

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 909**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2010 PCT/US2010/031757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10123904**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010 E 10718360 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2421977**

54 Título: **Resistencia a múltiples virus en plantas**

30 Prioridad:

20.04.2009 US 171021 P

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

30.01.2018

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Blvd.
St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, SHIHSHIEH;
FLASINSKI, STANISLAW;
FRIZZI, ALESSANDRA;
GABOR, BRAD;
HAGEN, CHARLES;
KAO, JOHN y
SALATI, RAQUEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 651 909 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

Resistencia a múltiples virus en plantas

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en líneas generales a procedimientos para potenciar la resistencia a múltiples virus de plantas en plantas de tomate.

2. Descripción de la técnica relacionada

10 Las plantas solanáceas están sometidas a múltiples agentes que causan enfermedades potenciales, incluyendo enfermedades inducidas por virus que son responsables de pérdidas de cultivos principales en todo el mundo. Para muchos virus de ARN, la expresión de la proteína de la envuelta transgénica (CP) o la replicasa bloquea la progresión de los procesos infecciosos víricos. La resistencia basada en ARN hace uso del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional de la planta (PTGS) para degradar los ARN víricos. Sin embargo, dichas estrategias pueden producir resistencia de base muy estrecha y/o no es duradera, especialmente con una rápida propagación/evolución de nuevas especies de virus o aislados. En algunos casos, los rasgos de resistencia
15 clásicamente definidos (no transgénicos) están disponibles para ayudar al desarrollo de plantas resistentes a virus. Además, el control de plagas vegetales, tales como insectos que sirven para transmitir virus de las plantas, pueden ayudar a limitar las pérdidas debido a infección vírica de las plantas.

20 Se han descrito en la técnica diversas maneras posibles para llegar a una resistencia a virus de amplio espectro, por ejemplo, por Shepherd y col. (2009), Niu y col. (2006), Lin y col. (2006), Ramesh y col. (2007), Praveen y col. (2007), Bucher y col. (2006), Zrachya y col. (2006) y Safarnejad y col. (2009). Se ha informado de plantas de tomate resistentes a varios tospovirus, así como la resistencia combinada contra geminivirus y tospovirus, aunque en tabaco, en el estudio "Establishment of the broad-spectrum resistance to tospoviruses in crops" publicado en línea en http://btc.nchu.edu.tw/myweb/new_page_3.htm el 16 de julio de 2008.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Diagrama esquemático de la organización genómica de los virus de interés.

Figura 2A: Diagrama esquemático que ilustra la estrategia para identificar la secuencia eficaz para el control de virus de plantas.

30 Figura 2B: Diagrama esquemático de un genoma de ADN-A de begomovirus típico que muestra la localización de regiones cribadas por su eficacia para el control de virus cuando se expresa como repeticiones invertidas. Las flechas grises numeradas representan partes del genoma que se ensayaron.

Figura 2C: Diagrama esquemático de un genoma de potexvirus típico (virus del mosaico del pepino; PepMV) que muestra la localización de regiones cribadas por su eficacia para el control de virus cuando se expresa en repeticiones invertidas. Las flechas grises numeradas representan partes del genoma que se ensayaron.

35 Figura 2D: Diagrama esquemático de un genoma de tospovirus (por ejemplo, el virus del marchitamiento moteado del tomate (TSWV)) que muestra la localización de regiones cribadas por su eficacia para el control de virus cuando se expresa como repeticiones invertidas. Las flechas grises numeradas representan partes del genoma que se ensayaron.

Figura 3: Correlación de la resistencia a virus con producción de ARNip en plantas de tomate transformadas.

40 Figura 4: Construcciones de fusión de ARNbc artificiales ejemplares para conferir resistencia a múltiples virus ("MVR").

Figura 5: Secuencias de 21 nt adecuadas (entre las SEQ ID NO: 1-42) que se analizaron frente a cinco geminivirus diana (emparejamiento perfecto: doble subrayado; emparejamiento incorrecto G:U: subrayado sencillo; otros emparejamientos incorrectos o no utilizados: no subrayado).

45 Figura 6: Secuencias de 21 nt adecuadas (entre las SEQ ID NO: 43-70) que se analizaron frente a tospovirus (emparejamiento perfecto: doble subrayado; emparejamiento incorrecto G:U: subrayado sencillo; otros emparejamientos incorrectos o no utilizados: no subrayado).

Figura 7A, 7B: Secuencias de 21 nt adecuadas (entre las SEQ ID NO: 71-154) que se analizaron frente a potexvirus diana (emparejamiento perfecto: doble subrayado; emparejamiento incorrecto G:U: subrayado sencillo; otros emparejamientos incorrectos o no utilizados: no subrayado).

50

Figura 8: Esquema de la construcción ejemplar para destacar múltiples miARN modificados por ingeniería en un casete transgénico, tal como con ARNip progresivo.

Figura 9: Diagrama esquemático que ilustra el casete de expresión para destacar múltiples modos de acción para resistencia a virus.

5 Figura 10: Construcciones ejemplares adicionales para destacar múltiples miARN modificados por ingeniería en un casete transgénico, así como para expresar miARN junto con ARNbc.

10 Figura 11A, 11B: Barrido de regiones del genoma de tospovirus para definir segmentos que pueden expresarse como ARNbc con eficacia antivírica. El eje X representa eventos individuales y regiones diana (CP: proteína de la cubierta; GP: glucoproteína de la envuelta; y RdRP: ARN polimerasa dependiente de ARN). El eje Y representa el % de plantas R₁ transgénicas que presentan resistencia a virus. Figura 11A: resultados de TSWV; figura 11B: resultados de CaCV y GBNV. "CP4 +" se refiere a la presencia del gen marcador de selección unido a la secuencia codificante de ARNbc, en plantas R₁.

15 Figura 12: Regiones del genoma PepMV ensayadas para la eficacia en la generación de resistencia mediada por ARNbc contra este potexvirus (CP: proteína de la cubierta; Mov: proteína de movimiento; RdRP o RdR: ARN polimerasa dependiente ARN; TGB: proteína de tripe bloque génico).

20 Figura 13A, 13B: Regiones de genoma de geminivirus ensayadas para la eficacia en la generación de resistencia mediada por ARNbc contra este grupo de virus (CP: proteína de la cubierta; Rep: proteína de replicación). Otras plantas transgénicas contienen un gen de resistencia a glifosato. "0 %- 100 %" indica el porcentaje de plantas R₁ que son positivas al marcador de selección y resistentes a virus. Figura 13A: resultados representativos para TYLCV y ToSLCV; figura 13B: resultados representativos para PepGMV, PHYVV y ToLCNDV. Para eventos PHYVV y ToLCNDV, "Spc" se refiere a la presencia de un gen marcador de selección que confiere resistencia a espectinomicina. Otros eventos se transformaron con una construcción que comprende un gen marcador de selección que confiere resistencia a glifosato ("CP4 positiva").

25 Figura 14: Diagrama esquemático que ilustra casetes de expresión representativos para abordar múltiples virus en múltiples familias de virus.

Figura 15: Resultados del uso de una construcción de fusión de ARNbc artificial que dirige la expresión de CP de tospovirus y PepMV (potexvirus) para resistencia a múltiples virus como se analiza en el ejemplo 3.

La construcción usada se muestra esquemáticamente en la figura 4B, construcción inferior: TSWV (16 pb), TSWV (296 pb), PepMV (231 pb), CaCV/GBNV (232 pb).

30 Figura 16: Representa la resistencia observada contra CaCV inoculado en plantas R₁ CP4 positivas inoculadas transformadas con una construcción que comprende secuencias de repetición terminal de tospovirus (SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378, encontradas en la SEQ ID NO: 455).

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona plantas de tomate resistentes a al menos dos de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae* y procedimientos para su producción. En un aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica de tomate o semilla transgénica de tomate, o célula vegetal transgénica de tomate que comprende resistencia a especies de virus de plantas de al menos dos de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae*, en la que la resistencia se proporciona por al menos dos modos diferentes de acción seleccionados de

40 (a) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce ARNbc, (b) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN y (c) expresión de una secuencia terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión, en la que la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia de repetición terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión de tospovirus, en la que además la secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus se selecciona de una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una

45 secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455. En otras realizaciones, la resistencia se proporciona por al menos tres modos diferentes de acción. La resistencia de la planta de tomate puede comprender resistencia contra un begomovirus, tospovirus o potexvirus.

50 En ciertas realizaciones, la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una construcción de ácido nucleico que produce ARNbc. En algunas realizaciones, la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una construcción de fusión de ARNbc. En algunas realizaciones de la invención, el ARNbc interfiere con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus o un gen de la replicación del virus. En realizaciones particulares, la construcción de ácido nucleico que produce ARNbc comprende

55 una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-455.

En otras realizaciones, la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN. Por tanto, en ciertas realizaciones, la resistencia contra un begomovirus o tospovirus se proporciona por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado. En otras realizaciones más, el miARN interfiere con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus o un gen de la replicación del virus. En realizaciones particulares, el miARN comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141.

En ciertas realizaciones, la planta de tomate comprende (a) resistencia contra un begomovirus que se proporciona por la expresión de ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de la replicación de begomovirus; (b) resistencia contra un tospovirus o potexvirus que se proporciona por la expresión de un ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus o gen de la proteína del movimiento del virus; (c) resistencia contra un potexvirus que se proporciona por la expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN; o (d) resistencia contra un begomovirus o tospovirus que se proporciona por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado.

Se proporciona una planta de tomate en la que la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión, en la que la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia de repetición terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión de tospovirus, en la que además la secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus se selecciona de una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455. En ciertas realizaciones, la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona inhibiendo el ensamblaje del virión, en la que el ensamblaje del virión se inhibe por una secuencia comprendida dentro de una construcción de ácido nucleico que comprende un primer segmento de ácido nucleico y un segundo segmento de ácido nucleico, en la que el primer y el segundo segmento son repeticiones sustancialmente invertidas entre sí y están unidas juntas por un tercer segmento de ácido nucleico, y en la que el tercer segmento comprende al menos una secuencia terminal de un segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión. En realizaciones particulares, el tercer ácido nucleico comprende una secuencia terminal genómica de tospovirus seleccionada del grupo que consiste en: una secuencia terminal de un segmento genómico L de CaCV o GBNV, una secuencia terminal de un segmento genómico M de CaCV o GBNV, una secuencia terminal de un segmento genómico S de CaCV o GBNV, una secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455.

La planta de tomate comprende resistencia a virus de al menos dos de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae*. Por tanto, en algunas realizaciones, los virus se seleccionan de los géneros potexvirus, tospovirus y begomovirus. En realizaciones particulares los virus se seleccionan de: al menos uno de TYLCV, ToSLCV, ToLCNDV, PHYVV, PepGMV; b) uno o más de TSWV, GBNV, CaCV; y c) PepMV. En una realización más particular, el potexvirus es el virus del mosaico del pepino. En ciertas realizaciones, el begomovirus es TYLCV, ToLCNDV, PHYVV, ToSLCV o PepGMV. En algunas realizaciones, el tospovirus es CaCV, GBNV, o TSWV. En realizaciones particulares, el begomovirus es TYLCV y el potexvirus es el virus del mosaico del pepino; o el tospovirus es TSWV y el potexvirus es el virus del mosaico del pepino; o en la que el begomovirus es TYLCV, el potexvirus es el virus del mosaico del pepino y el tospovirus es TSWV.

En algunas realizaciones la planta de tomate puede comprender una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 156, 160, 162, 164, 363-371, 373 y 375. En esas u otras realizaciones, la planta de tomate comprende, o comprende además, una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127, 141 y 379-454. Por tanto, una planta de tomate de la invención puede comprender: (a) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378 y 455; (b) al menos una secuencia selecciona de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141; o (c) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378 y 455.

En otras realizaciones más, la planta de tomate comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga que confiere resistencia a virus seleccionada de a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de ARN que es complementaria a la totalidad o una parte de un primer gen diana; b) una secuencia de ácido nucleico que comprende múltiples copias de al menos un segmento de ADN anti-sentido que es anti-sentido para al menos un segmento de dicho al menos un primer gen diana; c) una secuencia de ácido nucleico que comprende un segmento de ADN sentido de al menos un gen diana; d) una secuencia de ácido nucleico que comprende múltiples

copias de al menos un segmento de ADN sentido de un gen diana; e) una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN para suprimir un gen diana formando ARN bicatenario y que comprende al menos un segmento que es anti-sentido para la totalidad o una parte del gen diana y al menos un segmento de ADN sentido que comprende un segmento de dicho gen diana; f) una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN para suprimir un gen diana formando un ARN bicatenario que comprende múltiples segmentos en serie de ADN anti-sentido y que son anti-sentido para al menos un segmento del gen diana y múltiples segmentos en serie de ADN sentido que comprenden al menos un segmento de dicho gen diana; g) una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN para suprimir un gen diana formando múltiples hebras dobles de ARN y comprende múltiples segmentos que son anti-sentido para al menos un segmento de dicho gen diana y múltiples segmentos de ADN sentido del gen diana, y en la que dichos múltiples segmentos de ADN anti-sentido y dichos múltiples segmentos sentido están dispuestos en una serie de repeticiones invertidas; h) una secuencia de ácido nucleico que comprende nucleótidos derivados de un miARN de plantas; e i) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia terminal de tospovirus que interfiere con el ensamblaje del virión. La invención también proporciona una planta en la que la expresión de la al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga provoca resistencia a dos o más virus seleccionados de: tospovirus, begomovirus y potexvirus. La planta también puede comprender además un rasgo de resistencia a virus de plantas no transgénico.

En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para conferir resistencia en una planta de tomate a especies de virus de plantas de al menos dos de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae*, comprendiendo el procedimiento transformar la planta con y expresar en el planta al menos dos secuencias de ácido nucleico que proporcionan de forma colectiva resistencia a dichas al menos dos especies de virus de plantas, en la que se utilizan al menos dos modos diferentes de acción para proporcionar dicha resistencia, que comprende (a) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce ARNbc, (b) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN y (c) expresión de una secuencia terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión, en la que la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia de repetición terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión de tospovirus, en la que además la secuencia de repetición terminal del genoma de tospovirus se selecciona de una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455. En ciertas realizaciones, la resistencia comprende resistencia contra un begomovirus, tospovirus o potexvirus.

La resistencia puede proporcionarse a al menos una de las especies de virus de plantas por transformación y expresión de una construcción de ácido nucleico que produce ARNbc. En realizaciones particulares, la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por transformación y expresión de una construcción de fusión de ARNbc. En realizaciones más particulares, el ARNbc interfiere con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus o un gen de la replicación del virus. En más realizaciones más particulares, la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-455.

En otras realizaciones, la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por transformación y expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN. En una realización, se contempla que la resistencia contra un begomovirus o tospovirus se proporciona por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado. El miARN producido puede interferir además con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus o un gen de la replicación del virus. En realizaciones particulares el miARN comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141.

Por tanto, en ciertas realizaciones, (a) se proporciona resistencia contra un begomovirus por transformación y expresión de ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de replicación de begomovirus; (b) se proporciona resistencia contra un tospovirus o potexvirus por la expresión de un ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus o gen de la proteína del movimiento del virus; (c) se proporciona resistencia contra un potexvirus por expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN; o (d) se proporciona resistencia contra un begomovirus o tospovirus por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado.

La resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión, en la que la resistencia proporcionada a al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia de repetición terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión de tospovirus, en la que además la secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus se selecciona de una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455. En ciertas realizaciones, la resistencia se

proporciona a al menos una de dichas especies de virus de plantas inhibiendo el ensamblaje del virión, en la que el ensamblaje del virión se inhibe por una secuencia comprendida dentro de una construcción de ácido nucleico que comprende un primer segmento de ácido nucleico y un segundo segmento de ácido nucleico, en la que el primer y el segundo segmento son repeticiones sustancialmente invertidas entre sí y están unidas juntas por un tercer segmento de ácido nucleico, y en la que el tercer segmento comprende al menos una secuencia terminal de un segmento genómico de tospovirus, cuya expresión inhibe el ensamblaje del virión. Además, en realizaciones particulares, el tercer ácido nucleico puede comprender una secuencia terminal del genoma de tospovirus seleccionada de: una secuencia terminal de un segmento genómico L de CaCV o GBNV, una secuencia terminal de un segmento genómico M de CaCV o GBNV, una secuencia terminal de un segmento genómico S de CaCV o GBNV y una secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus. En realizaciones más particulares, la secuencia terminal o la secuencia de repetición terminal comprende la SEQ ID NO: 167, la SEQ ID NO: 168, la SEQ ID NO: 376, la SEQ ID NO: 377 o la SEQ ID NO: 378.

En otras realizaciones de la invención, la pluralidad de especies de virus de plantas se selecciona de al menos dos de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae*. Por tanto, los virus pueden seleccionarse de los géneros *Potexvirus*, *Tospovirus*, y *Begomovirus*. En ciertas realizaciones, los virus se seleccionan de: a) uno o más de TYLCV, ToSLCV, ToLCNDV, PHYVV, PepGMV; b) uno o más de TSWV, GBNV, CaCV; y c) PepMV.

La secuencia de ácido nucleico puede comprender al menos un elemento de supresión génica para suprimir al menos un primer gen diana. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender la expresión en la planta de: (a) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378 y 455; (b) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141; o (c) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378 y 455.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la invención

Lo siguiente es una descripción detallada de la invención proporcionada para ayudar a los expertos en la materia a poner en práctica la presente invención. Los expertos en la materia pueden hacer modificaciones y variaciones en las realizaciones descritas en el presente documento.

La presente invención proporciona procedimientos para el control genético de enfermedades víricas en plantas de tomate (es decir, *Lycopersicon* o *Solanum sp.*). la supresión génica mediada por ARN puede conferirse por la expresión de un casete transgénico de repetición invertida que genera una población de pequeños ARN interferentes (ARNip) derivados de la región de ARNbc de un transcrito transgénico. Otra estrategia mediada por ARN para la supresión génica es por la expresión de uno o más segmentos de miARN que "abordan" transcritos específicos y dan lugar a su degradación. Por tanto, pueden utilizarse estrategias que incluyen el diseño por ingeniería de ARNbc, miARN, ta-ARNip y/o ARNip progresivo. Por ejemplo, también pueden utilizarse secuencias derivadas de begomovirus o derivadas de otros virus, dirigidas a la replicación, la proteína de la cubierta, y las proteínas C2 y/o C3. Asimismo, para el control de potexvirus tales como el virus del mosaico del pepino, pueden usarse secuencias dirigidas a partes de la proteína de la cubierta (cápsida) ("CP"), la proteína de la replicación tal como la ARN polimerasa dependiente de ARN ("RdRP") y/o una o más proteínas del movimiento ("MP") que pueden incluir un bloque de tres genes ("TGB") o un MP "30K". Para el control de tospovirus, pueden utilizarse de forma similar secuencias dirigidas a, por ejemplo, la proteína de la cubierta ("CP", también llamada la nucleocápsida, proteína "N"), RdRP, la proteína del movimiento ("NsM") y/o glucoproteínas no estructurales (codificadas por los genes "G1" o "G2"). Dichas secuencias pueden corresponder exactamente a secuencias de uno o más aislados víricos, o pueden ser variantes, por ejemplo, diseñadas para aumentar su eficacia antivírica, o para evitar efectos no diana.

Puede conseguirse resistencia a múltiples virus ("MVR") utilizando ARNbc y/o miARN expresado a partir de una única construcción transformada, o más de una construcción. Además, una única construcción puede comprender uno o más casetes de expresión que producen ARNbc y/o miARN dirigido a una o más funciones necesarias para la infección vírica de la planta, la multiplicación y/o la transmisión, así como uno o más casetes de expresión que producen al menos un ARNm que codifica una proteína o parte de una proteína que es la diana. Por tanto, la resistencia a múltiples virus de plantas puede conseguirse en un único "evento" transgénico. La resistencia mediada por ARN puede potenciarse además por estrategias basadas en proteínas utilizando uno o más aptámeros que inhiben la replicación, la expresión o la mutación en la replicasa o proteinasa asociadas con la replicación, proteínas de unión a ADNmc tale como m13-G5 (por ejemplo, patente de Estados Unidos 6.852.907; Padidam y col., 1999), para resistencia a geminivirus o también puede emplearse un aptámero peptídico que interfiere con la replicación de geminivirus (por ejemplo, López-Ochoa y col., 2006).

También se contempla que la inhibición del ensamblaje del virión, por ejemplo, por una estrategia basada en ácido nucleico, puede utilizarse como a modo de acción para proporcionar resistencia a virus a una planta de tomate. Esta inhibición del ensamblaje del virión se proporciona, por ejemplo, por el uso de una secuencia terminal de tospovirus, tal como una secuencia de repetición terminal. Por "inhibición del ensamblaje del virión" se entiende la interferencia con la interacción entre las proteínas de la cápsida vírica y uno o más ácidos nucleicos que juntos pueden formar una partícula vírica ("virión"). Dicha interferencia puede producirse, por ejemplo, por la expresión de una secuencia que puede servir como sustrato artificial que compite por la transcriptasa inversa y/o puede producirse por interferencia con la circularización apropiada de los componentes del genoma vírico de replicación.

Además, pueden utilizarse locus de resistencia genética clásicos para la tolerancia en tomate, pimientos y otras plantas solanáceas, por ejemplo, a través de estrategias clásicas de reproducción. También se contemplan estrategias basadas en proteínas usando el gen "N" de tospovirus (nucleocápsida; proteína de la cubierta) más/menos repeticiones invertidas y una proteína de la cubierta de potexvirus (por ejemplo, virus del mosaico del pepino) (CP) y la replicasa para la resistencia.

Los procedimientos de supresión génica pueden incluir el uso de ARN anti-sentido, cosupresión e interferencia de ARN. La supresión génica anti-sentido en plantas se describe por Shewmaker y col. en las patentes de Estados Unidos 5.107.065, 5.453.566 y 5.759.829. La supresión génica en bacterias usando ADN que es complementario al ARNm que codifica el gen a suprimir se divulga por Inouye y col. en las patentes de Estados Unidos 5.190.931, 5.208.149, y 5.272.065. la interferencia de ARN o supresión génica mediada por ARN se ha descrito, por ejemplo, por Redenbaugh y col., 1992; Chuang y col., 2000; y Wesley y col., 2001.

Se han descrito diversas rutas celulares implicadas en la supresión génica mediada por ARN, cada una distinguida por una ruta característica y componentes específicos. Véanse, por ejemplo, las revisiones de Brodersen y Voinnet (2006), y Tomari y Zamore (2005). La ruta de ARNip implica la escisión no progresiva de un ARN bicatenario en ARN interferentes pequeños ("ARNip"). La ruta de micro-ARN implica micro-ARN ("miARN"), ARN no codificantes de proteínas generalmente entre 19 y 25 nucleótidos (habitualmente 20-24 nucleótidos en plantas) que guían la escisión en trans de transcritos diana, regulando negativamente la expresión de genes implicados en diversas rutas de regulación y desarrollo; véase Ambros y col. (2003). Los miARN de plantas se han definido por un conjunto de características incluyendo un precursor de tallo-bucle emparejado que se procesa por DCL 1 en un único miARN de ~21 nucleótidos específico, la expresión de un único par de miARN y especies de miARN* del precursor de ARN bicatenario con salientes 3' de dos nucleótidos y silenciamiento de dianas específicas en trans (véase, Bartel (2004); Kim (2005); Jones-Rhoades y col. (2006); Ambros y col. (2003)). En la ruta de ARNip de acción en trans ("ta-ARNip"), los miARN sirven para guiar el procesamiento en fase de los transcritos primarios de ARNip en un proceso que requiere una ARN polimerasa dependiente de ARN para la producción de un precursor de ARN bicatenario; los ARNip de acción en trans se definen por la ausencia de estructura secundaria, un sitio diana de miARN que inicia la producción de ARN bicatenario, requisitos de DCL4 y una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6) y la producción de múltiples ARN pequeños de ~21 nt perfectamente progresivos con dúplex perfectamente emparejados con salientes 3' de dos nucleótidos (véase, Allen y col., 2005).

Se han identificado muchos genes de micro-ARN (genes MIR) y están disponibles al público en una base de datos ("miRBase" disponible en línea en www.microrna.sanger.ac.uk/sequences; véase también, Griffiths-Jones y col. (2003)). También se describen genes MIR adicionales y miARN maduros en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0120415 y 2005/144669. Las familias de genes MIR parecen ser sustanciales, y se estima que representan un 1 % de al menos algunos genomas y son capaces de influir o regular la expresión de aproximadamente un tercio de todos los genes (véase, por ejemplo, Tomari y col. (2005); Tang (2005); y Kim (2005)). Se ha informado de que los genes MIR se producen en regiones intergénicas, tanto aisladas como en grupos en el genoma, pero también pueden estar localizados completa o parcialmente dentro de intrones de otros genes (tanto codificantes de proteínas como no codificantes de proteínas). Para una revisión reciente de la biogénesis de miARN, véase Kim (2005). La transcripción de los genes MIR puede ser, al menos en algunos casos, bajo el control de un promotor del propio gen MIR. El transcrito primario, llamado "pri-miARN", puede ser bastante grande (varias kilobases) y puede ser policistrónico, que contiene uno o más pre-miARN (estructuras retroplegadas que contienen una disposición de tallo-bucle que se procesa en el miARN maduro), así como la "capucha" 5' habitual y la cola poliadenilada de un ARNm. Véase, por ejemplo, la figura 1 en Kim (2005).

También puede emplearse un "locus de ARN pequeño progresivo" que se transcribe en un transcrito de ARN que forma una única estructura retroplegada que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños (llamados "ARN pequeños progresivos") capaces de suprimir un gen diana (por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20080066206). En contraste con los ARNip, un transcrito de ARN pequeño progresivo se escinde en fase. En contraste con los miARN, un transcrito de ARN pequeño progresivo se escinde por DCL4 o una ribonucleasa ortóloga de tipo DCL4 (no DCL1) para producir múltiples ARN pequeños abundantes capaces de silenciar un gen diana. En contraste con la ruta de ta-ARNip, el locus de ARN pequeño progresivo se transcribe en un transcrito de ARN que forma ARN hibridado independientemente de un ARN polimerasa dependiente de ARN y sin un sitio diana de miARN que inicia la producción de ARN bicatenario. Las novedosas construcciones de ADN recombinante que se diseñan basándose en un locus de ARN pequeño progresivo son útiles para la supresión de uno o múltiples genes diana, sin el uso de miARN, ta-ARNip o vectores de expresión diseñados para formar una estructura de horquilla para procesarse en ARNip. Además, los sitios de reconocimiento correspondientes a un ARN

pequeño progresivo son útiles para la supresión de una secuencia diana en una célula o tejido donde se expresa el ARN pequeño progresivo apropiado de forma endógena o como un transgén.

A. Dianas víricas

5 De acuerdo con la invención, se proporcionan procedimientos para conferir resistencia a múltiples virus a plantas de tomate. Los virus a los que puede estar dirigida la resistencia en la presente invención incluyen dos o más virus entre los geminivirus, tospovirus y potexvirus. La figura 1 ilustra la organización genómica de estos géneros víricos representativos.

1. Begomovirus

10 Las *Geminiviridae* son una familia diversa y grande de virus de plantas que infectan una amplia diversidad de plantas y causan pérdidas significativas de cultivos en todo el mundo. Se caracterizan por cápsidas icosaédricas dobles y genomas circulares de ADNmc que se replican a través de intermedios de ADNbc. Los geminivirus ("begomovirus" y "geminivirus" se usan de forma intercambiable en el presente documento) dependen de las ADN y ARN polimerasas nucleares de la planta para la replicación y la transcripción. Estos virus aportan únicamente unos pocos factores para su replicación y transcripción. La familia *Geminiviridae* contiene tres géneros principales (antiguamente llamados "subgrupos") que difieren con respecto al insecto vector, al rango de hospedador y a la estructura genómica.

Los *Geminiviridae* subgrupo I (género *Mastrevirus*) incluyen virus transmitidos por saltahojas que generalmente infectan plantas monocotiledóneas y tienen genomas de un único componente.

20 Los *Geminiviridae* subgrupo III (género *Begomovirus*) incluyen virus transmitidos por la mosca blanca que infectan plantas dicotiledóneas y muy habitualmente tienen genomas bipartitos.

Los virus *Geminiviridae* subgrupo II (género *Curtovirus*) se transmiten por saltahojas y tienen genomas de un único componente como el subgrupo I, pero infectan plantas dicotiledóneas como el subgrupo III.

2. Tospovirus

25 Los virus del género *Tospovirus* causan pérdidas de cultivos significativas en todo el mundo. El nombre del género deriva del virus del marchitamiento moteado del tomate ("TSWV"). La enfermedad del marchitamiento moteado del tomate se observó por primera vez en Australia en 1915 y posteriormente demostró ser de origen vírico. Hasta principios de la década de 1990 se consideraba que TSWV era el único miembro del grupo del marchitamiento moteado del tomate de virus de plantas. La identificación y caracterización de varios virus similares, incluyendo el virus del moteado necrótico de la *Impatiens* (INSV), el virus de la clorosis de *Capsicum* ("CaCV"), el virus de la necrosis de las yemas del cacahuete (también conocida como virus de la necrosis de las yemas del maní, "GBNV") y el virus del moteado necrótico del tomate dio lugar a la creación del género tospovirus que infecta plantas dentro de la familia *Bunyaviridae*. Esta familia incluye un gran grupo de virus de infección predominantemente de animales. Ya se han identificado y caracterizado más de 20 tospovirus y siguen describiéndose especies previamente desconocidas del género en una base regular.

35 Los tospovirus tienen un genoma de ARN tripartito de polaridad ambisentido. Las tres partes del genoma se llaman el segmento "L", el segmento "M" y el segmento "S". Se encuentra una secuencia terminal consenso de cada parte del genoma de ARN, definida por los segmentos UCUCGUUAGC (SEQ ID NO: 167) en el extremo 3' y AGAGCAAUCG (SEQ ID NO: 168) en el extremo 5'. El ARN más grande, el "segmento L", codifica la replicasa. El ARN de tamaño medio, "segmento M", codifica las glucoproteínas G1 y G2 en el ARN sentido complementario y una proteína no estructural, NSm, en el ARN sentido del genoma. El segmento más pequeño, "segmento S", codifica la proteína de la nucleocápsida (N) en el ARN sentido complementario y una de movimiento de una célula a otra, NSs, en el ARN sentido del genoma. El virus se transmite por arañuelas de los géneros *Frankliniella* (cinco especies) y *Thrips* (tres especies). La transmisión mecánica del virus también es posible. TSWV puede infectar a más de 925 especies de plantas que pertenecen a 70 familias botánicas, mientras que las otras especies de tospovirus tienen rangos de hospedador mucho más estrechos.

3. Potexvirus

50 El virus del mosaico del pepino (PepMV) es un potexvirus representativo entre los *Flexiviridae*, y es muy contagioso con un potencial significativo de causar daños en la producción protegida de tomates. Las pérdidas de cultivos significativas son posibles si no se toman acciones para eliminar la infección. El virus se propaga fácilmente mediante herramientas contaminadas, las manos de las personas o la ropa, y por contacto directo de una planta a otra. También puede transmitirse por injerto o cuando se recogen esquejes de plantas madre infectadas. El uso de resistencia mediada por la proteína de la cubierta puede proporcionar buena resistencia. Sin embargo, incluir repeticiones invertidas del CP puede potenciar la producción de una línea resistente.

B. Composiciones y construcciones de ácido nucleico

Se divulgan en el presente documento construcciones de ADN recombinante y procedimientos para su uso para conseguir resistencia a múltiples (es decir, más de una) especies de virus y cepas entre los begomovirus, tospovirus y potexvirus en plantas transgénicas. La resistencia puede conferirse a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más especies de virus seleccionados de al menos dos de los siguientes grupos: begomovirus, tospovirus y potexvirus. La resistencia puede estar dirigida por la producción de ARNip o miARN, y también puede complementarse por estrategias basadas en proteínas tales como resistencia mediada por la proteína de la cubierta o replicasa expresada, formas mutadas de las replicasas y producción de aptámeros. También puede utilizarse la tolerancia de base genética (es decir, identificada en una estrategia clásica de reproducción).

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere a un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5' hasta el 3'. El "ácido nucleico" también puede contener opcionalmente bases nucleotídicas que no son de origen natural o alteradas que permiten la lectura correcta por una polimerasa y no reducen la expresión de un polipéptido codificado por ese ácido nucleico. La expresión "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a las hebras tanto sentido como anti-sentido de un ácido nucleico como hebras simples individuales o en el dúplex. La expresión "ácido ribonucleico" (ARN) incluye ARNbc (ARN bicatenario), ARNip (ARN interferente pequeño), ARNhp (ARN de horquilla pequeña), ARNm (ARN mensajero), miARN (micro-ARN), ARNt (ARN transferente, ya esté cargado o descargado del aminoácido acilado correspondiente) y ARNc (ARN complementario) y la expresión "ácido desoxirribonucleico" (ADN) incluye ADNc y ADN genómico e híbridos de ADN-ARN. Las expresiones "segmento de ácido nucleico", "segmento de secuencia de nucleótidos" o más generalmente "segmentos" se entenderán por los expertos en la materia como una expresión funcional que incluye tanto secuencias genómicas, como secuencias de ARN ribosómico, secuencias de ARN transferente, secuencias de ARN mensajero, secuencias de operón y secuencias de nucleótidos modificadas por ingeniería más pequeñas que expresan o pueden adaptarse para expresar proteínas, polipéptidos o péptidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente homóloga" u "homología sustancial", con referencia a un secuencia de ácido nucleico, incluye una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con cualquiera de la SEQ ID NO: 169-455, o una parte o complemento de las mismas, así como aquellas que permiten que tenga lugar una alineación antiparalela entre las dos secuencias, y las dos secuencias entonces son capaces, en condiciones rigurosas, de formar enlaces de hidrógeno con las bases correspondientes en la hebra opuesta para formar una molécula dúplex que es suficientemente estable en condiciones de rigurosidad apropiada, incluyendo rigurosidad elevada, que es detectable usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Las secuencias sustancialmente homologas pueden tener de un 70 % a un 80 % de identidad de secuencia, o más preferentemente de un 80 % a un 85 % de identidad de secuencia, o mucho más preferentemente de un 90 % a un 95 % de identidad de secuencia, hasta un 99 % de identidad de secuencia, con las secuencias de nucleótidos de referencia expuestas en la lista de secuencias, o los complementos de las mismas.

Como se usa en el presente documento, el término "ortólogo" se refiere a un gen en dos o más especies que ha evolucionado desde una secuencia de nucleótidos ancestral común, y puede retener la misma función en las dos o más especies.

Como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia", "similitud de secuencia" u "homología" se usa para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos. El porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación tal como la longitud completa de una SEQ ID NO de referencia, en la que la parte de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en que aparece la base de ácido nucleico o resto aminoacídico idéntico en ambas secuencias para producir la cantidad de posiciones emparejadas, dividiendo la cantidad de posiciones emparejadas por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia se dice que es idéntica a la secuencia de referencia y viceversa. Una primera secuencia de nucleótidos, cuando se observa en la dirección 5' a 3', se dice que es un "complemento" de, o complementaria a, una segunda secuencia de nucleótidos o de referencia observada en la dirección 3' a 5' si la primera secuencia de nucleótidos muestra complementariedad completa con la segunda secuencia o de referencia. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas de secuencia de ácido nucleico muestran "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las secuencias leídas de 5' a 3' es complementario a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee de 3' a 5'. Una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de referencia mostrará una secuencia idéntica a la secuencia del complemento inverso de la secuencia de nucleótidos de referencia. Estos términos y descripciones están bien definidos en la técnica y se comprenden fácilmente por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente de 50 a 100, más habitualmente de 100 a 150, en que se compara

una secuencia con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de alinear de forma óptima las dos secuencias. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de un 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. Los expertos en la materia deben remitirse a los procedimientos detallados usados para la alineación de secuencias, tales como en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wis., EE. UU.).

Se divulgan en el presente documento secuencias de ADN capaces de expresarse como un transcrito de ARN en una célula o microorganismo para inhibir la expresión de un gen diana de al menos un virus de plantas. Las secuencias comprenden una molécula de ADN que codifica una o más secuencias de nucleótidos diferentes, en las que cada una de las secuencias de nucleótidos diferentes comprenden una secuencia de nucleótidos sentido y una secuencia de nucleótidos anti-sentido. Las secuencias pueden estar conectadas por una secuencia espaciadora. La secuencia espaciadora puede constituir parte de la secuencia de nucleótidos sentido o la secuencia de nucleótidos anti-sentido o una secuencia de nucleótidos no relacionada y se forma dentro de la molécula de ARNbc entre las secuencias sentido y anti-sentido. La secuencia espaciadora puede comprender, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de al menos 10-100 nucleótidos de longitud, o como alternativa de al menos 100-200 nucleótidos de longitud, al menos 200-400 nucleótidos de longitud o al menos 400-500 nucleótidos de longitud. La secuencia de nucleótidos sentido o la secuencia de nucleótidos anti-sentido puede ser sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen diana o un derivado del mismo o una secuencia complementaria al mismo. La molécula de ADNbc puede situarse funcionalmente bajo el control de una o más secuencias promotoras que funcionan en la célula, tejido u órgano del hospedador que expresa el ADNbc para producir moléculas de ARN. Como se usa en el presente documento, "expresar" o "expresión" se refiere a la transcripción de una molécula de ARN a partir de un polinucleótido transcrito. La molécula de ARN puede traducirse o no en una secuencia polipeptídica.

En el presente documento se divulga también una secuencia de ADN para su expresión en una célula de una planta que, tras la expresión del ADN en ARN y el contacto con un virus de plantas consigue la supresión de un gen vírico diana o la replicación vírica o sintomatología (es decir, expresión de síntomas). Los procedimientos para expresar una molécula de supresión génica en plantas son conocidos (por ejemplo, publicación de Estados Unidos 2006/0200878 A1; publicación de Estados Unidos 2006/0174380; publicación de Estados Unidos 2008/0066206; Niu y col., 2006), y pueden usarse para expresar una secuencia de nucleótidos.

Los promotores no constitutivos adecuados para su uso con construcciones de ADN recombinante incluyen promotores específicos de forma espacial, promotores específicos respecto al desarrollo y promotores inducibles. Los promotores específicos respecto al espacio pueden incluir promotores específicos de orgánulo, célula, tejido u órgano (por ejemplo, un promotor específico de plastidios, específico de raíces, específico de polen o específico de semillas para suprimir la expresión del primer ARN diana en plastidios, raíces, polen o semillas, respectivamente). En muchos casos, se usa especialmente un promotor específico de semillas, específico de embriones, específico de aleurona o específico de endosperma. Los promotores específicos respecto al desarrollo pueden incluir promotores que tienden a promover la expresión durante ciertas fases del desarrollo en el ciclo de crecimiento de una planta, o en diferentes estaciones en un año. Los promotores inducibles incluyen promotores inducidos por agentes químicos o por condiciones ambientales tales como sobrecarga biótica o abiótica (por ejemplo, escasez de agua o sequía, calor, frío, altos o bajos niveles de nutrientes o sales, altos o bajos niveles de luz, o infección por plagas o patógenos). También son de interés los promotores de micro-ARN, especialmente aquellos que tienen un patrón de expresión específico respecto al desarrollo, específico en el espacio o inducible. Un promotor específico de la expresión también puede incluir promotores que generalmente se expresan de forma constitutiva, pero en diferentes grados o "fuerza" de expresión, incluyendo promotores habitualmente considerados como "promotores fuertes" o como "promotores débiles".

Por tanto, una secuencia génica o fragmento para el control de virus de plantas puede clonarse en dirección 3' de un promotor o promotores que son funcionales en una célula de planta transgénica y en la que se expresa para producir ARNm en la célula de la planta transgénica que forma moléculas de ARNbc. Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de promotores expresables en plantas (por ejemplo, CaMV 35S; FMV 35S; PCISV (por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.850.019); ScBV; AtAct7). Los promotores útiles para la expresión de polipéptidos en plantas incluyen aquellos que son inducibles, víricos, sintéticos o constitutivos como se describe en Odell y col. (1985), y/o promotores que están regulados de forma temporal, regulados de forma espacial o regulados de forma espacio-temporal. Se han identificado varios promotores específicos de órgano y son conocidos en la técnica (por ejemplo, patentes de Estados Unidos 5.110.732; 5.837.848; 5.459.252; 6.229.067; Hirel y col. 1992). Las moléculas de ARNbc contenidas en tejidos vegetales se expresan en una planta de modo que se consigue la supresión pretendida de la expresión génica del virus diana. El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor fuerte arquetípico común en aplicaciones de plantas transgénicas, o un promotor relacionado tal como el promotor E35S o FMV, puede emplearse para dirigir genes de resistencia a virus. También se han identificado promotores que dirigen la expresión génica específica de tejido.

Una unidad de transcripción transgénica incluye una secuencia de ADN que codifica un gen de interés. Un gen de interés puede incluir cualquier secuencia codificante o no codificante de una especie de virus. Los ejemplos de una secuencia no codificante a expresar por una unidad de transcripción transgénica incluyen regiones no traducidas 5', promotores, potenciadores u otras regiones transcripcionales no codificantes, regiones no traducidas 3',

terminadores, intrones, micro-ARN, secuencias de ADN precursoras de micro-ARN, ARN interferentes pequeños, componentes de ARN de ribosomas o ribozimas, ARN nucleolares pequeños, aptámeros de ARN capaces de unirse a un ligando y otros ARN no codificantes.

5 Los ejemplos de un gen de interés incluyen además una secuencia traducible (codificante), tal como genes que
 10 codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o catabolismo de
 moléculas de interés (tales como aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros carbohidratos,
 polímeros biológicos y metabolitos secundarios incluyendo alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no
 15 ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto. Un gen de interés puede ser un gen nativo para
 la célula (por ejemplo, una célula vegetal) en que tiene que transcribirse la construcción de ADN recombinante de la
 invención, o puede ser un gen no nativo. Un gen de interés puede ser un gen marcador, por ejemplo, un gen
 marcador de selección que codifica resistencia a antibióticos, a antifúngicos o a herbicidas, o un gen marcador que
 codifica un rasgo fácilmente detectable (por ejemplo, en una célula vegetal, la fitoeno sintasa u otros genes que
 confieren un pigmento particular a la planta) o un gen que codifica una molécula detectable, tal como una proteína
 fluorescente, luciferasa o un polipéptido único o "marca" de ácido nucleico detectable por procedimientos de
 20 detección de proteínas o ácidos nucleicos, respectivamente). Los marcadores de selección son genes de interés de
 utilidad particular en la identificación del procesamiento satisfactorio de construcciones descrita en el presente
 documento.

20 Los genes de interés incluyen aquellos genes que pueden describirse como "genes diana". El gen diana puede
 incluir un único gen o parte de un único gen que se aborda para su supresión, o puede incluir, por ejemplo, múltiples
 segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de
 un gen diana o múltiples genes diana de una o más especies. El gen diana puede ser una secuencia traducible
 (codificante), o puede ser una secuencia no codificante (tal como una secuencia reguladora no codificante), o
 25 ambas. La unidad de transcripción transgénica puede incluir además una secuencia 5' o 3' o ambas según lo
 necesario para la transcripción del transgén. Cuando es deseable, por ejemplo, suprimir un gen diana en múltiples
 cepas o especies, por ejemplo, de virus, puede ser deseable diseñar la construcción de ADN recombinante para que
 se procese en un miARN maduro para suprimir una secuencia génica diana común a las múltiples cepas o especies
 en que tiene que silenciarse el gen diana. Por tanto, el miARN procesado de la construcción de ADN recombinante
 puede diseñarse para que sea específico para un taxón (por ejemplo, específico para un género, familia, pero no
 para otros taxones).

30 Las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de las moléculas de ácido nucleico u otras moléculas de ácido
 nucleico en la lista de secuencias son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en
 ciertas circunstancias. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son
 capaces de hibridar específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido
 nucleico antiparalela, bicatenaria. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el complemento de otra molécula
 35 de ácido nucleico si muestra complementariedad completa. Se dice que dos moléculas son "mínimamente
 complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer hibridadas entre
 sí en al menos condiciones convencionales "de baja rigurosidad". Se dice que las moléculas son complementarias si
 pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer hibridadas entre sí en condiciones
 convencionales "de alta rigurosidad". Las condiciones convencionales de rigurosidad se describen por Sambrook, y
 40 col. (1989), y por Haymes y col. (1985).

Por lo tanto, se permiten distanciamientos de la complementariedad completa, siempre que dichos distanciamientos
 no imposibiliten completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura bicatenaria. Por tanto, para
 que una molécula de ácido nucleico o un fragmento de la molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda,
 únicamente tiene que ser suficientemente complementaria en la secuencia para ser capaz de formar una estructura
 45 bicatenaria estable en las concentraciones particulares de disolvente y sal empleadas.

Las condiciones apropiadas de rigurosidad que promueven la hibridación del ADN son, por ejemplo, para
 aplicaciones que requieren alta selectividad, una condición de relativamente baja salinidad y/o alta temperatura, tal
 como se proporciona por NaCl de 0,02 M a 0,15 M a temperaturas de 50 °C a 70 °C. Una condición de alta
 50 rigurosidad, por ejemplo, es lavar el filtro de hibridación al menos dos veces con tampón de lavado de alta
 rigurosidad (SSC 0,2 x o SSC 1 x, SDS al 0,1 %, a 65 °C). Otras condiciones, tales como cloruro de sodio/citrato de
 sodio (SSC) 6,0 x a 45 °C, seguido por un lavado de SSC 2,0 x a 50 °C, también son conocidas por los expertos en
 la materia o pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology (1989). Por ejemplo, la concentración
 salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad a aproximadamente SSC 2,0 x a 50 °C
 hasta una alta rigurosidad de SSC 0,2 x a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse
 55 de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, a 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a 65 °C.
 Tanto la temperatura como la salinidad pueden variarse, o la temperatura o la concentración salina pueden
 mantenerse constantes mientras que la otra variable se cambia. Un ácido nucleico para su uso en la presente
 invención puede hibridar específicamente con una o más moléculas de ácido nucleico de un virus de plantas
 seleccionado de un tospovirus, un begomovirus y un potexvirus o complementos de las mismas en dichas
 60 condiciones. Específicamente, un ácido nucleico para su uso en la presente invención puede mostrar al menos de
 un 80 %, o al menos de un 90 %, o al menos de un 95 %, o al menos de un 98 % o incluso un 100 % de identidad de
 secuencia con una o más moléculas de ácido nucleico expuestas en la lista de secuencias, o un complemento de las

mismas.

Los ácidos nucleicos también pueden sintetizarse, completamente o en parte, especialmente cuando es deseable proporcionar secuencias preferidas de plantas, por procedimientos conocidos en la técnica. Por tanto, la totalidad o una parte de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden sintetizarse usando codones preferidos por un hospedador seleccionado. Los codones preferidos de especie pueden determinarse, por ejemplo, a partir de los codones usados más frecuentemente en las proteínas expresadas en una especie hospedadora particular. Otras modificaciones de las secuencias de nucleótidos pueden provocar mutantes que tienen actividad ligeramente alterada.

Las secuencias de nucleótidos de ARNbc o ARNip comprenden hebras dobles de ribonucleótidos polimerizados y pueden incluir modificaciones a la estructura de fosfato-azúcar o el nucleósido. Las modificaciones en la estructura de ARN pueden adaptarse para permitir la inhibición genética específica. Las moléculas de ARNbc pueden modificarse a través de un procedimiento enzimático de modo que puedan generarse moléculas de ARNip. Como alternativa, pueden modificarse por ingeniería una construcción para expresar un segmento de nucleótidos para su uso en una estrategia de resistencia mediada por miARN o ARNip. El ARNip puede mediar de forma eficaz el efecto de regulación negativa para algunos genes diana en algunos patógenos. Este procedimiento enzimático puede conseguirse utilizando una enzima RNasa III o una enzima DICER, presente en las células de un insecto, un animal vertebrado, un hongo o una planta en la ruta de iARN eucariota (Elbashir y col., 2001; Hamilton y Baulcombe, 1999). Este procedimiento también puede utilizar una DICER o RNasa III recombinante introducida en las células de un insecto diana a través de técnicas de ADN recombinante que son muy conocidas para los expertos en la materia. Tanto la enzima DICER como la RNasa III, que se producen de forma natural en un patógeno o se preparan a través de técnicas de ADN recombinante, escinden hebras más grandes de ARNbc en oligonucleótidos más pequeños. Las enzimas DICER cortan específicamente las moléculas de ARNbc en trozos de ARNip cada uno de los cuales es de 19-25 nucleótidos de longitud mientras que las enzimas RNasa III normalmente escinden las moléculas de ARNbc en ARNip de 12-15 pares de bases. Las moléculas de ARNip producidas por cualquiera de las enzimas tienen salientes 3' de 2 a 3 nucleótidos, y extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las moléculas de ARNip generadas por la enzima RNasa III son igual que las producidas por las enzimas DICER en la ruta de iARN eucariota y, por tanto, después se abordan y degradan por el mecanismo de degradación de ARN celular inherente después de desarrollarse posteriormente, separarse en ARN monocatenario e hibridar con las secuencias de ARN transcritas por el gen diana. Este procedimiento provoca la degradación eficaz o eliminación de la secuencia de ARN codificada por la secuencia de nucleótidos del gen diana en el patógeno. El resultado es el silenciamiento de una secuencia de nucleótidos diana particular dentro del patógeno. Pueden encontrarse descripciones detalladas de los procedimientos enzimáticos en Hannon (2002).

La secuencia de nucleótidos puede grabarse en un medio legible por ordenador. Como se usa en el presente documento, "medio legible por ordenador" se refiere a cualquier medio tangible de expresión que pueda leer y al que pueda accederse directamente por un ordenador. Dichos medios incluyen: medio de almacenamiento magnético, tal como discos flexibles, disco duro, medio de almacenamiento y cinta magnética; medio de almacenamiento óptico tal como CD-ROM; medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM, archivos de ordenador con formato de reconocimiento de caracteres ópticos e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos. Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que puede usarse cualquiera de los medios legibles por ordenador actualmente conocidos para crear un producto fabricado que comprenda un medio legible por ordenador que tenga grabado en el mismo una secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "grabado" se refiere a un procedimiento de almacenar información en un medio legible por ordenador. El experto en la materia puede adoptar fácilmente cualquiera de los procedimientos actualmente conocidos para grabar información en medio legible por ordenador para generar un medio que comprenda la información de secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento. Está disponible una diversidad de estructuras de almacenamiento de datos para los expertos en la materia para crear un medio legible por ordenador que tenga grabada en el mismo una secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento. La elección de la estructura de almacenamiento de datos generalmente se basará en el medio elegido para acceder a la información almacenada. Además, puede usarse una diversidad de programas de procesamiento de datos y formatos para almacenar la información de secuencia de nucleótidos en un medio legible por ordenador. La información de secuencia puede representarse en un archivo de texto de procesamiento de textos, con formato en software disponible en el mercado tal como WordPerfect y Microsoft Word, o representado en forma de un archivo de texto ASCII, almacenado en una aplicación de base de datos, tal como DB2, Sybase u Oracle. Los expertos en la materia pueden adaptar fácilmente cualquiera de varios formatos de estructuración de procesamiento de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) para obtener un medio legible por ordenador que tenga grabado en el mismo la información de secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento.

El software informático está disponible al público, lo que permite a un experto en la materia acceder a la información de secuencia proporcionada en un medio legible por ordenador. El software que implementa los algoritmos de búsqueda BLAST (Altschul y col., 1990) y BLAZE (Brutlag, y col., 1993) en un sistema Sybase puede usarse para identificar fases de lectura abierta (ORF) dentro de secuencias tales como Unigenes y EST que se describen en el presente documento y que contienen homología a las ORF o proteínas de otros organismos. Dichas ORF son fragmentos codificantes de proteína dentro de las secuencias descritas en el presente documento y son útiles en la

producción de proteínas comercialmente importantes tales como enzimas usadas en la biosíntesis de aminoácidos, metabolismo, transcripción, traducción, procesamiento de ARN, degradación de ácido nucleico y proteínas, modificación de proteínas y replicación de ADN, restricción, modificación, recombinación y reparación.

5 Como se usa en el presente documento, una "diana", un "motivo estructural diana" o un "motivo diana" se refiere a cualquier secuencia seleccionada de forma racional o combinación de secuencias en que la secuencia o secuencias se eligen basándose en una configuración tridimensional que se forma tras el plegamiento del motivo diana o la secuencia de nucleótidos del mismo, según lo apropiado. Hay una diversidad de motivos diana conocidos en la técnica.

C. Expresión de ácido nucleico y supresión del gen diana

10 La presente invención proporciona, como un ejemplo, una planta de tomate hospedadora transformada de un organismo diana patógeno, células de la planta de tomate transformadas y plantas de tomate transformadas y su descendencia. Las células de la planta de tomate transformadas y las plantas transformadas pueden modificarse por ingeniería para expresar una o más de las secuencias de ARNbc, miARN o ARNm, bajo el control de un promotor heterólogo, descrito en el presente documento para proporcionar un efecto protector contra patógenos. Estas secuencias pueden usarse para la supresión génica en un patógeno, reduciendo de ese modo el nivel de incidencia de la enfermedad causada por el patógeno en un organismo hospedador transformado por tejido. Como se usa en el presente documento, la expresión "supresión génica" pretende hacer referencia a cualquiera de los procedimientos bien conocidos para reducir los niveles de proteína producidos como resultado de la transcripción génica en ARNm y la posterior traducción del ARNm.

20 La supresión génica también pretende indicar la reducción de la expresión proteica desde un gen o una secuencia codificante incluyendo la supresión génica post-transcripcional y la supresión transcripcional. La supresión génica post-transcripcional está mediada por la homología entre la totalidad o una parte del ARNm transcrito desde un gen o secuencia codificante abordada para la supresión y el ARN bicatenario correspondiente para la supresión, y se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para unirse por los ribosomas o la prevención de la traducción por los ribosomas. El ARN transcrito puede estar en la orientación sentido para lograr lo que se llama cosupresión, en la orientación anti-sentido para lograr lo que se llama supresión anti-sentido o en ambas orientaciones produciendo un ARNbc que logra lo que se llama interferencia de ARN (iARN).

30 La supresión génica también puede ser eficaz contra genes diana en un virus de plantas que puede entrar en contacto con material vegetal que contiene agentes de supresión génica, específicamente diseñados para inhibir o suprimir la expresión de una o más secuencias homologas o complementarias del virus. La supresión génica post-transcripcional por ARN orientado anti-sentido o sentido para regular la expresión génica en células de plantas se divulga en las patentes de Estados Unidos 5.107.065, 5.759.829, 5.283.184 y 5.231.020. El uso de ARNbc para suprimir genes en plantas se divulga en los documentos WO 99/53050, WO 99/49029, en la publicación de Estados Unidos 2003/017596, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0029283.

40 Un procedimiento beneficioso de la supresión génica post-transcripcional frente a un virus de plantas emplea ARN transcrito tanto orientado sentido como orientado anti-sentido, que se estabiliza, por ejemplo, como una horquilla o una estructura de tallo y bucle (por ejemplo, publicación de Estados Unidos 2007/0259785). Una construcción de ADN para lograr la supresión génica post-transcripcional puede ser una en que un primer segmento codifica un ARN que muestra una orientación anti-sentido que muestra identidad sustancial con un segmento de un gen abordado para supresión, que está unido a un segundo segmento que codifica un ARN que muestra complementariedad sustancial con el primer segmento. Dicha construcción forma una estructura de tallo y de bucle por hibridación del primer segmento con el segundo segmento y una estructura de bucle de las secuencias de nucleótidos que unen los dos segmentos (véanse los documentos WO94/01550, WO98/05770, US 2002/0048814 y US 2003/0018993). También puede expresarse la coexpresión con un segmento génico diana adicional, como se indica anteriormente (por ejemplo, WO05/019408).

50 Por consiguiente, se divulga una secuencia de nucleótidos exógena (es decir, no encontrada de forma natural en el genoma de la célula vegetal hospedadora), para la que su expresión provoca la transcripción de una secuencia de ARN que es sustancialmente similar en secuencia a una molécula de ARN de un gen diana de un virus de plantas, seleccionado de un tospovirus, un begomovirus y un potexvirus, que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma del virus. Por sustancialmente similar se entiende que la secuencia de ARN exógena es capaz de lograr la supresión génica mediada por ARN de una secuencia diana en un genoma vírico. Por tanto, se logra una regulación negativa de la expresión de la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen diana.

55 Puede utilizarse la expresión de un fragmento de al menos 21 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 169-455, o complementos de las mismas, incluyendo la expresión de un fragmento de hasta 21, 36, 60, 100, 550 o 1000 nucleótidos contiguos, o secuencias que presentan un 90-100 % de identidad con dichas secuencias, o sus complementos. Un nucleótido puede comprender una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141. Un

nucleótido también puede comprender una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 379-455. Un nucleótido puede describirse además comprendiendo uno o más de los nucleótidos 1-21, 22-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 601-650, 651-700, 701-750, 751-800, 801-850, 851-900, 901-950, 951-1000, 1001-1050, 1051-1100, 1101-1150, 1151-1200, 1201-1250, 1251-1300, 1301-1350, 1351-1400, 1401-1450, 1451-1500, 1501-1550, 1551-1600, 1601-1650, 1651-1700, 1701-1750, 1751-1800, 1801-1850, 1851-1900, 1901-1950, 1951-2000, 2001-2050, 2051-2100, 23-75, 76-125, 126-175, 176-225, 226-275, 276-325, 326-375, 376-425, 426-475, 476-525, 526-575, 576-625, 626-675, 676-725, 726-775, 776-825, 826-875, 876-925, 926-975, 976-1025, 1026-1075, 1076-1125, 1126-1175, 1176-1225, 1226-1275, 1276-1325, 1326-1375, 1376-1425, 1426-1475, 1476-1525, 1526-1575, 1576-1625, 1626-1675, 1676-1725, 1726-1775, 1776-1825, 1826-1875, 1876-1925, 1926-1975, 1976-2025, 2026-2075, 2076-2125, 1-550, 200-750, 300-850, 400-950, 500-1050, 600-1150, 700-1250, 800-1350, 900-1450, 1000-1550, 1100-1650, 1200-1750, 1300-1850, 1400-1950, 1500-2050, hasta la longitud completa de la secuencia, de una o más de cualquiera de las SEQ ID NO: 169-455. Se contempla una secuencia complementaria a la totalidad o a una parte de una cualquiera de las SEQ ID NO: 169-455 o SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141, en la que la expresión de dicha secuencia suprime la expresión de uno cualquiera o más de los genes codificados por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 169-455. Las secuencias dispuestas para su expresión para producir ARNbc pueden combinarse con: (1) secuencias diseñadas para la producción de miARN, incluyendo en casetes de miARN apilados; y/o (2) secuencias para la inhibición del ensamblaje del virus, para inhibir de forma sinérgica los virus diana. Los procedimientos para seleccionar subsecuencias específicas como dianas para la supresión génica mediada por miARN o por ARNip son conocidos en la técnica (por ejemplo, Reynolds y col., 2004).

La inhibición de un gen diana usando tecnología de ARNbc es específica de secuencia porque las secuencias de nucleótidos correspondientes a la región dúplex del ARN se abordan para su supresión. Habitualmente se prefiere para la inhibición el ARN que contiene una secuencia de nucleótidos idéntica a una parte del transcrito del gen diana. También se ha descubierto que las secuencias de ARN con inserciones, eliminaciones y mutaciones puntuales individuales respecto a la secuencia diana son eficaces para la inhibición. En la realización de la presente invención, el ARNbc inhibidor y la parte del gen diana pueden compartir al menos un 80 % de identidad de secuencia, o de un 90 % de identidad de secuencia, o de un 95 % de identidad de secuencia, o de un 99 % de identidad de secuencia, o incluso de un 100 % de identidad de secuencia. Como alternativa, la región dúplex del ARN puede definirse funcionalmente como una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar con una parte del transcrito del gen diana. Una secuencia de longitud menor que la totalidad que muestra una homología mayor compensa una secuencia menos homóloga más larga. La longitud de las secuencias de nucleótidos idénticas puede ser de al menos 18, 21, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o al menos 1000 bases. Normalmente, debe usarse una secuencia de más de 20-100 nucleótidos, aunque puede preferirse una secuencia de más de 200-300 nucleótidos, y puede preferirse especialmente una secuencia de más de 500-1000 nucleótidos dependiendo del tamaño del gen diana. Pueden tolerarse variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepas o divergencia evolutiva. La molécula de ácido nucleico introducida no tiene que ser absolutamente homóloga a la secuencia diana, y no tiene que ser de longitud completa respecto al producto de transcripción primario o el ARNm completamente procesado del gen diana. Por lo tanto, los expertos en la materia tienen que lograr que, como se divulga en el presente documento, no se requiera un 100 % de identidad de secuencia entre el ARN y el gen diana para poner en práctica la presente invención.

La inhibición de la expresión del gen diana puede cuantificarse midiendo el ARN diana endógeno con la proteína producida por la traducción del ARN diana y las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse por examen de las propiedades superficiales de la célula u organismo. Las técnicas para cuantificar el ARN y las proteínas son bien conocidas para los expertos en la materia.

La expresión génica puede inhibirse en al menos un 10 %, en al menos un 33 %, en al menos un 50 % o en al menos un 80 %. En particular, la expresión génica puede inhibirse en al menos un 80 %, en al menos un 90 %, en al menos un 95 % o en al menos un 99 % dentro de las células hospedadoras infectadas por el virus, de modo que tenga lugar una inhibición significativa. La inhibición significativa pretende hacer referencia a una inhibición suficiente que provoque un fenotipo detectable (por ejemplo, reducción de la expresión de síntomas) o una disminución detectable en el ARN y/o en la proteína correspondiente al gen diana que se está inhibiendo.

Las moléculas de ARNbc pueden sintetizarse *in vivo* o *in vitro*. El ARNbc puede formarse por una única hebra de ARN auto-complementaria o a partir de dos hebras de ARN complementarias. La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción *in vivo*, o puede usarse la ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición puede abordarse por transcripción específica en un órgano, tejido o tipo celular; la estimulación de una condición ambiental (por ejemplo, infección, sobrecarga, temperatura, inductores químicos); y/o modificación por ingeniería de la transcripción en una fase o edad del desarrollo. Las hebras de ARN pueden estar poliadeniladas o no; las hebras de ARN pueden ser capaces o no de traducirse en un polipéptido por un aparato de traducción de la célula.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de control de enfermedades" o "agente de supresión génica" puede hacer referencia a una molécula de ARN particular que consiste en un primer segmento de ARN y un segundo segmento de ARN unidos por un tercer segmento de ARN. El primer y el segundo segmento de ARN recaen dentro de la longitud de la molécula de ARN y son repeticiones sustancialmente invertidas entre sí y están

unidos juntos por el tercer segmento de ARN. La complementariedad entre el primer y el segundo segmento de ARN provoca la capacidad de que los dos segmentos hibriden *in vivo* e *in vitro* para formar una molécula bicatenaria, es decir, un tallo, unido en un extremo de cada uno del primer y segundo segmento por el tercer segmento que forma un bucle, de modo que la estructura completa forma una estructura de tallo y bucle, o incluso estructuras de hibridación más estrecha pueden formarse en una estructura anudada de tallo-bucle. El primer y el segundo segmento corresponden invariablemente, pero no necesariamente, respectivamente, a una secuencia sentido y una anti-sentido homóloga con respecto al ARN diana transcrito a partir del gen diana en el virus diana que se pretende suprimir por la molécula de ARNbc.

Como se usa en el presente documento, el término "genoma" según se aplica a un virus de plantas o a un hospedador abarca no solamente ADN o ARN vírico, o ADN cromosómico encontrado dentro del núcleo, sino ADN de orgánulos encontrado de componentes subcelulares de la célula. El ADN de la presente invención introducido en células vegetales, por lo tanto, puede estar integrado de forma cromosómica o localizado en orgánulos. El término "genoma" según se aplica a bacterias, abarca tanto el cromosoma como los plásmidos dentro de una célula hospedadora bacteriana. El ADN que se introduce en células hospedadoras bacterianas, por lo tanto, puede integrarse cromosómicamente o localizarse en plásmidos.

Se prevé que las composiciones divulgadas en el presente documento puedan incorporarse dentro de las semillas de una especie de planta como un producto de expresión a partir de un gen recombinante incorporado en el genoma de las células vegetales. La célula vegetal que contiene un gen recombinante se considera en el presente documento un evento transgénico.

D. Vectores recombinantes y transformación de células hospedadoras

Un vector de ADN recombinante puede ser, por ejemplo, un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vector puede ser un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total a introducir en el genoma del hospedador bacteriano. Además, un vector bacteriano puede ser un vector de expresión. Las moléculas de ácido nucleico expuestas en la lista de secuencias, o complementos o fragmentos de las mismas, pueden insertarse adecuadamente, por ejemplo, en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más hospedadores microbianos para dirigir la expresión de una secuencia codificante unida u otra secuencia de ADN. Muchos vectores están disponibles para este fin, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico a insertar en el vector y de la célula hospedadora particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de su función (amplificación de ADN o expresión de ADN) y la célula hospedadora particular con la que es compatible. Los componentes del vector para transformación bacteriana generalmente incluyen uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores de selección y un promotor inducible que permite la expresión de ADN exógeno.

Los vectores de expresión y de clonación generalmente contienen un gen de selección, también mencionado como marcador de selección. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células hospedadoras transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos. Esas células que se transforman satisfactoriamente como una proteína heteróloga o un fragmento de la misma producen proteína que confiere resistencia a fármacos y, por tanto, sobreviven al régimen de selección.

Un vector de expresión para producir un ARNm también puede contener un promotor inducible que se reconoce por un organismo hospedador y está unido de forma funcional al ácido nucleico. La expresión "unido de forma funcional", como se usa en referencia a una secuencia reguladora y a una secuencia de nucleótidos estructural, significa que la secuencia reguladora causa la expresión regulada de la secuencia de nucleótidos estructural unida. "Secuencias reguladoras" o "elementos de control" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas en dirección 5' (secuencias no codificantes 5') dentro o en dirección 3' (secuencias no traducidas 3') de una secuencia de nucleótidos estructural, y que influye en la cronología y nivel o la cantidad de la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia de nucleótidos estructural asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, potenciadores, estructuras de tallo-bucle, secuencias de unión al represor y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas convencionales de ADN recombinante. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN se escinden, adaptan y vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Los ejemplos de vectores de expresión bacterianos disponibles incluyen los vectores de clonación y de expresión multifuncionales de *E. coli* tales como Bluescript™ (Stratagene, La Jolla, CA), en que, por ejemplo, un ácido nucleico, o un fragmento del mismo puede ligarse en el vector en fase con secuencias para la Met aminoterminal y los 7 restos posteriores de β-galactosidasa para producir una proteína híbrida, y vectores pIN (Van Heeke y Schuster, 1989).

El procedimiento de la presente invención implica la transformación de al menos dos secuencias de ácido nucleico

que proporcionan de forma colectiva resistencia a al menos dos especies de virus de plantas de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae* en una planta para conseguir resistencia a virus. Puede prepararse fácilmente un vector de transformación usando procedimientos disponibles en la técnica. El vector de transformación comprende una o más secuencias de nucleótidos que son capaces de transcribirse en una molécula de ARN y que son sustancialmente homólogas y/o complementarias a una o más secuencias de nucleótidos codificadas por el genoma del virus o de los virus diana, de modo que tras el contacto del ARN transcrito a partir de la una o más secuencias de nucleótidos por el virus parasitario de la planta diana, existe una regulación negativa de la expresión de al menos una de las secuencias de nucleótidos respectivas del genoma del virus.

El vector de transformación puede denominarse construcción de ADNbc y también puede definirse como una molécula recombinante, un agente de control de enfermedades, una molécula genética o una construcción genética quimérica. Una construcción genética quimérica puede comprender, por ejemplo, secuencias de nucleótidos que codifican uno o más transcritos anti-sentido, uno o más transcritos sentido, uno o más de cada uno de los mencionados anteriormente, en el que todo o parte de un transcrito del mismo es homólogo a todo o a parte de una molécula de ARN que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma de un virus de plantas.

Un vector de transformación de plantas puede comprender una molécula de ADN aislada y purificada que comprende un promotor heterólogo unido de forma funcional a una o más secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento. La secuencia de nucleótidos incluye un segmento que codifica todo o parte de un ARN presente dentro de un transcrito de ARN diana y puede comprender repeticiones invertidas de todo o parte de un ARN diana. La molécula de ADN que comprende el vector de expresión también puede contener una secuencia intrónica funcional situada dirección 5' de la secuencia codificante o incluso dentro de la secuencia codificante, y también puede contener una secuencia líder no traducida cinco prima (5') (es decir, una UTR o 5'-UTR) situada entre el promotor y el punto de inicio de la traducción.

Un vector de transformación de plantas puede contener secuencias para más de un gen, permitiendo, por tanto, la producción de más de un ARNbc, miARN o ARNip para inhibir la expresión de genes del más de un virus diana. Por ejemplo, un vector o construcción puede comprender hasta 8 o 10, o más, segmentos de ácido nucleico para la transcripción de secuencias antivíricas, como se muestra en la figura 10. Un experto en la materia apreciará fácilmente que los segmentos de ADN cuya secuencia corresponde a la presente en diferentes genes pueden combinarse en un único fragmento de ADN compuesto para su expresión en una planta transgénica. Como alternativa, puede modificarse un plásmido que ya contiene al menos un segmento de ADN por la inserción de secuencias de segmentos de ADN adicionales entre el potenciador y el promotor y las secuencias terminadoras. En el agente de control de enfermedades diseñado para la inhibición de múltiples genes, los genes a inhibir pueden obtenerse de la misma cepa o especie de virus de plantas para potenciar la eficacia del agente de control. Los genes pueden obtenerse de diferentes virus de plantas para ampliar el rango de virus contra los que es eficaz el agente o agentes. Cuando se abordan múltiples genes para su supresión o una combinación de expresión y supresión, puede fabricarse un elemento de ADN policistrónico como se ilustra y se divulga en la publicación de Estados Unidos 2004/0029283.

Un vector o construcción de ADN recombinante puede comprender un marcado de selección que confiere un fenotipo de selección en células vegetales. Los marcadores de selección también pueden usarse para seleccionar plantas o células vegetales que contienen los ácidos nucleicos exógenos que codifican polipéptidos o proteínas divulgados en el presente documento. El marcador puede codificar resistencia a biocidas, resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina) o resistencia a herbicidas (por ejemplo, glifosato). Los ejemplos de marcadores de selección incluyen un gen neo que codifica resistencia a kanamicina y puede seleccionarse usando kanamicina o G418, un gen bar que codifica resistencia a bialafos; un gen mutante de EPSP sintasa que codifica resistencia a glifosato; un gen de nitrilasa que confiere resistencia a bromoxinilo; un gen mutante de acetolactato sintasa (ALS) que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea; y un gen DHFR resistente a metotrexato. Hay múltiples marcadores de selección disponibles que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomicina, rifampicina y tetraciclina. Los ejemplos de dichos marcadores de selección se ilustran en las patentes de Estados Unidos 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 y 6.118.047.

Un vector o construcción recombinante también puede incluir un marcador seleccionable. Los marcadores seleccionables pueden usarse para controlar la expresión. Los marcadores seleccionables ejemplares incluyen el gen de la β -glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (Jefferson y col., 1987); uno o más de los diversos genes de proteínas fluorescentes (FP) tales como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP) o una cualquiera de una gran familia de proteínas que típicamente emiten fluorescencia a una longitud de onda característica; un gen de locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta y col., 1988); un gen de β -lactamasa (Sutcliffe y col., 1978), un gen que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen de luciferasa (Ow y col., 1986); un gen *xylE* (Zukowski y col., 1983) que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen de α -amilasa (Ikata y col., 1990); un gen de tirosinasa (Katz y col., 1983) que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina en DOPA y dopaquinona que, a su vez, se condensa en melanina;

una α -galactosidasa, que cataliza un sustrato cromogénico de α -galactosa.

Los vectores de transformación de plantas para su uso con la presente invención pueden incluir, por ejemplo, los derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, patentes de Estados Unidos 4.536.475, 4.693.977, 4.886.937, 5.501.967 y el documento EP 0 122 791). También son útiles los plásmidos de *Agrobacterium rhizogenes* (o "Ri") y son conocidos en la técnica. Otros vectores de transformación de plantas preferidos incluyen los divulgados, por ejemplo, por Herrera-Estrella (1983); Bevan (1983), Klee (1985) y el documento EP 0 120 516.

Un ADN recombinante funcional puede introducirse en una ubicación no específica en un genoma de una planta. En casos especiales, puede ser útil insertar una construcción de ADN recombinante por integración específica de sitio. Existen varios sistemas de recombinación específica de sitio que se sabe que funcionan en plantas, incluyendo *cre-lox* como se divulga en la patente de Estados Unidos 4.959.317 y FLP-FRT como se divulga en la patente de Estados Unidos 5.527.695.

Los procedimientos adecuados para la transformación de células hospedadoras para su uso con la presente invención se cree que incluyen casi cualquier procedimiento por el que pueda introducirse ADN en una célula (véase, por ejemplo, Miki y col., 1993), tal como por transformación de protoplastos (patente de Estados Unidos 5.508.184; Omirulleh y col., 1993), por desecación/captación de ADN mediada por inhibición (Potrykus y col., 1985), por electroporación (patente de Estados Unidos 5.384.253), por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppeler y col., 1990; patentes de Estados Unidos 5.302.523; y 5.464.765), por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de Estados Unidos 5.563.055; 5.591.616; 5.693.512; 5.824.877; 5.981.840; 6.384.301) y por aceleración de partículas recubiertas con ADN (patentes de Estados Unidos 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; 6.403.865; Padgett y col. 1995). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, pueden transformarse de forma estable las células de casi cualquier especie. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden regenerarse en organismos transgénicos.

El procedimiento más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium* (por ejemplo, Horsch y col., 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas de plantas que transforman genéticamente células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta. Se proporcionan descripciones de sistemas de vector de *Agrobacterium* y procedimientos para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium* en numerosas referencias, incluyendo Gruber y col. 1993; Miki y col., 1993, Moloney y col., 1989 y las patentes de Estados Unidos 4.940.838 y 5.464.763. Otras bacterias tales como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan con plantas de forma natural pueden modificarse para que medien la transferencia génica a varias plantas diversas. Estas bacterias simbióticas asociadas con plantas pueden hacerse competentes para la transferencia génica por adquisición tanto de plásmidos Ti desarmados como de un vector binario adecuado (Broothaerts y col., 2005). También pueden usarse procedimientos para la introducción de secuencias víricas en plantas (por ejemplo, Grimsley, 1990, Boulton, 1996).

Los procedimientos para la creación de plantas transgénicas y la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en plantas en particular son conocidos y pueden usarse con los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento para preparar plantas transgénicas que muestran susceptibilidad reducida a virus patógenos de plantas. Los vectores de transformación de plantas pueden prepararse, por ejemplo, insertando los ácidos nucleicos productores de ARNbc divulgados en el presente documento en vectores de transformación de plantas e introduciendo estos en plantas. Un sistema de vector conocido se ha obtenido modificando el sistema de transferencia génica natural de *Agrobacterium tumefaciens*. El sistema natural comprende plásmidos Ti grandes (inductores de tumor) que contienen un segmento grande, conocido como ADN-T, que se transfiere a plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región vir, es responsable de la transferencia del ADN-T. La región de ADN-T está delimitada por repeticiones terminales. En los vectores binarios modificados, se han eliminado los genes inductores de tumor y se utilizan las funciones de la región vir para transferir ADN foráneo delimitado por las secuencias de borde de ADN-T. La región T también puede contener un marcador de selección para la recuperación eficaz de plantas y células transgénicas, y un sitio de clonación múltiple para insertar secuencias para la transferencia, tal como un ácido nucleico codificante de ARNbc.

Los protocolos para la transformación de células de tomate son conocidos en la técnica (por ejemplo, McCormick, 1991). Se analizan protocolos de transformación de plantas alternativos en Boulton (1996), y Grimsley (1990). Los protocolos de transformación y regeneración para otras plantas, tales como pimiento, son conocidos en la técnica (por ejemplo, Christopher y Rajam, 1996; patente de Estados Unidos 5.262.316; Liu y col. 1990). Por ejemplo, dicho protocolo para la transformación de tomate podría incluir etapas bien conocidas de esterilización de semillas, germinación y crecimiento de semillas, explante de plántulas, crecimiento y preparación de cultivo de *Agrobacterium*, cocultivo, selección y regeneración.

E. Plantas y células transgénicas

Una planta transgénica formada usando procedimientos de transformación con *Agrobacterium* típicamente puede contener una única secuencia de ADN recombinante simple insertada en un cromosoma, mencionado como evento transgénico. Dichas plantas transgénicas pueden mencionarse como heterocigóticas para la secuencia exógena

insertada. Una planta transgénica homocigótica con respecto a un transgén puede obtenerse por apareamiento sexual (autofertilización) de una planta transgénica segregante independiente que contiene una única secuencia génica exógena consigo misma, por ejemplo, una planta F0, para producir semillas F1. Una cuarta parte de las semillas F1 producidas serán homocigóticas con respecto al transgén. La germinación de semillas F1 produce plantas que pueden ensayarse para la heterocigosidad, típicamente usando un ensayo de SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotos y homocigotos (es decir, un ensayo de cigosidad). El cruce de una planta heterocigótica consigo misma u otra planta heterocigótica produce una descendencia heterocigótica, así como descendencia transgénica homocigótica y nula homocigótica.

Además de la transformación directa de una planta con una construcción de ADN recombinante, pueden prepararse plantas transgénicas cruzando una primera planta que tiene una construcción de ADN recombinante con una segunda planta que carece de la construcción. Por ejemplo, puede introducirse un ADN recombinante para la supresión génica en una primera línea de plantas que es susceptible a transformación para producir una planta transgénica que puede cruzarse con una segunda línea de plantas para producir introgresión del ADN recombinante para supresión génica en la segunda línea de plantas.

15 F. Cribados de resistencia a virus

La inoculación y ensayo de enfermedades con virus tales como TSWV, TYLCV, y PepMV se realizó usando transmisión mecánica o agroinfección (por ejemplo, Boulton, 1996; Grimsley, 1990). La infección de TSWV se consiguió de forma mecánica, esencialmente como se describe por Kumar y col., (1993) con algunas modificaciones. La inoculación con begomovirus (por ejemplo, TYLCV) y el ensayo de la enfermedad de plantas se consiguió por agroinfección de la siguiente manera: Se sembraron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cvs. (Resistente (R): HP919; Resistente intermedio (IR): Hilario; Susceptible (S): Arletta) y se cultivaron aproximadamente 20 plantas para cada inoculación, así como un control no inoculado o de inoculación simulada, durante 7-10 días, hasta la fase de cotiledones sin hojas primarias visibles. Los laterales inferiores de los cotiledones entonces se infiltraron usando una jeringa sin aguja, y se realizaron posteriormente inoculaciones adicionales por inyección en los tallos en la fase de 2-3 hojas verdadera, aproximadamente 1-2 semanas después. La infiltración o inyección utilizó una cepa de *A. tumefaciens* transformada, inducida con acetosiringona, que contenía un clon infeccioso del virus que se había cultivado en caldo YEB con antibióticos para la selección del vector pBIN durante aproximadamente 15 horas a 28 °C en un agitador (170 r.p.m.) a partir de la inoculación de un cultivo fresco. Después del crecimiento a 28 °C, el cultivo se centrifugó y se resuspendió en 10 ml de MMA (por 1 litro: 20 g de sacarosa, 5 g de sales MS, 1,95 g de MES, pH 5,6 con NaOH y 1 ml de solución madre de acetosiringona 200 mM; dH₂O hasta 1 litro). Las plantas se cultivaron a 20-25 °C (día/noche), con 16 horas de luz en el invernadero o cámara de cultivo. Después de 6 semanas, se valoraron los síntomas de la siguiente manera:

1. sin síntomas visibles (resistente)
3. síntomas muy leves (resistente)
5. síntomas medios
7. síntomas fuertes
9. síntomas muy fuertes

La inoculación con el potexvirus virus del mosaico del pepino (PepMV) se consiguió de la siguiente manera: Se preparó el inóculo del virus infectando mecánicamente plántulas de tomate (susceptibles cv. Apollo, 9-12 días de edad) después de espolvoreo de las hojas con polvo de carborundo. Los tejidos infectados se recogieron y se homogeneizó 1 g de tejido infectado con 5-10 ml de tampón fosfato (pH 9). Este inóculo preparado entonces se usó para inocular mecánicamente plantas experimentales en la fase de cotiledones (7-10 días después de la siembra). Las plantas inoculadas se cultivaron en el invernadero a 19-23 °C (día/noche), con 16 horas de luz por 24 horas, en el invernadero con un 70 % de humedad relativa. Las plantas se evaluaron a los 11-21 días después de la inoculación, y se valoraron de la siguiente manera:

1. sin síntomas visibles (resistente)
3. algo de clorosis foliar
5. clorosis en venas foliares y/o mosaico foliar
7. clorosis en venas foliares y hojas puntiagudas
9. clorosis en venas foliares y hojas puntiagudas y mosaico amarillo

G. Extracción de ARN y transferencias de Northern de ARNip

Se extrajo el ARN para transferencia de Northern de ARN pequeño usando Trizol® esencialmente de acuerdo con las directrices del fabricante (Invitrogen). En resumen, se molieron aproximadamente 100-200 mg de tejido foliar fresco en nitrógeno líquido en un tubo de centrifuga de 1,5 ml colocado en hielo seco. La muestra se retiró del hielo seco y se añadió 1 ml de Trizol bajo una campana de extracción. Esto se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, y la muestra se agitó a mano durante 30 segundos y se centrifugó 13 000 r.p.m. en una centrifuga de mesa refrigerada durante 15 minutos a 4 °C.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se le añadió 0,5 ml de isopropanol y los tubos se invirtieron unas pocas

veces, y después se incubaron durante 10 min a TA seguido por centrifugación a 13 000 r.p.m. en una centrífuga de mesa refrigerada durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó añadiendo 0,75 ml de etanol al 75 %, después se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y ARN se secó al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente.

5 El sedimento se resuspendió añadiendo 100 µl de ddH₂O sin RNasa y se agitó con vórtice durante unos pocos segundos. Las muestras se congelaron en hielo seco y el ARN se concentró por el uso de un vacío por aceleración durante aproximadamente 20 minutos: esta etapa elimina todos los restos de etanol. El ARN se cuantificó por espectrofotómetro (habitualmente se recuperan aproximadamente 80-100 µg de las hojas de tomate). Se cargaron aproximadamente 7 µg de ARN total para el análisis de ARNip.

10 **Transferencia de Northern de ARNip con sonda marcada con DIG: Preejecución del gel de TBE al 15 %-urea** (Invitrogen EC68855BOX) durante 30 minutos a 110 V. Las muestras se prepararon para su carga añadiendo 7 µl de tampón de muestra de TBE-urea Novex® 2 x (Invitrogen LC6876) a 7 µl de ARN total (5-7 µg), se desnaturalizaron durante 10 min a 94 °C y se enfriaron inmediatamente en hielo. Si se necesitaba visualización de la muestra bajo luz UV, se añadió bromuro de etidio al tampón de muestra (1 µl de EtBr a 0,624 mg/ml por cada 10 µl de tampón). Las
15 muestras se centrifugaron brevemente antes de cargarlas en los pocillos del gel y se realizó la electroforesis durante aproximadamente 1,5 h a 180 V en TBE 0,5 x hasta que el colorante azul alcanzó el fondo del gel. Después de terminar la ejecución, el gel se observó bajo luz UV.

Transferencia del gel a membrana de nailon Nytran Supercharge (VWR 28151-318) se hizo en una celda de transferencia semiseca Transblot (BioRad 170-3940): la membrana se prehumedeció en agua y se equilibró en TBE
20 0,5 x junto con 2 trozos de papel extragrueso ((BioRad 170-3968). La transferencia se estableció de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ánodo-papel de transferencia-membrana-gel-papel de transferencia-cátodo) y se realizó durante 50 min a 380 mA. Después de la transferencia la membrana se dejó secar al aire durante aproximadamente 10 min y después el ARN se reticuló con la misma en un Stratallinker 1800 (Stratagene).

Hibridación: La membrana se prehibridó a 42 °C durante 1 h con 10 ml de solución PerfectHyb (Sigma H7033) en un horno de hibridación. Se desnaturalizaron 200 ng de sonda marcada con DIG, preparada con la mezcla de marca
25 con DIG de PCR (Roche 11585550910) siguiendo las instrucciones del fabricante, durante 10 min a 94 °C, se enfriaron en hielo y se añadieron a 10 ml de solución de hibridación fresca, que se añadió a la membrana prehibridada y se incubó durante 1 noche a 42 °C en el horno de hibridación.

Lavados y detección: Después de descartar la solución de hibridación, las membranas se aclararon brevemente en
30 SSC 2 x y SDS al 0,1 %; y después se lavaron 2 veces en SSC 2 x y SDS al 0,1 % precalentado durante 20 min a 50 °C, 2 veces en SSC 1 x y SDS al 0,1 % precalentado durante 20 min a 50 °C, 2 veces en SSC 0,5 x y SDS al 0,1 % precalentado durante 20 min a 50 °C. La detección se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el conjunto de lavado y tampón de bloqueo de DIG (Roche 11585762001). En resumen, la membrana se aclaró durante 2 min en tampón de lavado de DIG 1 x antes de incubar durante 1 h a TA en 100 ml de solución de bloqueo
35 de DIG (10 ml de tampón de bloqueo 10 x + 10 ml de ácido maleico 10 x + 80 ml de agua). Después se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en 100 ml de solución de bloqueo DIG fresca a la que se habían añadido 10 µl de anticuerpo anti-Digoxigenina-AP (Roche 11093274910). La membrana se lavó 15 min a TA dos veces con 100 ml de tampón de lavado de DIG 1 x y se equilibró con 100 ml de tampón de detección de DIG 1 x. Se distribuyó aproximadamente 1 ml de solución CDP-star (Roche 12041677001) en la parte superior de la membrana, que se
40 situó entre 2 láminas de plástico, se incubó a TA durante 5 min y se expuso a una película durante cantidades variables de tiempo antes del revelado.

H. Validación de las construcciones en plantas de tomate transgénicas

Las secuencias modificadas por ingeniería para generar ARNbc o miARN se clonaron en vectores binarios para la
45 transformación de tomate. Se ensayaron plantas transgénicas R₀ para la producción de oligómeros de ~21 unidades específicos y/o la eficacia de resistencia al virus por análisis de transferencia de Northern de ARN pequeño y ensayos de resistencia resumidos anteriormente y como se describe en el ejemplo 7. Otras secuencias de generación de ARNbc seleccionadas o secuencias de generación de miARN, por ejemplo, entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-154, o de las SEQ ID NO: 169-455 o partes de las mismas, pueden utilizarse para crear
50 construcciones eficaces adicionales. Por tanto, por ejemplo, pueden utilizarse una o más secuencias de estructura MIR, por ejemplo, MON1 de soja, MON5 de soja, MON13 de arroz, MON18 de maíz, miR159a de maíz o mi167g de maíz (SEQ ID NO: 155, 157, 159, 161, 163 o 165) para crear una o más secuencias generadoras de ARNbc o miARN. En ciertas realizaciones, la secuencia generadora de ARNbc o la secuencia generadora de miARN puede comprender cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127, 141, o 379-455. En realizaciones particulares, la secuencia puede comprender cualquiera de las SEQ ID NO: 156, 1160,
55 162, 164, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 373, o 375.

Se contemplan combinaciones con otros rasgos de control de enfermedades en una planta, incluyendo estrategias no transgénicas, para conseguir rasgos deseados para el control potenciado de enfermedades de plantas. Combinar rasgos de control de enfermedades que emplean distinto modos de acción puede proporcionar plantas transgénicas protegidas con durabilidad superior sobre plantas que albergan un único rasgo de control a causa de la probabilidad

reducida de que se desarrolle resistencia en el campo. Por tanto, pueden emplearse al menos dos o al menos tres modos de acción para conferir resistencia a virus, en el que dichos modos de acción se seleccionan de la expresión de ARNbc, expresión de miARN, inhibición del ensamblaje del virión, expresión fenotípica de un rasgo de resistencia a virus no transgénico y expresión de proteína transgénica. La expresión de proteína transgénica puede comprender la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la cubierta, expresión de una secuencia que codifica la proteína del movimiento o expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la replicasa.

Se contemplan específicamente productos básicos que contienen una o más de las secuencias divulgadas en el presente documento, y producidos a partir de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento. Se pretende que un producto básico que contiene una o más de las secuencias divulgadas en el presente documento incluya harinas, aceites, granos triturados o completos o semillas de una planta, o cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier harina, aceite o grano triturado o completo de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de estas secuencias. La detección de una o más de estas secuencias en uno o más artículos o productos básicos contemplados en el presente documento es una evidencia de hecho de que el artículo o producto básico está compuesto de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de estas secuencias de nucleótidos con el fin de controlar una enfermedad de plantas usando procedimientos de supresión génica mediada por ARNbc.

I. Composiciones de ácido nucleico

En el presente documento se divulgan procedimientos para obtener un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir un ARNbc, miARN o ARNip. Dicho procedimiento puede comprender: (a) analizar uno o más genes diana para su expresión, función y fenotipo tras la supresión mediada por ARNbc, o mediada por miARN o ARNip de un gen un virus patógeno de plantas; (b) sondear una biblioteca de ácidos nucleicos con una sonda de hibridación que comprende todo o una parte de una secuencia de nucleótidos, o un homólogo de la misma, a partir de un virus diana que presenta un fenotipo alterado en un análisis de supresión mediada por ARNbc; (c) identificar un clon de ADN que hibrida con la sonda de hibridación; (d) aislar el clon de ADN identificado en la etapa (b); y (e) secuenciar el fragmento de ácido nucleico que comprende el clon aislado en la etapa (d), en el que la molécula de ácido nucleico secuenciada transcribe todo o una parte sustancial de la secuencia de ácido nucleico de ARN o un homólogo de la misma. La estrategia de resistencia mediada por ARN utilizando ARNbc, miARN o ARNip puede complementarse situando las secuencias antivíricas en el bucle de una secuencia codificante de ARNbc, o insertando una secuencia que codifica un ARNbc o miARN eficaz en un intrón de un casete de expresión de polipéptido (ARNbc/miARN intrónico; Frizzi y col., 2008) (por ejemplo, figura 9). Por ejemplo, puede expresarse una o más proteínas víricas tal como la proteína de la cubierta y/o la replicasa en una planta transgénica que también expresa un ARNbc, miARN o ARNip, sin el uso de un casete transgénico adicional, insertando la secuencia codificante de la proteína en el bucle de un ARNbc.

Un procedimiento para obtener un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una parte sustancial de un ARNbc o ARNip puede comprender además: (a) sintetizar un primer y un segundo cebador oligonucleotídico correspondiente a una parte de una de las secuencias de nucleótidos de un patógeno diana; y (b) amplificar un inserto de ácido nucleico presente en un vector de clonación usando el primer y el segundo cebador oligonucleotídico de la etapa (a), en el que la molécula de ácido nucleico amplificada transcribe una parte sustancial del ARNbc o ARNip.

Los genes diana pueden obtenerse de un begomovirus, tospovirus o potexvirus. Se contempla que pueden emplearse varios criterios en la selección de genes diana preferidos. Dichas secuencias pueden identificarse por alineación, por ejemplo, de secuencias de begomovirus o de tospovirus de múltiples cepas y/o especies. Una estrategia de bioinformática ha identificado numerosos oligómeros de 21 unidades que están principalmente conservados en más de 100 cepas y especies de begomovirus. En algunos casos, se permiten emparejamientos incorrectos dentro de un oligómero particular de 21 unidades para un establecimiento de diana más amplio.

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de" se refiere a una secuencia de nucleótidos específica que puede obtenerse de una fuente o especie específica particular, aunque no necesariamente directamente de esa fuente o especie específica.

Puede seleccionarse un gen que provoque la supresión de la replicación del virus y/o la sintomatología. Otros genes diana pueden incluir, por ejemplo, los que desempeñan funciones importantes en la transmisión del virus, el movimiento dentro de una planta o el ensamblaje del virión (por ejemplo, secuencias terminales de tospovirus, que comprenden las secuencias de repeticiones terminal). Para el control de virus, las secuencias diana pueden obtenerse esencialmente de los virus de plantas diana. Algunas de las secuencias diana ejemplares clonadas de un begomovirus, tospovirus o potexvirus pueden encontrarse en la lista de secuencias, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141, así como dentro de las SEQ ID NO: 169-455.

Las moléculas de ARNbc pueden obtenerse por amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia génica diana derivada de una biblioteca de ADNg o ADNc o partes de la misma. La biblioteca de ADN puede prepararse usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia y puede extraerse el ADN/ARN. Las

bibliotecas de ADN genómico o ADNc de un organismo diana pueden usarse para la amplificación por PCR para la producción del ARNbc o del ARNip.

5 Las secuencias génicas diana entonces pueden amplificarse por PCR y secuenciarse usando los procedimientos fácilmente disponibles en la técnica. Un experto en la materia puede ser capaz de modificar las condiciones de PCR para asegurar la formación óptima del producto de PCR. El producto de PCR confirmado puede usarse como molde para la transcripción *in vitro* para generar ARN sentido y anti-sentido con los promotores mínimos incluidos. Las secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas pueden usarse como agentes de control de virus de plantas. Las secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas pueden comprender las expuestas en la lista de secuencias.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia codificante", "secuencia de nucleótidos estructural" o "molécula de ácido nucleico estructural" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se traduce en un polipéptido, habitualmente mediante ARNm, cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir ADN genómico, ADNc, EST y secuencias de nucleótidos recombinantes.

15 La expresión "ADN recombinante" o "secuencia de nucleótidos recombinante" se refiere al ADN que contienen una modificación diseñada por ingeniería genética a través de manipulación mediante mutagénesis y enzimas de restricción.

Ejemplos

20 Los inventores del presente documento han identificado un medio para controlar infecciones de virus en plantas incorporando en las plantas miARN modificados por ingeniería, ta-ARNip y/o ARNip progresivo. Uno cualquiera o cualquier combinación de estos atributos puede provocar una inhibición eficaz de la infección de la planta, inhibición de la enfermedad de la planta y/o reducción en la gravedad de los síntomas de la enfermedad.

Ejemplo 1

Dianas para resistencia a múltiples virus

25 Se ensamblaron secuencias de virus diana de Genbank. La figura 1 muestra esquemáticamente la organización del genoma de virus diana representativos. Para begomovirus diana, se analizaron 58 aislados de virus del rizado foliar amarillo del tomate (TYLCV), 30 aislados de virus New Delhi del rizado foliar del tomate (ToLCNDV), 5 aislados de virus del rizado foliar severo del tomate (ToSLCV), 5 aislados de virus del mosaico dorado del pimiento (PepGMV) y 2 aislados de virus de las venas amarillas del pimiento huasteco (PHYVV). Para tospovirus diana, se analizaron el virus del marchitamiento moteado del tomate (TSWV), virus de la necrosis de las yemas del cacahuete (GBNV) y virus de la clorosis de *Capsicum* (CaCV), 6 segmentos L (TSWV: 4; GBNV: 1; CaCV: 1), 23 segmentos M (TSWV: 20; GBNV: 2; CaCV: 1) y 45 segmentos S (TSWV: 41; GBNV: 2; CaCV: 2). Para los aislados de potexvirus diana, se analizaron 13 aislados de virus del mosaico del pepino (PepMV) (por ejemplo, Lopez y col., 2005; Cotillon y col., 2002). Se utilizó una estrategia de bioinformática para identificar secuencias de aproximadamente 20-24 nucleótidos a usar como miARN artificiales para suprimir la mayor cantidad posible de virus diana.

La siguiente tabla (tabla 1) enumera secuencias analizadas para el posible uso en el diseño de construcciones transgénicas para generar miARN modificados por ingeniería, así como para identificar secuencias para su uso en estrategias de resistencia a virus mediada por ARNbc:

Tabla 1. Secuencias ejemplares usadas para análisis bioinformático (SEQ ID NO: 169-362)

Tipo de virus	Nombre del virus	Acceso a GenBank
Begomovirus	<i>Virus del rizado foliar amarillo del tomate</i> (TYLCV)	AF024715, X15656, X76319, AB014346, AB014347, AB110217, AB110218, AB116629, AB116630, AB116631, AB116632, AB116633, AB116634, AB116635, AB116636, AF071228, AF105975, AF271234, AJ132711, AJ223505, AJ489258, AJ519441, AJ812277, AJ865337, AM282874, AM409201, AM698117, AM698118, AM698119, AY044138, AY134494, AY227892, AY502934, AY530931, AY594174, AY594175, DQ144621, DQ358913, DQ631892, DQ644565, EF051116, EF054893, EF054894, EF060196, EF101929, EF107520, EF110890, EF158044, EF185318,
		EF210554, EF210555, EF433426, EF523478, EF539831, EU031444, EU143745

40

ES 2 651 909 T3

(continuación)

Tipo de virus	Nombre del virus	Acceso a GenBank
Begomovirus	<i>Virus New Delhi del rizado foliar del tomate</i> (ToLCNDV)	NC_004611, U15015, U15016, Y16421, AB330079, AB368447, AB368448, AF102276, AF448058, AF448059, AJ620187, AJ875157, AM286433, AM286434, AM292302, AM850115, AY286316, AY428769, AY939926, DQ116880, DQ116883, DQ116885, DQ169056, EF035482, EF043230, EF043231, EF063145, EF068246, EF450316, EF620534, EU309045
Begomovirus	<i>Virus del rizado foliar severo del tomate</i> (ToSLCV)	AF130415, AJ508784, AJ508785, DQ347946, DQ347947
Begomovirus	<i>Virus de las venas amarillas del pimiento huasteco</i> (PHYVV)	NC_001359, X70418, AY044162
Begomovirus	<i>Virus del mosaico dorado del pimiento</i> (PepGMV)	NC_004101, U57457, AF149227, AY928512, AY928514, AY928516
Tospovirus	<i>Virus del marchitamiento moteado del tomate</i> (TSWV) (segmento L)	NC_002052, D10066, AB190813, AB198742, AY070218
Tospovirus	<i>Virus del marchitamiento moteado del tomate</i> (TSWV) (segmento M)	NC_002050, S48091, AB010996, AB190818, AF208497, AF208498, AY744481, AY744482, AY744483, AY744484, AY744485, AY744486, AY744487, AY744488, AY744489, AY744490, AY744491, AY744492, AY744493, AY870389, AY870390
Tospovirus	<i>Virus del marchitamiento moteado del tomate</i> (TSWV) (segmento S)	NC_002051, D00645, AB088385, AB190819, AF020659, AF020660, AJ418777, AJ418778, AJ418779, AJ418780, AJ418781, AY744468, AY744469, AY744470, AY744471, AY744472, AY744473, AY744474, AY744475, AY744476, AY744477, AY744478, AY744479, AY744480, AY870391, AY870392, DQ376177, DQ376178, DQ376179, DQ376180, DQ376181, DQ376182, DQ376183, DQ376184, DQ376185, DQ398945, DQ431237, DQ431238, DQ915946, DQ915947, DQ915948
Tospovirus	<i>Virus de la necrosis de las yemas del cacahuete</i> (GBNV) (segmento L)	NC_003614, AF025538
Tospovirus	<i>Virus de la necrosis de las yemas del cacahuete</i> (GBNV) (segmento M)	NC_003620, U42555, AY871097
Tospovirus	<i>Virus de la necrosis de las yemas del cacahuete</i> (GBNV) (segmento S)	NC_003619, U27809, AY871098
Tospovirus	<i>Virus de la clorosis de Capsicum</i> (CaCV) (segmento L)	NC_008302, DQ256124

(continuación)

Tipo de virus	Nombre del virus	Acceso a GenBank
Tospovirus	<i>Virus de la clorosis de Capsicum (CaCV)</i> (segmento M)	DQ256125
Tospovirus	<i>Virus de la clorosis de Capsicum (CaCV)</i> (segmento S)	DQ355974, DQ256123
Potexvirus	<i>Virus del mosaico del pepino (PepMV)</i>	EF599605, AY509926, AJ438767, DQ000984, DQ000985, AY509927, EF408821, AM491606, AJ606360, AJ606359, AJ606361, AF484251, AM109896

Ejemplo 2

Segmentos víricos para iARN

5 Los genomas víricos seleccionados se dividieron en fragmentos de ~350-500 pb, parcialmente solapantes en aproximadamente 50 pb (por ejemplo, figura 2A-2D). Se recogieron los datos de eficacia para la capacidad de las secuencias individuales de controlar especies de virus particulares cuando se expresan individualmente en plantas transformadas. En estudios iniciales, se cribaron segmentos correspondientes a aproximadamente 2,3 kB de los 2,7 kB del genoma de ADN-A de geminivirus (figura 2B; segmentos 1-8). Asimismo, como se muestra en la figura 2C, se ensayaron los segmentos 1-8 que representan aproximadamente 4 kB de los 5,6 kB del genoma de PepMV (potexvirus). La figura 2D muestra las partes del genoma de tospovirus tripartito que se ensayaron para la eficacia: aproximadamente 1,5 kB de los 8,9 kB del ARNv L (es decir, ARN vírico) (segmentos 1-3); aproximadamente 1,5 kB de los 5,4 kB de ARNv M (segmentos 4-6); y aproximadamente 1 kB de los 2,9 kB de ARNv S (segmentos 7-8).

15 En un estudio representativo, se ensayó un segmento de ácido nucleico correspondiente a una parte de la proteína de la cubierta TSWV (nucleocápsida) para la eficacia cuando se expresaba como una repetición invertida (figura 3). Se descubrió que la resistencia a virus se correlacionaba con la producción de ARNip en plantas de tomate. Además, en el cribado de resistencia a TYLCV, primero se examinaron plantas R₁ para la presencia del transgén y después se infectaron con el clon infeccioso de TYLCV. Como control, se incluyó una línea de tomate no transformada (de tipo silvestre); estas plantas de tipo silvestre típicamente tienen menos de un 5 % de "resistencia", es decir, menos de un 5 % de las plantas escapan a infección por inoculación en este ensayo. En contraste, entre las plantas CP4 positivas (que contiene el gen marcador de selección que especifica resistencia a glifosato, que está unido al casete de expresión con la secuencia vírica), un 56 % de las plantas R₁ que comprenden un segmento de ácido nucleico introducido dirigido a la proteína de la replicación (3 construcciones), un 27 % que comprende un segmento de ácido nucleico introducido dirigido a la proteína de la cubierta (3 construcciones) y un 38 % que comprende un segmento de ácido nucleico introducido dirigido al resto de las regiones codificantes (2 construcciones) mostraron resistencia a TYLCV.

25 Después se emprendieron estudios adicionales que exploran estas partes adicionales del genoma de tospovirus, para identificar y definir partes del genoma vírico que pueden mediar la resistencia a virus relacionada con ARNbc contra virus representativos. Estas secuencias se ensayaron como segmentos de repetición invertida en construcciones que generan doble hebra (ARNbc), en las que las construcciones ensayadas comprendían un promotor unido de forma funcional a una secuencia dada en una orientación anti-sentido (por ejemplo, SEQ ID NO: 379-442 como se describe a continuación), seguido por una secuencia de bucle, y después la secuencia dada en una orientación sentido, y un terminador de la transcripción. Después de la transcripción y del emparejamiento de bases de las secuencias de repetición invertida, se escindieron las regiones de ARN bicatenario por una RNasa Dicer o de tipo Dicer para generar los ARNip antivíricos específicos que abordan e impiden la expresión del gen vírico.

30 El virus de la clorosis de *Capsicum* (CaCV), el virus de la necrosis de las yemas del cacahuete (GBNV) y virus del marchitamiento moteado del tomate (TSWV), entre otros tospovirus. Los ensayos de resistencia a virus de plantas R₁ transgénicas demostraron que todas las regiones del genoma de tospovirus son igual de eficaces como diana de ARNbc. Por tanto, se observó resistencia significativa a virus después de la expresión de los transcritos que altera la expresión de la proteína de la cubierta de tospovirus (CP), así como los segmentos GP1, GP2, GP3 del genoma del virus que codifican glucoproteína y segmentos proteicos de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP). La figura 11A-B describe los resultados de resistencia observados de plantas transgénicas. Representando cada barra

un evento transgénico individual y la región diana, por ejemplo, un 50-80 % de las plantas R₁ que expresan un ARNbc dirigido a la región CP, eran resistentes a CaCV, mientras que ~25-90 % de las plantas R₁ que expresan un ARNbc dirigido a una glucoproteína del virus mostraban resistencia al virus, y aproximadamente un 25-80 % de las plantas R₁ que expresan un ARNbc dirigido a RdRP vírica mostraban resistencia (por ejemplo, figura 11B). La resistencia mediada por ARNbc contra TSWV fue particularmente eficaz, mostrando un 100 % de las plantas R₁ resistencia al virus de todos los eventos ensayados con construcciones dirigidas a la proteína de la cubierta (figura 11A). Las secuencias representativas de TSWV, CaCV y GBNV seleccionadas para su uso en la generación de ARNbc dirigidos a la expresión génica de tospovirus se muestran en las SEQ ID NO: 419-436 (en orientación anti-sentido según se enumera).

Estudios adicionales demostraron que todas las regiones del genoma de PepMV son igual de eficaces en la generación de resistencia mediada por ARNbc contra este potexvirus. La figura 12 muestra que, en la mayoría de los casos, un 95-100 % de todas las plantas R₁ transgénicas que comprenden segmentos codificados por el virus dirigidos a CP (proteína de la cubierta), CP/MOV (secuencias de la proteína de la cubierta y de la proteína del movimiento), RdRP, TGB (proteína de motivo de triple bloque génico implicada en el movimiento vírico de una célula a otra y a larga distancia en una planta hospedadora) o TGB/RdRP eran resistentes a PepMV. Las secuencias representativas de PepMV seleccionadas para su uso en la generación de ARNbc dirigidos a la expresión génica de potexvirus se enumeran en las SEQ ID NO: 437-442, en orientación anti-sentido según se enumera.

Asimismo, se ensayaron las regiones del genoma de begomovirus (geminivirus) para su capacidad de generar resistencia mediada por ARNbc contra este grupo de virus. Se ensayaron TYLCV, ToSLCV, PepGMV, PHYVV y ToLCNDV en bioensayos como begomovirus representativos. Las figuras 13A-B muestran que hasta aproximadamente un 70 % de las plantas R₁ transgénicas presentaban resistencia a un virus dado cuando CP era la diana de ARNbc, mientras que hasta aproximadamente un 100 % de las plantas R₁ transgénicas presentaban resistencia cuando un segmento de ácido nucleico que codifica la proteína de replicación vírica era la diana de ARNbc. Las secuencias representativas de tospovirus seleccionadas para su uso en la generación de ARNbc dirigidos a la expresión génica de begomovirus se enumeran en la SEQ ID NO: 379-418, en orientación anti-sentido según se enumera.

En conjunto, se identificaron numerosas dianas de ARNbc eficaces para virus en estos tres géneros (es decir, tospovirus, potexvirus, begomovirus).

Basándose en estos resultados de iARN, se seleccionaron secuencias dirigidas a regiones diana eficaces para cada virus y se fusionaron en dos casetes transgénicos en una construcción de ácido nucleico, para abordar múltiples virus en múltiples familias de virus. Un ejemplo de esta estrategia se muestra en la figura 14. Para begomovirus, se usó una región Rep, mientras que para tospovirus y potexvirus, se seleccionaron regiones CP ya que la región CP está relativamente más conservada entre las diferentes cepas de los mismos virus. Algunas de las secuencias utilizadas en los casetes se modificaron adicionalmente, en vista de los emparejamientos de bases G::U esperados, para permitir la ampliación de la protección contra cepas víricas relacionadas. Las secuencias representativas seleccionadas para su uso en la generación de ARNbc dirigidos a la expresión génica del virus en los casetes se enumeran en las SEQ ID NO: 443-446 para el "casete 1" de la figura 14 y en la SEQ ID NO: 447-451 para el "casete 2" de la figura 14, cada uno en orientación anti-sentido como se enumera en la lista de secuencias. Por tanto, por ejemplo, el segmento de ácido nucleico dirigido a GBNV-CP1 que se encuentra en el casete 1 (SEQ ID NO: 443) es similar al segmento dirigido a GBNV-CP1 que se encuentra en la SEQ ID NO: 429, pero puede tener una modificación como se indica anteriormente, y asimismo para los otros segmentos de ácido nucleico usados en los casetes, respecto a los segmentos diana que se ensayaron inicialmente para la eficacia relativa.

Ejemplo 3

Construcciones de fusión de ARNbc artificial para resistencia a múltiples virus

También se combinaron segmentos de nucleótidos para la expresión de ARNbc, de dos o de tres de los grupos de virus diferentes (geminivirus, tospovirus, potexvirus) en un único casete de expresión y se generaron plantas a partir de las células transformadas y se analizaron para la resistencia a más de un virus. Esto se consiguió fusionando fragmentos genómicos víricos que dieron resultado positivo en el ensayo para la generación de ARNip que confieren resistencia a virus, por ejemplo, como se muestra en el ejemplo 2. De forma análoga al ejemplo 2, estas secuencias se ensayaron como segmentos de repetición invertida en construcciones que generan doble hebra (ARNbc), en el que las construcciones ensayadas comprendían un promotor unido de forma funcional a una secuencia dada en una orientación anti-sentido (por ejemplo, las SEQ ID NO: 452-454 como se describe a continuación), seguido por una secuencia de bucle, y después la secuencia dada en una orientación sentido, y un terminador de la transcripción. Después de la transcripción y del emparejamiento de bases de las secuencias de repetición invertida, las regiones de ARN bicatenario se escinden por una RNasa Dicer o de tipo Dicer para generar los ARNip antivíricos específicos que abordan e impiden la expresión génica del virus. En esta estrategia, se usaron segmentos de ARNbc específicos para cada uno de los virus diana para resistencia a múltiples virus (figura 4A).

Como alternativa, regiones conservadas de los diversos genomas víricos pueden proporcionar un espectro más amplio de resistencia contra diferentes variantes dentro de las especies o especies muy relacionadas. Además, las

repeticiones invertidas que comprenden secuencias que son muy similares a, pero menos de un 100 % idénticas a, segmentos diana de genomas víricos pueden diseñarse y ensayarse para su eficacia. Esta estrategia, es decir, repeticiones invertidas parcialmente similares o "imperfectas", pueden ampliar la protección mediada por ARN contra cepas y especies de virus relacionadas. Por ejemplo, como el emparejamiento de bases G-U a nivel de ARN tiene un grado comparable de estabilidad termodinámica que algunos emparejamientos de bases de Watson-Crick típicos (por ejemplo, A-U), algunas repeticiones imperfectas, no obstante, pueden activar RISC y guiar la escisión de dianas víricas tanto perfectas como imperfectas.

En este caso, dichas repeticiones invertidas parcialmente similares también pueden comprender una o más subsecuencias de al menos 21 nucleótidos de longitud que presentan casi un 100 % de identidad con una o más secuencias diana víricas, para estimular la resistencia a virus mediada por iARN. Por tanto, por ejemplo, la identidad global de un segmento de repetición imperfecta con una o más dianas víricas puede ser tan baja como de un 75 %, pero con 2-4 o más subsecuencias de 21-24 nucleótidos que presentan un 100 % de identidad con una secuencia diana vírica. Adicionalmente, la presencia de dicho ARNbc "imperfecto" puede ayudar a aumentar la acumulación de ARNbc en plantas y evitar la activación del silenciamiento génico transcripcional. Por tanto, pueden utilizarse segmentos de nucleótidos de más de una cepa de un virus, o de más de un virus, en el diseño y la preparación de una construcción de fusión para la expresión de ARNbc.

Dichas secuencias pueden identificarse alineando, por ejemplo, secuencias de geminivirus o de tospovirus de múltiples cepas y/o especies. La tabla 2 muestra los porcentajes de similitud entre las dianas de geminivirus a nivel de genoma completo. La tabla 3 muestra los porcentajes de similitud entre las dianas de tospovirus a nivel de genoma completo.

Tabla 2. Porcentajes de similitud entre dianas de geminivirus (genoma completo)

	TYLCV	ToLCNDV	PHYW	ToSLCV	PepGMV
TYLCV	-	71	64	63	60
ToLCNDV	71	-	62	60	59
PHYVV	64	62	-		
ToSLCV	63	60	67	-	76
PepGMV	60	59	66	76	-

Tabla 3. Porcentajes de similitud entre dianas de tospovirus (genoma completo)

Segmento	Virus	CapCV	GBNV	TSWV
ARNv L	CapCV_L	-	44	45
8,8 kB	GBNV_L	44	-	58
	TSWV_L	45	58	-
ARNv M	CapCV_M	-	78	53
4,8 - 5,4 kB	GBNV_M	78	-	54
	TSWV_M	53	54	-
ARNv S	CapCV_S	-	65	42
2,9 - 3,3 kB	GBNV_S	73	-	48
	TSWV_S	49	49	-

La figura 4B ilustra esquemáticamente construcciones de fusión ejemplares para la expresión de ARNbc. Las secuencias codificantes, incluyendo secuencias que carecen de identidad significativa con el genoma humano y genomas de plantas hospedadoras, se seleccionaron para la generación de repeticiones invertidas. Los segmentos derivados de virus pueden orientarse, por ejemplo, "anti-sentido-bucle-sentido" para la expresión de ARNbc. Esta estrategia puede reducir el tamaño de un casete de ARNbc transgénico necesario para resistencia a múltiples virus. Las construcciones de fusión artificiales descritas esquemáticamente de la figura 4B se enumeran como las SEQ ID NO: 452-453. La construcción de la proteína de la cubierta artificial de la SEQ ID NO: 452 comprende las siguientes secuencias: pb 1-157: proteína de la precubierta de TYLCV para el bucle; pb 158-507 (es decir, segmento de 350 pb) dirigida a CP de TYLCV y ToLCNDV; pb 508-851 (es decir, segmento de 344 pb) dirigida a la expresión de CP de ToSLCV, PepGMV y PHYVV. La SEQ ID NO: 453 comprende los siguientes segmentos: pb 1-160 dirigido a la

proteína de la cubierta de TSWV (CP) para el bucle; pb 161-456 (es decir, segmento de 296 pb) dirigido a CP de TSWV; pb 457-687 (es decir, segmento de 231 pb) dirigido a CP de PepMV; pb 688-919 (es decir, segmento de 232 pb) dirigido a CP de CaCV y GBNV. Los resultados de eficacia para la SEQ ID NO: 453, la secuencia CP artificial contra múltiples tospovirus y PepMV, se muestran en la figura 15. Se proporciona una construcción de fusión de ARNbc artificial adicional dirigida a proteínas Rep de cinco geminivirus (TYLCV, ToLCNDV, ToSLCV, PepGMV y PHYVV) como la SEQ ID NO: 454. En esta secuencia, el segmento de pb 1-150 está dirigido a la proteína Rep de TYLCV para el bucle; el segmento de pb 151-500 (es decir, de 350 pb) está dirigido a proteína Rep de TYLCV y ToLCNDV; el segmento de pb 501-860 (es decir, de 360 pb) está dirigido a la proteína Rep de ToSLCV, PepGMV y PHYVV.

5

10 **Ejemplo 4**

Estrategia de miARN modificado por ingeniería: Selección de secuencias adecuadas

Se usó la estrategia de bioinformática descrita en el ejemplo 1 para identificar varias secuencias adecuadas, de aproximadamente 21 nt de longitud, dirigidas a secuencias de geminivirus que se cree que son útiles para la supresión mediada por miARN de la replicación de geminivirus y/o expresión de síntomas (tabla 4; figura 5).

15

Tabla 4: Secuencias adecuadas de 21 nt contra geminivirus diana

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de miARN (5' → 3')	Diana
1	Gemini 1	TGTCATCAATGACGTTGTACT	Rep
7	Gemini 2	TGGACTTTACATGGGCCTTCA	Proteína de la cubierta
13	Gemini 3	TACATGCCATATACAATAGCA	Proteína de la cubierta
19	Gemini 4	TCATAGAAAGTAGATCCGGATT	Proteína de la cubierta
25	Gemini 5	TTCCCCTGTGCGTGAATCCGT	C2/C3
31	Gemini 6	TTCCGCCTTTAATTTGGATTG	Rep
37	Gemini 7	TTACATGGGCCTTCACAGCCT	Proteína de la cubierta

La estrategia de bioinformática descrita en el ejemplo 1 se usó para identificar varias secuencias adecuadas, de aproximadamente 21 nt de longitud, dirigidas a secuencias de tospovirus que se cree que son útiles para la supresión mediada por miARN de la replicación de tospovirus y/o la expresión de síntomas (tabla 5; figura 6).

20

Tabla 5: Secuencias adecuadas de 21 nt para cada segmento genómico contra tres tospovirus diana

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de miARN (5' → 3')	Diana
43	TospoL1-1	TTTAGGCATCATATAGATAGCT	RdRP
47	Tospo L1-2	TGATTTAGGCATCATATAGAT	RdRP
51	Tospo M1	TATCTATATTTTCCATCTACC	GP
55	Tospo M2	TTAGTTTGCAGGCTTCAATTA	NSm
59	Tospo M3	TTGCATGCTTCAATGAGAGCT	NSm
63	Tospo S2	TTGACGTTAGACATGGTGTTT	N
67	Tospo S3	TAGAAAGTTTTGAAGTTGAAT	N

La estrategia de bioinformática descrita en el ejemplo 1 se usó para identificar varias secuencias adecuadas, de aproximadamente 21 nt de longitud, dirigidas a secuencias de potexvirus que se cree que son útiles para la supresión mediada por miARN de la replicación de tospovirus y/o la expresión de síntomas (tabla 6; figura 7A-7B).

25

Tabla 6: Secuencias adecuadas de ~21 nt contra potexvirus diana

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de miARN (5' → 3')	Diana
71	PepMV1	TCTTCATTGTAGTTAATG GAG	RdPR
85	PepMV2	TTGGAAGAGGAAAAGGTGGTT	RdPR
99	Pep MV3	TCAATCATGCACCTCCAGTCG	RdPR
113	PepMV4	TAAGTAGCAAGGCCTAGGTGA	TGBp1
127	PepMV5	TTTGGAAGTAAATGCAGGCTG	TGBp2
141	PepMV6	TAACCCGTTCCAAGGGGAGAAG	TGBp3

Ejemplo 5**Incorporación de secuencias generadoras de miARN en una estructura génica MIR**

- 5 Las secuencias generadoras de miARN de las tablas 4-6 se incorporaron en construcciones transgénicas por síntesis génica. Por ejemplo, la estructura génica MIR de tipo silvestre "MON1" (véase, la publicación de Estados Unidos 2007/0300329) de soja con la secuencia generadora de miARN de 21 nt de tipo silvestre (SEQ ID NO: 155 de la presente solicitud) se alteró para remplazar la secuencia generadora de miARN de tipo silvestre con la diana Gemini1 (SEQ ID NO: 1), produciendo la construcción Gemini1/MON1 (SEQ ID NO: 156). Por tanto, puede alterarse una estructura MIR (por ejemplo, la estructura MON1 de la SEQ ID NO: 155) remplazando la secuencia generadora de miARN de 21 nt de tipo silvestre con cualquiera de las secuencias de miARN de las tablas 4-6.
- 10 Asimismo, se usaron MON5 de soja (SEQ ID NO: 157), MON13 de arroz (SEQ ID NO: 159), MON18 de maíz (SEQ ID NO: 161), miR159a de maíz (SEQ ID NO: 163) o miR167g (SEQ ID NO: 165) como secuencias estructurales con las secuencias generadoras de miARN de las tablas 4-6. Por tanto, se crearon las siguientes secuencias (tabla 7):

Tabla 7: Secuencias ejemplares incorporadas en la estructura génica MIR

Secuencia generadora de miARN (SEQ ID NO:)	Estructura MIR (SEQ ID NO:)	Construcción incorporada (SEQ ID NO:)
Gemini 1 (SEQ ID NO: 1)	MON1 (SEQ ID NO: 155)	<i>Gemini1/MON1</i> (SEQ ID NO: 156)
Gemini 4 (SEQ ID NO: 19)	MON5 (SEQ ID NO: 157)	<i>Gemini4/MON5</i> (SEQ ID NO: 158)
Gemini 7 (SEQ ID NO: 37)	MON13 (SEQ ID NO: 159)	<i>Gemini7/MON13</i> (SEQ ID NO: 160)
PepMV5 (SEQ ID NO: 127)	MON18 (SEQ ID NO: 161)	<i>PepMV5/MON18</i> (SEQ ID NO: 162)
Gemini 6 (SEQ ID NO: 31)	miR159a (SEQ ID NO: 163)	<i>Gemini6/miR159a</i> (SEQ ID NO: 164)
PepMV6 (SEQ ID NO: 141)	miR167g (SEQ ID NO: 165)	<i>PepMV6/miR167g</i> (SEQ ID NO: 166)
Gemini 2 (SEQ ID NO: 7)	MON13 (SEQ ID NO: 159)	<i>Gemini2/MON13</i> (SEQ ID NO: 367)
Gemini 3 (SEQ ID NO: 13)	MON1 (SEQ ID NO: 155)	<i>Gemini3/MON1</i> (SEQ ID NO: 368)
Gemini 5 (SEQ ID NO: 25)	miR159a (SEQ ID NO: 163)	<i>Gemini5/miR159a</i> (SEQ ID NO: 369)
PepMV1 (SEQ ID NO: 71)	miR159a (SEQ ID NO: 163)	<i>PepMV1/miR159a</i> (SEQ ID NO: 363)
PepMV2 (SEQ ID NO: 85)	MON5 (SEQ ID NO: 157)	<i>PepMV2/MON5</i> (SEQ ID NO: 364)
PepMV3 (SEQ ID NO: 99)	MON13 (SEQ ID NO: 159)	<i>PepMV3/MON13</i> (SEQ ID NO: 365)
PepMV4 (SEQ ID NO: 113)	MON1 (SEQ ID NO: 155)	<i>PepMV4/MON1</i> (SEQ ID NO: 366)
TospoL1-1 (SEQ ID NO: 43)	miR167g (SEQ ID NO: 165)	<i>TospoL1-1/miR167g</i> SEQ ID NO: 370)
TospoL1-2 (SEQ ID NO: 47)	MON1 (SEQ ID NO: 155)	<i>TospoL1-2 /MON1</i> (SEQ ID NO: 371)
TospoM2 (SEQ ID NO: 55)	MON1 (SEQ ID NO: 155)	<i>TospoM2/MON1</i> (SEQ ID NO: 372)
TospoM3 (SEQ ID NO: 59)	MON13 (SEQ ID NO: 159)	<i>TospoM3/MON13</i> (SEQ ID NO: 373)
TospoS2 (SEQ ID NO: 63)	MON5 (SEQ ID NO: 157)	<i>TospoS2/MON5</i> (SEQ ID NO: 374)
TospoS3 (SEQ ID NO: 67)	MON13 (SEQ ID NO: 159)	<i>TospoS3/MON13</i> (SEQ ID NO: 375)

- 15 Pueden utilizarse otras secuencias generadoras de miARN seleccionadas, por ejemplo, entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-154 o de las SEQ ID NO: 169-362 o partes de las mismas, con secuencias estructurales MIR, por ejemplo, MON1 de soja, MON5 de soja, MON13 de arroz, MON18 de maíz, miR159a de maíz o miR167g de maíz (SEQ ID NO: 155, 157, 159, 161, 163 o 165) para crear construcciones generadoras de miARN eficaces adicionales. Adicionalmente, las secuencias estructurales MIR pueden modificarse, por ejemplo, remplazando la parte de la
- 20 secuencia de la secuencia estructural derivada de plantas que especifica un miARN con una secuencia derivada de virus o artificial (por ejemplo, consenso) seleccionada, y/o puede acortarse, por ejemplo, puede hacerse una eliminación en el extremo 3' y/o 5', por ejemplo, como se refleja en las secuencias generadoras de miARN y las partes estructurales MIR de las SEQ ID NO: 158, 160, 162, 164, 166, 363, 364, 365, 367, 369, 370, 373, 374 y 375, descritas a continuación.
- 25 Se ensayaron individualmente oligómeros de 21 unidades identificados de las SEQ ID NO: 169-362, por ejemplo, entre o de las SEQ ID NO: 1-154, o dos o más de una vez mientras están presentes en un casete de expresión, para la eficacia en plantas de tomate transgénicas contra virus apropiados tales como TYLCV y TSWV. Se expresan múltiples oligómeros de 21 unidades eficaces en un casete transgénico usando una estructura de ARNip policistrónica o de fase (por ejemplo, figura 8). Los resultados de los ensayos de resistencia a virus de dichos
- 30 ensayos de oligómeros de 21 unidades se proporcionan en el ejemplo 7.

Una vez identificados los miARN antiviricos eficaces, se desplegaron múltiples miARN como un único rasgo transgénico, para conseguir resistencia a múltiples virus en plantas transgénicas. Esto se consigue fusionando uno o más genes MIR modificados por ingeniería descritos anteriormente juntos (por ejemplo, para crear las SEQ ID NO: 156, 158, 160, 162, 164, 166, 363-375), o usando un ta-ARNip o una estructura génica de ARNip progresivo que puede aportar múltiples secuencias antiviricas de ~21 nt (por ejemplo, figura 8). Las últimas estrategias se consiguen mediante una nueva ronda de síntesis génica para remplazar los ARNip de tipo silvestre con las secuencias antiviricas de 21 nt eficaces en la estructura de ta-ARNip o ARNip progresivo.

Ejemplo 6

Complementación de resistencia basada en ARN

La estrategia de resistencia mediada por ARN utilizando ARNbc o miARN puede complementarse colocando secuencias antiviricas, por ejemplo, las que codifican una proteína en el bucle de una secuencia codificante de ARNbc, o insertando una secuencia que codifica un ARNbc o miARN eficaz en un intrón de un casete de expresión de polipéptido (ARNbc intrónico/miARN; Frizzi y col., 2008) (por ejemplo, figura 9). Por ejemplo, puede expresarse una o más proteínas víricas tales como la proteína de la cubierta y/o la replicasa en una planta transgénica que también expresa un ARNbc, miARN o ARNip eficaz, sin el uso de un casete transgénico adicional, insertando la secuencia codificante de proteína en el bucle de una ARNbc. También puede emplearse una secuencia que codifica un aptámero peptídico que interfiere con la replicación del geminivirus (por ejemplo, López-Ochoa y col., 2006).

Por tanto, pueden expresarse secuencias artificiales junto con el ARNbc, miARN o ARNip para aumentar el fenotipo resistente a virus. Por ejemplo, puede usarse un bucle de nucleótidos artificial modificado por ingeniería del genoma de tospovirus. El genoma de tospovirus (ARNmc) comprende una estructura de "franja" debido a la presencia de repeticiones terminales conservadas de 8-11 nt en ambos extremos de cada componente del genoma. Estas repeticiones terminales de cada componente del genoma (SEQ ID NO: 167-168), por ejemplo, de GBNV (virus de la necrosis de las yemas del cacahuete) o CaCV (virus de la clorosis de *Capsicum*), pueden fusionarse y usarse como parte de una secuencia formadora de bucle en una construcción de transformación de plantas. Dicha secuencia artificial puede comprender, por ejemplo, las SEQ ID NO: 376-378 o la SEQ ID NO: 455, y puede servir como sustrato artificial que compite por la transcriptasa inversa, puede impedir la circularización apropiada de los componentes del genoma vírico de replicación, pueden generar por sí mismos segmentos de nucleótidos eficaces mediante iARN, o uno o más de los anteriores, impidiendo de esta manera el ensamblaje de virión.

La figura 16 demuestra que la inclusión de secuencias terminales de tospovirus en una construcción para generar ARNbc provoca resistencia medible a un virus tal como CaCV. En la construcción ensayada, las SEQ ID NO: 376-378, que comprenden por sí mismas la SEQ ID NO: 168, se fusionaron para crear la SEQ ID NO: 455 (es decir, las pb 1-217 de la SEQ ID NO: 455 comprenden la SEQ ID NO: 376; las pb 248-303 comprenden la SEQ ID NO: 377 y las pb 304-369 comprenden la SEQ ID NO: 378). La construcción se ensayó tanto en la orientación sentido como en la orientación anti-sentido, y se comparó el nivel de resistencia a virus con el demostrado por una planta de tomate de control, no transgénica, pero por lo demás isogénica.

Las secuencias que codifican, por ejemplo, la proteína de la cubierta o la replicasa, así como secuencias artificiales descritas anteriormente, pueden incluirse dentro de una secuencia intrónica también. Por tanto, pueden destacarse múltiples modos de acción modificando por ingeniería un casete de expresión individual (por ejemplo, figura 9) o más de un casete de expresión.

Ejemplo 7

Resultados de ensayos de resistencia a virus ejemplares usando miARN modificados por ingeniería

Se ensayaron las construcciones productoras de miARN modificadas por ingeniería enumeradas en la tabla 7 para la eficacia. Los resultados de bioensayo para los ensayos de geminivirus y potexvirus se muestran en las tablas 8-9. Se observó resistencia a virus debido a la expresión de miARN, y correlación con la expresión y el apropiado procesamiento de un transcrito transgénico dado. Por ejemplo, para la SEQ ID NO: 166, no se observó procesamiento apropiado de PepMV6/mir167g, ni se observó resistencia a virus para esta construcción, que se correlaciona por tanto con la producción de miARN que correlaciona por tanto la producción de miARN con la resistencia a virus en plantas R₁ transgénicas. Respecto a los experimentos con tospovirus, se observó expresión y procesamiento apropiado de los transcritos de las SEQ ID NO: 370, 371, 373 y 375, dirigidas, respectivamente, a los genes RdRP, RdRP, NsM, y N. Las plantas R₁ CP4 positivas presentaban síntomas reducidos cuando se infectaban con TSWV. Para las SEQ ID NO: 372 y 374, dirigidas, respectivamente, a los genes NsM y N, no se observó procesamiento apropiado de miARN, y no se observó reducción en los síntomas.

Los miARN sintéticos fueron más eficaces contra PepMV, y proporcionaron síntomas de infección por virus retardados o reducidos contra geminivirus y tospovirus. Las construcciones pueden combinarse en casetes de miARN apilados para inhibir de forma sinérgica los virus diana. Como pueden expresarse múltiples miARN a partir de un único casete de expresión, pueden quererse construcciones que expresan, por ejemplo, 8 o 10 miARN antiviricos (como se muestra en la figura 10A-10B). Como estrategia adicional, pueden insertarse casetes de expresión de miARN antiviricos como la secuencia de "bucle" (por ejemplo, la figura 9) de un casete de expresión de

ARNbc, para combinar los mecanismos de ARNbc y miARN para el control de virus (véase la figura 10C).

Tabla 8: Resultados de los ensayos de resistencia a geminivirus utilizando secuencias modificadas por ingeniería incorporadas en estructuras génicas MIR

Construcción incorporada (SEQ ID NO)	miARN	Expresión ^a	% de resistencia a virus ^b				Región diana
			TYLCV	ToLCNDV	PepGMV	PHYW	
SEQ ID NO: 156	Gemini1/MON1	sí	16 ± 16 %	31 ± 17	37 ± 13	29 ± 16	Rep
SEQ ID NO: 367	Gemini 2/MON13	sí	34 ± 27	27 ± 14	29 ± 4	32 ± 16	CP
SEQ ID NO: 368	Gemini3/MON1	sí	13 ± 8	23 ± 7	34 ± 11	14 ± 19	CP
SEQ ID NO: 158	Gemini4/MON5	no	-	-	-	-	CP
SEQ ID NO: 369	Gemini5/miR159a	sí	14 ± 19	30 ± 20	51 ± 16	28 ± 37	C2/C3
SEQ ID NO: 164	Gemini6/miR159a	sí	20 ± 13	23 ± 12	36 ± 10	23 ± 19	Rep
SEQ ID NO: 160	Gemini7-1/MON13	sí	7	28	40	11	CP

^a procesamiento apropiado de miARN detectado en plantas transgénicas
^b porcentaje promedio ± d.t. de segregantes R1 CP4-positivos para resistencia al *virus del rizado foliar amarillo del tomate* (TYLCV), el *virus New Delhi del rizado foliar del tomate* (ToLCNDV), el *virus del mosaico dorado del pimiento* (PePGMV) o el *virus de las vena amarillas del pimiento huasteco* (PHYVV).

5 **Tabla 9: Resultados de los ensayos de resistencia al virus del mosaico del pepino (PepMV) utilizando secuencias modificadas por ingeniería incorporadas en estructuras génicas MIR**

Construcción incorporada (SEQ ID NO)	miARN	Expresión ^a	% de resistencia a virus ^b	Región diana
363	PepMV1/miR159a	sí	No ensayado	RdRP
364	PepMV2/ MON5	sí (débil)	10 ± 14	RdRP
365	PepMV3/ MON13	sí	100 ± 0	RdRP
366	PepMV4/ MON1	sí (débil)	44 ± 52	TGBp1
162	PepMV5/ MON18	sí	99 ± 3	TGBp2
166	PepMV6/ miR167g	no	-	TGBp3

^a procesamiento apropiado de miARN detectado en plantas transgénicas
^b porcentaje promedio ± d.t. de segregantes R1 CP4-positivos para resistencia a PepMV

Referencias

10 Las referencias enumeradas a continuación complementan, explican, proporcionan antecedentes o muestran metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en el presente documento.

15 Patentes de Estados Unidos 4.536.475; 4.693.977; 4.886.937; 4.940.838; 4.959.317; 5.015.580; 5.107.065; 5.110.732; 5.231.020; 5.262.316; 5.283.184; 5.302.523; 5.384.253; 5.464.763; 5.464.765; 5.501.967; 5.508.184; 5.527.695; 5.459.252; 5.538.880; 5.550.318; 5.563.055; 5.591.616; 5.693.512; 5.633.435; 5.759.829; 5.780.708; 5.824.877; 5.837.848; 5.850.019; 5.981.840; 6.118.047; 6.160.208; 6.229.067; 6.384.301; 6.399.861; 6.403.865; 6.852.907.

20 Publicaciones de Estados Unidos 2002/0048814; 2003/017596; 2003/018993; 2004/0029283; 2005/0120415; 2005/144669; 2006/0200878; 2006/0174380; 2007/0259785; 2007/0300329; 2008/0066206.

Allen y col., Cell 121:207-221, 2005.

Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990.

20 Ambros y col., RNA 9:277-279, 2003.

Bartel, Cell 116:281-297, 2004.

Bevan, Nature 304:184-187, 1983.

Boulton, "Agrobacterium-Mediated Transfer of Geminiviruses to Plant Tissues," in "Methods in Molec. Biol., vol. 49: Plant Gene Transfer and Expression Protocols, ed. H. Jones, Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

25 Brodersen and Voinnet, Trends Genetics, 22:268-280, 2006.

Broothaerts y col., Nature, 433:629-633, 2005.

Brutlag y col., Comp. Chem. 17: 203-207, 1993.

Bucher y col., J. Gen. Virol. 87:3697-3701, 2006.

Christopher y Rajam, Pl. Cell Tiss. Org. Cult. 46:245-250, 1996.

30 Chuang y col., PNAS, 97:4985-4990, 2000.

- Cotillon y col., *Arch. Virol.* 147:2225-2230, 2002.
 Dellaporta y col., *Stadler Symposium* 11:263-282, 1988.
 Elbashir y col., *Genes & Devel.*, 15:188-200, 2002.
 Frizzi y col., *Plant Biotechnol. J.*, 6:13-21, 2008.
 5 Griffiths-Jones, *Nucleic Acids Res.*, 31:439-441, 2003.
 Grimsley, *Physiol. Plantarum*, 79:147-153, 1990.
 Gruber y col., In: *Vectors for Plant Transformation*, Glick y Thompson (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, 89-119, 1993.
 Hamilton y Baulcombe, *Science*, 286:950-952, 1999.
 10 Hannon, *Nature* 418:244-251, 2002.
 Haymes y col., *Nucleic Acid Hybridization*, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985).
 Herrera-Estrella *Nature* 303:209-213, 1983.
 Hirel y col., *Plant Molecular Biology*, 20:207-218, 1992.
 Horsch y col., *Science*, 227:1229, 1985.
 15 Ikatu y col., *Bio/Technol.* 8:241-242, 1990.
 Jefferson y col., *EMBO J.* 6:3901-3907, 1987.
 Jones-Rhoades y col. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:19-53, 2006.
 Kaeppler y col., *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
 Katz y col., *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714, 1983.
 20 Kim, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:376-385, 2005.
 Klee, *Bio/Technol.* 3:637-642, 1985.
 Kumar y col., *Plant Dis.* 77:938-941, 1993.
 Lin y col., *International Symposium (2006) Ecological and Environmental Biosafety of Transgenic Plants*, 209-220, 2006.
 25 Liu y col., *Plant Cell Rep.* 9:360-364, 1990.
 López y col., *Arch. Virol.* 150:619-627, 2005.
 López-Ochoa y col., *J. Virol.*, 80:5841, 2006.
 McCormick, *Plant Tissue Culture Manual B6:1-9*, 1991.
 Miki y col., In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick and Thompson (Eds.), CRC Press, 67-88, 1993.
 30 Moloney y col., *Plant Cell Reports*, 8:238, 1989.
 Niu y col., *Nature Biotechnology* 24:1420-1428, 2006.
 Odell y col., *Nature* 313:810-812, 1985.
 Omirulleh y col., *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993.
 35 Ow y col., *Science* 234:856-859, 1986.
 Padidam y col., *J. Gen. Virol.* 73:1609-1616, 1999.
 Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
 Praveen y col., *Journal of Plant Interactions*, 2:4, 213-218, 2007.
 Ramesh y col., *Oligonucleotides*, 17(2):251-257, 2007.
 40 Redenbaugh y col. in "Safety Assessment of Genetically Engineered Fruits and Vegetables", CRC Press, 1992.
 Reynolds y col., *Nat Biotechnol.* 22:326-30, 2004.
 Safarnejad y col., *Arch. Virol.* 154:457-467, 2009.
 Sambrook y col., (ed.), *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 Shepherd y col., *Plant Sci.* 176, 1-11, 2009.
 45 Sutcliffe y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 75:3737-3741, 1978.
 Tang, *Trends Biochem. Sci.*, 30:106-14, 2005.
 Tomari y Zamore, *Genes & Dev.*, 19:517-529, 2005.
 Tomari y col. *Curr. Biol.*, 15:R61-64, 2005.
 Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509, 1989.
 50 Wesley y col., *Plant. J.*, 27:581-590, 2001.
 Documentos WO 98/05770; WO 99/053050; WO 99/049029; WO 94/01550; WO 05/019408.
 Zrachya y col., *Transgenic Rev.* 16:385-398, 2006.

REIVINDICACIONES

1. Una planta transgénica de tomate o una semilla transgénica de tomate, o una célula vegetal transgénica de tomate que comprende resistencia a especies de virus de plantas de al menos dos de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae*, en la que la resistencia se proporciona por al menos dos modos diferentes de acción seleccionados de (a) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce ARNbc interferente con la expresión de un gen de la proteína de la envuelta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus o un gen de la replicación del virus; (b) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN interferente con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus o un gen de la replicación del virus; y (c) expresión de una secuencia terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión, en el que la resistencia proporcionada contra al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia de repetición terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión de tospovirus, en el que además la secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus se selecciona de una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455.
2. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 1, en la que
- (i) la resistencia se proporciona por al menos tres modos diferentes de acción; o
 - (ii) la resistencia comprende resistencia contra un begomovirus, tospovirus o potexvirus; o
 - (iii) la resistencia proporcionada contra al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una construcción de fusión de ARNbc; o
 - (iv) la construcción de ácido nucleico que produce ARNbc comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-455; o
 - (v) la resistencia contra un begomovirus o tospovirus se proporciona por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado; o
 - (vi) el miARN comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141; o
 - (vii) la planta comprende además una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 156, 160, 162, 164, 363-371, 373 y 375; o
 - (viii) la planta comprende además una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127, 141 y 379-454.
3. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 1, en la que
- (a) la resistencia contra un begomovirus se proporciona por la expresión de ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de la replicación de begomovirus;
 - (b) la resistencia contra un tospovirus o un potexvirus se proporciona por la expresión de un ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus o un gen de la proteína del movimiento del virus;
 - (c) la resistencia contra un potexvirus se proporciona por la expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN; o
 - (d) la resistencia contra un begomovirus o un tospovirus se proporciona por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado.
4. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 1, en la que la resistencia proporcionada contra al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona inhibiendo el ensamblaje del virión, en la que el ensamblaje del virión se inhibe por una secuencia comprendida dentro de una construcción de ácido nucleico que comprende un primer segmento de ácido nucleico y un segundo segmento de ácido nucleico, en la que el primer y el segundo segmento son repeticiones sustancialmente invertidas entre sí y están unidos juntas por un tercer segmento de ácido nucleico, y en la que el tercer segmento comprende al menos una secuencia terminal de un segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión.
5. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 4, en la que
- (i) el tercer ácido nucleico comprende una secuencia terminal genómica de tospovirus seleccionada de: una secuencia terminal de un segmento genómico L de CaCV o de GBNV, una secuencia terminal de un segmento genómico M de CaCV o de GBNV, una secuencia terminal de un segmento genómico S de CaCV o de GBNV, una secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455; o
 - (ii) el tercer ácido nucleico comprende una secuencia de repetición terminal del segmento genómico de tospovirus que comprende la SEQ ID NO: 167 o SEQ ID NO: 168.

6. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 2(ii), en la que
- (i) los virus se seleccionan de:
 - (a) al menos uno de TYLCV, ToSLCV, ToLCNDV, PHYVV, PepGMV,
 - (b) uno o más de TSWV, GBNV, CaCV, y
 - (c) PepMV; o
 - (ii) el potexvirus es virus del mosaico del pepino; o
 - (iii) el begomovirus es TYLCV, ToLCNDV, PHYVV, ToSLCV o PepGMV; o
 - (iv) el tospovirus es CaCV, GBNV o TSWV; o
 - (v) el begomovirus es TYLCV y el potexvirus es virus del mosaico del pepino; o el tospovirus es TSWV y el potexvirus es virus del mosaico del pepino; o en la que el begomovirus es TYLCV, el potexvirus es virus del mosaico del pepino y el tospovirus es TSWV.
7. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 1, que comprende
- (a) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378 y 455;
 - (b) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141; o
 - (c) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378 y 455.
8. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 1, en la que la planta comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga que confiere resistencia a virus seleccionada de
- (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de ARN que es complementaria a todo o a una parte de un primer gen diana;
 - (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende múltiples copias de al menos un segmento de ADN anti-sentido que es anti-sentido para al menos un segmento de al menos un primer gen diana;
 - (c) una secuencia de ácido nucleico que comprende un segmento de ADN sentido de al menos un gen diana;
 - (d) una secuencia de ácido nucleico que comprende múltiples copias de al menos un segmento de ADN sentido de un gen diana;
 - (e) una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN para suprimir un gen diana formando ARN bicatenario y que comprende al menos un segmento que es anti-sentido para todo o una parte del gen diana y al menos un segmento de ADN sentido que comprende un segmento de dicho gen diana;
 - (f) una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN para suprimir un gen diana formando un único ARN bicatenario que comprende múltiples segmentos de ADN anti-sentido en serie que son anti-sentido para al menos un segmento del gen diana y múltiples segmentos de ADN sentido en serie que comprenden al menos un segmento de dicho gen diana;
 - (g) una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN para suprimir un gen diana formando múltiples hebras dobles de ARN y comprende múltiples segmentos que son antisentido para al menos un segmento de dicho gen diana y múltiples segmentos de ADN sentido del gen diana, y en la que dichos múltiples segmentos de ADN anti-sentido y dichos múltiples segmentos de ADN sentido están dispuestos en una serie de repeticiones invertidas;
 - (h) una secuencia de ácido nucleico que comprende nucleótidos derivados de un miARN de plantas; y
 - (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia terminal de tospovirus que interfiere con el ensamblaje del virión.
9. La planta, semilla o célula vegetal transgénica de tomate de la reivindicación 7, en la que
- (i) la planta comprende además un rasgo de resistencia a virus de plantas no transgénicas; o
 - (ii) la expresión de al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga provoca resistencia a dos o más virus seleccionados de: tospovirus, begomovirus y potexvirus.
10. Un procedimiento para conferir resistencia en una planta de tomate a especies de virus de plantas de al menos dos de las familias *Geminiviridae*, *Bunyaviridae* y *Flexiviridae*, comprendiendo el procedimiento transformar la planta con y expresar en la planta al menos dos secuencias de ácido nucleico que proporcionan de forma colectiva resistencia a dichas al menos dos especies de virus de plantas, en el que se utilizan al menos dos modos diferentes de acción para proporcionar dicha resistencia, que comprende (a) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce ARNbc interferente con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus y un gen de la replicación del virus; (b) expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN interferente con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus, un gen de la proteína del movimiento del virus o un gen de la replicación del virus; y (c) expresión de una secuencia terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión, en el que la resistencia proporcionada contra al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por la expresión de una secuencia de

- repetición terminal del segmento genómico de tospovirus que inhibe el ensamblaje del virión de tospovirus, en el que además la secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus se selecciona de una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 167, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 168, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 376, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 377, una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 378 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 455.
- 5
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que
- 10
- (i) la resistencia comprende resistencia contra un begomovirus, tospovirus o potexvirus; o
 - (ii) la resistencia proporcionada contra al menos una de las especies de virus de plantas se proporciona por una construcción de fusión de ARNbc; o
 - (iii) la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-455; o
 - (iv) la resistencia contra un begomovirus o un tospovirus se proporciona por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado; o
 - (v) el miARN comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141; o
 - (vi) la secuencia de ácido nucleico comprende al menos un elemento de supresión génica para suprimir al menos un primer gen diana.
- 15
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que:
- 20
- (a) la resistencia contra un begomovirus se proporciona por la expresión de ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de la replicación de begomovirus;
 - (b) la resistencia contra un tospovirus o un potexvirus se proporciona por la expresión de un ARNbc que interfiere con la expresión de un gen de la proteína de la cubierta del virus o un gen de la proteína del movimiento del virus;
 - (c) la resistencia contra un potexvirus se proporciona por la expresión de una construcción de ácido nucleico que produce miARN; o
 - (d) la resistencia contra un begomovirus o un tospovirus se proporciona por una secuencia codificada por un casete de expresión de miARN apilado.
- 25
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la resistencia proporcionada contra al menos una de dichas especies de virus de plantas se proporciona inhibiendo el ensamblaje del virión, en el que el ensamblaje del virión se inhibe por una secuencia comprendida dentro de una construcción de ácido nucleico que comprende un primer segmento de ácido nucleico y un segundo segmento de ácido nucleico, en el que el primer y el segundo segmento son repeticiones sustancialmente invertidas entre sí y están unidos juntos por un tercer segmento de ácido nucleico, y en el que el tercer segmento comprende al menos una secuencia terminal de un segmento genómico de tospovirus, cuya expresión inhibe el ensamblaje del virión.
- 30
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que
- 35
- (i) el tercer ácido nucleico comprende una secuencia terminal genómica de tospovirus seleccionada de: una secuencia terminal de un segmento genómico L de CaCV o de GBNV, una secuencia terminal de un segmento genómico M de CaCV o de GBNV, una secuencia terminal de un segmento S de CaCV o de GBNV y una secuencia de repetición terminal genómica de tospovirus, o
 - (ii) la secuencia terminal o la secuencia de repetición terminal comprende la SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 376, SEQ ID NO: 377 o SEQ ID NO: 378.
- 40
15. El procedimiento de la reivindicación 11(i), en el que los virus se seleccionan de:
- 45
- (a) uno o más de TYLCV, ToSLCV, ToLCNDV, PHYVV, PepGMV,
 - (b) uno o más de TSWV, GBNV, CaCV, y
 - (c) PepMV.
16. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende expresar en la planta:
- 50
- (a) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378 y 455,
 - (b) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 379-454 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141, o
 - (c) al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 85, 99, 113, 127 y 141 y al menos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 167, 168, 376, 377, 378, y 455.

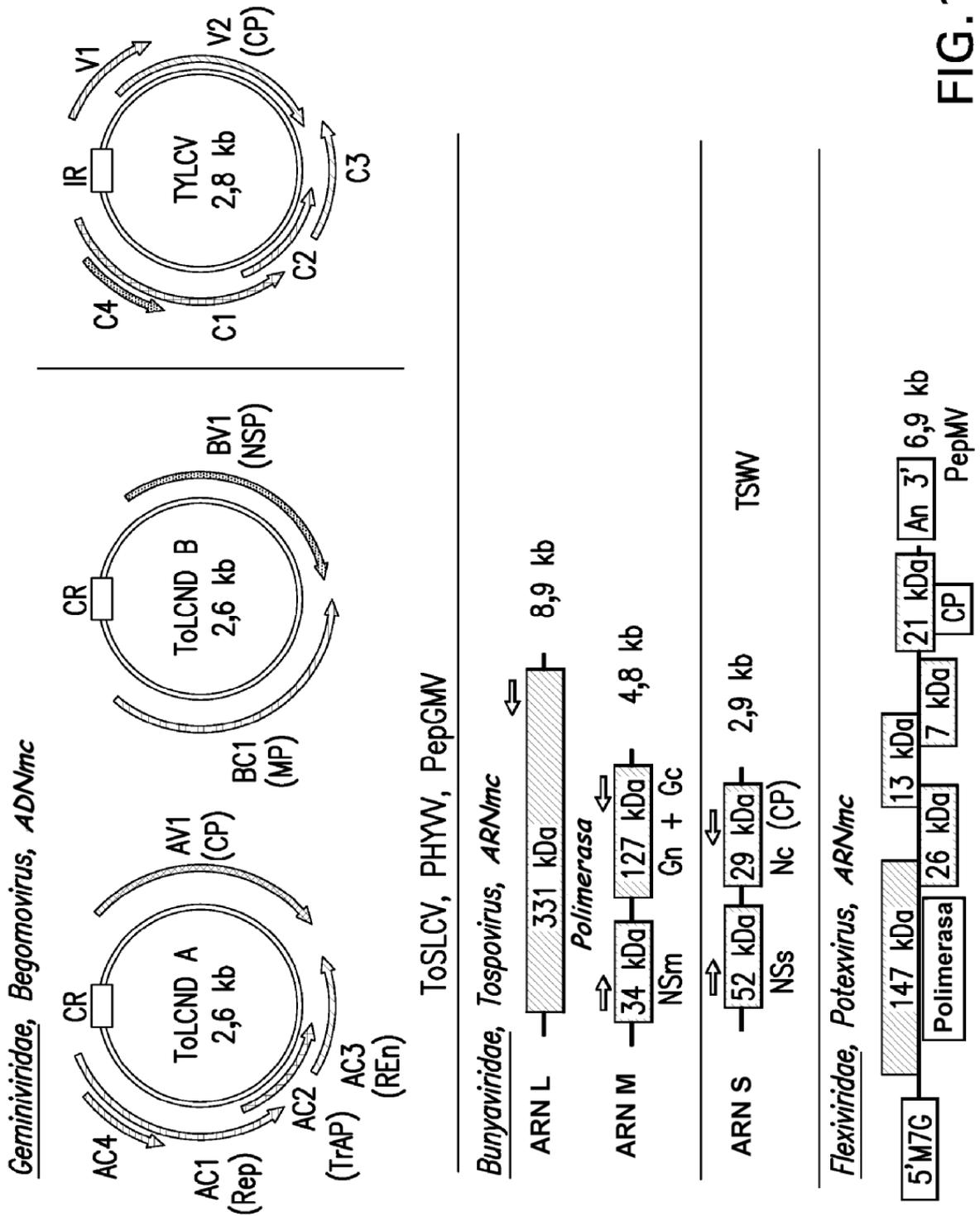


FIG.1

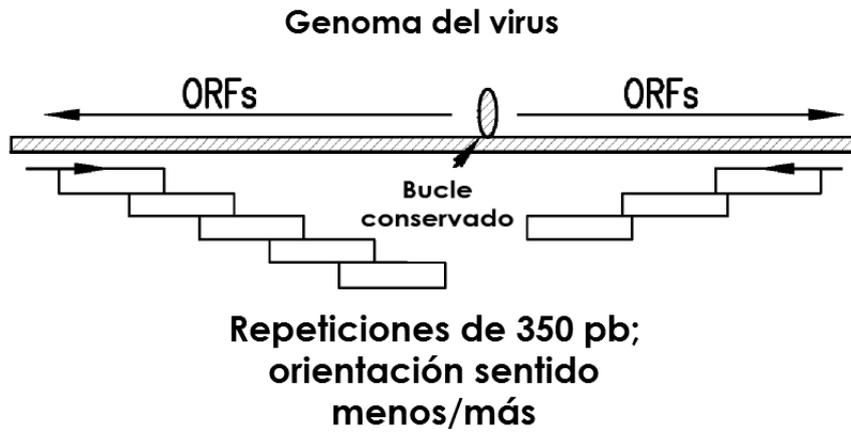


FIG.2A

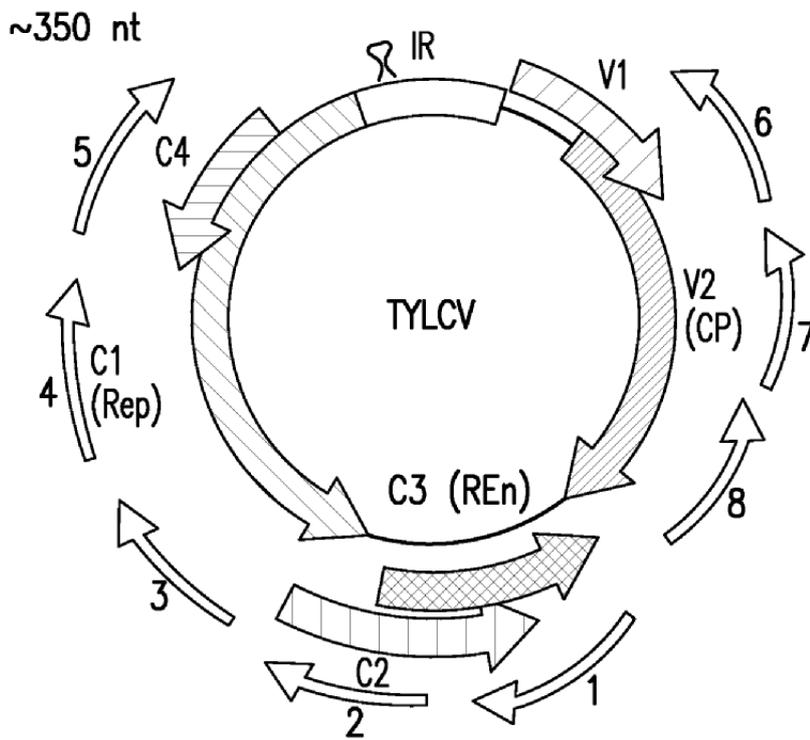


FIG.2B

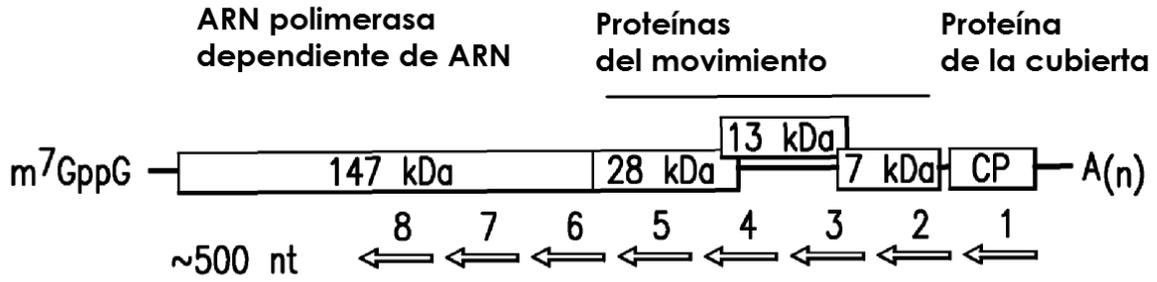


FIG.2C

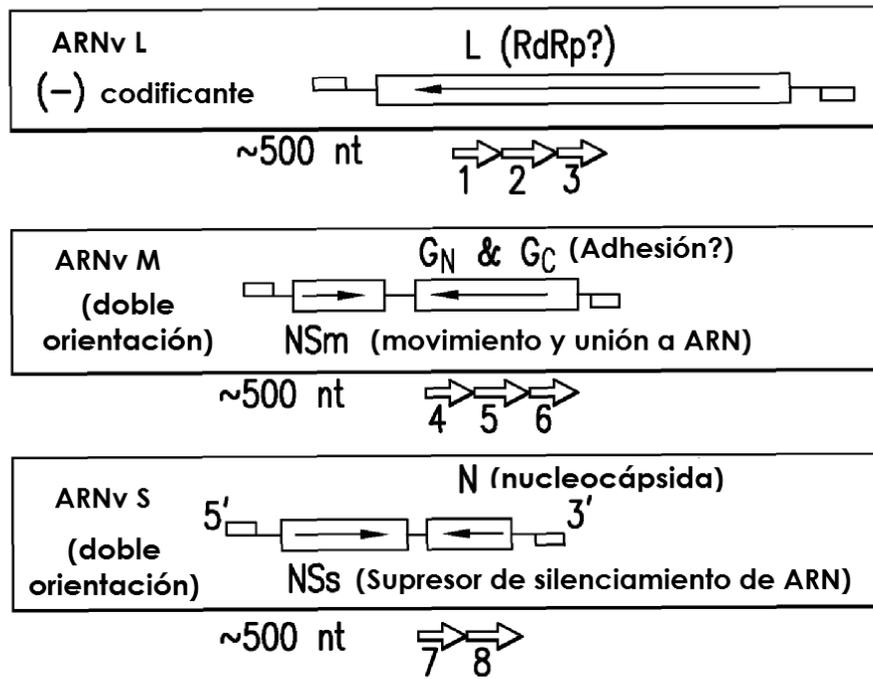


FIG.2D

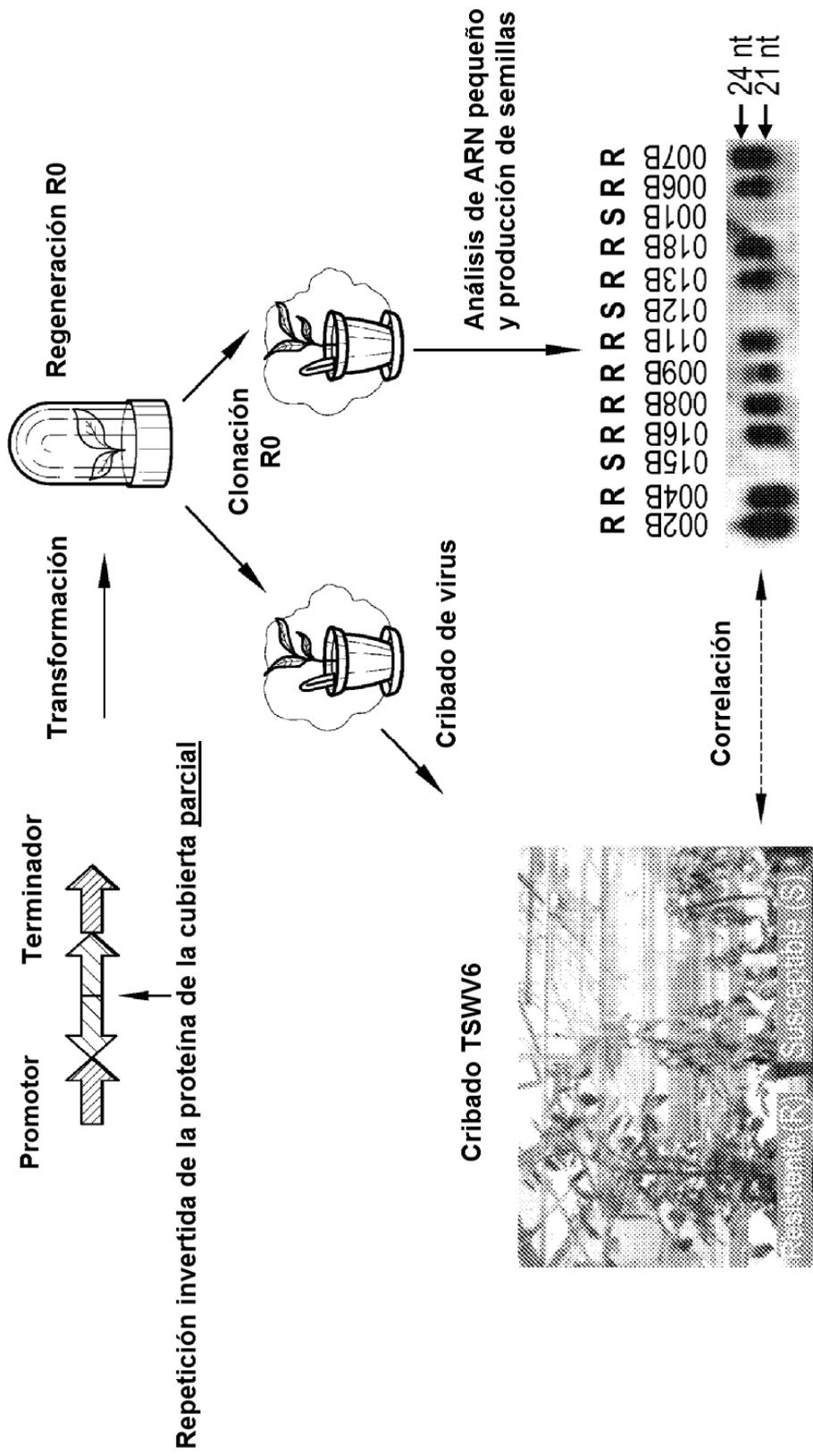


FIG.3

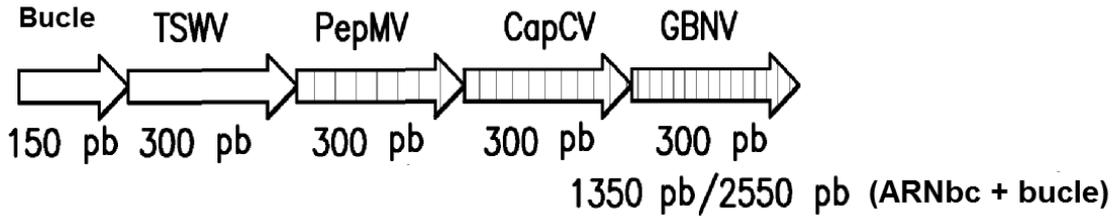
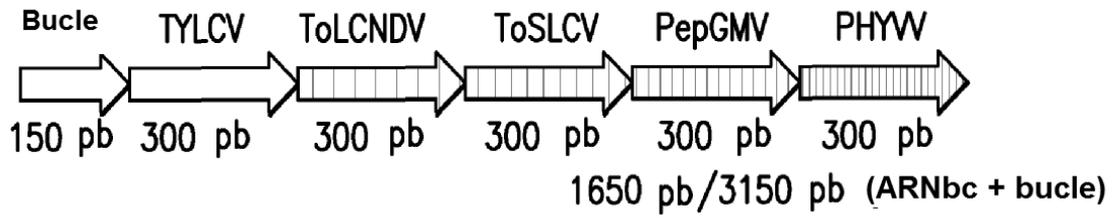


FIG.4A

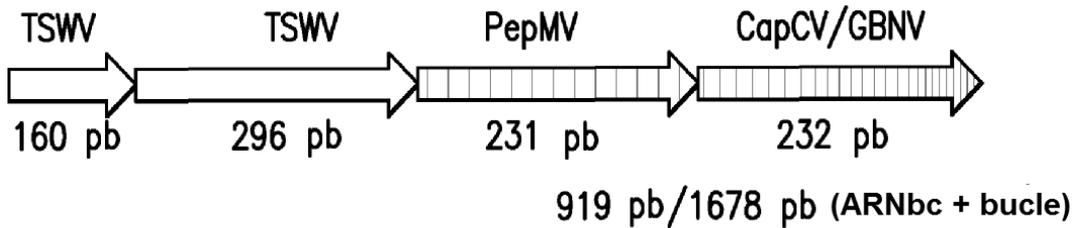
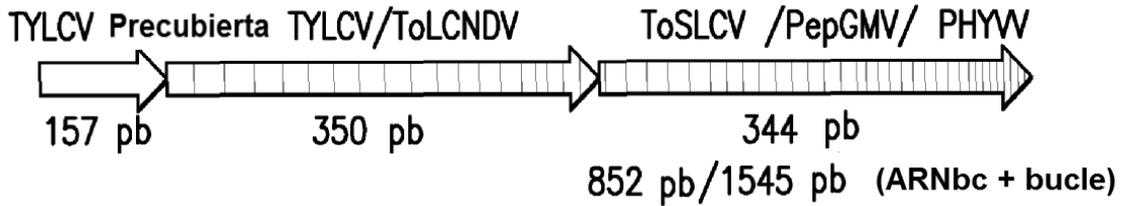


FIG.4B

ES 2 651 909 T3

Gemini1: 5'TGTCATCAATGACGTTGTTACT3' $\Delta\Delta G$: 2.4 (Dirigido a Rep)
 TYLCV(AF024715) 5' GCGTGGTACAACGTCATTGATGACGTAGACC3'
 ToLCNDV(U15015) 5' GCCTGGTACAACGTCATTGATGACGTTGATC3'
 ToSLCV(AF130415) 5' GCGGAATACAACGTCATTGATGACATCACTC3'
 PepGMV(U57457) 5' GTGGAGTATAACGTCATTGATGATATCACGC3'
 PHYVV(X70418) 5' GCATGGTATAACGTCATTGATGACATCCCTC3'
 miARN Gemini1 3' -TCATGTTGCAGTAACTACTGT-5'

Gemini2: 5'TGGACTTTACATGGGCCTTCA3' $\Delta\Delta G$: 0.9 (Dirigido a CP)
 TYLCV(AF024715) 5' GGATGTGAAGGCCCATGTAAGTCCAGTCTT3'
 ToLCNDV(U15015) 5' GGCTGTGAAGGCCCTTGTAAAGTGCAGTCCT3'
 ToSLCV(AF130415) 5' GGCTGTGAAGGCCCATGTAAGTCCAGTCTT3'
 PepGMV(U57457) 5' GGATGTGAAGGCCCATGTAAGTCCAGTCTT3'
 PHYVV(X70418) 5' GGTTGTGAAGGTCCTGTAAGGTTCAATCGT3'
 miARN Gemini2 3' -TCTTCGGGTACATTTCCAGGT-5'

Gemini3: 5'TACATGCCATATACAATAGCA3' $\Delta\Delta G$: 1.2 (Dirigido a CP)
 TYLCV(AF024715) 5' CCTTGTTATTGTATATGGCATGTACGCATGC3'
 ToLCNDV(U15015) 5' CATTAAATGTTGTATATGGCCTGTACTCACGC3'
 ToSLCV(AF130415) 5' CCCTGTTATTGTATATGGCATGTACTCATGC3'
 PepGMV(U57457) 5' CCCTGCTATTGTATATGGCATGTACACATGC3'
 PHYVV(X70418) 5' CGCTGTTATTGTATATGGCATGTACTCATGC3'
 miARN Gemini3 3' -TCGATAACATATACCGTACAT-5'

Gemini4: 5'TCATAGAAGTAGATCCGGATT3' $\Delta\Delta G$: -4.2 (Dirigido a CP)
 TYLCV(AF024715) 5' AAAATACGCATCTATTTCTATGATTCAATAT3'
 ToLCNDV(U15015) 5' AAAATCCGGATCTACTTTTATGATTCCGGCCA3'
 ToSLCV(AF130415) 5' AAGATCCGGATCTATTTTATGATTCCGGTAT3'
 PepGMV(U57457) 5' AAAATTCCAATCTATTTTATGATTCCGATAA3'
 PHYVV(X70418) 5' AAAATTCCGGTCTATTTTATGACTCGATAA3'
 miARN Gemini4 3' -TTAGGCCTAGATGAAGATACT-5'

Gemini5: 5'TTCCCCTGTGCGTGAATCCGT3' $\Delta\Delta G$: 0.7 (Dirigido a C2/C3)
 TYLCV(AF024715) 5' AATCATGGATTCACGCACAGGGGAATCATC3'
 ToLCNDV(U15015) 5' GATCACGGATTCACGCACAGGGGAATACATC3'
 ToSLCV(AF130415) 5' AACCATGGATTCACGCACAGGGGAGAGCATC3'
 PepGMV(U57457) 5' AATAATGGATTCACGCACAGGGGAGAGCATC3'
 PHYVV(X70418) 5' AACAATGGATTTACGCACGGGGTACCCATC3'
 miARN Gemini5 3' TGCCATAAGTGCCTGTCCCCTT-5'

FIG.5

ES 2 651 909 T3

Gemini6: 5' TTCCGCCTTTAATTTGGATTG3' $\Delta\Delta G$: 1.6 (Dirigido a Rep)
TYLCV(AF024715) 5' GCCCATTCAAATTAAAAGGGGAATCCCACT3'
ToLCNDV(U15015) 5' GCCGGTCATGATTAAAAGGTGGAATCCCACT3'
ToSLCV(AF130415) 5' GCCAGTTCAAATTAAAAGGGGAATCCGTCA3'
PepGMV(U57457) 5' GCCAGTTCAAATTAAAAGGGGGATACCATCA3'
PHYVV(X70418) 5' ACCAATTCAAATTAAAAGGTGGGATACCCACT3'
miARN Gemini6 3' -GTTAGGTTTAATTTCCGCCTT-5'

Gemini7: 5' TTACATGGGCCTTCACAGCCT3' $\Delta\Delta G$: -3.8 (Dirigido a CP)
TYLCV(AF024715) 5' CCCCGTGGATGTGAAGGCCCATGTAAGTCC3'
ToLCNDV(U15015) 5' CCAAGGGGCTGTGAAGGCCCTGTAAAGTGC3'
ToSLCV(AF130415) 5' CCAAGGGGCTGTGAAGGCCCATGTAAGTCC3'
PepGMV(U57457) 5' CCTAGAGGATGTGAAGGCCCATGTAAGTCC3'
PHYVV(U57457) 5' CCGAAAGGTTGTGAAGGTCCCTGTAAGTTC3'
miARN Gemini7 3' -TCCGACACTTCCGGGTACATT-5'

FIG. 5-1

ES 2 651 909 T3

Segmento L:

TospoL1-1: 5' TTTAGGCATCATATAGATAGC3' $\Delta\Delta G$: -1.7 (Dirigido a RdRP)
TSWV(D10066) 5' TTGGCTATTTATATGATGCCTAAATCACTGC3'
GBNV(AF025538) 5' CTAGCAATCTATATGATGCCTAAATCTTTGC3'
CapCV(DQ256124) 5' CTAGCAATCTATATGATGCCTAAATCACTCC3'
miARN TospoL1-1 3' -CGATAGATATACTACGGATTT-5'

TospoL1-2: 5' TGATTTAGGCATCATATAGAT3' $\Delta\Delta G$: -0.2 (Dirigido a RdRP)
TSWV(D10066) 5' TTGGCTATTTATATGATGCCTAAATCACTGC3'
GBNV(AF025538) 5' CTAGCAATCTATATGATGCCTAAATCTTTGC3'
CapCV(DQ256124) 5' CTAGCAATCTATATGATGCCTAAATCACTCC3'
miARN TospoL1-2 3' -TAGATATACTACGGATTTAGT-5'

Segmento M:

TospoM1: 5' TATCTATATTTTCCATCTACC3' $\Delta\Delta G$: 0.2 (Dirigido a GP)
TSWV(S48091) 5' TGTTGTAGACGGGAAATATAGATATGATA3'
GBNV(U42555) 5' TGAAGTAGATGGGAAATATAGATACTTTTA3'
CapCV(DQ256125) 5' AGAGGTTGATGGAAAATACAGATATCTTATA3'
miARN TospoM1 3' -CCATCTACCTTTTATATCTAT-5'

TospoM2: 5' TTAGTTTGCAGGCTTCAATTA3' $\Delta\Delta G$: 0.2 (Dirigido a NSm)
TSWV(S48091) 5' CATTCAATTGAAGCCTGCAAGCTGATAATTCC3'
GBNV(U42555) 5' CTCTAATTGAAGCATGCAAATTAATGATACC3'
CapCV(DQ256125) 5' CTTTGATTGAAGCATGCAAATTAATGATACC3'
miARN TospoM2 3' -TTTAACTTCGGACGTTTGATT-5'

TospoM3: 5' TTGCATGCTTCAATGAGAGCA3' $\Delta\Delta G$: -0.4 (Dirigido a NSm)
TSWV(S48091) 5' TCTCAGGCATTCATTGAAGCCTGCAAGCTGA3'
GBNV(U42555) 5' GCTGCTGCTCTAATTGAAGCATGCAAATTA3'
CapCV(DQ256125) 5' GCTGCTGCTTTGATTGAAGCATGCAAATTA3'
miARN TospoM3 3' -TCGAGAGTAACTTCGTACGTT-5'

FIG.6

Segmento S:

TospoS2: 5' TCGTCGTTAGACATGGTGT3' $\Delta\Delta G$: -1.6 (dirigido a N)
 TSWV(D00645) 5' ACGATCATCATGTCTAAGGTTAAGCTCACTA3'
 GBNV(U27809) 5' GTA AACACCATGTCTAACGTC AAGCAACTCA3'
 CapCV(DQ355974) 5' GTAAACACCATGTCTAACGTCAGGCAACTTA3'
 miARN TospS2 3' -TTTGTGGTACAGATTGCTGCT-5'

TospoS3: 5' TAGAAAGTTTTGAAGTTGAAT3' $\Delta\Delta G$: -1.0 (dirigido a N)
 TSWV(D00645) 5' GGTAGCATTCAACTTCAAGACTTTTTIGTCTG3'
 GBNV(U27809) 5' TCCCGGATTTAGCTTTAAAGCTTTCTATGAC3'
 CapCV(DQ355974) 5' TCCAGGATTCAACTTCAAGACATTTTATGAT3'
 miARN TospS3 3' -TAAGTTGAAGTTTTGAAAGAT-5'

FIG. 6-1

ES 2 651 909 T3

PepMV1: 5'TCTTCATTGTAGTTAATGGAG3' $\Delta\Delta G$: -0.4 (Dirigido a RdPR)

AY509926 5' ATATACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
AJ438767 5' ATTTACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
DQ000984 5' ATATACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
DQ000985 5' ATATACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGTT3'
AY509927 5' ATATACTCCATTAATTACAATGAAGAAAGGTT3'
EF480021 5' ATATACTCCATTAATTACAATGAAGAAAGGTT3'
AM491606 5' ATTTACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
AJ606360 5' ATTTACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
AJ606359 5' ATTTACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
AJ606361 5' ATTTACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
AF484251 5' ATTTACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
AM109896 5' ATTTACTCCATTAACTACAATGAAGAAAGGCT3'
EF599605 5' ATATACTCCATTAATTACAATGAAGAAAGGTT3'

miARN PepMV1 3'GAGGTAATTGATGTTACTTCT5'

PepMV2: 5'TTGAAGAGGAAAAGGTGGTT3' $\Delta\Delta G$: -2.5 (Dirigido a RdPR)

AY509926 5' GCGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AJ438767 5' GTGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
DQ000984 5' GCGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
DQ000985 5' GAGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AY509927 5' GAGCCAAACCATCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
EF480021 5' GAGCCAAACCATCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AM491606 5' GTGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AJ606360 5' GTGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AJ606359 5' GTGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AJ606361 5' GTGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AF484251 5' GTGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
AM109896 5' GTGCCAAACCACCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'
EF599605 5' GAGCCAAACCATCTTTTCCTTTTCCAAAGAGG3'

miARN PepMV2 3'TTGGTGGAAAAGGAGAAGGTT5'

FIG. 7A

ES 2 651 909 T3

PepMV3: 5'TCAATCATGCACCTCCAGTCG3' $\Delta\Delta G$: -2.5 (Dirigido a RdPR)

AY509926 5' CAACAAGACTGGAGGTGCATGATTGAAYTCT3'
AJ438767 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
DQ000984 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
DQ000985 5' CAACATGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
AY509927 5' CAACATGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
EF480021 5' CAACATGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
AM491606 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
AJ606360 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
AJ606359 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGGATTCT3'
AJ606361 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
AF484251 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
AM109896 5' CAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'
EF599605 5' CAACATGACTGGAGGTGCATGATTGAATTCT3'

miARN PepMV3 3'GCTGACCTCCACGTACTAACT5'

FIG. 7A-1

ES 2 651 909 T3

PepMV4: 5'TAAGTAGCAAGGCCTAGGTGA3' $\Delta\Delta G$: -2.2 (Dirigido a TGBp1)

AY509926 5'TAGGATCACCTAGGCCTTGTTATTTAGATAA3'
AJ438767 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTCTATTTAGATAA3'
DQ000984 5'TAGGATCACCTAGGCCTTGTACTTAGATAA3'
DQ000985 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTACTTAGATAA3'
AY509927 5'TAGGATCACCTAGGCCTTGTTATTTAGATAA3'
EF480021 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTACTTAGATAA3'
AM491606 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTCTATTTAGATAA3'
AJ606360 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTCTATTTAGATAA3'
AJ606359 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTCTATTTAGATAA3'
AJ606361 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTTATTTAGACAA3'
AF484251 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTCTATTTAGATAA3'
AM109896 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTTATTTAGACAA3'
EF599605 5'TAGGTTCACCTAGGCCTTGTACTTAGATAA3'

miARN PepMV4 3'AGTGGATCCGGAACGATGAAT5'

PepMV5: 5'TTTGGAAGTAAATGCAGGCTG3' $\Delta\Delta G$: -4.5 (Dirigido a TGBp2)

AY509926 5'GTTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAACAGC3'
AJ438767 5'GTTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAATAGC3'
DQ000984 5'GTTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAACAGC3'
DQ000985 5'ACTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAACAGT3'
AY509927 5'ACTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAACAGT3'
EF480021 5'ACTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAACAGT3'
AM491606 5'GTTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAATAGC3'
AJ606360 5'GTTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAATAGC3'
AJ606359 5'GTTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAATAGC3'
AJ606361 5'GTTGTCAGCCTGCATTTACTTCCAAAATAGC3'
AF484251 5'GTTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAATAGC3'
AM109896 5'GTTGTCAGCCTGCATTTACTTCCAAAATAGC3'
EF599605 5'ACTGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAACAGT3'

miARN PepMV5 3'GTCGGACGTAATGAAGGTTT5'

FIG.7B

ES 2 651 909 T3

PepMV6: 5'TAACCCGTTCCAAGGGGAGAAG3' $\Delta\Delta G$: -3.9 (Dirigido a TGBp3)

AY509926 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AJ438767 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
DQ000984 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
DQ000985 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AY509927 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
EF480021 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AM491606 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AJ606360 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AJ606359 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AJ606361 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AF484251 5'TAAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
AM109896 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'
EF599605 5'TCAACTTCTCCCCTGGAACGGGTTAAGTTT3'

miARN PepMV6 3'AAGAGGGGGACCTTGCCCAAT5'

FIG. 7B-2

Empelo de múltiples oligómeros eficaces de 21 unidades en un casete transgénico usando una estructura policistrónica o de ARNip progresivo

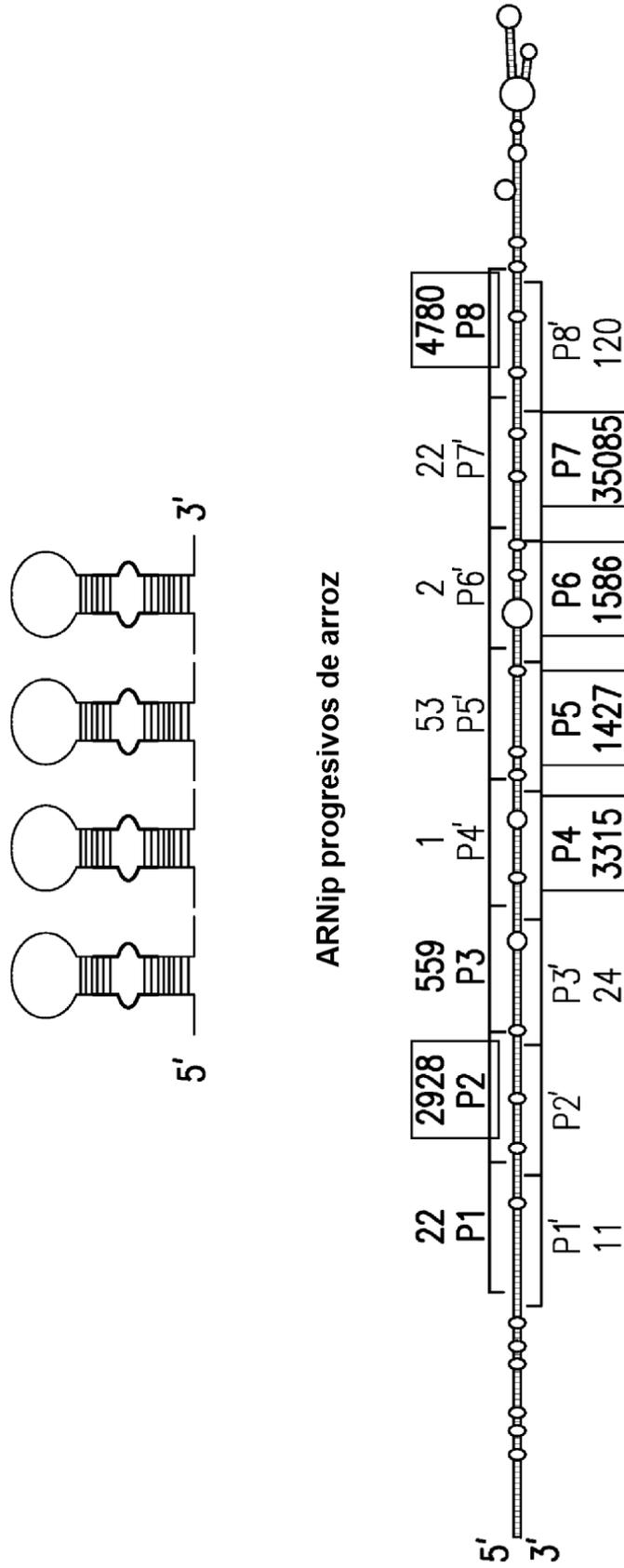


FIG.8

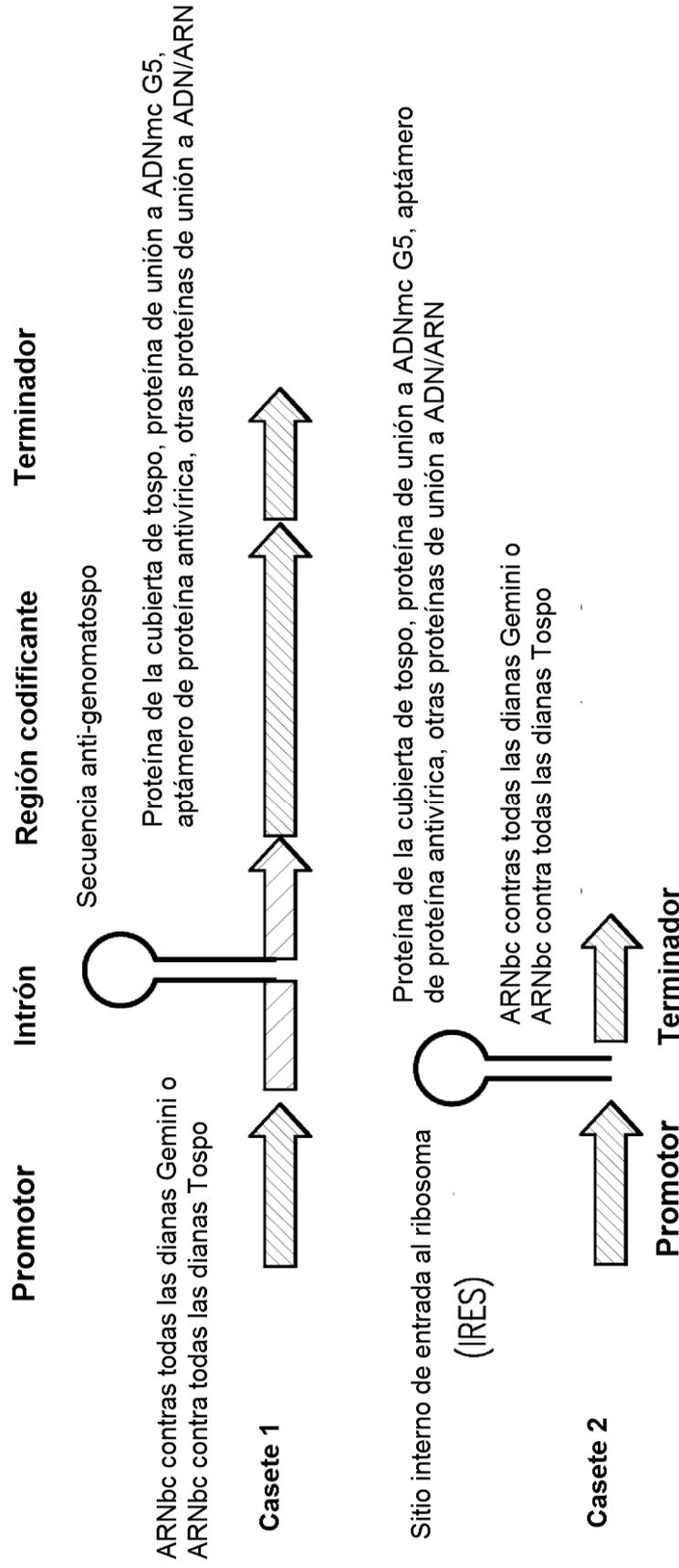


FIG.9

Expresión de 8 miARN antivíricos en una construcción

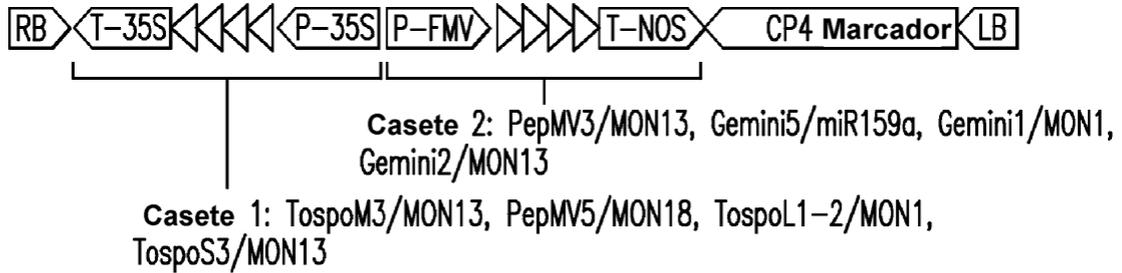


FIG. 10A

Expresión de 10 miARN antivíricos en una construcción

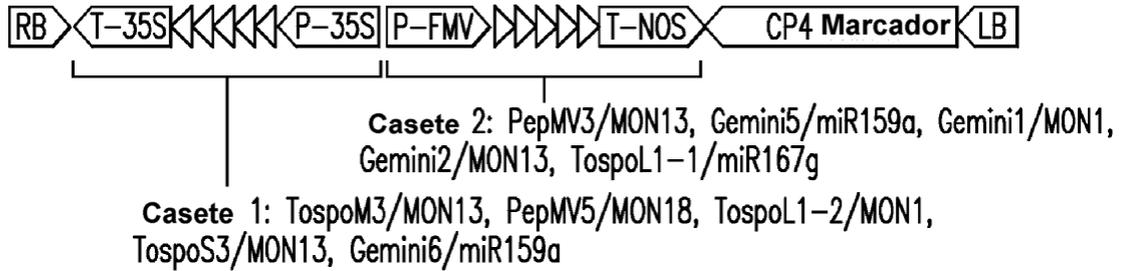


FIG. 10B

miARN antivíricos insertados como la secuencia de "bucle" de un casete de ARNbc

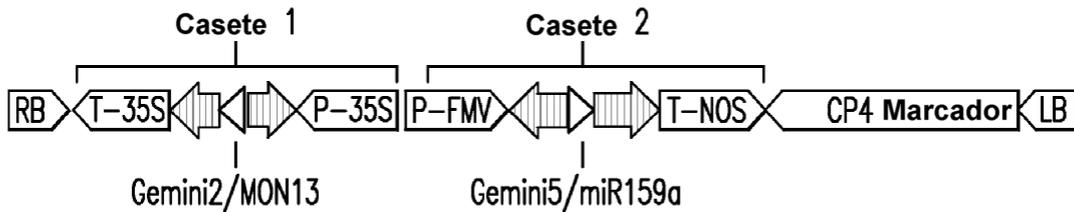


FIG. 10C

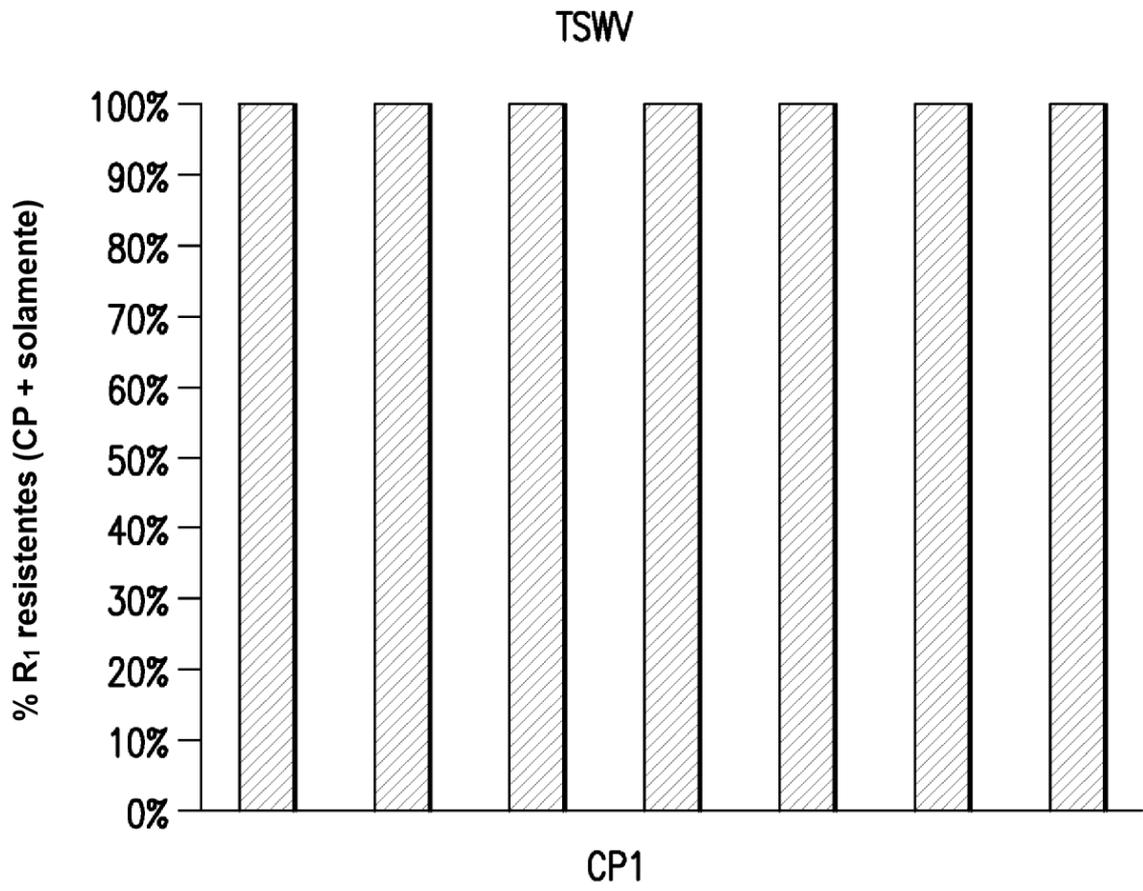


FIG. 11A

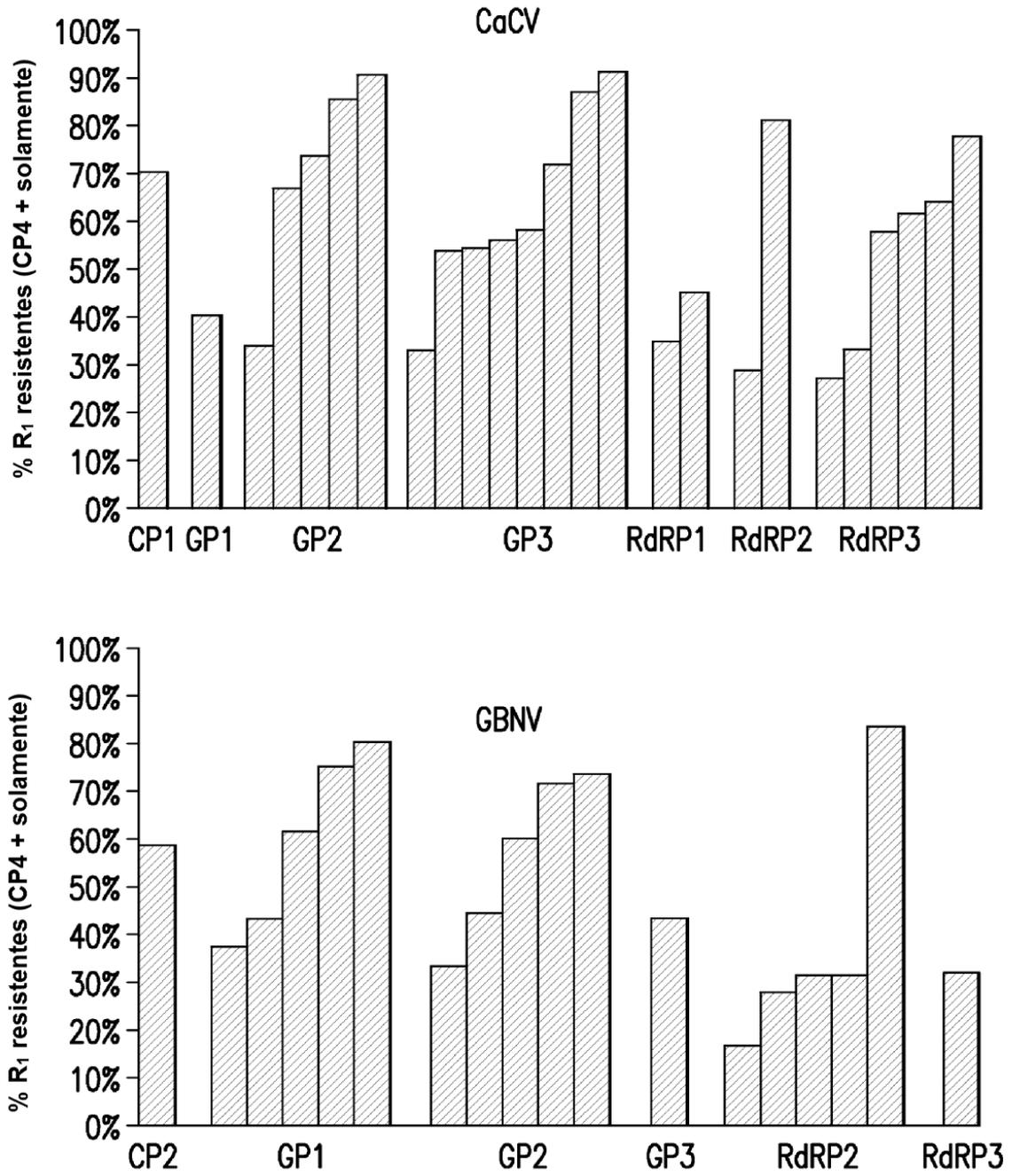


FIG. 11 B

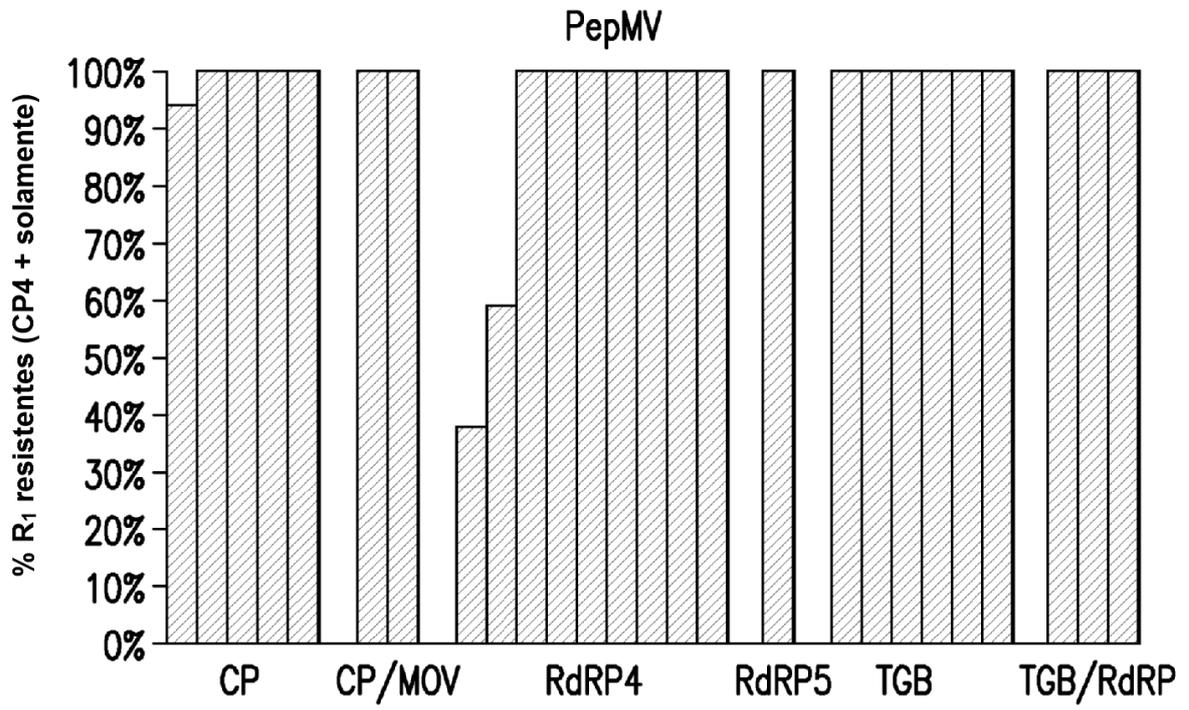


FIG. 12

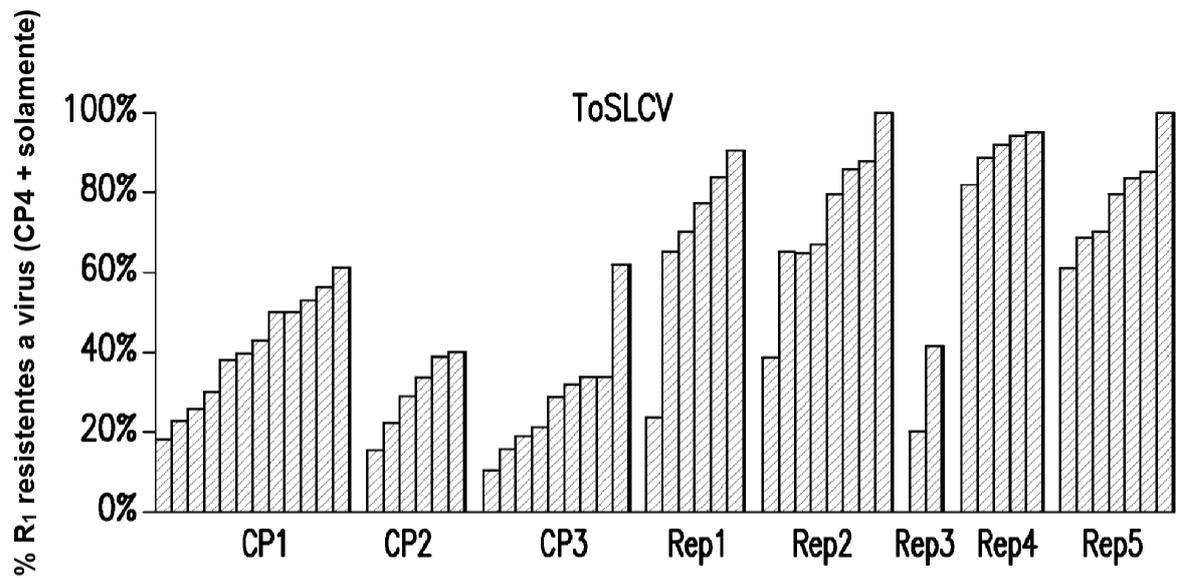
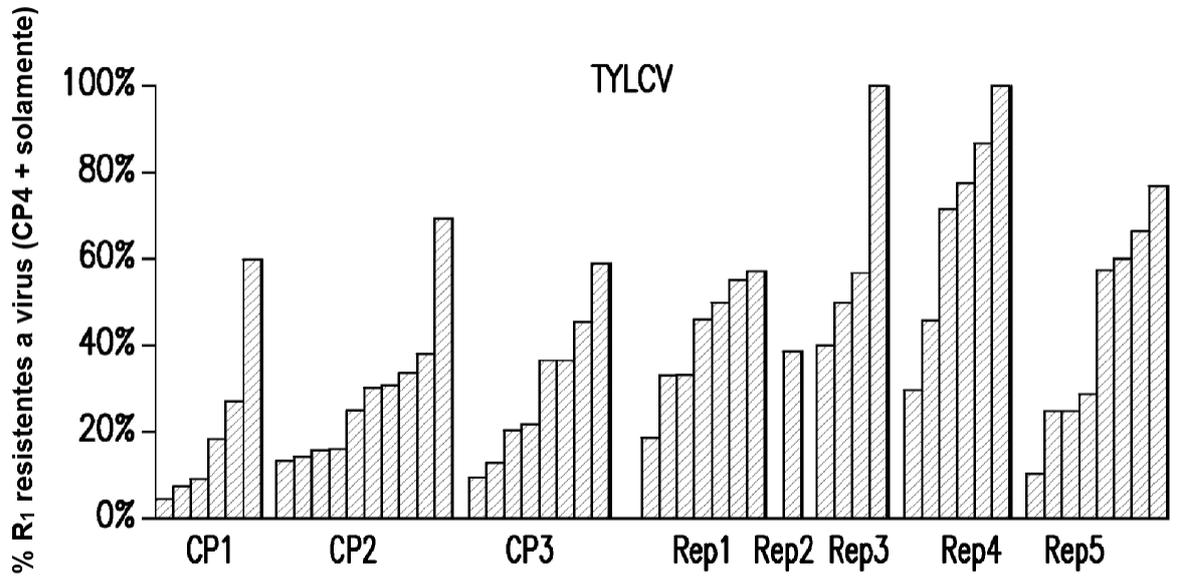


FIG. 13A

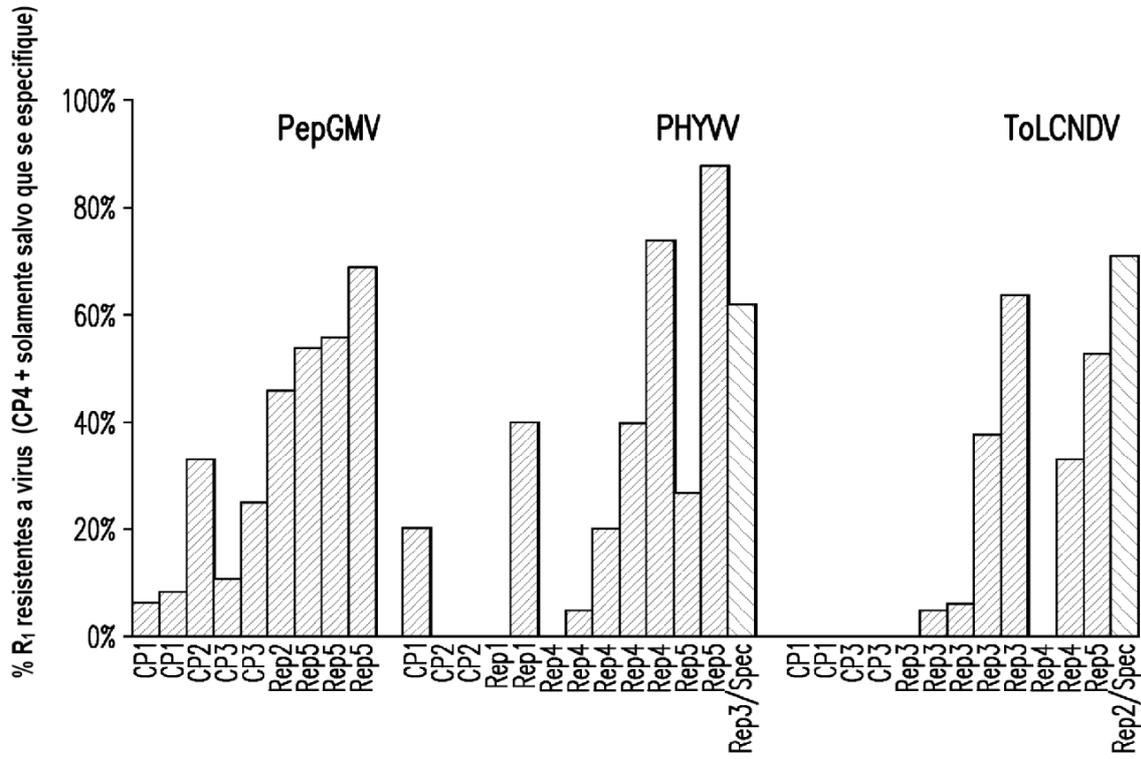


FIG. 13B

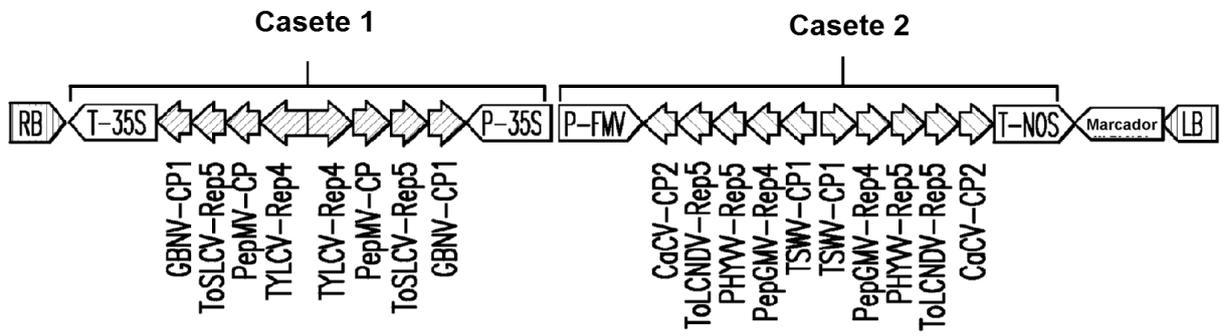


FIG. 14

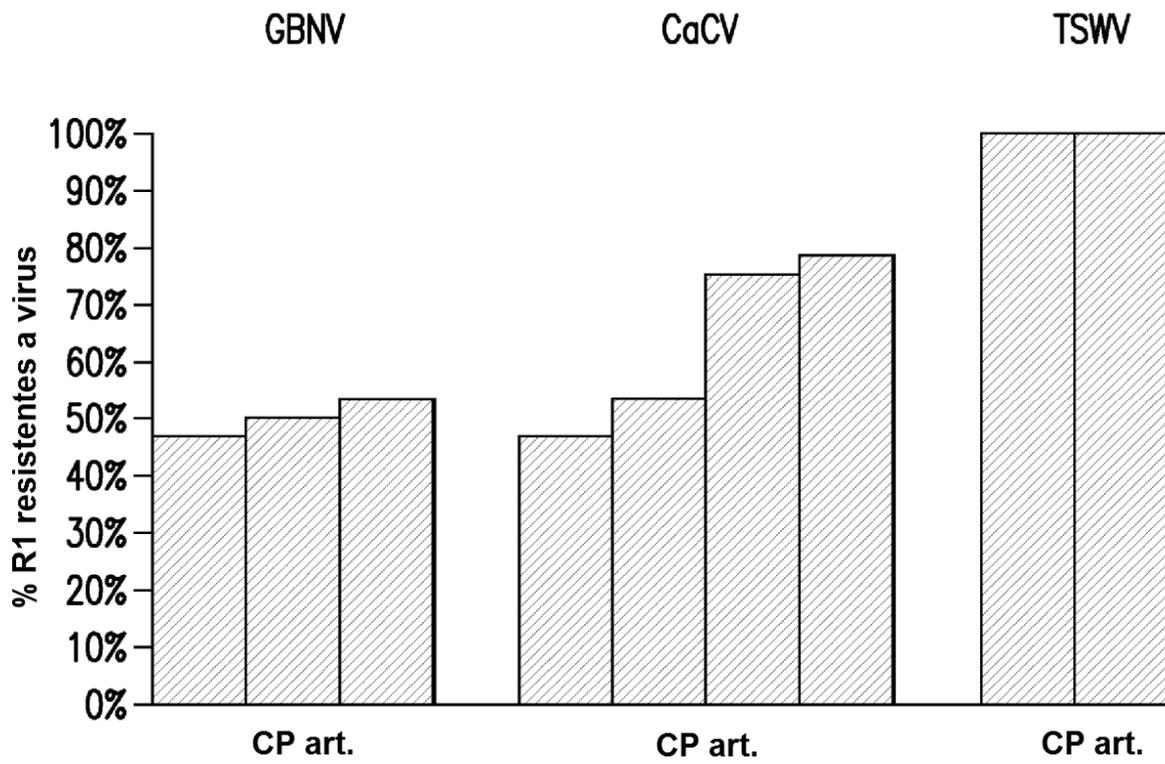


FIG.15

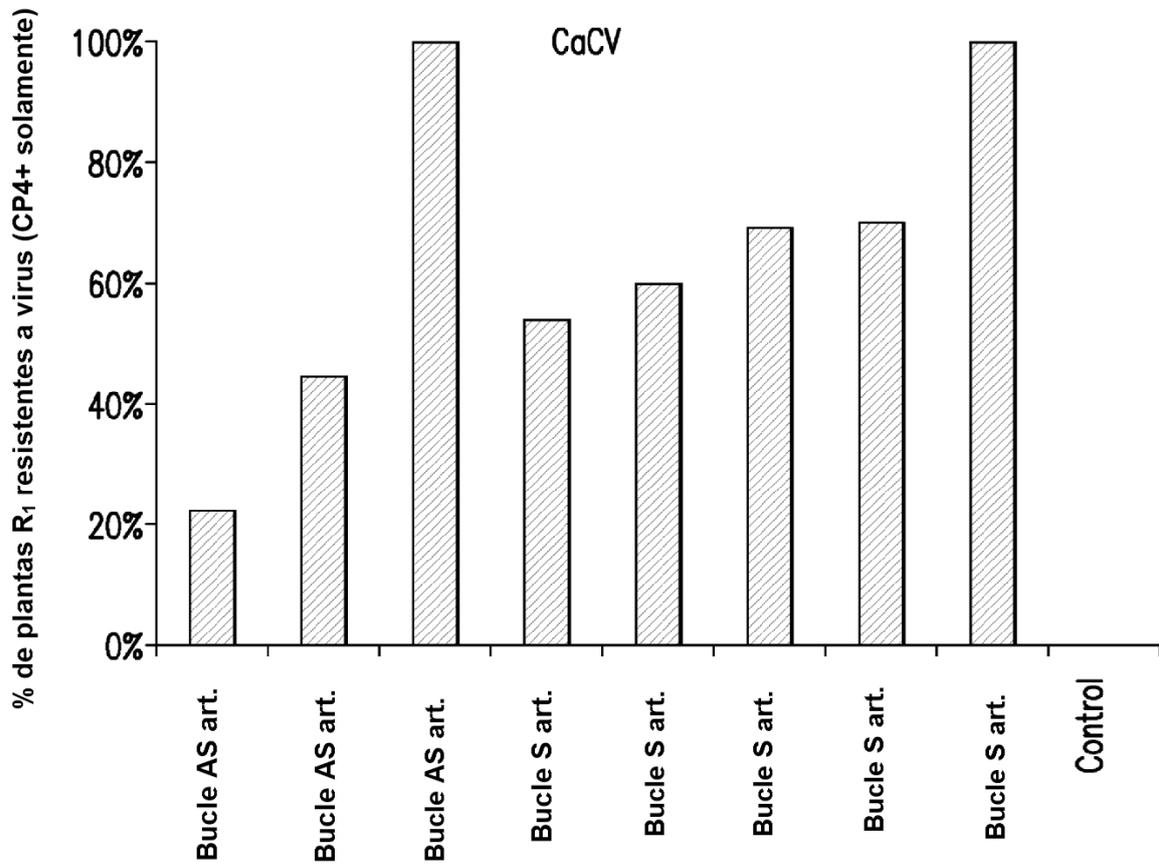


FIG.16