

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 850**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/00** (2008.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077799**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15090468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13811572 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3082403**

54 Título: **Secuencia de nucleótidos aislada de Solanum lycopersicum para una resistencia mejorada al virus del bronceado del tomate, TSWV**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.01.2020**

73 Titular/es:

**ISI SEMENTI S.P.A. (100.0%)  
Frazione Ponte Ghiara 8/A  
43036 Fidenza, IT**

72 Inventor/es:

**BELFANTI, ENRICO;  
MALATRASI, MARINA;  
ORSI, ILARIA y  
BONI, ANNA GIULIA**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 738 850 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

Secuencia de nucleótidos aislada de *Solanum lycopersicum* para una resistencia mejorada al virus del bronceado del tomate, TSWV.

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que es responsable de la resistencia de las plantas de tomate a variantes del virus del bronceado del tomate (TSWV). Más específicamente, la presente invención divulga una nueva secuencia en el locus SW-5.

El TSWV (virus del bronceado del tomate) es un virus que infecta plantas que pertenece al género *Tospovirus* de la familia *Bunyaviridae*. Su genoma consiste en tres segmentos de ARN de sentido negativo o ambisentido: el segmento L (grande) que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN putativo (de Haan et al., 1991), el segmento M (medio) que codifica la proteína de movimiento célula a célula NSm (Li et al., 2009) y el precursor de las glicoproteínas de superficie GN/GC, implicadas en la transmisión de TSWV por trips (Sin et al., 2005; Naidu et al., 2008), y el segmento S (pequeño) que codifica un supresor de silenciamiento, NSs (Takeda et al., 2002) y la nucleocápside, N (de Haan et al., 1990).

Los tospovirus son los únicos virus que infectan plantas de esta familia, dado que todos los otros miembros descritos de la familia *Bunyaviridae* infectan animales. El género tospovirus toma su nombre directamente del virus del bronceado del tomate (TSWV), descubierto en Australia en 1915. El TSWV siguió siendo el único miembro de la familia hasta principios de la década de 1990, cuando la caracterización genética de los virus descubiertos en plantas se hizo más común. Actualmente existen por lo menos veinte especies víricas en la familia, y se están registrando y describiendo más de forma relativamente regular. Se ha documentado que estos virus, en conjunto, infectan más de ochocientas especies diferentes de plantas de 82 familias diferentes.

El TSWV posee una serie de huéspedes que comprende varios cientos de especies tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, entre las que se encuentran verduras y plantas ornamentales y malezas; en particular, las infecciones por TSWV representan un grave problema que afecta a la producción mundial de, entre otros, pimiento, tomate, alcachofa, lechuga, berenjena, cacahuete, tabaco. En particular, en algunas zonas del mundo, el TSWV se ha convertido en un factor limitante en la producción de tomate (Canady et al., 2001), causando unas pérdidas en la producción de tomate de hasta el 70%.

Se conocen por lo menos diez especies de diminutos insectos conocidos como trips, pertenecientes a la familia *Thripidae*, que actúan como vectores para la transmisión de por lo menos trece tospovirus, entre los cuales se encuentra el TSWV. El TSWV se propaga en particular por los trips del tabaco (*Frankliniella Fusca*) y los trips de la flor occidental (*Frankliniella Occidentalis*). Los vectores trips del tabaco que se dispersan a partir de huéspedes herbáceos son capaces de transmitir el TSWV a cultivos susceptibles rápidamente, a menudo antes de que puedan ser destruidos por los insecticidas aplicados al cultivo. Los trips de las flores occidentales son extremadamente difíciles de erradicar, ya que son muy tolerantes a los insecticidas que se utilizan habitualmente en las plantas de tomate y residen preferentemente en una zona profunda de las flores, en la que los insecticidas difícilmente pueden alcanzarlos. Además, las infestaciones por trips de las flores occidentales se ven agravadas por la aplicación de determinados insecticidas que eliminan los enemigos naturales de los trips.

En el tomate, los primeros síntomas de una infección por TSWV suelen ser pequeñas motas de color naranja en algunas hojas medias o inferiores o en el cáliz. A medida que aparecen nuevas manchas, las hojas más viejas devienen marrones, mueren y caen. Aparecen manchas o rayas similares en los tallos y pecíolos. Toda la planta deviene enana, y con la caída de sus hojas parece una planta afectada de marchitamiento. En las frutas verdes aparecen manchas amarillentas de hasta 10 mm de diámetro, generalmente con distintas zonas concéntricas de tonos amarillos o marrones que se alternan con verdes y posteriormente con rosas o rojos.

El control de la infección por TSWV por medios agronómicos o químicos no es particularmente eficaz, debido a varias cuestiones, tales como: la dificultad de un diagnóstico temprano de la infección, la nula posibilidad de curar plantas infectadas, el gran número de insectos vectores, la difusión de trips resistentes a los insecticidas, el amplio tropismo del huésped de TSWV (más de 1000 especies de plantas).

La mayor parte de las cepas de TSWV no son capaces de dañar variedades de tomate que contienen el alelo Sw-5b del gen SW-5b. El SW-5b es un único gen de resistencia dominante, originario de la especie de tomate *Lycopersicon peruvianum* y ubicado en el cromosoma 9. En la actualidad solo se conocen dos variantes alélicas del gen del tomate SW-5b, a saber, sw-5b, es decir, la variante sensible al TSWV y Sw-5b, es decir, la variante resistente a TSWV. En el contexto de la presente invención, "sw-5b" indica la variante alélica sensible al TSWV del gen SW-5b y "Sw-5b" indica la variante alélica resistente al TSWV del gen SW-5b.

Se ha sugerido (Brommonschenkel et al., 2000) que la proteína Sw-5b es una proteína citoplásmica, con un dominio potencial de sitio de unión a nucleótidos estructurado como una hélice superenrollada y un extremo carboxi-terminal que consta de repeticiones ricas en leucina.

Las plantas de tomate que presentan por lo menos un alelo Sw-5b representan un beneficio máximo para el cultivo en zonas en las que la presencia de TSWV es endémica. Por este motivo, entre los genes de tomate que confieren resistencia al TSWV, en la actualidad solo SW-5b tiene relevancia en cultivares comerciales de tomate. El uso de cultivares de tomate resistentes a TSWV representa la estrategia más importante para el control de TSWV. Además, la relevancia del alelo Sw-5b resistente a TSWV radica en su durabilidad a múltiples tospovirus, además del TSWV (Boiteux y Giordano, 1992; Stevens et al, 1992).

No obstante, en tiempos recientes, en zonas que las que se cultivaron cultivares de tomate Sw-5b, se han identificado nuevas cepas de TSWV que superan la resistencia otorgada por el Sw-5b (Latham. y Jones, 1998; McMichael et al. 2002). Estas cepas de TSWV se conocen comúnmente como cepas "que rompen la resistencia" (RB). En particular, en 2005 Ciuffo et al. registraron la presencia en Italia de una cepa que rompe la resistencia de Sw-5b, que se denominó T1012.

Por este motivo, los cultivares de tomate resistentes generalmente tienen que ser revaluados anualmente para determinar su resistencia al TSWV.

Por lo tanto, encontrar nuevos medios mediante los que se pueda conferir resistencia a cepas de TSWV "que rompen la resistencia" a plantas de tomate representa un objetivo extremadamente relevante. En particular, existe la necesidad de encontrar genes adicionales y/o alelos adicionales de genes conocidos que permitan que las plantas de tomate no se vean afectadas tanto por el TSWV sensible al Sw-5b como por el TSWV "que rompen la resistencia".

El documento US2002/062504 se refiere a un ácido nucleico de plantas aislado que confiere resistencia a los tospovirus, así como a sistemas de expresión, a células huésped y a plantas transgénicas transformadas con dicho ácido nucleico.

El documento WO2013/127988 se refiere a una planta de pimiento que es resistente frente a la cepa que rompe la resistencia a Tsw del TSWV designada Ve427<sup>RB</sup>.

El objeto principal de la presente invención es la provisión de una nueva secuencia de nucleótidos de tomate que haga que las plantas sean resistentes a infecciones mediadas por tospovirus, en particular por TSWV. Dentro de este objeto, un objetivo de la invención es proporcionar una secuencia de nucleótidos de tomate que otorgue a las plantas una resistencia por lo menos moderada (es decir, intermedia) a cepas "que rompen la resistencia" de TSWV (es decir, cepas mutantes que son capaces de infectar plantas que tienen el alelo Sw-5b), mientras se mantiene una resistencia estándar (es decir, elevada) a cepas de TSWV que no son capaces de infectar plantas que presentan el alelo Sw-5b.

Como es bien conocido en el sector de la genética de plantas, la resistencia es la capacidad de una variedad de planta para restringir el crecimiento y el desarrollo de un patógeno específico capaz de atacar dicha planta y/o reducir el daño que dicho patógeno puede causar, en comparación con variedades de plantas susceptibles en condiciones ambientales y una presión de patógenos similares. No obstante, las variedades resistentes pueden mostrar algunos síntomas de la enfermedad y/o daños bajo una fuerte presión de patógenos. Se definen dos niveles de resistencia:

- (i) resistencia elevada (HR): las variedades de plantas de resistencia elevada son variedades de plantas que restringen en gran medida el crecimiento y el desarrollo de un patógeno específico bajo una presión de patógeno normal en comparación con las variedades sensibles. Sin embargo, estas variedades de plantas pueden presentar algunos síntomas y/o daños bajo una fuerte presión de patógenos;
- (ii) resistencia intermedia (IR): las variedades de plantas de resistencia intermedia son variedades de plantas que restringen el crecimiento y el desarrollo de un patógeno específico, pero pueden presentar una mayor diversidad de síntomas y/o daños en comparación con las variedades de resistencia elevada. Las variedades de plantas con resistencia intermedia seguirán mostrando síntomas y/o daños menos graves que las variedades de plantas susceptibles cuando se cultivan en condiciones ambientales y/o una presión de patógenos similares. Las definiciones anteriores con respecto a la resistencia están de acuerdo con la ISF (International Seed Federation).

El objeto y los objetivos anteriores, así como otros objetivos que se pondrán más claramente de manifiesto a continuación, se logran mediante una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la SEC ID n°: 1, o que comprende secuencias complementarias de la misma.

El objeto y los objetivos anteriores asimismo se logran mediante el uso de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1, o que comprende secuencias complementarias de la misma para la selección de plantas asistida por marcadores.

Otros objetivos y otras características y ventajas de la presente invención se derivarán mejor a partir de la

descripción detallada que se proporciona a continuación.

La expresión "línea parental" se utiliza comúnmente para referirse a una población de plantas fenotípicamente uniforme que presenta un alto grado de homocigosidad. Una estrategia típica para desarrollar nuevas líneas parentales de plantas de tomate (una especie principalmente autógama) está representada por la selección entre la población de plantas que tienen una variabilidad genética para uno o más caracteres fenotípicos. Esta población se puede generar cruzando dos líneas parentales; la descendencia obtenida de esta forma se denomina "un híbrido": un híbrido es uniforme desde un punto de vista fenotípico pero es poco homocigótico desde un punto de vista genotípico. Mediante autofecundación de un híbrido, se obtiene una denominada población F2, en la que los caracteres que originariamente eran típicos de una o de la otra línea parental se han recombinado. La población F2 es, por lo tanto, no uniforme desde un punto de vista fenotípico y presenta un grado intermedio de homocigosidad desde un punto de vista genotípico.

Tal como se ha indicado anteriormente, en la actualidad solo se conocen dos variantes alélicas del gen SW-5b, es decir, sw-5b y Sw-5b. Sorprendentemente, se ha descubierto que existe un tercer alelo del gen del tomate SW-5, que se ha denominado Sw-5b2 y que es distinto de las variantes alélicas Sw-5b y sw-5b conocidas hasta la fecha. El alelo Sw-5b2 se ha extraído de la colección de germoplasmas del solicitante. El alelo Sw-5b2 es una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1, o que comprende una secuencia complementaria de la misma.

Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la expresión "alelo Sw-5b2" sirve para indicar una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende una secuencia complementaria a dicha SEC ID n°: 1. El Sw-5b2 es alélico tanto con respecto a Sw-5b como con respecto a sw-5b (es decir, Sw-5b2, Sw-5b y sw-5b ocupan exactamente la misma posición en el genoma del tomate). Dicha SEC ID n°: 1 se ha aislado y amplificado a través de un par de cebadores diseñados específicamente en el contexto de la presente invención. Estos cebadores son específicos para el gen SW-5b, es decir, son capaces de evaluar la presencia de los alelos Sw-5b, sw-5b y Sw-5b2. Estos cebadores tienen las secuencias de nucleótidos siguientes:

Cebador directo (sw5 30937 F):  
ACTGCATAGTTGCCAGACT (SEC ID n°: 4)

Cebador inverso (Sw5 32077 R):  
CTTTGGTGGATTGAGCTTTCTG (SEC ID n°: 5)

Una vez aislada, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la SEC ID n°: 1 se secuenció. La secuenciación mostró que la SEC ID n°: 1 es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente del alelo Sw-5b (es decir, la SEC ID n°: 2) excepto en 11 nucleótidos. Del mismo modo, la SEC ID n°: 1 es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente en el alelo sw-5b (es decir, la SEC ID n°: 3) excepto en 17 nucleótidos.

La demostración de que Sw-5b2 es alélico tanto con respecto a Sw-5b como con respecto a sw-5b se debe al hecho de que en aproximadamente 400 plantas de tomate de la población F2 estudiada, no se ha encontrado ninguna planta que tuviera, al mismo tiempo, la secuencia Sw-5b2, la secuencia Sw-5b y la secuencia sw-5b. Otra confirmación viene dada por el hecho de que en aproximadamente 400 plantas de tomate de la población F2 estudiada, no se encontraron recombinantes. Además, al analizar los productos de PCR mediante la técnica de "curva de fusión de alta resolución", nunca se encontró la presencia de tres alelos en una única planta. La evidencia anterior, por lo tanto, demuestra que las secuencias Sw-5b2, Sw-5b y sw-5b son alélicas.

La resistencia a la infección por cepas de TSWV "que rompen la resistencia" en plantas de tomate que presentan el alelo Sw-5b2 puede deberse al hecho de que las diferencias en los nucleótidos dan como resultado un polipéptido codificado por Sw-5b2 que difiere del polipéptido codificado por Sw-5b en su estructura secundaria y terciaria y, en consecuencia, en su función.

Se han infectado artificialmente plantas de tomate con dos cepas de TSWV: T105 TSWV, que es la cepa de tipo silvestre de TSWV, ampliamente diseminada en Italia, y T1012 TSWV, que es una cepa "que rompe la resistencia" aislada en Italia. Se han infectado tres tipos de plantas: (i) plantas que contienen solo el alelo sw-5b (sensible); (ii) plantas que contienen el alelo Sw-5b (resistente) y (iii) plantas que contienen el alelo Sw-5b2. Estos estudios se han llevado a cabo en el Vegetal Virology Institute del National Centre for Research (CNR) de Turín. Se realizaron tres ciclos de infección distintos.

Las plantas de tomate que contienen solo el alelo sw-5b (sensible) sufren una infección letal por ambas cepas T105 TSWV y T1012 TSWV.

Las plantas de tomate que contienen el alelo Sw-5b (resistente) sobreviven a la infección por la cepa T105 TSWV (tipo silvestre) pero mueren cuando se infectan con la cepa T1012 TSWV (resistente).

Finalmente, todas las plantas de tomate que contienen el alelo Sw-5b2 sobreviven a la infección por la cepa

T105 TSWV (tipo silvestre) y un gran porcentaje de las mismas sobrevive asimismo a la infección por la cepa T1012 TSWV (resistente). El grado de supervivencia varía del 100% al 20% (el promedio es de aproximadamente el 60%) según la variedad de plantas de tomate, la condición de cigosis, la presión del inóculo.

5 El alelo Sw-5b2 se ha detectado mediante la técnica de PCR utilizando el cebador directo Sw5 30937 F y el cebador inverso Sw5 32077 R descritos anteriormente y el SsoFast EvaGreen Supermix (Bio Rad, número de catálogo 172-5205). El producto resultante se ha analizado mediante una "curva de fusión de alta resolución" en un sistema Bio Rad cfx-96 en tiempo real. El producto de la PCR se purificó por medio del "kit de extracción de gel rápida PureLink" de Invitrogen (número de catálogo 2100-12) después de una aplicación en gel de agarosa.  
10 La clonación se realizó por Topo PCR Cloning (Invitrogen, número de catálogo 450030) y la secuenciación se realizó por Syngene Biotech GmbH (Suiza).

Los resultados anteriores demuestran que el alelo Sw-5b2 es de gran importancia para otorgar a las plantas de tomate una resistencia casi moderada a infecciones por cepas de TSWV que son perjudiciales para las plantas  
15 que tienen el alelo Sw-5b (es decir, a cepas de TSWV "que rompen la resistencia").

Otro aspecto de la presente invención se representa mediante la utilización de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1, o que comprende una secuencia complementaria de la misma, para la selección de plantas asistida por marcadores.  
20

La selección asistida por marcadores (MAS, asimismo conocida como selección ayudada por marcadores) es un proceso de selección indirecto, ampliamente utilizado en la reproducción de plantas y animales, mediante el que se selecciona un carácter genético de interés (por ejemplo, productividad, resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés, esterilidad, etc.), no sobre la base del carácter mismo, sino sobre la base de un marcador vinculado al mismo. El principio en el que se basa la MAS es que el marcador utilizado para la selección se asocia en alta frecuencia con el gen (o el locus genético) de interés, debido a la vinculación genética, es decir, la estrecha proximidad, en el cromosoma, del locus del marcador y el carácter del locus que determina el interés. En consecuencia, el gen de interés y el marcador tienden a moverse juntos durante la segregación de gametos debido a su proximidad en el mismo cromosoma y la baja probabilidad de eventos de cruce de cromosomas  
25 entre el marcador y el gen de interés.  
30

En términos generales, los marcadores pueden ser de uno de tres tipos: (i) morfológicos (tales como, en lo que respecta a las plantas, coloración de las hojas, altura, color del grano), (ii) bioquímicos (es decir, una proteína que se puede extraer y observar, tal como una enzima), o (iii) basados en ADN y/o moleculares, con lo que se produce un gen (o secuencia de ADN) fácilmente identificable cerca del gen o locus de interés. El mejor marcador posible se ubica en el gen que determina el carácter de interés.  
35

La MAS puede ser muy útil para seleccionar de forma eficaz caracteres que tienen un fenotipo recesivo, son difíciles o caros de medir, se expresan en el desarrollo tardío y/o requieren la presencia de condiciones especiales para expresarse, tales como la selección para resistencia a enfermedades y plagas.  
40

La MAS permite confirmar, en un determinado punto del proceso de selección, que los individuos o la progenie seleccionados expresan el fenotipo o carácter deseado, desarrollando así nuevas líneas parentales y, sucesivamente, nuevos híbridos, en los que el carácter de interés está presente.  
45

En la presente invención, SEC ID n°: 1 representa el marcador que permite identificar la presencia de la variante alélica Sw-5b2, correspondiente al fenotipo de plantas resistentes a la infección por cepas de TSWV "que rompen la resistencia". El uso de la SEC ID n°: 1 como marcador para identificar la presencia de la variante alélica Sw-5b2 ofrece una serie de ventajas sobre la infección (ya sea artificialmente o de forma natural) de las plantas. En primer lugar, la resistencia a la infección por cepas de TSWV "que rompen la resistencia" se puede evaluar de una forma más fiable y dentro de un periodo de tiempo más corto (pocos días), ya que no es necesario desarrollar plantas adultas. Además, el uso de la SEC ID n°: 1 como marcador de selección no es destructivo para las plantas e incluso evita el deterioro de las plantas analizadas. Además, dado que no se produce ninguna infección en la planta, dicho uso permite evitar el riesgo de contaminación accidental de plantas no infectadas. Este uso asimismo tiene la ventaja de permitir distinguir si existe homocigosidad o heterocigosidad para la variante alélica Sw-5b2 en las plantas analizadas. Esta es una característica muy importante porque la progenie de plantas heterocigóticas para el alelo Sw-5b2 no sería estable en términos de resistencia a la infección por cepas de TSWV "que rompen la resistencia". En consecuencia, asimismo se obtienen ventajas económicas de lo anterior: la posibilidad de identificar precozmente plantas homocigóticas para el alelo Sw-5b2 (que ascienden a 25%) permite descartar la parte de la progenie de las plantas (es decir, 75%) que no es homocigótica para el alelo Sw-5b2, ahorrando de esta forma tiempo, dinero y carga de trabajo.  
50  
55  
60

En una forma de realización preferida, la invención se refiere a la utilización de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende una secuencia complementaria de la misma, para la selección asistida por marcadores de plantas que tienen relevancia comercial (ya sean plantas ornamentales o vegetales). Los ejemplos de plantas comercialmente relevantes son los siguientes: tomate, tabaco, pimiento dulce, pimiento  
65

picante, berenjena. Una forma de realización más preferida es la utilización de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende una secuencia complementaria de la misma, para la selección asistida por marcadores de plantas de tomate.

5 Un aspecto de la presente divulgación se representa mediante la utilización de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1, o que comprende una secuencia complementaria de la misma, para la introgresión en plantas.

10 La introgresión, asimismo conocida como hibridación introgresiva, es un proceso mediante el cual un gen de interés se transfiere del grupo genético de un individuo que contiene el gen al grupo de genes de otro individuo que no lo contiene. La introgresión puede suceder por medio de una técnica tradicional, es decir, mediante repetidos cruces entre los dos individuos, o mediante una técnica biotecnológica, por ejemplo, mediante transformación genética.

15 En particular, la secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1, o que comprende una secuencia complementaria de la misma, puede introducirse en especies que no contienen esta secuencia, pero que son comercialmente relevantes gracias a una o más características comercialmente valiosas (tales como alta productividad, resistencia a plagas, floración notable, etc.). En consecuencia, pueden obtenerse nuevas líneas parentales que poseen tanto las características comercialmente valiosas como la resistencia a la infección por cepas TWSV "que rompen la resistencia" (conferida por la presencia del alelo Sw-5b2).

20 En un aspecto preferido, la presente divulgación se refiere a la utilización de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende una secuencia complementaria de la misma, para la introgresión en plantas que tienen una relevancia comercial (ya sean plantas ornamentales o verduras). Los ejemplos de plantas comercialmente relevantes son los siguientes: tomate, tabaco, pimiento dulce, pimiento picante, berenjena. Un aspecto más preferido de la presente divulgación es la utilización de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende una secuencia complementaria de la misma, para la introgresión en una planta de tomate.

30 Además, otro aspecto de la presente divulgación está representado por un procedimiento para producir plantas casi moderadamente resistentes a infecciones por cepas de TSWV que son perjudiciales para plantas que presentan el alelo Sw-5b introduciendo en el genoma de la planta una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende una secuencia complementaria de la misma.

35 En un aspecto preferido de la divulgación, las plantas que pueden hacerse resistentes a infecciones por cepas de TSWV "que rompen la resistencia" son plantas que tienen una relevancia comercial (ya sean plantas ornamentales o verduras). De manera más preferida, las plantas comercialmente relevantes son las siguientes: tomate, tabaco, pimiento dulce, pimiento picante, berenjena. Un aspecto aún más preferido de la presente divulgación es un procedimiento para hacer que las plantas de tomate sean resistentes a las infecciones por cepas de TSWV "que rompen la resistencia".

A partir de lo expuesto anteriormente, se ha establecido que la presente invención cumple completamente con el objeto y los objetivos expuestos anteriormente.

45 De hecho, las secuencias de nucleótidos que comprenden la SEC ID n°: 1 o que comprenden una secuencia complementaria de la misma, demostraron proporcionar un aumento en la resistencia de las plantas de tomate a la infección por TSWV. En particular, las plantas de tomate que presentan en su genoma una secuencia que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende una secuencia complementaria de la misma, presentan el mismo grado de resistencia al TSWV de tipo silvestre que las plantas de tomate que presentan la SEC ID n°: 2 (es decir, que presenta el alelo Sw-5b). Es conocido que el grado de resistencia asegurado por el alelo Sw-5b (y, en consecuencia, asimismo por el alelo Sw-5b2) frente al TSWV de tipo silvestre es un grado estándar (es decir, una resistencia elevada).

55 Además de ofrecer la resistencia estándar anterior al TSWV de tipo silvestre, una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende secuencias complementarias de la misma, asimismo asiste a plantas de tomate con una resistencia moderada a cepas TSWV mutantes (cepas TSWV "que rompen la resistencia"), a las que son sensibles plantas que presentan el alelo Sw-5b.

60 La SEC ID n°: 1 es, por lo tanto, de la mayor importancia desde un punto de vista económico. De hecho, la presencia de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID n°: 1 o que comprende secuencias complementarias de la misma en plantas comercialmente relevantes (tales como verduras o plantas ornamentales) realmente protege el cultivo de dichas plantas, lo que permite un crecimiento más eficaz y produce mayores cantidades de productos.

65

**Listado de secuencias**

<110> ISI SEMENTI RESEARCH SOCIETA' A RESPONSABILITA' LIMITATA

<120> SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS AISLADA DE SOLANUM LYCOPERSICUM

5 <130> E052146 - M227216

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 1163

<212> ADN

<213> *Solanum lycopersicum*

15

<400> 1

```

actgcatagt tgccagactg tattcttcga actcactgtc aagatagtca aataaagcat      60
ctttcacctc attccaccaa gattcttcca ttttcctttt tttgattatt ccagctacca      120
agacaaccac taggggcagt cttttgcatt tttctgctac tgcttgactc acatcttgta      180
gttcaggcgg gcaatcttcc ttttgaaaca ctttttctg caacaattgg caactctctt      240
ctgtttgtgag gaatggaaga gaataaggat cagtatggta cttgacttgc ttaccactt      300
cttcaagtcg agttgttacg actattctgc ttctatttcc ggaatctgga aaggaaagcc      360
ttaagtcatc ccataccata caatcccaca tatcatcaa tacaatgaga tatctctttc      420
ccattaattt tctcctcaac atgtcggcaa caacgtcaac cgtagctcca ttgtcgttgc      480
aacctgtaac ttgactgaaa atatcttgta ataactctct ccgattatac gtttgagaaa      540
tgatgcacca tgctcgaaca tcaaagcgag aaacaataat gtcattattg tacaactttc      600
tagcaattgt cgttttccct tgtcctcca tgcctacaat tgggacaacg tctagctcat      660
ttgtacctct aatcagataa tcaattagtt cttctgcttt attctcaaaa ccactacct      720
cctcatcagt tacaagattg ctatgtcgat ccggcagatg ttttaatgga gcagccacat      780
agtgaggatt aagaggaatg tccgctgacc acatctcagt cacctctgca ttaatttgc      840
tgatctcttt tacaattgta ggaagtgagc aaaaaatatg caaaaaagca ttatactgag      900
caagaataga atcaatagca acctcagcct catatgcaa attgatggta cgcctctgaa      960
gatcttttagg aatgttatgt tcatggtgca cgacatcacg gaaaatggat gagagctcct     1020
tctctaaaat ggatgtaaga gatgatagct ctttctocaa attocctaaa agaggtttca     1080
tcagaaacc taatccggac ttagatgtcg acatctcatt cagtttcctt aaaagagaat     1140
ccagaaagct caatccacca aag                                             1163
    
```

20

<210> 2

<211> 1163

<212> ADN

<213> *Solanum lycopersicum* cv Stevens

<400> 2

ES 2 738 850 T3

actgcatagt tgccagactg tattcttcga actcactgtc aagatagtca aataaagcat 60  
ctttcacctc attccaccaa gattcttcca ttttcctttt tttgattatt ccagctacca 120  
agacaaccac taggggcagt cctttgcatt tttctgctac tgcttgactc acatcttgta 180  
gttcaggcgg gcaatcttcc ttttgaaaca cttttttctg caacaattgg caactctctt 240  
ctgttgtgag gaatggaaga gaataaggat cagtatggta cttgacttgc ttaccactt 300  
cttcaagtog agttgttacg actattctgc ttctaattcc atcatctgga aaagaaagcc 360  
ttaagtcatc ccataccata caatcccaca tatcatccaa tacaatgaga tatctctttc 420  
ccattaattt tctcctcaac atgtcggcaa gaacatcaac cgtagctcca ttgtcgtcgg 480  
aacctgtaac ttgactgaaa atatcttgta ataactctct ccgattatac gtttgagaaa 540  
tgatgcacca tgctogaaca tcaaagcgag aaacaataat gtcattattg tacaactttc 600  
tagcaattgt cgttttcctt tgtcctccca tgcctacaat tgggacaacg tctagctcat 660  
ttgtacctct aatcagataa tcaattagtt cttctgcttt attctcaaaa cccactacct 720  
cctcatcagt tacaagattg ctatgtcgat cgggcagatg ttttaatgga gcagccacat 780  
agtgaggatt aagaggaatg tccgctgacc acatctcagt cacctctgca ttaattgct 840  
tgatctcttt tacaattgta ggaagtgagc aaaaaatag caaaaaagca ttatactgag 900  
caagaataga atcaatagca acctcagcct catatgacaa attgatggta cgcctctgaa 960  
gatctttagg aatgttatgt tcatggtgca cgacatcacg gaaaatggat gagagctcct 1020  
tctctaaaat ggatgtaaga gatgatagct ctttctccaa attccctaaa agaggtttca 1080  
tcagaaacc taatccggac ttagatgtcg acatctcatt cagtttcctt aaaagagaat 1140  
tcagaaagct caatccacca aag 1163

<210> 3

<211> 1163

5 <212> ADN

<213> *Solanum lycopersicum* cv Heinz 1706

<400> 3

actgcatagt tgccagacta tattcttcga actcactgtc aagatagtca aataaagcat 60  
ctttcacctc attccaccaa gattcttcca ttttcctttt tttgattatt ccagctacca 120  
agacaaccac taggggcagt cctttgcatt tttctgctac tgcttgactc acatcttgta 180  
gttcaggcgg gcaatcttcc ttttgaaaca cttttttctg caacaattgg caactctctt 240  
ctgttgtgag gaatggaaga gaataaggat cagtatggta cttgacttgc ttaccactt 300  
cttcaagtog agttgttacg actattctgc ttctaattcc aacatctgga aaagaaagcc 360  
ttaagtcatc ccataccata caatcccaca tatcatccaa tacaatgaga tatctctttc 420

10

ES 2 738 850 T3

ccattaat	ttctcctcaac	atgtcggcaa	gaacgtcaac	cgtagctcca	ttgtcgttga	480
aacctgtaac	ttgactaaaa	atatcttgta	ataactctct	ctgattatac	gtttgagaaa	540
tgatgcacca	tgctogaaca	tcaaagcgag	aaacaataat	gtcattattg	tacaactttc	600
tagcaattgt	cgttttcct	tgctctcca	tgctacaat	tgggacaacg	tctagctcat	660
ttgtacctct	aatcagataa	tcaattagtt	cttctgcttt	attctcaaaa	cccactacct	720
cctcatcagt	tacaagattg	ctatgtcgat	cggcagatg	ttttaatgga	gcagccacat	780
aatgaggatt	aagaggaatg	tccgctgacc	acatctcagt	cacctctgca	ttaatttgct	840
tgatctcttt	tacaattgta	ggaagtgagc	aaaaaatatg	caaaaaaca	ttatactgag	900
caagaataga	atcaatagca	acctcagcct	cacatgcaa	attgatggta	cgtctctgaa	960
gatctttagg	aatgttatgt	tcatggtgca	cgacatcact	gaaaatggat	gagagctcct	1020
tctctaaaa	ggatgcaaga	gatgatagct	ctttctcaa	attccctaaa	agaggtttgcg	1080
tcaggaacc	taatccggac	ttagatgtcg	acatctcatt	cagtttcctt	aaaagagaat	1140
ccagaaagct	caatccacca	aag				1163

5 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador directo

<400> 4  
 actgcatagt tgccagact 19

15 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador inverso

<400> 5  
 ctttgggga ttgagcttc tg 22

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Secuencia de nucleótidos aislada que comprende la SEC ID nº: 1, o que comprende secuencias complementarias de la misma.
  2. Utilización de la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 para la selección asistida por marcadores de plantas de tomate.