgagg 5280
 catggcgacc tgacgtgaac cccggatatt ccaaggaaga cgtggcagcg gccactgtta 5340
 tgtacggggg ttccgttaat gaaggccggt ctatgattga caagcgtgat aaagctgtgt 5400
 tagacggccg caagagttgg ggttcttctc tggcgtctc cttgacggga ggcacgctta 5460
 aggcctctgc aaagtcagag aagcttgcca aactcacttc gagtgaaagg gcgagttca 5520
 aacgaattaa gcgccagcaa ggtgccacac gagcttcaga attttagaa caacttctgg 5580
 ctggcacaaa ccctgacca aggtcctgat gaaccttcc caatcatcac agtcaagccc 5640
 gtgactttaa acgcggaacg actccgaaag gataggcaac gagtgtttta cgctgggata 5700
 actccctacg gcacttcggt gt 5722

<210> 5

<211> 397

5 <212> ADN

<213> Virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (1)..(397)

<223> P15 mutado (sentido)

<400> 5

ggtgcttgtg gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttgtgt 60

tgttgtcagt atgttgact caccgtttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc 120

gggagcaatt ttaagggga gcggctgtat catggccgag aattcgtttg ctcaatttgg 180

gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aaggttgcca ccaaagagca 240

cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgtttgga ctctcaccga 300

aactattttt ataatattat ctagattggt tggtttggcg gtgtttttgt tcatgatatg 360

15 tttaatgtct atagtttgggt tttggtatca tagataa 397

<210> 6

<211> 397

<212> ADN

20 <213> Virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha

<220>

<221> característica_misc

25 <222> (1)..(397)

<223> P15 BNYVV mutado (antisentido)

ES 2 647 077 T3

<400> 6

ttatctatga taccaaaacc aaactataga cattaaacat atcatgaaca aaaacaccgc 60
 caaaccaaac aatctagata atattataaa aatagtttcg gtgagagtca caacacgaac 120
 ggtcacttca ccccttttta ccattatgtc aacatcgtgc tctttggtgg caaccttagt 180
 gatggactcg gctacatgct ttggaatata gcaactccca aattgagcaa acgaattcgc 240
 ggccatgata cagccgctcc ccttaaaaat tgctcccga tagctggacg ctttaacatc 300
 gttgctgaaa aacggtgagt acaacatact gacaacaaca caaccggcaa ctatgtacaa 360
 tacaatatta gataaatcta ctttaaccac aagcacc 397

5

<210> 7
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> BMYV & BNYVV

10

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1056)
 <223> Sentido P15-P0

15

<400> 7

ggtgcttggt gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttggtg 60
 tgttgcagtg atgttgact caccgtttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc 120
 gggagcaatt ttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg 180
 gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aaggttgccca ccaaagagca 240
 cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccggt cgtgttggtga ctctcaccga 300
 aactattttt ataataattat ctagattggt ttggttggcg gtgtttttgt tcatgatatg 360
 tttaatgtct atagtttgggt tttggtatca tagataacaa aagaaaccag cgaggatcta 420
 gcagtctatg caatttcagc ttaaaacaaa cagtttact tgttcgttga accgaccgct 480
 aacagctaca gagcgagttt taaacaccgc gtattttctt acgaatcatt taccgctcgt 540
 aacttttgag aatgaaaact gtattcgttc tcttctcgtc gctctgcctt tgctgctcag 600
 taagcagctc gaccccgga gctttattta cgctcccggg aaacgccagt ctttacgact 660
 ggccaggttc tacaattact gcggagccgt gttaccagc actcgcaca ttgacttacg 720
 agtgccccc agaaaagacg ttaaaagatt ttacctgccc cgaaattcag gcagagatct 780
 gggggagagg ctacaacgcc gcagagaaat tttctctcgc ggtgaagcag agtttaaaaa 840
 gttcctttca gtatggtgtg ctgaaagcga gagaagccta cgggagagtc ctaaaatcga 900
 tattagaatg gaccatatta ttatggtctt acgcgatatg ggcaactctt tgcaccgtct 960
 ggtacttggt gaagaactat accatagaaa tacttatgct gagctcgtt tttgcgttca 1020
 ccaccttttt ggtgaagctc gtggtatgga tttttg 1056

20

<210> 8
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> BMYV & BNYVV

25

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1056)
 <223> Antisentido P15 P0

30

ES 2 647 077 T3

<400> 8

caaaaatcca taccacgagc ttcacaaaa aggtggtgaa cgcaaaaagc gagctcagca 60
 taagtatttc tatggtatag ttcttcaaca agtaccagac ggtgcaagag agtgcccata 120
 tcgcgtaaga ccataataat atggtccatt ctaatatcga ttttaggact ctcccgtagc 180
 tttctctcgc tttcagcaca ccatactgaa aggaactttt taaactctgc ttcaccgca 240
 gagaaaattt ctctgcggcg ttgtagcctc tccccagat ctctgcctga atttcgggca 300
 aggtaaaatc ttttaacgtc ttttctgggg ggcactcgta agtcaatggt gcgagtgctg 360
 ggtaacacgg ctccgcagta attgtagaac ctggccagtc gtaaagactg gcgtttcccg 420
 ggagcgtaaa taaagctccc ggggtcgagc tgcttactga gcagcaaagg cagagcagcg 480
 agaagagaac gaatacagtt ttcattctca aaagttacga gcggtaaatg attcgtaaga 540
 aaatacgcgg tgtttaaac tcgctctgta gctgtagcg gtcggttcaa cgaacaagtg 600
 aaactgtttg ttttaagctg aaattgcata gactgctaga tcctcgctgg tttcttttgt 660
 tatctatgat accaaaacca aactatagac attaaacata tcatgaacaa aaacaccgcc 720
 aaaccaaaaca atctagataa tattataaaa atagtttcgg tgagagtcac aacacgaacg 780
 gtcacttcac ccctttttac cattatgtca acatcggtct ctttggtggc aaccttagtg 840
 atggactcgg ctacatgctt tggaatatcg caactcccaa attgagcaaa cgaattcgcg 900
 gccatgatac agccgctccc cttaaaaatt gctcccgcac agctggagcg ttaacatcg 960
 ttgctgaaaa acgggtgagta caacatactg acaacaacac aaccggcaac tatgtacaat 1020
 acaatattag ataaatctac ttttaaccaca agcacc 1056

5

<210> 9
 <211> 1058
 <212> ADN
 <213> BMYV & BNYVV

10

<220>
 <221> característica_misc
 <223> Sentido P0 P15

15

<400> 9

caaaaagaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaac aaacagtttc 60
 acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatttt 120
 cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc 180

ES 2 647 077 T3

gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctccc 240
 gggaaacgcc agtcctttacg actggccagg ttctacaatt actgaggagc cgtgttacc 300
 agcactcgcga acattgactt acgagtgcc cccagaaaag acgttaaaag attttacctt 360
 gcccgaatt caggcagaga tctgggggag aggctacaac gccgcagaga aattttctct 420
 cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag 480
 ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcat 540
 atgggcactc tcttgaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat 600
 gctgagctcg ctttttgcgt tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttga 660
 tgggtcctgt ggttaaagta gatttatcta atattgtatt gtacatagtt gccggttgtg 720
 ttgttgcag tatgttgtag tcaccgtttt tcagcaacga tgtaaagcg tccagctatg 780
 cgggagcaat ttttaagggg agcggctgta tcatggccgc gaattcgttt gctcaatttg 840
 ggagtgcga tattccaaag catgtagccg agtccatcac taaggttgcc accaaagagc 900
 acgatgttga cataatggtg aaaaggggtg aagtgaccgt tcgtgttgtg actctcaccg 960
 aaactatttt tataatatta tctagattgt ttggtttggc ggtgtttttg ttcagatata 1020
 gtttaatgtc tatagtttgg ttttggatc atagataa 1058

<210> 10
 <211> 1572
 <212> ADN
 <213> BMYV & BNYVV

5

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1572)
 <223> Antisentido P0 P15

10

<400> 10

ggtgcttgtg gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttgtgt 60
 tgttgtcagt atgttgact caccgtttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc 120
 gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg 180
 gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aaggttgcca ccaaagagca 240
 cgatgttgac ataatggtg aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttga ctctcaccga 300
 aactatttt ataatattat ctagattgtt tggtttggcg gtgttttgt tcatgatata 360
 tttaatgtct atagtttggg tttggtatca tagataacct aggaaattta aattaaatcc 420
 tggttttata tgtactactg ttgtagctga aatttaggtc ttcttgcga atttatttct 480
 gtttcgtttt cactgttatt caggggatcc taggttatct atgatacaca aaccaaacta 540
 tagacattaa acatatcatg aacaaaaaca ccgcaaac aaacaatcta gataatatta 600
 taaaaatagt ttcggtgaga gtcacaacac gaacggtcac ttcaccctt tttaccatta 660
 tgtcaacatc gtgctctttg gtggcaacct tagtgatgga ctcggctaca tgctttggaa 720
 tatcgcaact cccaaattga gcaaacgaat tcgcgccat gatacagccg ctccccttaa 780

15

ES 2 647 077 T3

aaattgctcc cgcatagctg gacgctttaa catcgttgct gaaaaacggt gagtacaaca 840
 tactgacaac aacacaaccg gcaactatgt acaatacaat attagataaa tctactttaa 900
 ccacaagcac catcaaaaat ccataaccag agcttcacca aaaaggtggt gaacgcaaaa 960
 agcgagctca gcataagtat ttctatggta tagttcttca acaagtacca gacggtgcaa 1020
 gagagtgcc atatcgcgta agaccataat aatatggtcc attctaataat cgattttagg 1080
 actctcccgt agcttttctct cgctttcagc acaccatact gaaaggaact ttttaaactc 1140
 tgcttcaccg cgagagaaaa tttctctgcg gcgttgtagc ctctcccca gatctctgcc 1200
 tgaatttcgg gcaaggtaaa atcttttaac gtcttttctg gggggcactc gtaagtcaat 1260
 gttgcgagtg ctgggtaaca cggctccgca gtaattgtag aacctggcca gtcgtaaaga 1320
 ctggcgtttc ccgggagcgt aaataaagct cccggggtcg agctgcttac tgagcagcaa 1380
 aggcagagca gcgagaagag aacgaatata gttttcattc tcaaaagtta cgagcggtaa 1440
 atgattcgta agaaaatagc cgggtgttaa aactcgtct gtagctgta gcggtcggtt 1500
 caacgaacaa gtgaaactgt ttgttttaag ctgaaattgc atagactgct agatcctcgc 1560
 tggtttcttt tg 1572

<210> 11
 <211> 1351
 <212> ADN
 <213> Petunia sp.

5

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1351)
 <223> intrón Petunia

10

<400> 11

gtgtaagaat ttcttatggt acattattac attcaacggt ttatcttaat tggctcttca 60
 tttgattgaa atttgacaat tatttcttgt ttttttttt gtcacactct ttttgggtg 120
 gggtgccga cgaattgtgg gaaggtagaa agaggggagg acttttgta tactccatta 180
 gtaattactg tttccgtttc aatttatgtg acaatatttc ctttttagtc ggttccaaaa 240
 gaaaaagtca gcattataaa caatttaatt ttgaaattac aattttgcca ttaataaaat 300
 gatttacaac cacaaaagta tctatgagcc tgtttgggtg ggcttataag cagcttattt 360
 taagtggctt ataagtcaaa aagtgacant ttttgagaag ttagaaaatc ctaacttctc 420
 aaaaagtagc ttttaagcca cttatgactt ataagtccaa aaatttttaa gttaccaaac 480
 atatattaat gggtttataa gcttataagc cacttttaag ctcacccaaa cgggttctat 540
 gtctcacttt agactacaaa ttttaaaagt cttcatttat ttcttaatct ccgtggcgag 600
 tnaaactata acacataaag tgaaacggag ggaataagat ggagtcataa actaatccaa 660
 atctatactc tctccgttaa tttgtttttt agtttgattt ggtacattaa taaaacagat 720
 ttttcgaagg ttataaacac agacagatgt ttcccagcga gctagcaaaa ttccaagatt 780
 tctgtcgaag attcgtgtgt ttctagctag tacttgatgt tatctttaac cttttagtaa 840
 tttttgtcc ttttcttctc atttttcatc ttacaatgaa ttatgagcaa gttccttaag 900

15

ES 2 647 077 T3

tagcatcaca cgtgagatgt tttttatgat attgactaaa tccaatcttt accattcctt 960
aactagtaaa atacaacaca tgtaattga tacattgctt aacactgagg ttagaaaatt 1020
ttagaaatta gttgtccaaa tgctttgaaa ttagaaatct ttaatccctt attttttttt 1080
aaaatgtttt ttctcactcc aaagaaagag aaactgacat gaaagctcaa aagatcatga 1140
atcttactaa ctttgtggaa ctaaagtac atcagaatgt ttctgacatg tgaaaatgaa 1200
agctcttaat tttcttcttt tatttattga gggtttttgc atgctatgca ttcaatttga 1260
gtacttttaa gcacctataa acacttactt acacttgcct tggagtttat gtttttagtgt 1320
tttcttcaca tcttttttgg tcaatttga g 1351

5 <210> 12
<211> 91
<212> ADN
<213> Beta vulgaris

10 <220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(91)
<223> intrón remolacha

<400> 12

15 taaatcctgg ttttatatgt actactgttg tagctgaaat ttaggtcttc ttgctgaatt 60
tatttctggt tcgttttcac tgttattcag g 91

20 <210> 13
<211> 2701
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> P0 en horquilla

25 <220>
<221> característica_misc
<222> (1064)..(1064)
<223> n es a, c, g, o t

30 <220>
<221> característica_misc
<222> (1277)..(1277)
<223> n es a, c, g, o t

35 <400> 13

caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaaac aacagtttc 60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatfff 120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc 180
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctccc 240
gggaaacgcc agtctttacg actggccagg ttctacaatt actgaggagc cgtgttacc 300
agcactcgca acattgactt acgagtgcc cccagaaaag acgttaaaag attttacctt 360
gcccgaatt caggcagaga tctgggggag aggtacaac gccgcagaga aattttctct 420
cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag 480

ES 2 647 077 T3

ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcgat 540
atgggcactc tcttgaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat 600
gctgagctcg ctttttgcgt tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttgc 660
ctaggaaatt taaatgtgta agaatttctt atgttacatt attacattca acgttttatc 720
ttaattggct cttcatttga ttgaaatttg acaattattt cttgtttttt tttttgtcac 780
actctttttg ggttggggg ggcgacgaat tgtgggaagg tagaaagagg ggaggacttt 840
tgttatactc cattagtaat tactgtttcc gtttcaattt atgtgacaat atttcctttt 900
tagtcgggtc caaaagaaaa tgtcagcatt ataacaatt taattttgaa attacaattt 960
tgccattaat aaaatgattt acaaccacaa aagtatctat gagcctgttt ggggtgggctt 1020
ataagcagct tattttaagt ggcttataag tcaaaaagt acantttttg agaagttaga 1080
aaatcctaac ttctcaaaaa gtagctttta agccacttat gacttataag tccaaaaatt 1140
tttaagttag caaacatata ttaatgggtt tataagctta taagccactt ttaagctcac 1200
ccaaacgggt tctatgtctc acttttagact acaaatttta aaagtcttca tttatttctt 1260
aatctccgtg gcgagtnaaa ctataacaca taaagtgaag cggaggggaat aagatggagt 1320
cataaactaa tccaaatcta tactctctcc gttaatttgt ttttagttt gatttggtag 1380
attaataaaa cagatttttc gaaggttata aacacagaca gatgtttccc agcgagctag 1440
caaaattcca agatttctgt cgaaaattcg tgtgtttcta gctagtactt gatgttatct 1500
ttaacctttt agtaattttt tgtccttttc tttctatttt tcatcttaca atgaattatg 1560
agcaagtcc ttaagtagca tcacacgtga gatgtttttt atgatattga ctaaaccctaa 1620
tctttaccat tccttaacta gtaaaataca acacatgtta attgatacat tgcttaacac 1680
tgaggttaga aaattttaga aattagttgt ccaaagtctt tgaaattaga aatctttaat 1740
ccctattttt tttttaaaat gttttttctc actccaaaga aagagaaact gacatgaaag 1800
ctcaaagat catgaatctt actaactttg tggaactaaa tgtacatcag aatgtttctg 1860
acatgtgaaa atgaaagctc ttaattttct tcttttattt attgaggggtt tttgcatgct 1920
atgcattcaa tttgagtact ttaaagcacc tataaacact tacttacact tgccttggag 1980
tttatgtttt agtgttttct tcacatcttt tttggtcaat ttgcaggat ttggatccta 2040
ggcaaaaatc cataccacga gcttcaccaa aaaggtggtg aacgcaaaaa gcgagctcag 2100
cataagtatt tctatggtat agttcttcaa caagtaccag acggtgcaag agagtgccca 2160
tatcgcgtaa gaccataata atatggtcca ttctaatac gattttagga ctctcccgta 2220
gctttctctc gctttcagca caccatactg aaaggaactt tttaaactct gcttcaccgc 2280
gagagaaaat ttctctgagg cgttgtagcc tctccccag atctctgcct gaatttcggg 2340
caaggtaaaa tcttttaacg tcttttctgg ggggcactcg taagtcaatg ttgcgagtgc 2400
tgggtaacac ggctccgag taattgtaga acctggccag tcgtaaagac tggcgtttcc 2460
cgggagcgta aataaagctc ccggggtcga gctgcttact gagcagcaaa ggcagagcag 2520
cgagaagaga acgaatacag ttttcattct caaaagttac gagcggtaaa tgattcgtaa 2580
gaaaatacgc ggtgttttaa actcgctctg tagctgttag cggtcggttc aacgaacaag 2640
tgaaactggt tgttttaagc tgaaattgca tagactgcta gatcctcgct ggtttctttt 2700
g 2701

- 5 <210> 14
- <211> 1435
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

ES 2 647 077 T3

<220>
<223> P0 en horquilla (intrón remolacha)

5 <220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1435)
<223> P0 en horquilla (intrón remolacha)

<400> 14

10
caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaaac aaacagtttc 60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatttt 120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc 180
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctccc 240
gggaaacgcc agtcttttac actggccagg ttctacaatt actgcgagac cgtgttacct 300
agcactcgca acattgactt acgagtcccc cccagaaaag acgttaaaag attttacctt 360
gccccgaaatt caggcagaga tctgggggag aggtacaac gccgcagaga aattttctct 420
cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag 480
ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgggat 540
atgggcactc tcttgaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat 600
gctgagctcg ctttttgctg tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttgc 660
ctaggaaatt taaattaaat cctggtttta tatgtactac tgttgtagct gaaatttagg 720
tcttcttgcg gaattttatt ctgtttcgtt ttactgtta ttcaggggat cctaggcaaa 780
aatccatacc acgagcttca ccaaaaagggt ggtgaacgca aaaagcgagc tcagcataag 840
tatttctatg gtatagttct tcaacaagta ccagacggtg caagagagtg cccatatcgc 900
gtaagacat aataatatgg tccattctaa tatcgatttt aggactctcc cgtagctttc 960
tctcgctttc agcacacat actgaaagga actttttaa ctctgcttca ccgcgagaga 1020
aaatttctct gcggcgttgt agcctctccc ccagatctct gcctgaattt cgggcaagggt 1080
aaaatctttt aacgtctttt ctggggggca ctcgtaagtc aatgttgcga gtgctgggta 1140
acacggctcc gcagtaattg tagaacctgg ccagtcgtaa agactggcgt ttcccgggag 1200
cgtaaataaa gctcccgggg tcgagctgct tactgagcag caaaggcaga gcagcgagaa 1260
gagaacgaat acagttttca ttctcaaaag ttacgagcgg taaatgattc gtaagaaaat 1320
acgcggtggt taaaactcgc tctgtagctg ttacggtcgt gttcaacgaa caagtgaaac 1380
tgtttgtttt aagctgaaat tgcatagact gctagatcct cgctggtttc ttttg 1435

15 <210> 15
<211> 2229
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> P15 P0 en horquilla

<400> 15

ES 2 647 077 T3

ggtgcttggt gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg cgggttggt 60
 tgttgctcagt atgttgact caccgtttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc 120
 gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgttt ctcaatttgg 180
 gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aaggttgcca ccaaagagca 240
 cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtggttgga ctctcaccga 300
 aactattttt ataatattat ctgattgtt tggtttggcg gtgttttgt tcatgatatg 360
 tttaatgtct atagtttgggt tttggatca tagataacaa aagaaaccag cgaggatcta 420
 gcagctatg caatttcagc ttaaaacaaa cagtttact tgttcgttga accgaccgct 480
 aacagctaca gagcgagttt taaacaccgc gtattttctt acgaatcatt taccgctcgt 540
 aacttttgag aatgaaaact gtattcgttc tcttctcgt gctctgcctt tgctgctcag 600
 taagcagctc gaccccgga gctttattha cgctcccgga aaacgccagt ctttacgact 660
 ggccagggtc tacaattact gcggagccgt gttaccagc actcgcaca ttgacttacg 720
 agtgcacccc agaaaagacg ttaaaagatt ttacctgccc cgaaattcag gcagagatct 780
 gggggagagg ctacaacgcc gcagagaaat tttctctcgc ggtgaagcag agtttaaaaa 840
 gttcctttca gtatggtgtg ctgaaagcga gaaaagcga cgggagagtc ctaaaatcga 900
 tattagaatg gaccatatta ttatggtctt acgcgatatg ggcactctct tgcaccgtct 960
 ggtacttggt gaagaactat accatagaaa tacttatgct gagctcgtt tttgcgttca 1020
 ccaccttttt ggtgaagctc gtggtatgga tttttgccta ggaaatttaa attaaatcct 1080
 ggttttatat gtactactgt tgtagctgaa atttaggctt tcttgctgaa tttatttctg 1140
 tttcgtttt actgttattc aggggatcct aggcacaaaat ccataccacg agcttcacca 1200
 aaaaggtggt gaacgcaaaa agcgagctca gcataagtat ttctatggta tagttcttca 1260
 acaagtacca gacggtgcaa gagagtgcc atatcgcgta agaccataat aataggtcc 1320
 attctaatat cgattttagg actctcccgt agctttctct cgctttcagc acaccatact 1380
 gaaaggaact ttttaaac tgcctcaccg cgagagaaaa tttctctcgc gcgttgtagc 1440
 ctctccccc gatctctgcc tgaatttcgg gcaaggtaaa atcttttaac gtcttttctg 1500
 gggggcactc gtaagtcaat gttgcgagtg ctgggtaaca cggctccgca gtaattgtag 1560
 aacctggcca gtcgtaaaga ctggcgtttc ccgggagcgt aaataaagct cccggggtcg 1620
 agctgcttac tgagcagcaa aggcagagca gcgagaagag aacgaatata gtttctattc 1680
 tcaaaagtta cgagcggtaa atgattcgta agaaaatcag cgggtgtttaa aactcgtctt 1740
 gtagctgtta gcggtcgggt caacgaacaa gtgaaactgt ttgttttaag ctgaaattgc 1800
 atagactgct agatcctcgc tggtttctt ttgtatctat gataccaaaa ccaaactata 1860
 gacattaac atatcatgaa caaaaacacc gccaaacaa acaatctaga taatattata 1920
 aaaatagttt cggtgagagt cacaacacga acggtcactt caccctttt taccattatg 1980
 tcaacatcgt gctctttgggt ggcaacctta gtgatggact cggctacatg ctttggata 2040
 tcgcaactcc caaattgagc aaacgaattc gcggccatga tacagccgct ccccttaaaa 2100
 attgctccc catagctgga cgcttaaca tcgttgctga aaaacggtga gtacaacata 2160
 ctgacaacaa cacaaccggc aactatgtac aatacaatat tagataaatc tactttaacc 2220
 acaagcacc 2229

5 <210> 16
 <211> 2233
 <212> ADN

ES 2 647 077 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> P0 P15 en horquilla

5

<400> 16

```

caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaac aaacagtttc      60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatttt     120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc     180
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctccc     240
gggaaacgcc agtcttttac actggccagg ttctacaatt actgcgagac cgtgttaccc     300
agcactcgcga acattgactt acgagtgcc cccagaaaag acgttaaaag attttacctt     360
gcccgaatc caggcagaga tctgggggag aggctacaac gccgcagaga aattttctct     420
cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag     480
ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcat      540
atgggcactc tcttgaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat      600
gctgagctcg ctttttgctg tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttga     660
tggtgcttgt ggttaaagta gatttatcta atattgtatt gtacatagtt gccggttggt     720
ttgttgtcag tatgttgtac tcaccgtttt tcagcaacga tgtaaagcg tccagctatg     780
cgggagcaat ttttaagggg agcggctgta tcatggccgc gaattcgttt gctcaatttg     840
ggagttgcca tattccaaag catgtagccg agtccatcac taaggttgcc accaaagagc     900
acgatgttga cataatggtg aaaaggggtg aagtgaccgt tcgtgttgtg actctcaccg     960
aaactatttt tataatatta tctagattgt ttggtttggc ggtgtttttg ttcattgatat    1020
gtttaatgtc tatagtttgg ttttggatc atagataacc taggaaattt aaattaaatc    1080
ctggttttat atgtactact gttgtagctg aaatttaggt cttcttgctg aatttatctc    1140
tgtttcgttt tcaactgtat tcaggggatc ctaggttatc tatgatacca aaaccaaact    1200
atagacatta aacatatcat gaacaaaaac accgccaac caacaatct agataatatt    1260
ataaaaatag tttcgggtgag agtcacaaca cgaacggtca cttcaccctt ttttaccatt    1320

```

ES 2 647 077 T3

atgtcaacat cgtgctcttt ggtggcaacc ttagtgatgg actcggctac atgctttgga 1380
ataticgcaac tcccaaattg agcaaacgaa ttcgcggcca tgatacagcc gctcccccta 1440
aaaattgctc ccgcatagct ggacgcttta acatcgttgc tgaaaaacgg tgagtacaac 1500
atactgacaa caacacaacc ggcaactatg tacaatacaa tattagataa atctacttta 1560
accacaagca ccatcaaaaa tccataccac gagcttcacc aaaaagtggtg tgaacgcaaa 1620
aagcggagctc agcataagta tttctatggt atagttcttc aacaagtacc agacggtgca 1680
agagagtgcc catatcgcgt aagaccataa taatatgggc cattctaata tcgattttag 1740
gactctcccg tagctttctc tcgctttcag cacaccatac tgaaaggaac tttttaaact 1800
ctgcttcacc gcgagagaaa atttctctgc ggcgtttag cctctcccc agatctctgc 1860
ctgaatttcg ggcaaggtaa aatcttttaa cgtcttttct ggggggact cgtaagtcaa 1920
tgttgcgagt gctgggtaac acggctccgc agtaattgta gaacctggcc agtcgtaaag 1980
actggcgttt cccgggagcg taaataaagc tccgggggtc gagctgctta ctgagcagca 2040
aaggcagagc agcgagaaga gaacgaatac agttttcatt ctcaaaagt acgagcggta 2100
aatgattcgt aagaaaatac gcggtgttta aaactcgtc tgtagctgtt agcggtcggt 2160
tcaacgaaca agtgaaactg tttgttttaa gctgaaattg catagactgc tagatcctcg 2220
ctggtttctt ttg 2233

<210> 17
<211> 720
5 <212> ADN
<213> Virus de la amarillez de la remolacha

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(720)
<223> Proteína P0 de BMV

<400> 17

atg caa ttt cag ctt aaa aca aac agt ttc act tgt tcg ttg aac cga 48
Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg
1 5 10 15
ccg cta aca gct aca gag cga gtt tta aac acc gcg tat ttt ctt acg 96
Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr
20 25 30
aat cat tta ccg ctc gta act ttt gag aat gaa aac tgt att cgt tct 144
Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser
35 40 45
ctt ctc gct gct ctg cct ttg ctg ctc agt aag cag ctc gac ccc ggg 192
Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly
50 55 60
agc ttc att tac act ccc ggg aaa cgc cag tct tta cga ctg gcc agg 240
Ser Phe Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg
65 70 75 80
ttc tac aat tac tgc gga gcc gtg tta ccc agc act cgc aac att gac 288
Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp
85 90 95

15

ES 2 647 077 T3

tta cga gtg ccc ccc aga aaa gac gtt aaa aga ttt tac ctt gcc cga 336
 Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp Val 105 Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg 110

aat tca ggc aga gat ctg ggg gag agg cta caa cgc cgc aga gaa att 384
 Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Glu Ile 115 120 125

ttc tct cgc ggt gaa gca gag ttt aaa aag ttc ctt tca gta tgg tgt 432
 Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys 130 135 140

gct gaa agc gag aga aag cta cgg gag agt cct aaa atc gat att aga 480
 Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg 145 150 155 160

atg gac cat att att atg gtc tta cgc gat atg ggc act ctc ttg cac 528
 Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His 165 170 175

cgt ctg gta ctt gtt gaa gaa cta tac cat aga aat act tat gct gag 576
 Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu 180 185 190

ctc gct ttt tgc gtt cac cac ctt ttt ggt gaa gct cgt ggt atg gat 624
 Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp 195 200 205

ttt tgg cgg ttg gct aac ttc cct ggt aaa tgg ttt att tgc tct cac 672
 Phe Trp Arg Leu Ala Asn Phe Pro Gly Lys Trp Phe Ile Cys Ser His 210 215 220

gaa atg tat ttt gaa aac tct ttc atc cag aaa gag cta cgt ttg tga 720
 Glu Met Tyr Phe Glu Asn Ser Phe Ile Gln Lys Glu Leu Arg Leu 225 230 235

<210> 18

<211> 239

5 <212> PRT

<213> Virus de la amarillez de la remolacha

<400> 18

Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg
 1 5 10 15

Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr
 20 25 30

Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser
 35 40 45

Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly
 50 55 60

Ser Phe Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg
 65 70 75 80

Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp
 85 90 95

Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg
 100 105 110

10

ES 2 647 077 T3

Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile
 115 120 125

Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys
 130 135 140

Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg
 145 150 155 160

Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His
 165 170 175

Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu
 180 185 190

Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp
 195 200 205

Phe Trp Arg Leu Ala Asn Phe Pro Gly Lys Trp Phe Ile Cys Ser His
 210 215 220

Glu Met Tyr Phe Glu Asn Ser Phe Ile Gln Lys Glu Leu Arg Leu
 225 230 235

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de ARN que comprende una secuencia de segmentos sentido y una secuencia de segmentos antisentido que tienen secuencias deducidas del gen de P0 del genoma del BMVYV o de un gen ortólogo, en donde dichas secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, ambas, un fragmento de nucleótidos que tienen una secuencia que comparte al menos el 85% de la identidad de secuencia con el gen de P0 (SEQ. ID. NO: 17) del genoma del BMVYV o de un gen ortólogo.
- 10 2. La construcción de ARN según la reivindicación 1, en donde la o las secuencias de segmentos sentido y/o de segmentos antisentido comprende(n), además, un fragmento de nucleótidos que tienen secuencia(s) que comparte(n) al menos el 85% de la identidad de secuencia con la secuencia no traducida del extremo 5' (5'UTR) adyacente a la secuencia de nucleótidos del gen de P0 del genoma del BMVYV.
- 15 3. La construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden un fragmento de nucleótidos que tienen secuencias que comparten al menos el 85% de la identidad de secuencia con el gen de P0 del genoma del BMVYV.
4. La construcción de ARN según la reivindicación 3, en donde las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, además, un fragmento de nucleótidos que tienen secuencias que comparten al menos el 85% de la identidad de secuencia con el gen de P1 del genoma del BMVYV.
- 20 5. La construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el segmento sentido comprende o consiste en la secuencia SEQ. ID. NO: 1 y/o el segmento antisentido comprende o consiste en la secuencia SEQ. ID. NO: 3.
6. La construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden ambas, además, un fragmento de nucleótidos que comparte al menos el 85% de la identidad de secuencia con el genoma de el BNYVV y preferiblemente en donde dicho segmento sentido comprende un fragmento de la SEQ. ID. NO: 5 y dicho segmento antisentido comprende un fragmento de la SEQ. ID. NO: 6.
- 25 7. La construcción según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el o los segmentos y el o los fragmentos comprenden más de 10 nucleótidos, preferiblemente entre 15 y 25 nucleótidos.
8. Una construcción de ADN con capacidad de transcribirse en la construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 7.
- 30 9. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de la construcción de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 8.
10. Una molécula de ARN autocomplementaria de doble cadena expresada por la construcción de ADN según la reivindicación 8 o el vector según la reivindicación 9.
- 35 11. Un método para inducir tolerancia o resistencia, preferiblemente resistencia total a al menos el virus BMVYV y posiblemente a otros virus, en una planta o en una célula vegetal, método que comprende las etapas de: preparar la construcción de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 9, operativamente unida a una o más secuencias reguladoras activas en la planta o la célula vegetal, y transformar la célula vegetal con la construcción de ácido nucleico, lo que induce a la resistencia a al menos el virus BMVYV en la planta o en la célula vegetal.
- 40 12. El método según la reivindicación 11, en donde el otro virus se selecciona del grupo que consiste en el virus del mosaico amarillo del nabo, el virus de la amarillez de las cucurbitáceas transmitido por pulgones, el virus del enrollamiento de la hoja de la patata, el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, el virus del mosaico del guisante, el virus de la amarillez de la remolacha occidental (EE. UU.), el virus de la clorosis de la remolacha, el virus del enanismo amarillo del cereal y el virus BNYVV, preferiblemente el virus BNYVV.
- 45 13. Un método para inducir la tolerancia a al menos el virus BMVYV que comprende la etapa de preparar una construcción de ácido nucleico que comprende un segmento sentido y un segmento antisentido deducidos de la secuencia de nucleótidos de BNYVV, que preferiblemente se deducen del gen codificante de la proteína P15 de dicho BNYVV.
- 50 14. Una planta transgénica o una célula vegetal transgénica tolerante o resistente, preferiblemente completamente resistente a al menos el virus BMVYV y posiblemente a uno o más de otros virus y que comprende una construcción de ácido nucleico capaz de expresar la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, preferiblemente la construcción de ADN según la reivindicación 8 operativamente unida a una o más secuencias reguladoras activas en la planta o en la célula vegetal, y/o que comprende un vector según la reivindicación 9, y/o que comprende una molécula de ARN autocomplementaria de doble cadena según la reivindicación 10.
15. La planta transgénica o célula vegetal transgénica según la reivindicación 14, seleccionada del grupo que

consiste en lechuga, pepino, patata, caña de azúcar, guisante, cebada y remolacha azucarera, prefiriéndose una remolacha azucarera o una célula de remolacha azucarera.

- 5 16. Un tejido vegetal transgénico y/o estructura reproducible derivada de la célula vegetal transgénica según las reivindicaciones 14 o 15, en donde dicho tejido se selecciona del grupo que consiste en fruto, tallo, raíz, tubérculo y semilla o en donde dicha estructura reproducible se selecciona del grupo que consiste en callos, yemas o embriones.

Intervalo de secuencia: 1 a 659

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAAAAGAACCAGCGAGGATCTAGCAGTCTATGCAATTTGAGCTTAAACAAACAGTTTCACTTGTTCGTTGAACCCGACCCGCTAACAGCTACAGAGCGAG
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TTTTAAACACCGGTATTTCTTACGAATCATTTACCGCTCGTAACCTTTGAGAATGAAAACGTATTGTTCTTCTCGCTGCTCGCCCTTGGCTGCT
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTAAGCAGCTGACCCCGGGAGCTTTATTACGCTCCCGGAAACGCCAGTCTTTACGACTGGCCAGGTTCTACAATTACTGGGAGCCGTGTTACCC
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 AGCACTCGCAACATTGACTTACGAGTGCCCCAGAAAAGACGTTAAAAGATTTTACCTTGCCCGAAATTCAGGCAGAGATCTGGGGGAGAGGCTACAAC
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 GCCGAGAGAAAATTTCTCTCGCGGTGAGCAGAGTTTAAAANGTTCTTTTCAGTATGGTGTCTGAAAGCCGAGAGAAAAGCTACGGGAGAGTCCTAAAAT
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CGATATTAGAATGGACCATATTATGGTCTTACCGGATATGGCACTCTCTTGCAACCGTCTGGTACTTGTGAAGAACTATACCATAGAATACTTAT
 610 620 630 640 650
 GCTGAGCTCGCTTTTGGGTTCAACCACCTTTTGGTGAAGCTCGTGGTATGGATTTTGG

Fig. 3

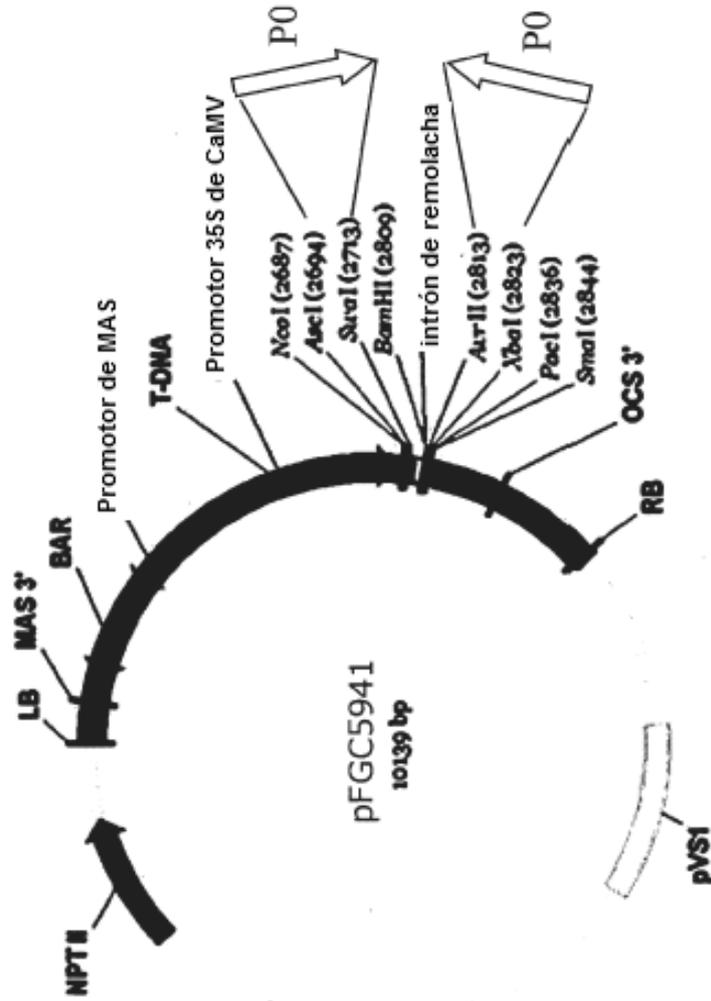


Fig. 4A

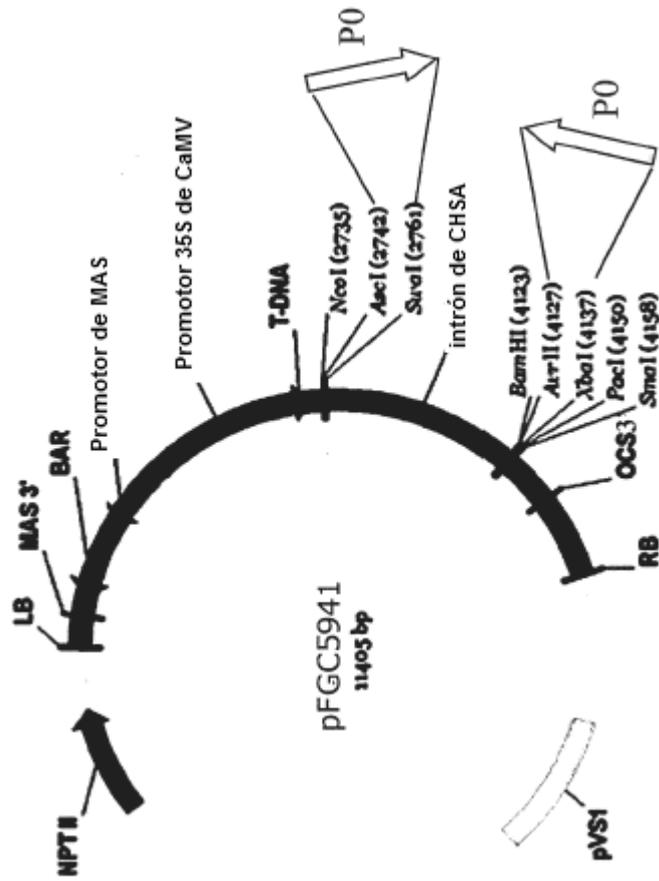


Fig. 4B

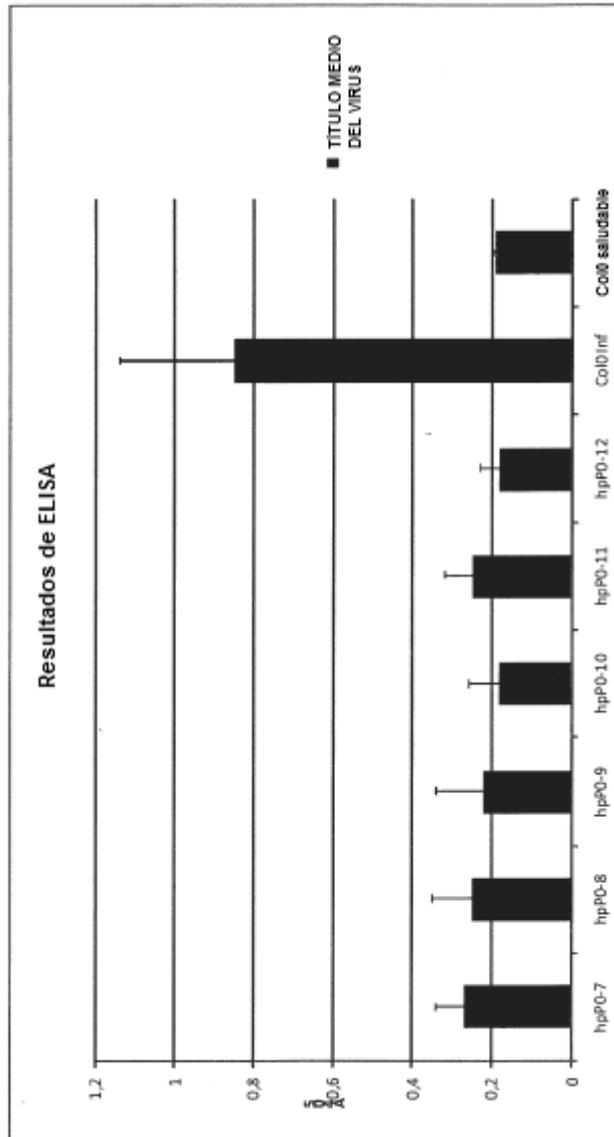


Fig. 5

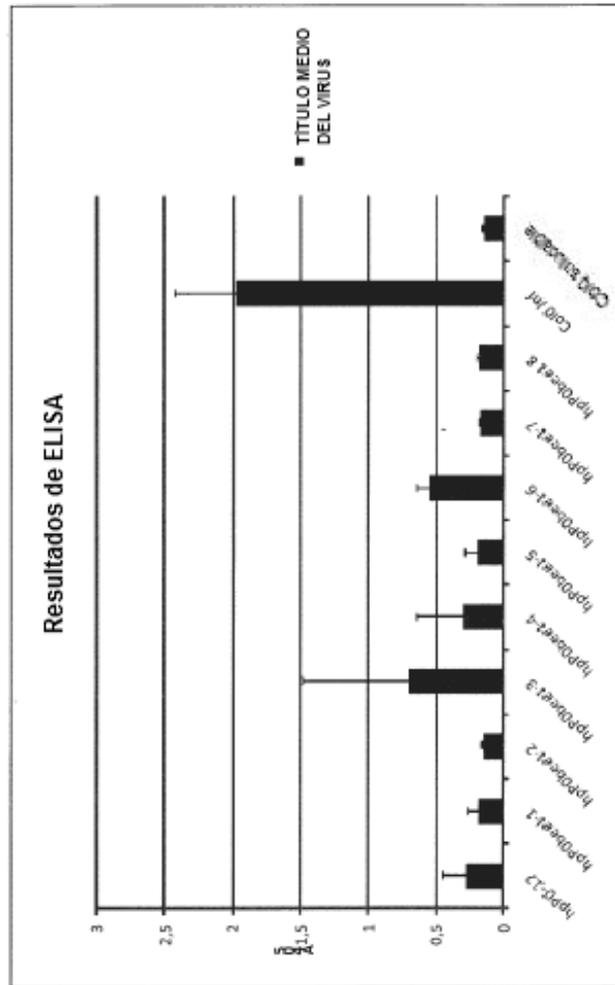


Fig. 6

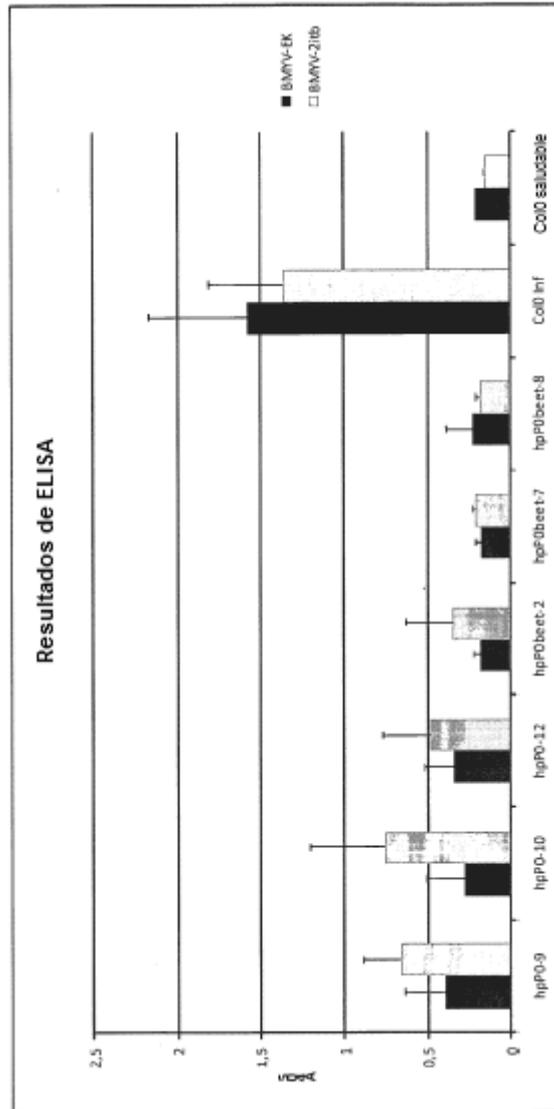


Fig. 7

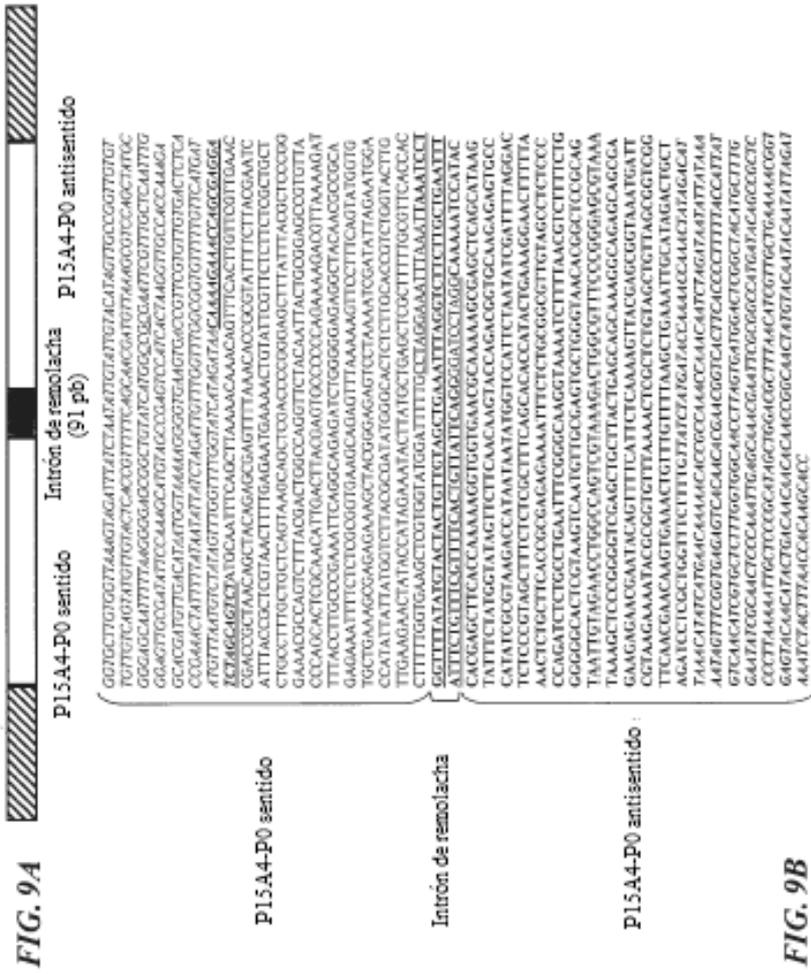


Fig. 9

FIG. 9B

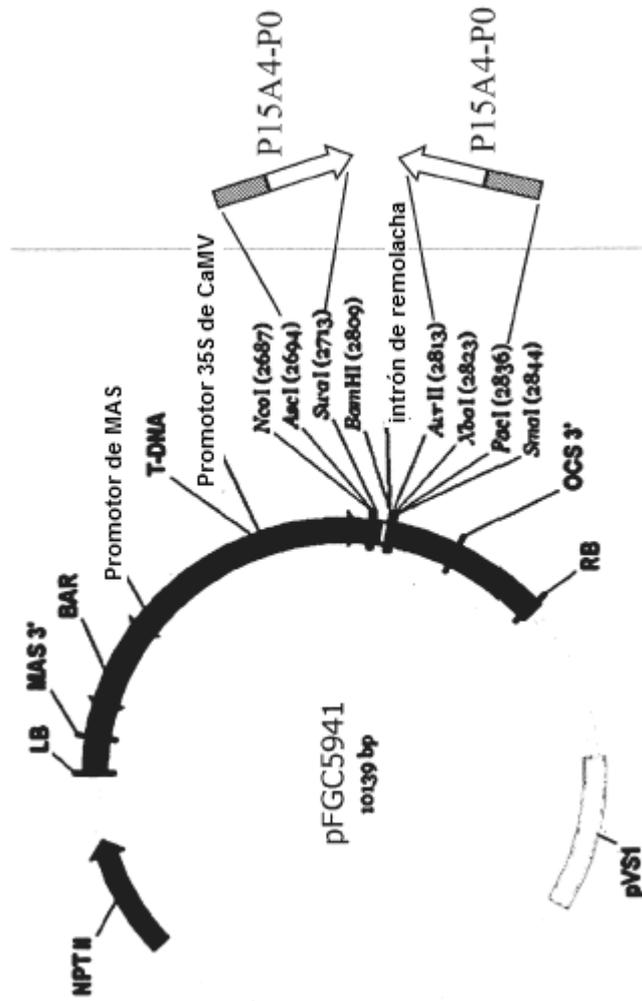


Fig. 11A

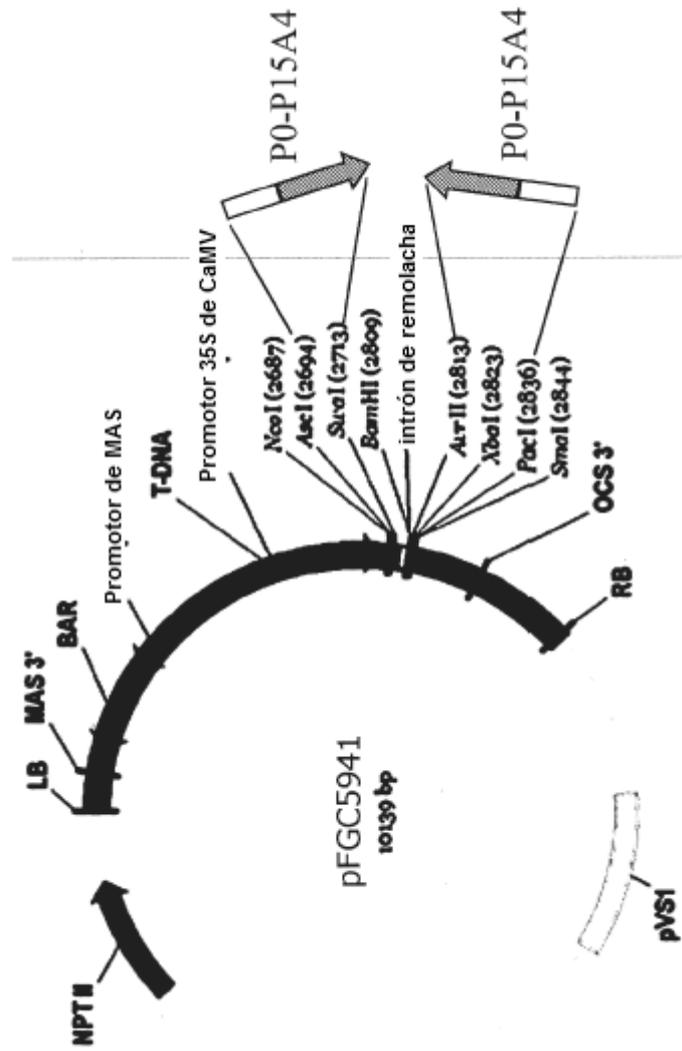


Fig. 11B