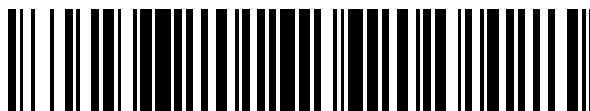


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 582**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A01H 5/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2006 PCT/NL2006/000009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2006 WO06085749**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2006 E 06700425 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1838847**

54 Título: **Virus de plantas denominado virus del torrado del tomate**

30 Prioridad:

07.01.2005 EP 05075042

29.03.2005 EP 05075725

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

15.11.2016

73 Titular/es:

MONSANTO INVEST B.V. (100.0%)

Leeuwenhoekweg 52

2661 CZ Bergschenhoek, NL

72 Inventor/es:

VAN DEN HEUVEL, JOHANNES, FRANCISCUS, JOHANNA, M.;

MARIS, PAULUS, CORNELIS;

VERBEEK, MARINUS;

DULLEMANS, ANNETTE, MARIA y

VAN DER VLUGT, RENÉ, ANDRIES, ANTONIUS

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 589 582 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

Virus de plantas denominado virus del torrado del tomate

5 SECTOR DE LA INVENCION

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El tomate, *Solanum lycopersicum* (antes *Lycopersicon esculentum*) es susceptible a gran número de especies víricas. Algunos de los virus del tomate más destacados incluyen el virus del bronceado del tomate (TSWV; género *Tospovirus*); el virus del mosaico del pepino (PepMV; género *Potexvirus*), y el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV; género *Begomovirus*). El daño que estas enfermedades causan a la planta varía desde decoloración de las hojas y lesiones necróticas hasta la pérdida grave de cultivos y la muerte de la planta.

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

En 1996, se informó de un nuevo virus del tomate, que había infectado a plantas de tomate en EE.UU. e Italia desde 1993, y se denominó virus de la clorosis infecciosa del tomate (TICV; género *Crinivirus*; Duffus y otros, 1996). Otro nuevo virus del tomate del mismo género se notificó en 1998. Se demostró que este virus había infectado a plantas del tomate en EE.UU. desde 1989 y se denominó virus de la clorosis del tomate (ToCV; Wisler y otros, 1998). Se observó que estos dos nuevos virus se diseminaban mediante una mosca blanca, siendo el insecto un vector muy eficaz de la transmisión de la enfermedad.

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

35 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Recientemente, se ha descubierto un nuevo virus en plantas de tomate de España, que causó síntomas que no se pudieron atribuir a ningún virus conocido. Las plantas mostraron lesiones necróticas en las hojas y anillos marrones en los frutos, y mostraron una reducción del crecimiento. Las pruebas serológicas (ELISA) indicaron la presencia del virus del mosaico del pepino (PepMV). De hecho, las investigaciones con el microscopio electrónico revelaron las partículas similares a varillas típicas de los potexvirus. Sin embargo, también se encontraron partículas víricas de forma esférica en el tejido de la hoja infectada. Los presentes inventores fueron capaces de separar el nuevo virus del complejo con PepMV. El nuevo virus se denominó provisionalmente virus del torrado del tomate (ToTV).

Para poder rastrear su origen, controlar su epidemiología y evitar la posible propagación de la enfermedad, es de gran importancia poder reconocer la enfermedad en una etapa temprana. Solo entonces se pueden adoptar suficientes medidas para aislar las plantas e iniciar precauciones fitosanitarias. En este momento, no hay herramientas de diagnóstico disponibles. En consecuencia, hay una necesidad de desarrollar herramientas de diagnóstico para esta enfermedad. Además, en la actualidad no se conocen plantas que presenten una resistencia específica a este nuevo virus, mientras que hay una necesidad para el desarrollo de plantas resistentes de este tipo.

Este virus de plantas se denominó provisionalmente virus del torrado del tomate (ToTV) y se depositó en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) en Braunschweig, Alemania, el 24 de noviembre de 2004 bajo el número de referencia depositante ToTV-E01 (DSM 16999).

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

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

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

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

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

Dicho virus ToTV comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70%, más preferentemente, como mínimo, del 80%, aún más preferentemente, como mínimo, del 90%, aún más preferentemente, como mínimo, del 95%, aún más preferentemente, como mínimo, del 98%, y de la forma más preferente, como mínimo, del 99% con la misma. Dichos virus también están abarcados por el término ToTV, tal como se utiliza en el presente documento.

Un virus que tiene la homología de secuencia mencionada anteriormente se asocia con enfermedades del tomate conocidos bajo los nombres de "torrado", "marchitez" y/o "enfermedad de las manchas de chocolate" y/o muestra, según análisis taxonómico numérico de descriptores taxonómicos esencialmente, tal como se define en la tabla 1, que están más estrechamente relacionadas con el virus, tal como se define en la reivindicación 1, que con cualquier otro aislado vírico disponible en colecciones públicas y dicho virus tiene una característica esencial que se asocia con una enfermedad que causa lesiones necróticas en el tomate.

La presente invención da a conocer un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70%, más preferentemente, como mínimo, del 80%, aún más preferentemente, como mínimo, del 90%, aún más preferentemente, como mínimo, del 95%, aún más preferentemente, como mínimo, del 98%, y, de la forma más preferente, como mínimo, del 99% con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, y sus cadenas complementarias y fragmentos específicos de ToTV-del mismo.

La presente invención da a conocer, además, un vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado o recombinante de la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un polipéptido aislado o recombinante codificado por un marco de lectura abierto (ORF) en la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en i) SEQ ID NO: 1, ii) SEQ ID NO: 2, y iii) cadenas complementarias de los mismos. En una realización preferente, dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en las proteínas de la cápside de 23, 26 y 35 kDa, la helicasa, la ARN polimerasa dependiente de ARN y la proteína putativa de movimiento (MP) del ToTV.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un antígeno que comprende un polipéptido, según con la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un anticuerpo dirigido específicamente contra un antígeno según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para producir un anticuerpo contra un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y

secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) proporcionar dicho virus ToTV o una proteína (recombinante) o fragmento de péptido de la misma; b) inmunizar un huésped vertebrado adecuado con dicho virus, proteína o fragmento peptídico, y c) recolectar de la sangre (incluyendo suero) o esplenocitos de dicho huésped vertebrado anticuerpos contra dicho virus, proteína o fragmento peptídico. En una realización preferente, dicho procedimiento comprende, además, las etapas de d) seleccionar un esplenocito productor de anticuerpos, e) la fusión de esplenocitos con una línea celular de hibridoma inmortalizada y f) permitir que dicha fusión de hibridoma produzca anticuerpos monoclonales.

Se describe adicionalmente un anticuerpo obtenible por un procedimiento de producción de un anticuerpo contra ToTV según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para identificar un aislado vírico como el virus ToTV, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo hacer reaccionar dicho aislado vírico o un componente del mismo con un anticuerpo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para detectar la presencia de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, en una muestra que comprende determinar en dicha muestra la presencia del virus o un componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con un anticuerpo, según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para identificar una planta que es resistente a un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo las etapas de: a) exponer una planta o parte de planta a una dosis de partículas víricas o de ácido nucleico vírico capaz de infectar una planta, en el que la infección se logra mediante inoculación mecánica de partículas de virus purificadas o ácido nucleico vírico del virus, y b) identificar dicha planta como una planta que es resistente al virus cuando, después de dicha exposición, ya sea i) los síntomas de enfermedad en dicha planta o parte de la planta permanecen ausentes o se retrasan en la expresión o, como mínimo, se reducen en gravedad o se localizan en relación con una planta control susceptible, y/o ii) dichas secuencias de virus o genómicas no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia de dicho virus se reduce, como mínimo, cuantitativamente en dicha planta con relación a una planta control susceptible. La etapa a) incluye un período de incubación de una duración suficientemente larga como para permitir el establecimiento de los síntomas de la enfermedad detectables en las plantas de control susceptibles expuestas a una dosis infecciosa comparable de virus. Mediante la realización de este procedimiento todas las formas de resistencia, incluyendo la resistencia completa, la resistencia parcial, la hipersensibilidad y la tolerancia pueden identificarse en una planta. Con el fin de confirmar la tolerancia, debe confirmar la presencia (sistémica) del virus en la planta (células). La etapa b) implica, preferentemente, la realización de un procedimiento para detectar la presencia de dicho virus en dicha planta o parte de la planta, en el que se utiliza un anticuerpo según la presente invención en inmunoensayos estándar, bien conocidos por el experto en la técnica. Como alternativa, la etapa b) puede comprender poner en contacto una parte de dicha planta expuesta con una planta indicadora susceptible. De esta manera, se puede detectar la presencia de una infección sistémica o local en dicha planta expuesta a través de la observación de la aparición de la enfermedad en la planta indicadora o incluso una planta indicadora en contacto adicional en contacto con dicha primera planta indicadora con la que se ha puesto en contacto.

Se describe adicionalmente un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV, que comprende las etapas de identificar una planta donante resistente a ToTV mediante la realización de cualquiera de los procedimientos

anteriores para la identificación de una planta resistente a ToTV, según la presente invención, cruzar dicha planta donante resistente a ToTV con una planta receptora (en el que la planta receptora puede ser susceptible a ToTV o bien resistente a ToTV, pero es adecuadamente una planta resistente a ToTV en caso de que el fenotipo resistente sea producido por un gen recesivo), y seleccionar de una planta descendiente (por ejemplo, una F₁, una F₂, y una planta autofecundada) una planta resistente mediante la realización de un procedimiento para identificar la resistencia a ToTV en una planta, tal como se ha descrito anteriormente. En el caso de que el rasgo de resistencia sea un rasgo recesivo, las plantas resistentes se pueden encontrar entre las plantas descendientes de la autofecundación de la F₁ o F₂ o aún otras generaciones. Dicha planta donante resistente a ToTV y la planta receptora son, preferentemente, plantas de la familia *Solanaceae* o de la familia *Cucurbitaceae*. Dicha planta receptora es, preferentemente, una planta de tomate, planta de berenjena, planta de pimiento, planta de melón, planta de sandía o planta de pepino, más preferentemente una planta de la especie *Solanum lycopersicum*, de la forma más preferente una línea de *S. lycopersicum* que posee características comercialmente deseables.

Se describe adicionalmente una planta resistente a ToTV, preferentemente una planta de tomate, planta de berenjena, planta de pimiento, planta de melón, planta sandía o planta de pepino, o parte de la misma, tal como una semilla, que puede obtenerse mediante un procedimiento de producción de una planta resistente a ToTV.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un kit de diagnóstico para detectar la presencia de ToTV en una muestra según un procedimiento de la presente invención, comprendiendo el kit, como mínimo, un componente seleccionado del grupo que consiste en un virus de plantas denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, un polipéptido, un antígeno, y/o un anticuerpo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, un polipéptido, un antígeno o un anticuerpo según la presente invención para la producción de una composición de diagnóstico.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición de diagnóstico que comprende un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, un polipéptido según la presente invención, un antígeno según la presente invención o un anticuerpo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, su genoma o partes del mismo que confieren resistencia como agente antiviral.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una

homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, o su genoma o partes del mismo como vector de expresión.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una forma atenuada de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, o su genoma o partes del mismo, para la premunición de una planta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "parte de la planta" indica una parte de una planta, incluyendo células individuales y tejidos de células, tales como células vegetales que están intactas en las plantas, grupos de células y cultivos de tejidos a partir de los que las plantas pueden regenerarse. Entre los ejemplos de partes de la planta se incluyen, pero sin limitación a los mismos, células individuales y tejidos de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, tallos, brotes y semillas; así como polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, tallos, brotes, vástagos, rizomas, semillas, protoplastos, callos, y similares.

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

La expresión "vector de transmisión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al agente o sustancia que propaga enfermedades. Los vectores de transmisión de ToTV en el campo pueden comprender, pero sin limitación a los mismos, animales, tales como artrópodos (en particular, los de las clases *Insecta* y *Arachnida*), nematodos (en particular, los de la clase *Adenophorea*), pero también animales más grandes, tales como, por ejemplo, aves, conejos y ratones, hongos (es decir, el filo Eumycota, en particular, hongos de la clase *Phycomycota*), plantas (parásitos) (incluidos los miembros de la familia *Cuscutaceae*), polen, semillas, el agua, partículas del suelo, e incluso manos humanas, equipos y zapatos.

El término planta "descendiente" se refiere a cualquier planta que es el resultado como progenie de una reproducción vegetativa o sexual de una o más plantas parentales o descendientes de las mismas. Por ejemplo, una planta descendiente se puede obtener clonando o autofecundando una planta parental o cruzando dos plantas parentales e incluyen autofecundaciones, así como las F1 o F2 o todavía otras generaciones. Un F1 es una descendiente de primera generación producida a partir de los padres, como mínimo, uno de los cuales se utiliza por primera vez como donante de un rasgo, mientras que la descendiente de la segunda generación (F2) o generaciones posteriores (F3, F4, etc.) son especímenes producidos por autofecundación de las F1, F2, etc. Por lo tanto, una F1 puede ser (y por lo general es) un híbrido resultante de un cruce entre dos padres de línea genéticamente pura (línea genéticamente pura es homocigota para un rasgo), mientras que una F2 puede ser (y por lo general es) una descendiente resultante de la autopolinización de dichos híbridos de F1.

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

"Resistencia total" se refiere a un fallo completo del virus para desarrollarse después de la infección y, puede ser el resultado de un fallo del virus para entrar en la célula (sin infección inicial) o bien puede ser el resultado de un fallo del virus para multiplicarse en la célula e infectar las células posteriores (sin infección subliminal, sin propagación). La presencia de la resistencia total puede determinarse mediante el establecimiento de la ausencia de partículas víricas o ARN vírico en las células de la planta, así como la ausencia de síntomas de enfermedad en dicha planta, tras la exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de virus (es decir, después de la "infección"). Entre los cultivadores, este fenotipo a menudo se denomina "inmune". Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, "inmunidad" se refiere a una forma de resistencia caracterizada por la ausencia de replicación vírica incluso cuando el virus se transfiere activamente a las células mediante, por ejemplo, electroporación.

Una "dosis infecciosa" se define como una dosis de partículas víricas o ácido nucleico del virus capaz de infectar una planta, dicha dosis puede variar entre las plantas y entre los aislados de ToTV analizados. En teoría, una cantidad desde aproximadamente 1 a 10 hasta una cantidad de aproximadamente 500 – 5000 partículas víricas de dicho virus o los ácidos nucleicos del mismo será suficiente. La infección de esta manera se puede conseguir mediante inoculación mecánica de partículas de virus purificadas o ácido nucleico del virus en las plantas.

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

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

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

En el presente documento, el término "susceptible" se utiliza para hacer referencia a una planta que no tiene resistencia al virus resultante en la entrada del virus en las células de la planta y la multiplicación y propagación sistémica del virus, lo que da lugar a síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, el término "susceptible" es equivalente a "no resistente". Una planta susceptible muestra títulos normales del virus en sus células tras la infección. Por lo tanto, la susceptibilidad puede determinarse mediante el establecimiento de títulos normales (es decir, en relación con otras infecciones víricas en plantas) de partículas víricas o de ARN del virus en las células de la planta y la presencia de síntomas normales de la enfermedad (es decir, en relación a los síntomas de la enfermedad, tal como se describen en el presente documento para la planta de la que se aisló primero el ToTV) en dicha planta después de la exposición de dicha planta a una dosis infecciosa de virus.

El término "sensible" refleja la reacción sintomática de una planta susceptible tras la infección por el virus. La reacción o los síntomas pueden ser más o menos graves en función del nivel de sensibilidad de la planta. Si el virus daña, o incluso mata, a la planta, dicha planta se clasifica como "sensible".

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

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tomate" significa cualquier planta, línea o población de *Lycopersicon* o *Solanum* que incluye, pero no se limita a las mismas, las que se presentan en la lista siguiente. Recientemente, la nomenclatura de *Lycopersicon* se ha cambiado. La nueva nomenclatura para *Lycopersicon* se proporciona en el listado siguiente (de: Peralta, Knapp y Spooner, monografía no publicada (véase: <http://www.sgn.cornell.edu> "Guía de la nomenclatura revisada de *Solanum*" ("Guide to revised *Solanum* nomenclature")))).

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

Un "vector de expresión" se define como una molécula de ácido nucleico que contiene un gen, por lo general un gen heterólogo, que se expresa en una célula huésped. Típicamente, este gen comprende una secuencia que codifica la proteína. La expresión de genes siempre se coloca bajo el control de un promotor, y se dice que un gen de este tipo está "unido de forma operativa" al promotor. El término "heterólogo" se refiere a una molécula de ADN, o una población de moléculas de ADN, que no existe de forma natural dentro de una célula huésped dada.

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

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "ácido ribonucleico" y "ARN" significan un polímero compuesto por ribonucleótidos.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "ácido desoxirribonucleico" y "ADN" significan un polímero compuesto por desoxirribonucleótidos.

El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia corta de monómeros de nucleótidos (por lo general, de 6 a

100 nucleótidos) unidos por enlaces de fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, alquil-fosfato y aril-fosfato, fosforotioato), o enlaces sin fósforo (por ejemplo, péptido, sulfamato y otros). Un oligonucleótido puede contener nucleótidos modificados que tienen bases modificadas (por ejemplo, 5-metil citosina) y grupos de azúcar modificados (por ejemplo, 2'-O-metilribosil, 2'-O-metoxietilribosil, 2'-fluororibosil, 2'-aminoribosil, y similares). Los oligonucleótidos pueden ser moléculas de origen natural o sintéticas de ADN de doble cadena y de cadena sencilla y ARN de doble cadena y de cadena sencilla con formas circulares, ramificadas o lineales, incluidos, opcionalmente, dominios capaces de formar estructuras secundarias (por ejemplo, tallo-bucle, seudonudos y estructuras de bucle, tipo "kissing loop").

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "homología de secuencia de nucleótidos" indica la presencia de homología entre dos polinucleótidos. Los polinucleótidos tienen secuencias "homólogas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima. La comparación de secuencias entre dos o más polinucleótidos se realiza generalmente mediante la comparación de las porciones de las dos secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La ventana de comparación es generalmente de aproximadamente 20 a 200 nucleótidos contiguos. El "porcentaje de homología de secuencia" de polinucleótidos, tal como 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 ó 100 por ciento de homología de secuencia puede determinarse mediante la comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede incluir adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante: (a) determinación del número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntico o residuo de aminoácido en ambas secuencias, para dar el número de posiciones apareadas, (b) dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y (c) multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de homología de secuencia. La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo mediante implementaciones computerizadas de algoritmos conocidos, o bien mediante inspección visual. Los algoritmos de comparación de secuencia y de alineación de secuencia múltiple disponibles fácilmente son, respectivamente, los programas BLAST, herramienta básica de alineación local ("Basic Local Alignment Search Tool") (Altschul y otros, 1990; Altschul y otros, 1997) y ClustalW, ambos disponibles en internet. Otros programas adecuados incluyen, aunque sin limitaciones a los mismos, GAP, BestFit, PlotSimilarity y FASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, EE.UU.) (Devereux y otros, 1984).

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

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

El término "híbrido" en el contexto de cultivo de plantas se refiere a una planta que es la descendiente de padres genéticamente distintos producida mediante cruce de plantas de diferentes líneas o razas o especies.

El término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos de cadena simple que reconocerá y formará un dúplex con enlaces de hidrógeno con una secuencia complementaria en una secuencia de ácido nucleico diana analito o su derivado de ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar con la diana de amplificación permitiendo que se una ADN polimerasa, por lo que sirve como punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de

extensión del cebador, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador (para amplificación) es, de forma preferente, de cadena sencilla para una máxima eficiencia en la amplificación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la composición (contenido de A/T en G/C) del cebador. Un par de cebadores bidireccionales consiste en un cebador directo y uno inverso como se utilizan habitualmente en la técnica de amplificación de ADN, tal como amplificación por PCR.

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

Los cebadores oligonucleotídicos se pueden preparar por cualquier procedimiento adecuado. En la técnica se conocen procedimientos para preparar oligonucleótidos de secuencia específica e incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los procedimientos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el procedimiento fosfodiéster o fosfotriéster, el procedimiento de dietilfosforamidato y el procedimiento de soporte sólido divulgados en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.458.066. Los cebadores se pueden marcar, si se desea, incorporando medios detectables, por ejemplo, mediante medios espectroscópicos, de fluorescencia, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

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

Los productos de la síntesis son moléculas dúplex que consiste en las cadenas del molde y las cadenas de extensión del cebador, que incluyen la secuencia diana. Estos productos, a su vez, sirven como molde para otra ronda de replicación. En la segunda ronda de replicación, la cadena de extensión del cebador del primer ciclo hibrida con su cebador complementario; la síntesis da un producto "corto" que está unido tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' por secuencias de cebadores o sus complementarias. Ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y extensión del cebador dan como resultado la acumulación exponencial de la región diana definida por los cebadores. Se realizan ciclos suficientes para lograr la cantidad deseada de polinucleótido que contiene la región diana de ácido nucleico. La cantidad deseada puede variar y está determinada por la función que debe tener el polinucleótido producto.

El experto en la técnica conoce el procedimiento PCR y este está bien descrito en los manuales.

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

Los términos "rigurosidad" o "condiciones de hibridación rigurosas" se refieren a condiciones de hibridación que afectan a la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan de forma empírica para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o la sonda a su secuencia de ácido nucleico diana. Los términos, tal como se utilizan, incluyen la referencia a condiciones en las que una sonda o cebador hibridará con su secuencia diana en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, como mínimo, 2 veces sobre el basal). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias distintas. Las

secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a la fuerza iónica y el pH definidos) a la cual el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda o cebador perfectamente apareados. Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sales es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion Na^+ , normalmente una concentración del ion Na^+ (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es, como mínimo, aproximadamente de 30°C para las sondas o cebadores cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y, como mínimo, aproximadamente de 60°C para las sondas o cebadores largos (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Entre los ejemplos de condiciones de baja rigurosidad o "condiciones de rigurosidad reducida" se incluyen hibridación con una solución tampón de formamida al 30%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 2 x SSC a 40°C. Entre los ejemplos de condiciones de rigurosidad alta se incluyen, la hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1 x SSC a 60°C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel y otros, 1998 y Sambrook y otros, 2001.

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

El término "anticuerpo" incluye la referencia a los péptidos de unión a antígeno y se refiere a anticuerpos, anticuerpos monoclonales, a una inmunoglobulina o anticuerpo enteros o a cualquier fragmento funcional de una molécula de inmunoglobulina. Entre los ejemplos de dichos péptidos se incluyen moléculas de anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, F(ab')₂, regiones determinantes de la complementariedad (CDR), VL (región variable de la cadena ligera), VH (la región variable de la cadena pesada) y cualquier combinación de estos o cualquier otra porción funcional de un péptido de anticuerpo. El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulinas, o fragmentos de los mismos que se unen y reconocen específicamente un analito (antígeno). Sin embargo, aunque varios fragmentos de anticuerpos pueden definirse en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* químicamente o bien mediante la utilización de metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, tal como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos, tales como Fv de cadena única, anticuerpos quiméricos (es decir, que comprenden regiones constantes y variables de diferentes especies), anticuerpos humanizados (es decir, que comprenden una región determinante de la complementariedad (CDR) que no es de origen humano) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

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

Identificación y taxonomía

En el presente documento se describe un virus aislado que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2 y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas. Tal como se ha indicado anteriormente, los polinucleótidos

5 tienen secuencias "homólogas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima. Las búsquedas BLAST utilizando secuencias de nucleótidos obtenidas a partir del aislado del virus ToTV revelaron ausencia de homologías significativas con cualquiera de las secuencias víricas o no víricas conocidas en las bases de datos GenBank y EMBL. El porcentaje de homología más alto encontrado hasta ahora era 46,5% entre los motivos de helicasa en ORF1 en la SEQ ID NO: 2, que corresponde al ARN1 del ToTV con motivos helicasa de otros virus de plantas. (Véanse los ejemplos siguientes).

10 Se debe entender que las homologías pueden ser grandes cuando se comparan dos secuencias sobre una ventana de comparación pequeña, ya que las regiones locales de similitud de secuencia a menudo se pueden encontrar cuando se comparan dos secuencias de nucleótidos largas. Sin embargo, el experto en la materia conoce que la homología de secuencia requiere el establecimiento de motivos comunes entre las secuencias, entre las que la identidad de secuencia puede ser, localmente, tan alto como del 35 a 100%, pero puede ser tan baja como del 10 al 20% en otras partes de la secuencia genómica del mismo ORF. Por lo tanto, cuando en el presente documento se hace referencia a que una secuencia tiene una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, esto puede hacer referencia a la homología de secuencia entre las regiones entre los motivos comunes, en los que la homología es mayor, pero también entre la secuencia de codificación de dos proteínas homólogas. Obsérvese que las homologías de secuencia pueden diferir entre los diferentes genes en el genoma (véanse los ejemplos).

20 Como una indicación de la relación entre el aislado de virus ToTV recién identificado y otros virus (incluidos los virus que se van a comparar con el mismo), normalmente se puede realizar un análisis filogenético sobre la base de (parte de) la información de la secuencia genómica de los virus.

25 En los ejemplos siguientes se presentan varios de estos análisis. La información obtenida hasta el momento indica que el ToTV muestra el nivel más alto de homología con los virus de los géneros *Sequivirus* y *Waikavirus* (*Sequiviridae*) y los géneros *Cheravirus* y *Sadwavirus*. Los virus de estos géneros se distinguen sobre la base de la cantidad de ARN víricos, *Sequiviridae* tiene 1 ARN, mientras que los géneros *Cheravirus* y *Sadwavirus* tienen dos ARN, y el número de proteínas de la cápside, el género *Sadwavirus* tienen dos CP, el género *Cheravirus* tienen tres CP. Estos criterios sugieren que es más probable que el virus del torrado del tomate se encuadre dentro del género *Cheravirus*. Sin embargo, los análisis filogenéticos que utilizan varios motivos diferentes de las proteínas RdRp y las proteínas helicasas, colocan al ToTV claramente separado de los géneros *Cheravirus* y *Sadwavirus* y, de hecho, sugieren que está más estrechamente relacionado con el género *Sequiviridae*. Por desgracia, actualmente solo están disponibles las secuencias completas de un *Cheravirus* (CRLV) y dos *Sadwavirus* (SDV y SMOV). Los datos preliminares sobre la transmisión vectorial sugieren que el ToTV podría ser transmitido por la mosca blanca, mientras que se desconocen los vectores naturales de CRLV y *Sadwavirus*. Sobre la base de la información disponible actualmente, incluyendo información sobre la secuencia, así como información taxonómica adicional, tal como se presenta en la tabla 1, a continuación, es muy probable que el virus recién descubierto sea un género nuevo.

40 Tabla 1: Descriptores taxonómicos para el virus del ToTV recién descubierto (tal como enumeran los procedimientos aceptados internacionalmente del manual "*Matthew's Plant Virology*" ("*Matthew's Plant Virology*", cuarta edición, Roger Hull (ed.) Academic Press, San Diego, pág. 15, tabla 2,1 en el mismo). La enumeración de la tabla en el texto de Matthews se ha pegado a la tabla 1, a continuación.

I Propiedades del virión
<i>A. Propiedades morfológicas de los viriones</i>
1. 28 nm de tamaño
2. Forma esférica (icosaédricos)
3. No tienen envoltura
<i>B. Propiedades físicas de los viriones</i>
(no investigado)

C. Propiedades del genoma	
1. Ácido nucleico de tipo ARN	
2. ARN monocatenario	
3. ARN lineal	
4. Codificación sentido positivo	
5. Como mínimo, 2 segmentos (ARN 2; SEQ ID NO:1 y ARN 1; SEQ ID NO:2)	
6. 5,5 kb (con mayor precisión, 5,2 kb o 5389 nucleótidos, excluyendo la cola de poli(A) y 8 kb (con mayor precisión 7,7 kb o 7793 nucleótidos, excluyendo la cola de poli(A))	
7. Capuchón terminal en 5' desconocido	
8. Polipéptido unido de forma covalente en el extremo 5' desconocido	
9. Tracto de poli(A) presente en ambos segmentos	
10. Comparaciones de la secuencia nucleotídica	
– El ARN 1 contiene un ORF1 con motivos típicos de helicasa (Hel), proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El nivel de homología con los motivos de helicasa y RdRp de otros virus se describe con detalle en los ejemplos.	
– El ARN 2 contiene dos ORF, de los que uno tiene en su extremo N un motivo típico de la proteína putativa de movimiento (MP) y que contiene en el extremo C las secuencias de las tres proteínas de la cápside (cubierta) (CP). El nivel de homología con proteínas de la cápside de otros virus se describe con detalle en los ejemplos.	
D. Propiedades de las proteínas	
1. 3 x CP; Hel; RdRp; Proteasa; MP putativa	
2. CP: 35, 26 y 23 kDa	
3. (Para las actividades funcionales, véase anteriormente y los ejemplos a continuación)	
4. (Para la comparación de las secuencias de aminoácidos, véanse los ejemplos a continuación)	
II. Organización y replicación del genoma	
1. Organización genómica, véase la figura 7	
6. Citopatología: como mínimo, la epidermis de células mesófilas o células acompañantes del floema	
III. Propiedades antigénicas	
1. No hay relaciones serológicas conocidas	
IV. Propiedades biológicas	
1a. Gama de huéspedes naturales: Tomate;	
1b. Gama de huéspedes experimentales:	
Plantas huéspedes alternativas analizadas para el ToTV	Síntomas locales/ Síntomas sistémicos
Chenopodium quinoa	–/–
Gomphrena globosa	–/–
Nicotiana benthamiana	–/c
Nicotiana clevelandii	–/c
Nicotiana glutinosa	–/c
Nicotiana hesperis 67A	nl/c, n, mf
Nicotiana occidentalis P1	nl/c, n, mf
Nicotiana rustica	–/– (la)
Nicotiana tabacum 'White Burley'	–/– (la)
Physalis floridana	nl/c, n, mf, do
c= clorosis; n= necrosis; l= lesiones; mf= malformación; do= muerte; la= infección latente, –= sin síntomas.	

2. Patogenicidad
<u>Síntomas en la planta huésped natural:</u> Lesiones necróticas que finalizan en una necrosis completa similar a una quemadura de material vegetal y muerte de la planta; anillos concéntricos de puntos necróticos sobre los frutos.
<u>Asociación con la enfermedad:</u> torrado; posiblemente también mancha chocolate; posiblemente también marchitez
3. Tropismo del tejido: como mínimo, la epidermis de células mesófilas o células acompañantes del floema
4. Modo de transmisión en la naturaleza desconocido
5. Relaciones con el vector: Posiblemente mosca blanca
6. Distribución geográfica: Mediterráneo; América (Centroamérica, Méjico y parte sur de Norteamérica)

Recientemente, los presentes inventores han descubierto que las secuencias genómicas del virus asociado de una enfermedad del tomate en Centroamérica (por ejemplo, Méjico y Guatemala) conocidas con el nombre de "enfermedad de la mancha chocolate", "chocolate" o "marchitez" eran idénticas a las que se describen en el presente documento para el ToTV (véase el ejemplo 2).

A medida que están disponibles más secuencias víricas, tanto de virus que no son ToTV que pueden o no estar directamente relacionados con estos, o de virus estrechamente relacionados con el virus ToTV o que se asemejan esencialmente al virus ToTV, el análisis filogenético resultará una valiosa manera de determinar la amplitud del taxón o clado del ToTV basado en la relación filogenética entre los aislados.

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

Con el fin de realizar un análisis de la relación filogenética entre un nuevo aislado, la secuencia del ToTV, tal como se da a conocer en el presente documento y las secuencias de referencia de las cepas víricas, por ejemplo, de las bases de datos GenBank, EMBL o DDBJ, el ARN genómico de dicho nuevo aislado se puede extraer directamente de las plantas infectadas y las secuencias genómicas pueden amplificarse a partir del mismo. La transcripción inversa con procedimientos de amplificación por PCR (RT-PCR) puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando cebadores de oligonucleótidos degenerados, siendo dichos cebadores, por ejemplo, capaces de actuar como cebador de amplificación para la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos a partir de los genomas de aislados de ToTV divergentes, así como de las genomas de especies víricas estrechamente relacionadas. Preferentemente, pero no necesariamente, los productos de amplificación genómica de longitud completa pueden obtenerse de este modo a partir de cepas de referencia (por ejemplo, aislados divergentes), cepas de ensayo (aislados sospechosos de ToTV) y especies estrechamente relacionadas. Preferentemente, las regiones genéticas específicas de interés se amplifican para la comparación. Los productos de amplificación (ADN) pueden secuenciarse después mediante, por ejemplo, secuenciación directa de nucleótidos de doble cadena utilizando terminadores de didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Smith y otros, 1986) con los cebadores de oligonucleótidos degenerados utilizados para la RT-PCR. La edición de secuencias de nucleótidos, el análisis, la predicción opcional de las secuencias de aminoácidos y las alineaciones se pueden realizar con los paquetes de software disponibles, tal como con el paquete de análisis de secuencia de LaserGene versión 5 (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) y el software IntelliGenetics GeneWorks versión 2.5.1 (IntelliGenetics, Mountain View, Calif.). A continuación se pueden realizar análisis filogenéticos con análisis filogenético utilizando, por ejemplo, el software de parsimonia (PAUP) con un algoritmo de unión al vecino utilizando distancias absolutas tras una búsqueda heurística y 1.000 repeticiones de arranque, y se puede generar un árbol filogenético mediante análisis de parsimonia del nucleótido contiguo alineado o las secuencias de aminoácidos, de modo que en dichos árboles los números representan generalmente los niveles de confianza de *bootstrap*. Después de 1.000 réplicas, un nivel de confianza superior al 60%, preferentemente superior al 70%, más preferentemente superior al 80%, 90%, 95% o 98%, dentro de un árbol filogenético, han de considerarse prueba suficiente de la correcta inferencia filogenética (colocación de aislados en un clado determinado), a condición de que el árbol esté suficientemente ramificado, mediante el cual opcionalmente, la ramificación puede mejorarse mediante enraizamiento a una especie de grupo de exclusión adecuado. De esta manera se puede determinar que aislado está más estrechamente relacionado con las secuencias del ToTV, tal como se da a conocer en el presente documento. La relación se expresa generalmente en términos de porcentaje de similitud de secuencia, en el presente documento denominada homología de secuencia.

Aunque los análisis filogenéticos dan a conocer un procedimiento conveniente de identificación de un virus en caso de suficiente homología de ácido nucleico, con virus conocidos, en el presente documento también se dan a conocer

varios otros procedimientos posiblemente más sencillos aunque algo más burdos para identificar dicho virus o proteínas o ácidos nucleicos víricos a partir de dicho virus. Como regla general, un virus ToTV puede identificarse por los porcentajes de homología de las proteínas víricas o ácidos nucleicos que se van a identificar en comparación con las proteínas o ácidos nucleicos víricos identificados en el presente documento por la secuencia. Generalmente, se conoce que las especies de virus, especialmente las especies de virus de ARN, a menudo constituyen una casi especie en la que el clúster de dichos virus muestra heterogeneidad entre sus miembros. Por lo tanto, cabe esperar que cada aislado pueda tener un porcentaje de homología con las secuencias del aislado algo diferente, tal como se da a conocer en el presente documento. Por lo tanto, se considera que otros aislados víricos que muestran suficiente homología de secuencia con el ToTV (por ejemplo, más de 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de homología de secuencia) pertenecen al mismo virus. Por lo tanto, el virus ToTV es un virus que tiene, como mínimo, el 70%, más preferentemente, como mínimo, el 80%, aún más preferentemente, como mínimo, el 90%, aún más preferentemente, como mínimo, el 95%, aún más preferentemente, como mínimo, el 98%, y de la forma más preferente, como mínimo, el 99% de homología con la proteína o secuencias de ácidos nucleicos dadas a conocer en el presente documento y causa síntomas de enfermedad inducidos por el ToTV en solanáceae, más particularmente en *Solanum* y *Nicotiana*, cuyos síntomas de la enfermedad pueden o no ser similares a los descritos en el presente documento. En *Cucurbitaceae*, el virus parece no causar síntomas visibles aunque el virus sea capaz de propagarse en las plantas.

Cuando se desea comparar un aislado de virus separado con las secuencias de proteínas o ácido nucleicos descritas en el presente documento, se puede identificar un virus aislado (ToTV) como filogenéticamente correspondiente a ToTV mediante la determinación de una secuencia de proteína o de ácido nucleico de dicho aislado de virus independiente y la determinación de que dicha secuencia de proteína o de ácido nucleico tiene un porcentaje de homología de secuencia, como mínimo, del 70%, más preferentemente, como mínimo, del 80%, aún más preferentemente, como mínimo, del 90%, aún más preferentemente, como mínimo, del 95%, aún más preferentemente, como mínimo, del 98%, y de la forma más preferente, como mínimo, del 99% con las secuencias que se enumeran en el presente documento.

Los aislados víricos que tienen proteínas o ácidos nucleicos individuales con una homología mayor que estos valores mínimos mencionados se consideran filogenéticamente correspondientes y, por lo tanto, taxonómicamente correspondientes al virus ToTV y, en general, las proteínas estarán codificadas por una secuencia de ácido nucleico correspondiente estructuralmente con una secuencia enumerada en el presente documento.

Cabe señalar que, de forma similar a otros virus, se puede esperar encontrar un cierto grado de variación entre los virus ToTV aislados de diferentes fuentes.

Asimismo, la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos del virus ToTV o fragmentos de los mismos según se da a conocer en el presente documento muestra, por ejemplo, menos de 70% y de la forma más preferente menos de 60% de homología de secuencia de aminoácidos con la respectiva secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de cualquier virus que no es ToTV o pariente más cercano.

La divergencia de las secuencias de las cepas de ToTV en todo el mundo puede ser algo mayor, de forma análoga a lo que ocurre con otros virus de plantas.

Se describe un virus aislado (ToTV) identificable como filogenéticamente correspondiente al mismo mediante la determinación de una secuencia de ácido nucleico de un fragmento adecuado del genoma de dicho virus y ensayándola en análisis filogenéticos, en los que se generan árboles de probabilidad máxima utilizando, por ejemplo, 1.000 muestreos repetitivos "bootstrap", tal como se ha descrito anteriormente y encontrando que está filogenéticamente más estrechamente relacionado con un aislado de virus que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, que se enumeran en el presente documento para ToTV de lo que está relacionado con un aislado de virus de una cepa de referencia que no es ToTV o un pariente más cercano.

Los fragmentos del genoma de ácido nucleico adecuados cada uno de ellos útil para dichos análisis filogenéticos son, por ejemplo, cualquier porción de las secuencias de ácido nucleico de los fragmentos de ARN de 5,5 kb u 8 kb (denominados en el presente documento, respectivamente, ARN2 y ARN1), tal como se describe en el ejemplo.

Con el aporte de información sobre la secuencia de este virus ToTV, se pueden utilizar medios y procedimientos de diagnóstico para la detección de virus ToTV en una muestra. Preferentemente, la detección de virus ToTV se lleva a cabo con reactivos que son más específicos para el virus ToTV. No obstante, esto no excluye de ninguna manera la posibilidad de que se utilicen en su lugar reactivos menos específicos, pero con suficiente reactividad cruzada, por ejemplo, porque son más fáciles de conseguir y abordan suficientemente la tarea en cuestión.

Adicionalmente se describe un procedimiento para detectar la presencia de ToTV en las plantas, preferentemente en plantas de tomate, más preferentemente, en plantas de *S. lycopersicum*. Dicho procedimiento puede comprender, por ejemplo, la determinación en dicha muestra de la presencia de un virus ToTV o componente del mismo mediante la reacción de dicha muestra con un ácido nucleico específico de ToTV, o con un anticuerpo según la presente invención. No obstante, la infección por contacto de una planta indicadora también es un procedimiento adecuado

para detectar la presencia de virus en una planta de ensayo.

En el presente documento se describe la secuencia de nucleótidos parcial de un nuevo virus aislado (en el presente documento también denominado virus ToTV) y componentes específicos de virus ToTV o análogos sintéticos de los mismos. Se pueden determinar otras secuencias genómicas del virus ToTV adicionales a las que se dan a conocer en el presente documento mediante procedimientos de secuenciación conocidos para el experto en la técnica. La determinación de la secuencia genómica está bien al alcance del experto, ahora que se describe un virus ToTV, así como las secuencias genómicas parciales del mismo. Estos procedimientos comprenden, por ejemplo, los descritos en el ejemplo siguiente. En general, dichos procedimientos de secuenciación incluyen el aislamiento de los ácidos nucleicos del genoma vírico por procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos y la determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico aislado, por ejemplo, mediante procedimientos de terminación de cadena (Sanger y otros, 1977) opcionalmente precedidos por transcripción inversa de ARN a ADN.

La presente invención da a conocer, entre otras cosas, un ácido nucleico aislado o recombinante obtenible de un virus de plantas denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente. Los ácidos nucleicos aislados o recombinantes comprenden las secuencias enumeradas en el presente documento o secuencias de homólogos, que son capaces de hibridar con aquellos en condiciones rigurosas. En particular, se describen cebadores y/o sondas adecuados para la identificación de un ácido nucleico del virus ToTV. Se pueden desarrollar sondas y cebadores adicionales capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico del virus ToTV mediante procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

Vectores de expresión y expresión de genes codificantes víricos

Además, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la presente invención. Para empezar, los vectores de expresión, tales como vectores plasmídicos que contienen (partes de) una secuencia de doble cadena del genoma del virus ToTV, vectores víricos que contienen (partes de) el genoma de ToTV (por ejemplo, pero no limitado a los mismos, virus vacunal, retrovirus, baculovirus), o virus ToTV que contiene (partes de) el genoma de otros virus u otros agentes patógenos son parte de la presente invención.

El vector de expresión puede comprender una secuencia genómica de ToTV o parte de la misma que está bajo el control de un elemento regulador, tal como un promotor o unido de forma operativa al mismo. El segmento de ADN al que se refiere como el promotor es responsable de la regulación de la transcripción del ADN en ARNm. El vector de expresión puede comprender uno o más promotores adecuados para la expresión del gen, preferentemente para la expresión del gen que codifica la proteína vírica, en células vegetales, células fúngicas, células bacterianas, células de levadura, células de insecto u otras células eucariotas. Los vectores de expresión de la presente invención son muy útiles para proporcionar antígenos del virus en sistemas de expresión de genes.

También se describe una célula huésped que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión según la presente invención. El plásmido o vectores víricos que contienen los ácidos nucleicos que codifican componentes proteicos del virus ToTV pueden generarse en células procariotas para la expresión de los componentes en tipos de células competentes (células vegetales, células fúngicas, bacterias, células de insecto, células vegetales u otras células eucariotas). Los vectores plasmídicos o víricos que contienen copias de longitud completa o parcial del genoma del virus ToTV pueden generarse en células procariotas para la expresión de ácidos nucleicos víricos *in vitro* o *in vivo*.

Procedimientos para el aislamiento y purificación de ToTV

El virus ToTV puede aislarse de plantas infectadas o de otras fuentes por cualquier procedimiento disponible. El aislamiento puede comprender purificar o purificar parcialmente partículas víricas de ToTV de una fuente adecuada. Una amplia gama de procedimientos está disponible para el aislamiento y purificación del virus (por ejemplo, véase Dijkstra y De Jager, 1998). La purificación de ToTV puede, por ejemplo, analizarse utilizando procedimientos estándar para, por ejemplo, nepovirus o luteovirus (con la ayuda de disolventes orgánicos) (véase, por ejemplo, Walker, 2004). Aunque dichos protocolos pueden dar lugar a una pérdida de infectividad del virus, estos procedimientos pueden todavía ser útiles para obtener material vírico para otros fines.

Preferentemente, con el fin de mantener la integridad vírica, se utiliza un procedimiento de purificación suave para purificar el ToTV. Dicho procedimiento de purificación suave puede comprender, por ejemplo, la homogeneización del material infectado de una planta (por ejemplo, hojas) en un tampón de homogeneización (que comprende, por ejemplo, tampón Tris-HCl 0,1 M a un pH de aproximadamente 8, aproximadamente 20 mM de sulfito de sodio [Na₂SO₃], aproximadamente 10 mM de dietilditiocarbamato de sodio [Na-DIECA] y aproximadamente 5 mM de

etilendiaminotetraacetato de sodio (Na-EDTA)), separando los restos mediante centrifugación (por ejemplo, durante 30 minutos a 49.000 g), colocando el sobrenadante sobre una cojín adecuado de sacarosa (por ejemplo, 20%) y sedimentación de las partículas víricas (por ejemplo, mediante centrifugación durante 1,5 horas a 70.000 g). A continuación, el sedimento que comprende las partículas víricas puede resuspenderse en un tampón adecuado (por ejemplo, en TRIS-HCl, a pH 8) y la fracción que contiene el virus puede separarse del resto de la suspensión mediante centrifugación por gradiente de densidad de sacarosa (por ejemplo, sacarosa al 10 - 40% en tampón de homogeneización centrifugada durante 2 horas a 110.000 g). La fracción que contiene el virus se puede determinar mediante la utilización de experimentos de infección. La purificación adicional se puede producir mediante la utilización de centrifugación de densidad en un gradiente de sulfato de cesio (por ejemplo, gradiente de sulfato de cesio al 10 - 40% en TRIS-HCl, a pH 8, centrifugado durante 16 horas a 125.000 g). A continuación, se pueden recoger las bandas víricas enriquecidas del gradiente y concentrar adicionalmente mediante centrifugación o diálisis (por ejemplo, contra Tris-HCl 0,1 M, pH 8).

La infectividad de ToTV después de la purificación puede comprobarse mediante la inoculación en una planta sensible (por ejemplo, *N. hesperis* '67A').

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

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

Las proteínas de interés de ToTV se pueden separar mediante electroforesis utilizando, por ejemplo, tricina-SDS-PAGE (Schagger y Von Jagow, 1987) o Glicina-SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Por supuesto, también pueden utilizarse otros sistemas de electroforesis que pueden resolver las diversas proteínas comprendidas en el aislado de virus o transcritas a partir de su genoma y expresadas en un sistema de expresión adecuado, tales como electroforesis en gel no desnaturizante. El área del gel PAGE que incluye la proteína diana puede escindirse y se pueden eluir del mismo los polipéptidos diana, por ejemplo mediante la utilización de un dispositivo Elutrap® (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Una proteína diana puede identificarse por su movilidad con respecto a los polipéptidos de referencia en un gel. Para aumentar la pureza, la proteína eluida se puede pasar por un segundo gel de SDS-PAGE y eluir una segunda vez. A continuación, la proteína o péptido contenido en el fragmento de gel escindido se puede eluir de nuevo y es adecuado para su utilización en la inmunización o en la secuenciación de proteínas.

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

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

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

Producción de anticuerpos

Se pueden generar anticuerpos, monoclonales o policlonales, frente a una proteína purificada o parcialmente purificada o fragmento peptídico del virus ToTV de diversas formas conocidas por el experto en la técnica,

incluyendo la inyección de la proteína como un antígeno en los animales, mediante fusión de hibridoma y mediante procedimientos recombinantes que implican bacterias o sistemas de fagos (véase, Marks y otros, 1992a; Marks y otros, 1992b; Lowman y otros, 1991; Lerner y otros, 1992, cada una de estas referencias da a conocer procedimientos adecuados).

Los anticuerpos contra partículas víricas, proteínas o péptidos del virus pueden producirse mediante la inmunización de un vertebrado adecuado, preferentemente un huésped mamífero, por ejemplo, conejos, cabras, ratas, pollos y ratones, con las partículas, proteínas o péptidos solos o junto con un adyuvante. Por lo general, estarán involucradas dos o más inmunizaciones y se cosecharán la sangre o el bazo unos pocos días después de la última inyección. Para los antisueros policlonales, las inmunoglobulinas se pueden precipitar, aislar y purificar (por afinidad). Para los anticuerpos monoclonales, los esplenocitos normalmente se fusionarán con un linfocito inmortalizado, por ejemplo, una línea mieloide, en condiciones selectivas para hibridomas. Después, los hibridomas se pueden clonar en condiciones de dilución límite y cribar sus sobrenadantes según los anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Las técnicas para producir anticuerpos (monoclonales) y procedimientos para su preparación y su utilización en diversos procedimientos son bien conocidas en la literatura (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.381.292, 4.451.570 y 4.618.577; Harlow y Lane, 1988; Ausubel, y otros, 1998; Rose y otros, 1997; Coligan y otros, 1997). Típicamente, un anticuerpo dirigido contra una proteína asociada a virus tendrá una afinidad de unión, como mínimo, de 1×10^5 – $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

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

Los procedimientos para la clonación de secuencias genómicas, para la manipulación de las secuencias genómicas a y desde los vectores de expresión y para la expresión de la proteína codificada por la secuencia genómica en un huésped heterólogo son bien conocidos y estas técnicas se pueden utilizar para proporcionar los vectores de expresión, células huésped y las secuencias genómicas clonadas que codifican los antígenos, secuencias que se van a expresar en un huésped para producir anticuerpos para su utilización en ensayos de diagnóstico (véase, por ejemplo, Sambrook y otros, 2001 and Ausubel, y otros, 1998).

Se pueden utilizar diversos sistemas de expresión para producir antígenos de ToTV. Por ejemplo, se han descrito diversos vectores de expresión adecuados para producir proteínas en *E. coli*, *B. subtilis*, levaduras, células de insecto, células vegetales y células de mamífero, cualquiera de los cuales podrían utilizarse para producir un antígeno de ToTV adecuado para producir un anticuerpo anti-ToTV o fragmento del mismo. Por supuesto, el propio ToTV también puede utilizarse como un vector de expresión para este fin.

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

También se describe una proteína vírica específica de ToTV o un fragmento de la misma, de aquí en adelante denominada molécula proteinácea. Las moléculas proteináceas útiles derivan, por ejemplo, de cualquiera de las secuencias genómicas o sus fragmentos que pueden derivar de un virus ToTV. Dichas moléculas proteicas, o fragmentos antigénicos de las mismas, tal como se da a conocer en el presente documento, son, por ejemplo, útiles en procedimientos o kits de diagnósticos y en composiciones de diagnóstico. Particularmente útiles son las moléculas proteináceas que están codificadas por fragmentos de ácido nucleico recombinante que se identifica que producen anticuerpos específicos del virus ToTV, ya sea *in vivo* (por ejemplo, para proporcionar anticuerpos de diagnóstico) o *in vitro* (por ejemplo, mediante tecnología de presentación en fagos u otra técnica útil para la generación de anticuerpos sintéticos o partes de los mismos).

En el presente documento también se dan a conocer anticuerpos, ya sea monoclonales o policlonales naturales o sintéticos (por ejemplo, moléculas de unión derivadas de la biblioteca (fagos) que reaccionan específicamente con un antígeno que comprende una molécula proteinácea un fragmento de la misma funcional específico del virus ToTV, tal como una proteína de la cápside.

Procedimientos para la identificación de un aislado vírico como un virus ToTV

Aparte de la detección del virus ToTV, que implica procedimientos diagnósticos, la presente invención también se refiere a procedimientos para la identificación, es decir, confirmación de que el aislado es un virus de plantas denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente. Dichos procedimientos pueden basarse en la inferencia filogenética, tal como se ha descrito anteriormente, y determinar el nivel de homología de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos entre un aislado vírico no identificado y una o más cepas de referencia del virus ToTV confirmado y virus no ToTV. Dichos procedimientos pueden comprender, por ejemplo, la secuenciación de (parte de) el genoma de un aislado vírico o de una proteína de la cápside y comparar el nivel de homología de dicha secuencia con las secuencias, tal como se ha dado a conocer en el presente documento para ToTV. Un aislado que tiene una homología de secuencia de más del 70% con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, tal como se da a conocer en el presente documento se considera taxonómicamente correspondiente a ToTV o perteneciente al taxón vírico de ToTV. Con el fin de identificar un virus como el virus del torrado del tomate (ToTV), también se puede utilizar los descriptores taxonómicos, tal como se presenta en la tabla 1 anterior, y encontrar mediante comparación que un nuevo aislado pertenece al posible nuevo género, al que se puede asignar la cepa de ToTV identificada por las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NOS: 1 y 2 dadas a conocer en el presente documento y depositadas en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), como la especie tipo. Por lo tanto, no es esencial llevar a cabo una comparación de secuencias, a efecto de evaluar que un virus es ToTV. Más bien, un procedimiento de identificación de un virus como un virus del torrado de tomate (ToTV) puede comprender las etapas de evaluar la presencia de la combinación de descriptores taxonómicos seleccionados del grupo que consiste en

a) descriptores morfológicos, tales como partículas de viriones esféricos, sin envoltura, de aproximadamente 28 nm de diámetro;

b) descriptores de las propiedades del genoma, tales como tener propiedades de virus de ARN sentido positivo lineal monocatenario basado en dos segmentos de ARN que comprenden colas de poli (A), que codifican poliproteínas de 5,5 y 8 kDa, respectivamente, y que comprenden regiones codificantes o motivos para 3 proteínas de la cápside, helicasa, proteasa, RdRP y proteína putativa de movimiento y qué segmentos de ARN y/o poliproteínas y/o motivos tienen homologías según la comparación de secuencias esencialmente, tal como se describe en el presente documento, y

c) descriptores de las propiedades biológicas, tales como la producción de lesiones necróticas y síntomas de tipo quemadura en el tomate, que tiene una gama de huéspedes, una relación del vector y/o una distribución geográfica esencialmente, tal como se describe en el presente documento, y que están asociados con las enfermedades de las plantas de tomate conocidas localmente con nombres, tales como torrado, marchitez mancha chocolate.

La combinación de descriptores taxonómicos que da lugar a una identificación positiva de que un aislado de virus es un virus del torrado del tomate (ToTV) es la combinación que muestra que el aislado está más estrechamente relacionado (basado en procedimientos numéricamente taxonómicos bien conocidos por el experto en la técnica) con el ToTV, tal como se describe en el presente documento, que con otros virus, y en el que dicho aislado produce, preferentemente, los síntomas de la enfermedad en el tomate típicas del torrado, tal como se describe en el presente documento.

Por lo tanto, un virus que, basado en el análisis taxonómico numérico de los descriptores taxonómicos esencialmente, tal como se define en la tabla 1, muestra estar más estrechamente relacionado con el virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004 bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, que con cualquier otro virus conocido en el momento de la presentación de la presente solicitud, y que el virus está asociado con una enfermedad que causa lesiones necróticas en el tomate, en el presente documento se considera que es un ToTV.

Dependiendo de la relación filogenética, o la distinción con otros taxones víricos, el taxón vírico del ToTV puede ser un aislado, una especie, un género o incluso una familia de virus.

Como alternativa, los procedimientos para identificar un aislado como un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, se pueden basar en la sintomatología, es decir en el reconocimiento del virus por sus síntomas de enfermedad.

No obstante, en una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención se utilizan en un procedimiento para identificar un aislado vírico como un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, a condición de que la reactividad cruzada de dichos anticuerpos con cepas que no son ToTV relacionadas se haya descartado eficazmente. Dichos procedimientos comprenden la etapa de hacer reaccionar dicho aislado vírico o un componente del mismo, con un anticuerpo, tal como se da a conocer en el presente documento. En el presente documento, se hace referencia a la reacción como que permite la aparición de la unión antígeno-anticuerpo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la utilización del virus ToTV, o partes del mismo (proteínas, péptidos), purificados o no purificados. Preferentemente, se utilizan células infectadas o cultivos de células para identificar antígenos víricos utilizando cualquier procedimiento inmunológico adecuado. Especialmente útiles en este sentido son los anticuerpos producidos contra las proteínas de la cápside vírica del ToTV.

Otros procedimientos para la identificación de un aislado vírico como un virus ToTV comprenden hacer reaccionar dicho aislado vírico o un componente del mismo con un polinucleótido específico de virus, en el que el polinucleótido es capaz de hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, de un 70% con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2, y sus cadenas complementarias. Dicha reacción de hibridación puede realizarse en cualquier formato disponible para el experto en la técnica y, en general, implicará la impresión de tejidos, procedimientos de transferencia puntual, transferencia o hibridación Northern/Southern, hibridación *in situ*, PCR, RT-PCR y similares.

Procedimientos de detección inmunológicos

Los procedimientos de la presente invención en los que los antígenos se detectan pueden, en principio, llevarse a cabo mediante la utilización de cualquier procedimiento inmunológico, tal como, por ejemplo, inmunofluorescencia clásica (IF), técnicas inmunohistoquímicas o formatos de ensayo de detección de antígenos comparables. Los procedimientos de detección de ToTV preferentes basados en la detección de la proteína de la cubierta vírica pueden, por ejemplo, comprender procedimientos, tales como pruebas de precipitación y aglutinación, radioinmunoensayo (RIA), marcaje inmuno-oro, microscopia electrónica inmunoabsorbente (ISEM), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), transferencia Western e inmunotransferencia. Los ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos de la presente invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Los anticuerpos pueden utilizarse en inmunoensayos en fase líquida o unirse a un soporte en fase sólida. Además, los anticuerpos en estos inmunoensayos pueden marcarse de forma detectable de varias maneras. Los expertos en la técnica conocerán, o pueden discernir fácilmente, formatos de inmunoensayo adecuados sin experimentación indebida. Los formatos de ensayo son bien conocidos en la literatura y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988).

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

Los anticuerpos se pueden unir a muchos vehículos diferentes y utilizarse para detectar la presencia de las moléculas diana. Como alternativa, los antígenos se pueden unir a muchos vehículos diferentes y utilizarse para detectar la presencia del anticuerpo. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la presente invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos o serán capaces de determinarlos.

utilizando experimentación de rutina.

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

Los ensayos de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) se describen generalmente en Harlow y Lane (1988). El ensayo implica la reacción de un componente vírico (por ejemplo, una proteína de la cápside) con un anticuerpo. En una realización, la muestra puede comprender un tejido de la planta que se muele y se hace reaccionar con el anticuerpo que se ha recubierto sobre una fase sólida, tal como una placa de ensayo. Si el virus está presente en la muestra, un anticuerpo específico marcado con una enzima se unirá al complejo anticuerpo-virus y se detectará mediante una reacción con el sustrato de la enzima que produce una reacción de color. Los procedimientos preferentes de análisis ELISA son ELISA directo de tipo sándwich con doble anticuerpo (DAS) (Clark y Adams, 1977), ELISA indirecto DAS (Vela y otros 1986), o TAS-ELISA. Será evidente para los expertos en la técnica que en un ELISA o cualquier otro tipo de ensayo a veces será deseable determinar la presencia de más de una proteína de la cápside vírica en una sola reacción, por ejemplo, mediante la mezcla de dos o más anticuerpos con diferentes especificidades y analizar cualquiera o todas las proteínas de protección asociadas a la cápside de la presente invención.

Procedimientos de detección basados en ácidos nucleicos

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

Con el fin de desarrollar procedimientos de detección basados en ácidos nucleicos, deben determinarse las secuencias específicas del virus para las que se pueden desarrollar cebadores o sondas. Para detectar el ToTV mediante amplificación de ácidos nucleicos y/o hibridación de la sonda, la proteína de la cápside del ToTV puede secuenciarse o, de forma alternativa, se puede aislar el ARN genómico vírico del virus purificado, realizar transcripción inversa para obtener el ADNc y clonarse y/o secuenciarse directamente. Mediante la utilización del ácido nucleico clonado como sonda de hibridación, la utilización de la información sobre la secuencia derivada del clon o el diseño de cebadores degenerados basados en la secuencia de aminoácidos de la proteína del ToTV, se pueden diseñar sondas de hibridación de ácidos nucleicos y/o cebadores de amplificación de ácidos nucleicos y utilizarlos en un ensayo de detección para detectar la presencia del virus en una muestra, tal como se define en el presente documento.

Los procedimientos en los que se detectan ácidos nucleicos pueden, en principio, llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y Faloona, 1987; Patente de Estados Unidos n.º 4.683.195; 4.683.202; y 4.800.159) o bien mediante reacciones de amplificación, tal como la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Barany, 1991; documento EP 0 320 308), replicación de secuencia autosostenida (3SR; Guatelli y otros, 1990), amplificación mediante desplazamiento de cadena (SDA; Walker y otros, 1992; Patentes de Estados Unidos n.º 5.270.184 y 5.455.166), sistema de amplificación transcripcional (TAS; Kwoh y otros, 1989), Q-Beta Replicasa (Lizardi y otros, 1988), amplificación por círculo rodante (RCA; Patente de Estados Unidos n.º 5.871.921), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA; Compton, 1991), polimorfismo de longitud por fragmentos de restricción (Patente de Estados Unidos n.º 5.719.028), amplificación de ácido nucleico iniciada por cebador quimérico e isotérmico (ICAN), procedimiento de amplificación por ramificación-extensión (RAM; Patentes de Estados Unidos n.º 5.719.028 y 5.942.391) u otros procedimientos adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos.

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

El ARN total, por ejemplo, se puede extraer de material de hojas o protoplastos de células vegetales y el ARN total,

o específicamente el ARN genómico del virus, o una parte del mismo, puede someterse a transcripción inversa para obtener el ADNc mediante la utilización de, por ejemplo, transcripción inversa del *virus de la mieloblastosis aviar* (AMV) o transcripción inversa del virus de la *leucemia murina de Moloney* (M-MuLV). Un procedimiento adecuado puede incluir, por ejemplo, la mezcla en un sistema tampón acuoso adecuado (por ejemplo, un tampón de RT disponible comercialmente) una cantidad adecuada de ARN totales (por ejemplo, de 1 a 5 µg), una cantidad adecuada (por ejemplo, 10 pmol) de un cebador de transcripción inversa, una cantidad adecuada de dNTP y la transcriptasa inversa, la desnaturalización de los ácidos nucleicos por ebullición durante 1 minuto y su enfriamiento en hielo, seguido por transcripción inversa a, por ejemplo, 45°C durante 1 hora, tal como se recomienda para la transcriptasa inversa específica utilizada, para obtener copias de ADNc de las secuencias víricas.

Como cebador de transcripción inversa se puede utilizar un polinucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido 18 - 25 unidades, que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia genómica del ToTV o, preferentemente, como mínimo, capaz de hibridar en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o un fragmento específico de ToTV del mismo. Como alternativa, se puede utilizar un cebador de poliT específico de a (cebador oligo dT) con el fin de iniciar la transcripción inversa a partir de los motivos de ARN poliA.

Después de la etapa de RT, el ADNc obtenido puede amplificarse mediante PCR a través de la utilización de, por ejemplo, ADN polimerasas de Pfu y Taq, y cebadores de amplificación específicos para las secuencias del ADNc genómico vírico. Asimismo, se pueden utilizar sistemas disponibles comercialmente para la RT-PCR (por ejemplo, los sistemas Access y AccessQuick™ RT-PCR de Promega [Madison WI, USA], o el sistema Titán™ One Tube RT-PCR o los sistemas de dos etapas RT-PCR facilitados por Roche Diagnostics [una división de F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basilea, Suiza]).

Con el fin de amplificar un ácido nucleico con un pequeño número de apareamientos erróneos de uno o más de los cebadores de amplificación, se puede realizar una reacción de amplificación en condiciones de rigurosidad reducida (por ejemplo, una amplificación por PCR utilizando una temperatura de hibridación de 38°C, o la presencia de MgCl₂ 3,5 mM). El experto en la técnica será capaz de seleccionar las condiciones de rigurosidad adecuadas.

Los cebadores en el presente documento se seleccionan de modo que sean "sustancialmente" complementarios (es decir, como mínimo, 65%, más preferentemente, como mínimo, 80% perfectamente complementarios) con sus regiones diana presentes en las diferentes cadenas de cada secuencia específica que se va a amplificar. Es posible utilizar secuencias de los cebadores que contienen, por ejemplo, restos de inositol o bases ambiguas o incluso cebadores que contienen uno o más apareamientos erróneos en comparación con la secuencia diana. En general, las secuencias que presentan, como mínimo, 65%, más preferentemente, como mínimo, 80%, de homología con las secuencias oligonucleotídicas de ADN o ARN diana, se consideran adecuadas para su utilización en un procedimiento tal como se describe. Los apareamientos erróneos en la secuencia no son cruciales cuando se utilizan condiciones de hibridación de rigurosidad baja.

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

Como alternativa, los fragmentos de ADN o de ARN se pueden detectar mediante la incorporación de bases dNTP marcadas en los fragmentos sintetizados. Los marcadores de detección que pueden asociarse con las bases nucleotídicas incluyen, por ejemplo, fluoresceína, colorante de cianina, digoxigenina (DIG) o bromodesoxiuridina (BrdUrd).

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

Las sondas útiles para la detección de las secuencias de ácidos nucleicos diana, tal como se describe en el presente documento, se unen, preferentemente, solo, como mínimo, a una parte de la región de la secuencia de ácido nucleico, tal como se amplifica mediante el procedimiento de amplificación del ácido nucleico. Los expertos en la técnica pueden preparar sondas adecuadas para la detección basada en la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana sin experimentación indebida, tal como se establece en el presente documento. Asimismo, las secuencias de nucleótidos complementarias, ya sea ADN o ARN o análogos sintetizados químicamente, del ácido nucleico diana se pueden utilizar adecuadamente como sondas de detección específicas de tipo en un

procedimiento tal como se ha descrito, siempre que una hebra complementaria de este tipo se amplifique en la reacción de amplificación empleada.

Los procedimientos de detección adecuados para su utilización en el presente documento pueden comprender, por ejemplo, la inmovilización de los amplicones y la aplicación de sondas a las secuencias de ácidos nucleicos de los mismos mediante, por ejemplo, transferencia Northern y Southern. Otros formatos pueden comprender un formato de EIA, tal como se ha descrito anteriormente. Para facilitar la detección de la unión, las sondas de detección de amplicones específicas pueden comprender un resto marcador, tal como un fluoróforo, un cromóforo, una enzima o un radiomarcador, a fin de facilitar el control de la unión de las sondas al producto de reacción de la reacción de amplificación. Dichos marcadores son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), β -galactosidasa, peroxidasa de rábano, estreptavidina, biotina, digoxigenina, ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P o ^{125}I . Otros ejemplos serán evidentes para los expertos en la técnica.

La detección también puede realizarse mediante el denominado ensayo de transferencia inversa de línea (RLB), tal como, por ejemplo, se describe en Van den Brule y otros (2002). Para este fin, las sondas de RLB se sintetizan, preferentemente, con un grupo amino en 5' para su posterior inmovilización sobre, por ejemplo, membranas de nylon recubiertas con carboxilo. La ventaja de un formato de RLB es la facilidad del sistema y su velocidad, lo que permite el procesamiento de muestras de alto rendimiento.

La utilización de sondas de ácido nucleico para la detección de fragmentos de ARN o ADN es bien conocida en la técnica. La mayoría de estos procedimientos comprenden la hibridación del ácido nucleico diana con la sonda, seguida de lavados posteriores a la hibridación. Normalmente, la especificidad es función de los lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ácidos nucleicos, la T_m se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984): $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ forma}) - 500/L$; en la que M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ácido nucleico, la % forma es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (a la fuerza iónica y el pH definidos) a la cual el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. La T_m se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de apareamiento erróneo; por lo tanto, las condiciones de hibridación y/o de lavado se pueden ajustar para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad $> 90\%$, la T_m se puede reducir 10°C . En general, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que sea 5°C menor que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica y su complementaria a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones intensamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 ó 4°C menos que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 ó 10°C menos que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones poco rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 ó 20°C menos que el punto de fusión térmica (T_m). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T_m deseada, los expertos entenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen inherentemente. Si el grado deseado de resultados de apareamientos incorrectos en una T_m inferior a 45°C (solución acosa) o 32°C (solución de formamida), Es preferente incrementar la concentración de SSC de modo que se pueda utilizar una temperatura superior. Se puede encontrar una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, 1993; Ausubel y otros, 1998.

Las sondas de oligonucleótidos se describen en el presente documento para la detección de ARN o ADNc de ToTV. Las sondas de detección en el presente documento se seleccionan de modo que sean "sustancialmente" complementarias a una molécula de ARN monocatenario o a una de las hebras de los ácidos nucleicos de doble cadena generadas por una reacción de amplificación. Preferentemente, las sondas son sustancialmente complementarias a las cadenas antisentido inmovilizadas opcionalmente (por ejemplo, marcadas con biotina) de los amplicones generados a partir del ARN o el ADN diana.

Se permite que las sondas de detección contengan uno o más apareamientos erróneos a su secuencia diana. En general, las secuencias que presentan, como mínimo, 65%, más preferentemente, como mínimo, 80%, de homología con las secuencias oligonucleotídicas diana, se consideran adecuadas para su utilización en un procedimiento tal como se describe.

Plantas resistentes al ToTV

También se describe un procedimiento para identificar una planta que es resistente a un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente. Hay varias posibilidades de identificar plantas resistentes a ToTV. En una primera serie de ejemplos de dicho

procedimiento, se pueden utilizar virus activos/infecciosos o clones infecciosos de longitud completa, mientras que en un ejemplo alternativo solo se utilizan medios de detección de virus.

Una primera etapa de un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV utilizando virus activo/infeccioso comprende exponer una planta o parte de la planta, tal como un segmento de la hoja o el tallo, a una dosis infecciosa de ToTV, cuyo objetivo es lograr una infección. La exposición puede, en muchos casos, implicar el establecimiento de contacto físico. Una dosis infecciosa puede variar entre las plantas y entre los aislados de ToTV analizados. En teoría, una cantidad de aproximadamente 1 a 10 a una cantidad de aproximadamente 500 – 5.000 partículas víricas de dicho virus o los ácidos nucleicos del mismo será suficiente. La infección de esta manera se puede conseguir mediante inoculación mecánica de partículas de virus purificadas o ácido nucleico del virus en las plantas sanas.

Como alternativa, la infección se puede lograr mediante, por ejemplo:

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

Los procedimientos para la exposición de una planta o parte de la planta a una dosis infecciosa de ToTV no se limitan a ningún procedimiento en particular.

Tal como se ha indicado, la infección puede comprender la inoculación mecánica del virus en las plantas sanas. Por ejemplo, una porción de una hoja enferma se puede frotar directamente sobre una hoja de una planta que se va a infectar. En un procedimiento alternativo, un inóculo puede prepararse, por ejemplo, moliendo tejido de la planta que contiene el virus, preferentemente hojas jóvenes que muestran síntomas, con un mortero y una mano de mortero, o cualquier otro tipo adecuado de homogeneizador en, por ejemplo, un tampón adecuado para la inoculación (por ejemplo, un tampón fosfato 0,03 M, a pH 7,7). Después de la molienda, el homogeneizado obtenido (la savia) se filtra, preferentemente, por ejemplo, mediante una estameña. A continuación, la savia se puede inocular, por ejemplo, poniendo en contacto suavemente las hojas con una cantidad de savia. Preferentemente, las hojas se tratan previamente con el fin de dañar la epidermis inferior y mejorar la entrada del virus. Esto puede lograrse, por ejemplo, espolvoreando previamente las hojas con polvo de carburo de silicio. Preferentemente se evitan los daños excesivos. Preferentemente, se utiliza un polvo de carburo de silicio que tenga partículas angulares microscópicamente pequeñas de carburo de silicio (malla de 400-500). El polvo de carburo de silicio también se puede añadir directamente a la savia, en cuyo caso se omite el pretratamiento. La savia puede aplicarse, por ejemplo, con el dedo índice, una almohadilla de espuma o tela empapada con savia, o incluso con la mano del mortero utilizada para moler, una espátula de vidrio, un cepillo duro o una pistola de pulverización. Después de la inoculación, las hojas se lavan, preferentemente, inmediatamente con agua.

Una segunda etapa de un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV comprende la identificación de dicha planta como una planta resistente a ToTV cuando, después de dicha exposición, i) los síntomas de enfermedad en dicha planta o parte de la planta permanecen ausentes o se retrasa su expresión o, como mínimo, tienen su gravedad reducida o están localizados en relación con una planta de control susceptible y/o sensible, y/o ii) virus ToTV o secuencias genómicas de ToTV no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia del virus ToTV está, como mínimo, reducida cuantitativamente en dicha planta con relación a una planta control susceptible. Tal como se utiliza en el presente documento, localizado significa limitado a la hoja inoculada.

La determinación del desarrollo de síntomas de enfermedad inducidos por el ToTV en las plantas infectadas se puede realizar por procedimientos cuantitativos, por ejemplo, en los que se observa el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas de enfermedad discernibles (por ejemplo, visibles), o por procedimientos cualitativos en los que, después de transcurrido un período determinado, se inspecciona la planta para detectar expresión de síntomas y se indica la presencia o la gravedad de los síntomas.

Además de determinar el desarrollo de síntomas de enfermedad inducidos por ToTV o, como una alternativa a ello, dependiendo del tipo de resistencia a ToTV que se va a detectar, se detecta la presencia del virus en la planta o parte de la planta. Con el fin de detectar la ausencia de virus en las plantas de ensayo, en principio se puede utilizar cualquier procedimiento. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento en el que se utilizan un anticuerpo específico de ToTV, un conjunto de cebadores o sondas. Como alternativa, se puede poner en contacto una parte de la planta de ensayo con una planta indicadora susceptible (por ejemplo, *N. hesperis* '67A') para establecer si el virus está presente o ausente en la planta de ensayo. El experto en la técnica comprenderá que para dichos procedimientos es importante descontaminar la superficie de la planta de ensayo, a fin de distinguir entre un vector de transmisión, una planta de ensayo tolerante y una planta de ensayo resistente, ya que solo tiene que

establecerse la presencia de virus en las células vegetales.

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

i) los síntomas de enfermedad permanecen ausentes; o no se pueden detectar partículas víricas o ARN vírico: la planta es resistente;

ii) los síntomas de enfermedad se retrasan o se reduce su gravedad; o se pueden detectar títulos bajos sistémicos de partículas víricas o de ARN vírico: la planta es parcialmente resistente;

iii) los síntomas de enfermedad son graves, pero son de carácter local, limitados a la hoja inoculada y no se extienden sistémicamente más allá del tejido inoculado por vía sistémica; o las partículas víricas o el ARN vírico solo pueden detectarse a nivel local: la planta es hipersensible;

iv) los síntomas de enfermedad permanecen ausentes; y se pueden detectar partículas víricas o ARN vírico: la planta es tolerante;

v) si la planta desarrolla síntomas de enfermedad y tiene títulos altos de virus sistémicos, la planta es susceptible y sensible. Ejemplos de dichas plantas son las plantas de las que se aisló el virus. Estas plantas pueden servir como plantas control adecuadas en los procedimientos de la presente invención.

Para el fin de producir plantas resistentes, y desde un punto de vista de higiene fitosanitaria, solo los resultados i), ii) y iii) pueden considerarse de interés. Para el fin de obtener plantas adecuadas para la producción de cosechas y productos asintomáticos, el resultado iv) también pueden ser de particular interés comercial.

En una realización alternativa de un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV, solo se utilizan medios de detección de virus. Por ejemplo, una planta resistente a ToTV puede identificarse en el campo mediante la observación o la identificación de una planta asintomática entre plantas sintomáticas y la determinación de la ausencia de virus en dicha planta mediante la realización de cualquiera de los procedimientos de detección de virus. De hecho, esto corresponde a un procedimiento para identificar una planta resistente a ToTV, en el que la etapa a) de exposición de una planta o parte de la planta a una dosis infecciosa de ToTV, se realiza de forma pasiva (por ejemplo, de forma natural). Cuando se realiza un procedimiento de este tipo, es preferente utilizar un procedimiento para detectar la presencia de ToTV en una muestra, en la que la presencia de un virus ToTV o un componente de la misma se lleva a cabo mediante la reacción de dicha muestra con un polinucleótido, o con un anticuerpo según la presente invención. Preferentemente, un procedimiento de identificación de una planta resistente a ToTV requiere la utilización del virus o un polinucleótido o un anticuerpo según la presente invención.

También se describe un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV, o parte de la misma. Una vez que se ha identificado la planta resistente a ToTV, esta planta puede servir como planta donante de material genético que se debe transferir desde dicha planta donante a una planta receptora con el fin de proporcionar a dicha planta receptora el material genético. La transferencia de material genético desde una planta donante a una planta receptora se puede producir por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. El material genético será, en la mayoría de los casos, material genómico. No obstante, es importante que se transfieran, como mínimo, las partes que confieren resistencia del genoma de la planta donante. En ausencia de procedimientos para determinar qué partes del genoma de la planta donante confieren la resistencia a ToTV, la transferencia puede producirse adecuadamente mediante la transferencia de cromosomas completos. Preferentemente, la planta resistente a ToTV sirve como planta parental macho o hembra en un cruce para la producción de plantas descendientes resistentes, de modo que la planta descendiente recibe el material genómico del donante resistente y actúa como planta receptora. Aunque un padre susceptible en los cruces no es en sentido estricto necesariamente una planta receptora, un padre de este tipo también se incluirá, en el presente documento, el término planta receptora.

En un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV, también se puede utilizar fusión de protoplastos para la transferencia del material genómico que confiere resistencia desde una planta donante a una planta receptora, es decir, como una manera de cruzar dichas plantas. La fusión de protoplastos es una unión inducida o espontánea, tal como una hibridación somática, entre dos o más protoplastos (células cuyas paredes celulares se eliminan mediante tratamiento enzimático) para producir una célula con uno, dos o varios núcleos. La célula fusionada, que incluso puede obtenerse con las especies de plantas que no pueden cruzarse en la naturaleza, es tejido cultivado en una planta híbrida que muestra la combinación deseable de rasgos. Más específicamente, se puede obtener un primer protoplasto de una planta de tomate u otra línea de planta que muestra resistencia a la infección por ToTV. Por ejemplo, se puede utilizar un protoplasto de una línea resistente a ToTV (tomate, berenjena, pimiento, melón, sandía o pepino). Se puede obtener un segundo protoplasto a partir de una segunda línea de planta susceptible, opcionalmente de otra especie o variedad de planta, preferentemente de la misma especie o variedad de planta, que comprende características comercialmente deseables, tales como, pero sin limitarse a las

mismas, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas de la fruta, etc. A continuación, los protoplastos se fusionan utilizando procedimientos de fusión de protoplastos tradicionales, que en la técnica se sabe que producen el cruce.

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

Un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV comprende, por lo tanto, las etapas de identificar una planta donante resistente a ToTV, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento y cruzar dicha planta donante resistente a ToTV con una planta receptora, tal como se ha descrito anteriormente, produciendo de este modo plantas descendientes resistentes.

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

Preferentemente, dicha planta donante resistente a ToTV es una planta de las familias *Solanaceae* o *Cucurbitaceae*, incluso más preferentemente una planta de tomate, una planta de berenjena, una planta de pimiento, una planta de melón, una planta de sandía o una planta de pepino.

Preferentemente, dicha planta receptora es una planta de las familias *Solanaceae* o *Cucurbitaceae*, incluso más preferentemente una planta de tomate, una planta de berenjena, una planta de pimiento, una planta de melón, una planta de sandía o una planta de pepino. Aún más preferentemente, dicha planta receptora es una planta de tomate de la especie *Solanum lycopersicum*, más preferentemente una planta de *S. lycopersicum* que posee características comercialmente deseables. La planta receptora puede ser una planta susceptible a ToTV, una planta sensible a ToTV o una planta receptora resistente a ToTV. Tal como se ha explicado anteriormente, la elección de la planta se determinará principalmente mediante el hecho de si el rasgo de resistencia es dominante o recesivo. El experto en la técnica conoce las diversas metodologías disponibles para resolver estos problemas.

Tal como se ha indicado, un procedimiento para producir una planta resistente a ToTV comprende, preferentemente, la transferencia mediante introgresión de dicha secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia desde una planta donante resistente a ToTV a una planta receptora mediante el cruzamiento de dichas plantas. Las plantas resistentes desarrolladas de acuerdo a este procedimiento pueden obtener, ventajosamente, la mayoría de sus rasgos de la planta receptora, y obtener resistencia a ToTV de la planta donante.

En un procedimiento, que se conoce como cruzamiento de razas puras, una planta donante que muestra resistencia a ToTV se cruza con una planta receptora que preferentemente muestra características deseables comercialmente, tales como, pero no limitado a las mismas, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas de las frutas, etc. La población de plantas resultante (que representa los híbridos F₁) se autopoliniza y se deja que las semillas germinen (semillas F₂). A continuación, las plantas de la F₂ cultivadas a partir de semillas de la F₂ se criban según la resistencia a ToTV. La población se puede cribar de muchas maneras diferentes, preferentemente mediante la realización de un procedimiento para la inspección visual.

Además, se describen procedimientos de prevención de la propagación de la infección por ToTV en plantas de tomate, proporcionando plantas de tomate resistentes, así como mediante la eliminación de las plantas portadoras del virus ToTV. Estas medidas pueden formar parte de una estrategia general para mejorar la fitosanidad en relación con el virus ToTV. Por lo tanto, las plantas tolerantes pueden identificarse y eliminarse con el fin de eliminar dichas fuentes del virus ToTV.

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

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar una planta que es resistente a un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una

proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo las etapas de:

a) exponer una planta o parte de la planta a una dosis de partículas víricas o de ácido nucleico vírico capaz de infectar una planta, en la que se logra la infección mediante inoculación mecánica de partículas de virus purificadas o ácido nucleico vírico del virus, y

b) identificar dicha planta como una planta que es resistente al virus cuando, después de dicha exposición,

- los síntomas de enfermedad en dicha planta o parte de la planta se mantienen ausentes o su expresión se retrasa o, como mínimo, se reduce la gravedad o están localizados en relación con una planta control susceptible, y/o

- dichas secuencias de virus o genómicas de los mismos no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia de dicho virus, como mínimo, se reduce cuantitativamente respecto a una planta control susceptible. La determinación del desarrollo de síntomas de enfermedad inducidos por el ToTV en las plantas infectadas se puede realizar por procedimientos cuantitativos, por ejemplo, en los que se observa el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas de enfermedad discernibles (por ejemplo, visibles), o por procedimientos cualitativos en los que, después de transcurrido un período determinado, se inspecciona la planta para detectar la ausencia de expresión de síntomas o se indica la reducción de la gravedad de los síntomas.

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

Kits de diagnóstico

Los procedimientos y medios dados a conocer en el presente documento son particularmente útiles en un kit de diagnóstico para el diagnóstico de una infección por el virus ToTV mediante diagnóstico virológico. Dichos kits o ensayos pueden comprender, por ejemplo, un virus, un ácido nucleico, una molécula proteínica o fragmento de la misma y/o un anticuerpo según la presente invención.

La presente invención también da a conocer un kit de diagnóstico para realizar un procedimiento de la presente invención, comprendiendo el kit, como mínimo, un componente seleccionado del grupo que consiste en un virus de plantas denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004 bajo los depositantes número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, un polipéptido, un antígeno, y un anticuerpo según la presente invención. Dicho kit comprende, preferentemente, un medio para detectar dicho virus ToTV, ácido nucleico específico del virus ToTV, molécula proteínica o fragmento de la misma y/o un anticuerpo, comprendiendo dicho medio, por ejemplo, un grupo excitable, tal como un fluoróforo o un sistema de detección enzimática utilizado en la técnica (ejemplos del formato de kit de diagnóstico adecuados comprenden IF, ELISA, ensayo de neutralización, ensayo de RT-PCR, ensayos de hibridación). Entre los ensayos de detección adecuados se incluyen ensayos directos e indirectos, ensayos de tipo sándwich, ensayos de fase sólida, tales como los que utilizan placas o perlas entre otros, y ensayos en fase líquida. Entre los ensayos adecuados se incluyen los que utilizan anticuerpos primarios y secundarios, y los que utilizan reactivos de unión al anticuerpo, tales como la proteína A. Por otra parte, se pueden utilizar diversos procedimientos de detección, incluyendo procedimientos colorimétricos, fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, luminiscentes y radiactivos.

Para determinar si un componente de virus todavía no identificado, tal como ácido nucleico, molécula proteínica o fragmento de la misma, puede identificarse como específico del virus ToTV, es suficiente analizar la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de dicho componente, por ejemplo, para un tramo de dicho ácido nucleico o aminoácidos, preferentemente, como mínimo, de 10, más preferentemente, como mínimo, de 25, más preferentemente, como mínimo, de 40 nucleótidos o aminoácidos (respectivamente), mediante la comparación de la homología de secuencia con las secuencias del virus ToTV proporcionadas y con las secuencias víricas que no son del virus ToTV conocidas (preferentemente se utiliza el pariente filogenético más cercano de ToTV) utilizando, por ejemplo, análisis filogenéticos, tal como se dan a conocer en el presente documento. Dependiendo del grado de relación con dichas secuencias víricas de ToTV o no ToTV, pueden identificarse el componente o análogo sintético.

Un kit para detectar un virus ToTV puede incluir, dependiendo del formato de ensayo, uno o más anticuerpos específicos de una proteína, preferentemente específicos, como mínimo, de una proteína de la cápside de ToTV, y, preferentemente, también incluye una proteína ToTV sustancialmente purificada o anticuerpo anti idiotipo para

utilizar como control positivo.

Agentes antivirales

5 También se describen procedimientos para obtener un agente antiviral útil en el tratamiento de la infección por ToTV en plantas, que comprenden el establecimiento de un cultivo celular o de la planta experimental que comprende un virus, tal como se ha descrito en el presente documento anteriormente, el tratamiento de dicho cultivo o planta con un agente antiviral candidato, y la determinación del efecto de dicho agente sobre dicho virus o su infección de dicho cultivo o planta. Un ejemplo de dicho agente antiviral comprende un anticuerpo neutralizante frente a ToTV o un
10 componente funcional del mismo, según se da a conocer en el presente documento, pero también se pueden obtener agentes antivirales de otra naturaleza.

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

20 También se describe la utilización de un agente antiviral para la preparación de una composición de tratamiento, en particular para el tratamiento de la infección por ToTV en plantas, y una composición farmacéutica que comprende un agente antiviral, útil en un procedimiento para el tratamiento o prevención de una infección por el virus ToTV, comprendiendo dicho procedimiento proporcionar una composición de tratamiento a una planta individual.

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

30 La presente invención también se refiere a la utilización de un virus de plantas denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:
35 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, como vector de expresión para, por ejemplo, su utilización en el silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS).
40 El VIGS es una tecnología que explota un mecanismo de defensa antiviral mediado por ARN en las plantas. En las plantas infectadas con virus sin modificar, el mecanismo está dirigido específicamente contra el genoma vírico. Mediante la utilización de vectores de expresión víricos portadores de insertos derivados de genes del huésped, el mecanismo también se puede utilizar para apuntar contra los ARN de las plantas correspondientes. El VIGS se ha utilizado ampliamente en las plantas para el análisis de la función génica y se ha adaptado para la genómica funcional de alto rendimiento. Hasta ahora, la mayoría de las aplicaciones de VIGS se han realizado en *Nicotiana benthamiana*. Sin embargo, se describe la utilización de ToTV como nuevos sistemas de vectores de expresión que permite el análisis de la función génica en otras plantas, tales como tomates y otras especies de la familia *Solanaceae*, tal como el pimiento y la patata, y especies de la familia *Cucurbitaceae*.

50 La presente invención se explica adicionalmente en el ejemplo, sin limitarla al mismo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Aislamiento y caracterización de ToTV de plantas de tomate

55

Procedimientos

Introducción

60 Se recibieron muestras de plantas de tomate de España para investigación en diagnóstico. Los síntomas en las plantas de tomate consistieron en manchas necróticas y clorosis en las hojas y anillos marrones en los frutos. Los ensayos serológicos (ELISA) señalaron la presencia del *virus del mosaico del pepino* (PepMV), pero, teniendo en cuenta los síntomas, era probable que estuviera presente otro agente todavía sin definir.

65 En los estudios de microscopia electrónica de tejido foliar infectado se encontraron partículas víricas esféricas.

Posteriormente se llevó a cabo un ensayo de infección y se encontró que múltiples accesos de tomate eran susceptibles al ToTV, varios de los cuales reaccionaron con claros síntomas (necrosis de las hojas, comenzando en la base de los folíolos individuales (véase la figura 1).

5 Transmisión y propagación del virus

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

Purificación del virus

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

En última instancia, un procedimiento de purificación muy suave dio lugar a preparaciones de virus limpias sobre las que pudieron realizar experimentos adicionales.

El siguiente procedimiento se utilizó para purificar el ToTV (todas las etapas de centrifugación se realizaron a 6°C). Las hojas infectadas de *N. glutinosa* o *N. benthamiana* se homogeneizaron en 5 partes de Tris-HCl 0,1 M (pH 8) más Na₂SO₃ 20 mM, Na-DIECA 10 mM en Na-EDTA 5 mM (tampón de homogeneización) y el homogeneizado se centrifugó durante 30 minutos a 49.000 x g. El sobrenadante se colocó en un cojín de sacarosa al 20% y se centrifugó durante 1,5 horas a 70.000 x g. El sedimento se resuspendió en 2 ml de TRIS-HCl, a pH 8, y la suspensión se colocó en un gradiente de sacarosa (sacarosa al 10 - 40% en tampón de homogeneización) y se centrifugó durante 2 horas a 110.000 x g. Dado que no se vio una banda de virus, el gradiente se dividió en alícuotas en fracciones discretas y la presencia de virus en cada fracción se determinó por inoculación de una parte de dicha fracción en hojas de *N. hesperis* '67A', tal como se describe en el presente documento y la observación de la aparición de infección. La fracción que contenía el virus se colocó sobre un gradiente de sulfato de cesio al 10-40% (en Tris-HCl, a pH 8) y se centrifugó durante 16 horas a 125.000 x g. Las bandas de virus se recogieron y se concentraron por centrifugación o se dializaron frente a TRIS-HCl 0,1 M a pH 8.

La infectividad del ToTV después de cada etapa de purificación se comprobó mediante la inoculación en *N. hesperis* '67A' (las fracciones de gradiente de sulfato de cesio se dializaron frente a TRIS-HCl, a pH 8, antes de la inoculación).

Microscopía de electrones

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

Análisis PAGE

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

Aislamiento y evaluación de ácidos nucleicos

El virus purificado se concentró mediante centrifugación (2 horas a 115.000 g). Los sedimentos se sometieron a extracción de ARN según el procedimiento Qiagen RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración del ARN se determinó en un espectrofotómetro UV (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, EE.UU.).

La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Después de la electroforesis durante 2 horas a 60 V, el ARN se tiñó utilizando azul la ortotoluidina.

Síntesis y clonación de ADNc

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

competentes Top10 (Invitrogen).

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

5 *Análisis del ADNc*

Tras la transformación se analizaron los clones recombinantes para determinar la presencia de insertos mediante PCR utilizando los cebadores específicos tanto de T3 como de T7. El tamaño de los productos de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1%. Los clones que contenían insertos de aproximadamente 1.500 nucleótidos se utilizaron para su posterior análisis de la secuencia. Los datos de secuencia resultantes se analizaron utilizando el paquete de programas DNASTAR.

15 *Determinación de las secuencias de aminoácidos de las tres proteínas de la cápside de ToTV*

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

25 Resultados

Transmisión y propagación del virus

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

Purificación del virus

La purificación de los viriones de tejido infectado de la hoja resultó ser bastante difícil. El ToTV no puede aguantar los disolventes orgánicos y tiende a agregarse cuando se centrifuga a temperaturas bajas. El protocolo de purificación utilizado (véase 1.2.) dió como resultado dos bandas visibles que contienen el virus en el gradiente de sulfato de cesio. Las bandas aparecieron en la parte inferior del gradiente, lo que indica una densidad de flotación en Cs_2SO_4 bastante alta, igual o mayor que $1,4 \text{ g/cm}^2$.

La infectividad del ToTV se ve afectada por el sulfato de cesio, pero no se pierde completamente cuando la concentración de virus en el material de partida fue alta. Las fracciones del gradiente de sulfato de cesio que contenían ambas bandas del virus eran infecciosas. No se determinó la infectividad de las bandas individuales.

Microscopia de electrones

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

Análisis PAGE

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

Aislamiento de ácidos nucleicos y análisis del ADNc

El aislamiento del ARN de las dos bandas de virus juntas reveló dos ARN: de aproximadamente 5,5 kb y 8 kb (véase la figura 4). El aislamiento del ARN de la banda superior dió como resultado solo un fragmento de ARN de 5,5 kb.

El ARN de 5,5 kb de la banda superior se utilizó como molde para la síntesis y clonación del ADNc. Las reacciones de secuencia se realizaron utilizando cebadores de la secuencia directos e inversos (T3/T7 o M13F/M13R) en diferentes clones. La amplificación rápida en 5' de los extremos del ADNc (RACE) se realizó para determinar el extremo 5' exacto del ARN. El análisis de los datos de secuencia resultantes, utilizando el paquete de software Lasergene® (DNASTAR, Inc., Madison, WI, EE.UU.), dió como resultado la secuencia completa del ARN2 del virus

(SEQ ID NO: 1; véase la figura 5). El tamaño del ARN es 5.389 nucleótidos, excluyendo la cola de poliA. En el ARN se encuentran dos marcos de lectura abierta (ORF). El ORF1 se localiza desde el nucleótido 182 al 742, tiene 561 nucleótidos de longitud y codifica una proteína de 187 aminoácidos. No se encontraron homologías para esta secuencia en las bases de datos del NCBI a nivel de proteínas y de nucleótidos.

El ORF2 se extiende desde el nucleótido 702 al 4298, tiene 3597 nucleótidos de longitud y codifica una proteína de 1.199 aminoácidos. Después de una búsqueda BLAST en la base de datos del NCBI, se encontraron homologías bajas con varias poliproteínas víricas. Para las homologías encontradas, los números de acceso de la base de datos del NCBI se dan a conocer junto con el nombre del virus y el tipo de proteína. Tanto las secuencias de ácidos nucleicos como las secuencias de aminoácidos derivadas en los tres marcos de lectura se utilizaron en un análisis BLAST. Se utilizó MAPDRAW del paquete de software Lasergene® para identificar los ORF.

Mapas de los ORF de ambos ARN:

ARN1

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

Los motivos típicos de la helicasa A (GKS), B (D), C (N) se identificaron en las posiciones de aa 398 - 400, 444 y 495 del polipéptido putativo.

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

La mayor similitud de la proteasa se encuentra para los aa 1000 - 1100, el 25% de identidad se encuentra con el *virus de la patata* V (PW; Nla proteasa en solapamiento de 86 aa).

La región RdRp entre los motivos I (KDE) a VII (FLSR) se encontró entre los aa 1303 - 1554 (Koonin 1991).

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

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

	NIMV	PYFV	RTSV	SDV	SMoV	ToTV	ALSV	CRLV	MCDV
NIMV	100	32,7	33,9	88,6	49,4	33,1	39,6	39,6	35,1
PYFV		100	43,7	33,2	32,0	35,2	36,4	36,0	42,9
RTSV			100	34,3	32,7	35,1	37,5	35,1	69,4
SDV				100	50,2	33,1	38,4	38,4	36,7
SMoV					100	35,7	40,6	38,5	38,5
ToTV						100	38,1	38,1	33,7
ALSV							100	79,5	35,5
CRLV								100	35,1
MCDV									100

NIMV= virus del moteado infeccioso de la naranja navel (*Sadwa*);

PYFV= virus de la mancha amarilla de la chirivía (*Sequivirus*);

RTSV= virus esférico del tungro del arroz (*Waikavirus*);

SDV= virus del enanismo *Satsumae* (*Sadwavirus*);

SMoV= virus del moteado de la fresa (*Sadwavirus*);

ToTV virus del torrado del tomate (género propuesto);

ALSV= virus esférico latente de la manzana (*Cheravirus*);

CRLV= virus de la hoja áspera del cerezo (*Cheravirus*);

MCDV= virus del enanismo clorótico del maíz (*Waikavirus*)

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

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

PYFV= virus de la mancha amarilla de la chirivía (*Sequivirus*);

RTSV= virus esférico del tungro del arroz (*Waikavirus*);

SDV= virus del enanismo *Satsumae* (*Sadwavirus*);

SMoV= virus del moteado de la fresa (*Sadwavirus*);

ToTV virus del torrado del tomate (género propuesto);

ALSV= virus esférico latente de la manzana (*Cheravirus*);

CRLV= virus de la hoja áspera del cerezo (*Cheravirus*);

MCDV= virus del enanismo clorótico del maíz (*Waikavirus*)

ARN2:

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

El segundo ORF que se superpone parcialmente con el ORF1 comienza con tres codones de iniciación ATG en el marco. Codifica una proteína putativa de 1.198 aa con un peso molecular predicho de 134 kDa. La identificación de proteínas mediante espectrometría de masas de las proteínas de la cubierta aisladas produce claramente un mapa de los tres cistrones de proteínas de cubierta en el extremo C del ORF2 del ARN2.

La región N-terminal de la poliproteína del ORF2 del ARN2, es muy probable que codifique la proteína putativa de movimiento (MP), ya que se encontró un motivo LRVPML altamente similar a la secuencia consenso de las proteínas de movimiento propuesta LxxPxL (Mushegian, 1994) en la posición aa 262-267. No se encontraron otras homologías de secuencia en el extremo N del ORF2 del ARN2.

El ORF2 codifica supuestamente cuatro proteínas que se escinden a partir del precursor de la poliproteína mediante escisión proteolítica. Sin embargo, no se pudo identificar ninguna homología aparente con sitios de escisión de la poliproteína conocidos. Las posiciones exactas de estos sitios de escisión todavía están pendientes de determinar.

Para la secuencia de la poliproteína CP1, los presentes inventores solo encontraron alguna homología con *parechovirus humanos* (HPeV) con un 21% de identidad en 103 aa.

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

Regiones no traducidas (UTR)

Las 3'UTR del ARN1 y el ARN2 tienen 1210 nt y 1092 nt respectivamente. Hay una identidad del 98% en los últimos 988 nucleótidos de ambos ARN. Para confirmar que las regiones 3' de las UTR de ambos ARN son idénticas, se realizaron RT-PCR en el ARN vírico total, con un cebador inverso derivado de la región 3'-UTR idéntica y dos cebadores directos específicos de ARN. Los productos resultantes de la PCR se secuenciaron.

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

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

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

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

Para los fines de detección e identificación de virus se han diseñado dos conjuntos de cebadores para RT-PCR (tabla 4) sobre la base de la secuencia de SEQ ID NO: 1.

Tabla 4. Cebadores para RT-PCR para la detección del ToTV.

Conjunto de cebadores	Longitud/temp.	Secuencia	SEQ ID No.
A:			
Cebador directo	17 unidades	5'-GAGAGCCGGCATTACACA-3'	SEQ ID NO:3
Cebador inverso	17 unidades	5'-GCACAGCTTGCGACAC-3'	SEQ ID NO:4
Longitud del producto	493 pb		
Temp. de hibridación óptima	54,8°C		
Conjunto de cebadores B:			
Cebador directo	24 unidades	5'-CCCATCATCACCTCCTCTTCGTA-3'	SEQ ID NO:5
Cebador inverso	22 unidades	5'-TTCCAGTAATGATCCAACCAAT-3'	SEQ ID NO:6
Longitud del producto	585 pb		
Temp. de hibridación óptima	54,9°C		

Un protocolo de RT-PCR adecuado comprendería lo siguiente. El ARN total se aísla y se purifica a partir de aproximadamente 100 µg de material de hoja infectada utilizando un kit de purificación de ARN, tal como por

ejemplo Qiagen RNA–Easy. De este ARN total, se utiliza una cantidad de aproximadamente 1 µg en una mezcla de reacción de 50 µl de la reacción Superscript One–Step RT–PCR (Invitrogen), en la que la mezcla de reacción comprende, además, una mezcla de reacción de 25 µl 2x, 1 µl (100 ng) de los cebadores superior e inferior, 1 µl de la mezcla RT/Taq y 22 µl de agua Milli-Q. Con el fin de realizar la transcripción inversa del ARN en ADNc y amplificar este ADNc se puede utilizar el siguiente programa de RT-PCR: Etapa 1: 30 minutos a 50°C (reacción de transcripción inversa); etapa 2: 3 minutos a 94°C (activación de la Taq Polimerasa); etapa 3: 30 segundos a 94°C; etapa 4: 30 segundos a 55°C; etapa 5: 1 minuto a 72°C; etapa 6: repetición de las etapas (3 a 5) 40x; etapa 7: 10 minutos a 72°C; etapa 8: 10°C el tiempo que sea necesario. Los productos de PCR pueden analizarse en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE o TBE.

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

Los fragmentos de la proteína de la cubierta más grande (CP1: aproximadamente 35 kDa) pudieron alinearse con partes de una zona en el ORF2 del ARN2 (aa 487 - 729). Los fragmentos de la banda de proteína de la cubierta intermedia (CP2: aprox. 26 kDa) pudieron alinearse con una zona en el ORF2 del ARN2 entre los aa 730 y 983.

Los fragmentos de la proteína de la cubierta más pequeña (CP3: aprox. 23 kDa) pudieron alinearse con el extremo C del ORF2 del ARN2 (aa 984 - 1195). A partir de estos resultados se puede concluir que las secuencias de codificación de las tres proteínas de la cápside se encuentran en el ORF2 del ARN2 (5,5 kb) del ToTV, y, por lo tanto, que las moléculas de ARN vírico aisladas son parte de las partículas del virus ToTV.

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

En 2003, se encontraron plantas de tomate cultivadas en Centroamérica (México y Guatemala) con síntomas similares a los síntomas del ToTV. Se sospechó que el agente causal era vírico. La enfermedad se conoce localmente con los nombres "Chocolate", "Marchitez (virus)" o "enfermedad de las manchas chocolate". Las plantas susceptibles que crecen en el campo pasan a estar muy infectadas a partir de 2003 en adelante.

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

Procedimientos

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

En la RT–PCR se utilizaron diferentes conjuntos de cebadores, que se sabía que hibridaban en lugares diferentes con el ARN1 o el ARN2 del genoma del ToTV.

Tabla 5. Cebadores para RT-PCR basados en la secuencia de ARN-2 del ToTV utilizada para la caracterización del virus causante de la enfermedad de las manchas chocolate, tal como se utiliza en el ejemplo 2 y tal como se indica en la figura 7

Conjunto de cebadores	Secuencia	SEQ ID No.
P1048/1049:		
cebador directo	5'–CAAGCCATCACGGAACCTAC–3'	SEQ ID NO:7
cebador inverso	5'–AGCATCTTCTTCTCCGCT–3'	SEQ ID NO:8
longitud del producto	Desde la base 36 - 544= 508 bases	
Conjunto de cebadores P1056/1057:		
cebador directo	5'–TGCTGAGGTGCTATCACTGG–3'	SEQ ID NO:9

cebador inverso	5'-CACACTTTCCACGATTTCCA-3'	SEQ ID NO:10
longitud del producto	Desde la base 2422 - 2955 = 523 bases	
Conjunto de cebadores P1060/1061:		
cebador directo	5'-AAAGGAAAGAAGCAGCCACA-3'	SEQ ID NO:11
cebador inverso	5'-GGAAATCTTGGTCAAGCCAG-3'	SEQ ID NO: 12
longitud del producto	Desde la base 3599 - 4170 = 571 bases	
Conjunto de cebadores P1056/1065:		
cebador directo	5'-GCAATGCCAGTGGTTCAGAG-3'	SEQ ID NO:13
cebador inverso	5'-GGTCAAATGGATACTCGGGA-3'	SEQ ID NO: 14
longitud del producto	Desde la base 4820 - 5327 = 507 bases	

Resultados

- 5 Los conjuntos de cebadores utilizados estimularon la amplificación de parte de la secuencia del ToTV, tal como se esperaba, pero la utilización de cuatro conjuntos de cebadores diferentes basados en la secuencia del ARN2 (P1048/1049, P1056/1057, P1060/1061 y P1064/1065) en la RT-PCR dio como resultado también la amplificación de parte del genoma de la "enfermedad de las manchas chocolate". El sitio de hibridación de estos conjuntos de cebadores se ilustra en la figura 1. Se secuenció el producto de la RT-PCR de los cuatro conjuntos de cebadores que amplifican fragmentos de la "enfermedad de las manchas chocolate" y mostró una identidad del 100% con las partes correspondientes de la secuencia del genoma vírico del virus, tal como se describe en el ejemplo 1.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

- 15 La figura 1 muestra una fotografía de los síntomas de la enfermedad del ToTV sobre las hojas de una planta de tomate.
- La figura 2 muestra una micrografía electrónica de partículas de ToTV purificadas. Las partículas tienen un diámetro de 28 nm.
- 20 La figura 3 muestra el resultado de un gel PAGE teñido con plata de las fracciones superior (TAgV-T) e inferior (TAgV-B) purificadas del virus ToTV, que indican las tres proteínas de la cápside de aproximadamente 23, 26 y 35 kDa.
- 25 La figura 4 muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa desnaturizante. Los tamaños de los segmentos están indicados en kilobases (kb). El gel se tiñó con azul de ortotoluidina. M: patrón del tamaño molecular. TAgV: 1 µg del ARN del ToTV aislado.
- La figura 5 muestra la secuencia completa de la molécula de ARN2 del ToTV 2 (SEQ ID NO: 1).
- 30 La figura 6 muestra la secuencia completa de la molécula de ARN1 del ToTV 1 (SEQ ID NO: 2).
- La figura 7 muestra la estructura general del virus ToTV, que indica el sitio de hibridación de los diversos conjuntos de cebadores utilizados en el ejemplo 2 con el ARN 2.

REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol.Biol., 215:403-410.
- 40 **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res., 25, 3389-3402.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** eds. (1998) Current protocols in molecular biology. V.B. Chanda, series ed. Nueva York: John Wiley & Sons.

- Barany, F. (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Noordaa, van der J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.
- 5 Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Bio.* 162:156- 159.
- Clark, M.F., Adams A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. Strober, W. (Eds.) (1997) *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons Inc. Baltimore.
- 10 Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991, 350:91-92.
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395.
- Dijkstra, J., de Jager, C. (Eds.) (1998) *Practical Plant Virology - Protocols and Exercises*, Springer
- 15 Duffus, J.E., Liu, H.Y., Wisler, G.C. (1996) Tomato infectious chlorosis virus - a new closterovirus-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 102(3), 219-226.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Guatelli, J.C., Whitfield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D., Gingeras, T.R. (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a mutienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878.
- 20 Hagiwara, K., Ichiki, T. U., Ogawa, Y., Omura, T., Tsuda, S. (2002). A single amino acid substitution in 126-kDa protein of Pepper mild mottle virus associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. *Arch Virol* 147:833-340.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 25 Hirata, H., Lu, X., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M. Namba, S. (2003) A single silent substitution in the genome of Apple stem grooving virus causes symptom attenuation. *J Gen Virol* 84:2579-2583.
- Jacobs M.V., Snijders P.J., van der Brule A.J. (1997) A general primer (GP5+/GP6+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 8 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 35:791-795.
- 30 Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P., Miller, N. (eds.) (1998) *Handbook of HPLC*. Marcel Dekker, Nueva York.
- Kinter, M., Sherman, N.E. (2000) *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. Wiley Interscience.
- Koonin, E.V. (1991) The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 72:2197-2206.
- 35 Kwoh, D.Y., Davis, G.R., Whitefield, K.M., Chappelle, H.L., DiMichele, L.J., Gingeras, T.R. (1989) Transcription-Based Amplification System and Detection of Amplified Human Immunodeficiency Virus Type 1 with a Bead-Based Sandwich Hybridization Format. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 1173-1177.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 40 Lerner, R.A., Kang, A.S., Bain, J.D., Burton, D.R., Barbas, C.F. (1992) Antibodies without immunization. *Science* 258:1313-1314.
- Lizardi, P.M., Guerra, C.E., Lomeli, H., Tussie-Luna, I., Kramer, F. R. (1988) Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes. *Biotechnology* 6, 1197-1202.
- 45 Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N., Wells, J.A. (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochem.* 30(45): 10832-8.
- Lu, X., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M., Namaba, S. (2001). Random mutagenesis in a plant viral genome using a DNA repair-deficient mutator *Escherichia coli* strain. *J Virol Methods* 94:37-43.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G. (1992a) Molecular evolution of proteins on filamentous phage. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 16007-16010.
- 50 Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M. Winter, G. (1992b). By passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology* 10: 779:783.
- Meinkoth J., Wahl G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem*, 138(2):267-284.
- 55 Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335-350.
- Pierik, R.L.M. (1999) *In vitro Culture of Higher Plants*, 4ª edición, 360 páginas, ISBN: 0-7923-5267-X.
- Rose, N., DeMacrio, E., Fahey, J., Friedman, H., Penn, G. (1997) *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. American Soc. Microbiology Press, Washington, D.C
- 60 Sambrook, J., Russell D.W., Sambrook, J. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463-5467.
- Schagger H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- 65

- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughs, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heins, C., Kent, S.B.H., Hood, L.E.** (1986) Fluorescent detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:673-681.
- Swofford, D. L.** (2000). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). 4^a edición. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- 5 **Takeshita, M., Suzuki, M., Takanami, Y.** (2001). Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of Cucumber mosaic virus determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. *Arch Virol* 146:697-711.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.** (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.
- 10 **Thompson, J.R., Perry, K.L., De Jong, W.** (2004a) A new potato virus in a new lineage of picorna-like viruses. *Arch Virol.* 149:2141-2154.
- Thompson, J.R., Perry, K.L., De Jong, W.** (2004b) The characterization of a new picorna-like virus infecting tomato. Abstract book of the 23rd Annual Meeting of the American Society for Virology, Montreal, Canada, July 2004.
- Tijssen, P.** 1993. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier. Nueva York.
- 15 **Van den Brule, A.J.C., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L.M., Meijer, C.J.L.M., Snijders, P.J.F.** (2002) GP5+/6+ PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 40:779-787.
- 20 **Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguét, J.G., Pérez de San Roman, C., Sanz, A.** (1986) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67:91-96.
- Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., Malinowski, D.P.** (1992) Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique *Nucleic Acids Res* 20:1691-1696.
- 25 **Walker, J.M.** 2004. PCR Protocols on CD. Humana Press.
- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H.Y., Lowry, D.S., Duffus, J.E.** (1998) Tomato chlorosis virus: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology*, 88(5), 402-409.
- Young R.A., Davis, R.W.** (1983) Efficient isolation of genes using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:1194-1198.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, secuencias que tienen una homología de la secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, y sus cadenas complementarias.
2. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 1.
3. Polipéptido aislado o recombinante codificado por un marco de lectura abierto (ORF) en la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en i) SEQ ID NO: 1, ii) SEQ ID NO: 2, y iii) cadenas complementarias de los mismos.
4. Polipéptido, según la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en las proteínas de la cápside de 23, 26 y 35 kDa, la helicasa, la ARN polimerasa dependiente de ARN y la proteína putativa de movimiento (MP) del ToTV.
5. Antígeno que comprende un polipéptido según la reivindicación 3 ó 4.
6. Anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno según la reivindicación 5.
7. Procedimiento para producir un anticuerpo contra un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo el procedimientos las etapas de
 - a) proporcionar dicho virus, o una proteína o fragmento peptídico de la misma;
 - b) inmunizar un huésped vertebrado adecuado con dicho virus, proteína o fragmento peptídico; y
 - c) recoger de la sangre o los esplenocitos de dicho huésped vertebrado anticuerpos contra dicho virus, proteína o fragmento peptídico.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, que comprende, además, las etapas de seleccionar un esplenocito productor de anticuerpos, fusionar dicho esplenocito a una línea celular de hibridoma inmortalizada y permitir la fusión de dicho hibridoma para producir anticuerpos monoclonales.
9. Procedimiento para identificar un aislado vírico como un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar dicho aislado vírico o un componente del mismo con un anticuerpo según la reivindicación 6.
10. Procedimiento para detectar la presencia de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas en una muestra, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo determinar en dicha muestra la presencia del virus o un componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con un anticuerpo según la reivindicación 6.
11. Procedimiento para identificar una planta que es resistente a un virus de planta denominado virus del torrado del

tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, comprendiendo las etapas de:

a) exponer una planta o parte de la planta a una dosis de partículas víricas o de ácido nucleico vírico capaz de infectar una planta, en la que se logra la infección mediante inoculación mecánica de partículas de virus purificadas o ácido nucleico vírico del virus, e

b) identificar dicha planta como una planta que es resistente al virus cuando, después de dicha exposición,

- los síntomas de enfermedad en dicha planta o parte de la planta se mantienen ausentes o su expresión se retrasa o, como mínimo, se reduce la gravedad o están localizados en relación con una planta control susceptible, y/o

- dichas secuencias de virus o genómicas de los mismos no están presentes en dicha planta o parte de la planta o la presencia de dicho virus, como mínimo, se reduce cuantitativamente respecto a una planta control susceptible.

12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que en la etapa b) la presencia de dicho virus en dicha planta o parte de la planta se determina mediante la realización de un procedimiento según la reivindicación 10.

13. Kit de diagnóstico para realizar un procedimiento, según la reivindicación 10, comprendiendo el kit, como mínimo, un componente seleccionado del grupo que consiste en un virus de plantas denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004 bajo los depositantes número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las Figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, un polipéptido según la reivindicación 3 ó 4, un antígeno según la reivindicación 5 y un anticuerpo según la reivindicación 6.

14. Utilización de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, un polipéptido según la reivindicación 3 ó 4, un antígeno según la reivindicación 5 o un anticuerpo según la reivindicación 6, para la producción de una composición de diagnóstico.

15. Composición de diagnóstico que comprende un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), comprendiendo un virus, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, un polipéptido según la reivindicación 3 ó 4, un antígeno según la reivindicación 5 o un anticuerpo según la reivindicación 6.

16. Utilización de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, su genoma o partes del mismo que confieren resistencia, como agente antiviral.

- 5 17. Utilización de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, su genoma o partes del mismo, como vector de expresión.
- 10 18. Utilización de una forma atenuada de un virus de planta denominado virus del torrado del tomate (ToTV), depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004, bajo los depositantes con número de referencia ToTV-E01 (DSM 16999), un virus que comprende, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, tal como se define en las figuras 5 y 6, respectivamente, y secuencias que tienen una homología de secuencia de
- 15 nucleótidos, como mínimo, del 70% con las mismas, en el que las secuencias homólogas son secuencias de nucleótidos de un virus ToTV que codifican una proteína putativa de movimiento y tres proteínas de la cápside, o una helicasa, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente, su genoma o partes del mismo, para la premunición de una planta.

20

Figura 1



Figura 2

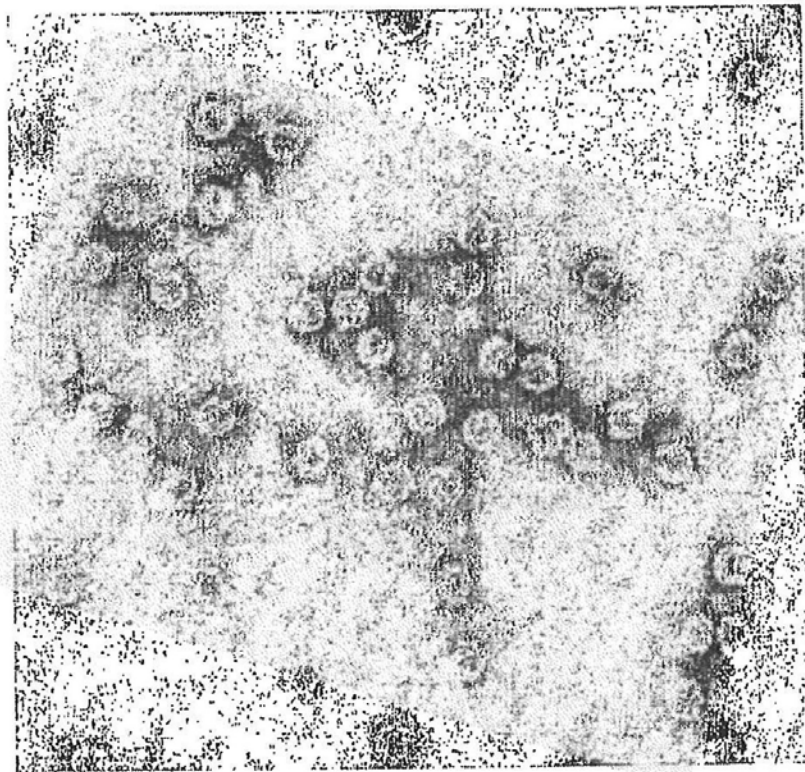


Figura 3

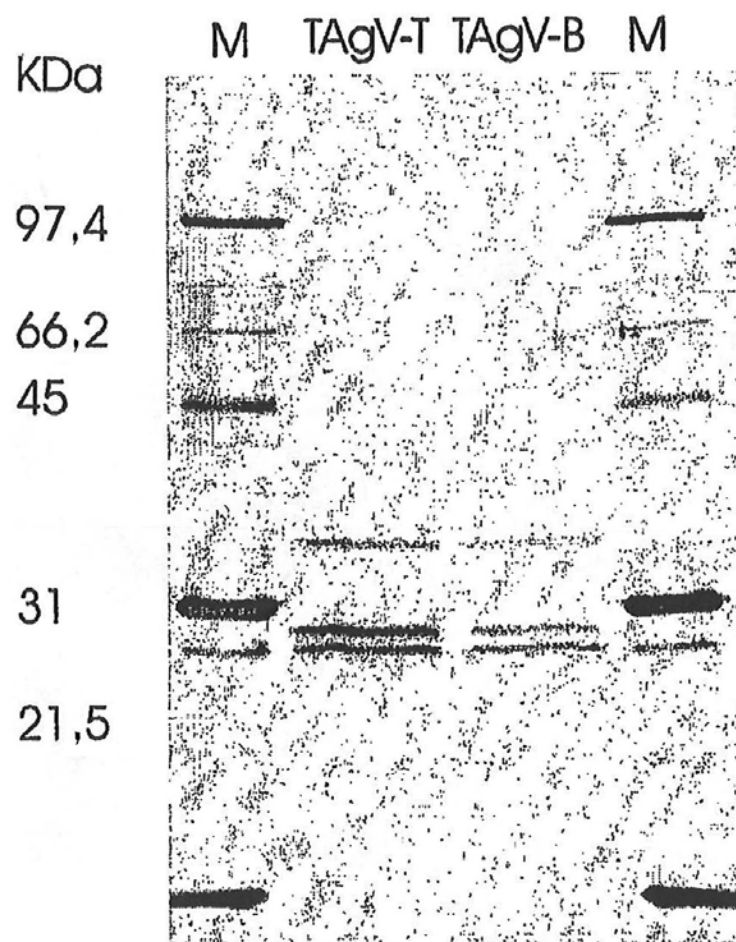


Figura 4

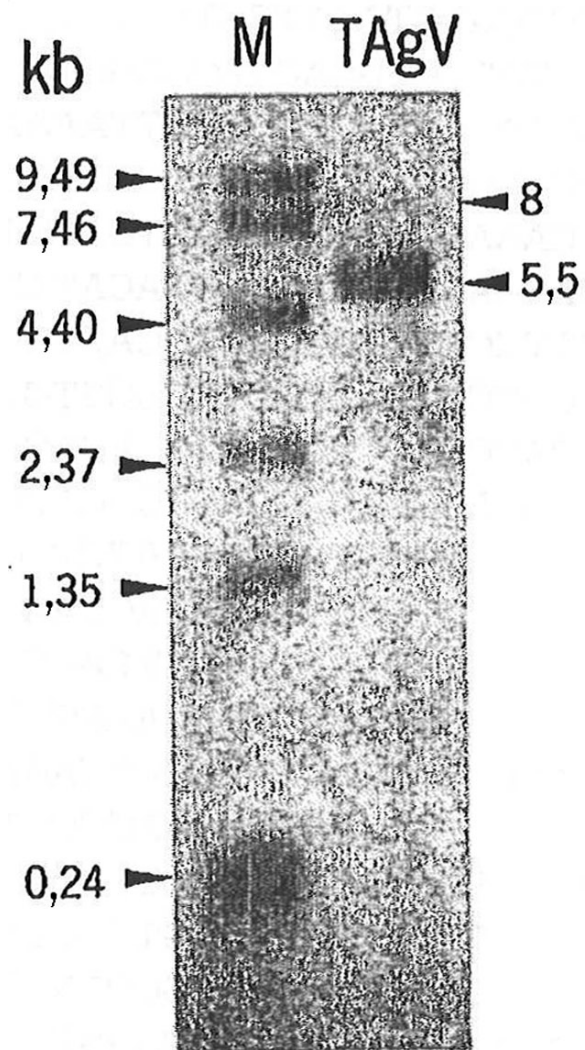


Figura 5

SEQ ID NO: 1

(Secuencia completa del ARN2)

TTTAAAAGAATAATTTTATACAATATTTATGTGATCCAAGCCATCACGGAACCTACGTCGTTCCCTA
 AGATATTGTATCAATTATCTTTGCTGTTACCATTTTGAGTGCACCGTCAACTGAAGGAACCTACGC
 CGTTTCCAAGGACAGTGTATCTTTTGTATTATTTTGGTTACATCTCTATGTCATTTATTTCTCG
 TTTGAATACATCTCTTGAAGAGGAGGCATTTACAAGCAAGTTGCAGACTCTCAGTGGGTGTGTTT
 GGTGATACAGGCTCTGGCaTAATAAACAGTGTCCAACCTCTAGACTTCAAGATTTGTCCCAAGAC
 AGGTGAGCAATTTCTGTCTATCTGTTTCGTGGCAAAACAATAGCCCTCAACTGGTTCCTGGTCA
 TTATTTACTGCGAAGTGGAACTTGGCCAATTACTGGCGTTAAGCTATCTGGCTTACTAGTTTCATAG
 ATCAATTCGTTTGGAAACCACCAGAAAACTTCTAGAAGCTCAGAGGATTTCTGTATCCCAGCAAGC
 ATCTTCTTCTCCGCTGCTGGTGCTGCAGGAAAAACAACCACAAGTAACGCTTACACAATTACAAGA
 GGAGCTTGACGAGGCCAAAACTCGCTTAGCTCTCAAAGAGAAAGAGTTACTTGAAGCTCTATCCGA
 AATATCCAAATTAAGATTGCAATTGTCCAACCACTAAGTAATGATGATGTCTTCAGTGGCTGGAC
 AGAGGAAGGGCCCAAGTGATAAAAGTGCAGCTGTATCTGAGCAATTAATTGCTCAGATTACAGCTG
 CAGTTGAAGCAGGCAACAAAAACCTGCTTCGCAAACTGGGCATGGGTTCATATGGGATTCTCTATG
 GCGCCCAAGAGAAGAAAGCCATGGAACCTGTTTGACCCTGAGGATGTACATAATATAACCTCATTGT
 GGTCTTCATTTAAGAAAACTTTCACTTCTCGAGGGATCATGGAAATCTATTCTTCCATTTGTATG
 GAGTTATGTTTTTTCATGGTTCCTCATGTACATGGTGGGGAAGGTAGTGTAAAAATTAGTTTATGTT
 CCAGTAATGATCCAACCAATCCTGTTCTGCAGGAGAAGGTTTTGTATTTTTCCGGGGGGGCACAGG
 CAGTGTTAATGAGTCCGACCATTACACTACCTTTTGTTAAAAGAGGCCCCATGTTCTACTACACAA
 TGGAGTGCTTGGCACTCGGGCTCAAATTCCTTGCTCAGTAGTGGCCATTTGGAAACAAAAGATTG
 ATATCCGTAGTGCCATTTACTCAAAGCAGGAAACAATGTCTTGGGCTATTGAGGCTCTTCACCGAC
 CTCAATTTTTCCAGGATAGACAGGAGGCAGCACAGTACATATCATCAGTATATTTCTAATGCTACCT
 CCTCAGCAACTGATTCACTGCTTCCGTTTGTGGGAGCACAGCTTGGCGACACAAAGATGAATGTGC
 CAAGCGAAGCAAGAATGATCCGGTCTCTCGCTCCGGGTGCCATGCTCAAGGTGCAGAGTAAGC
 GGTTTTCTCAATGGAAATACCATCTACCTCAACTGCACACCTCCTTGGCACAACCGGTGATGAAA
 CTGTAATACAGGAGGAAAGTAGGTACGAAGAGGAGGGTGATGATGGGGTTTTGTTCCCGTTAAAA
 AGGCTCAAGGCTGAACTATTTCCCATGTGTGGGATAATCTTGGTATTGAGTCCTTTGTAGATGTTG
 AGCTGCCCCGAAACTGGGATGAGCTGTGGTGAGACAGCAAGTTGCTGCAGCAATGATAGCATTTG
 CAAACAAGGGTGTGTTGCTTGGTCCCAAAACATATAATCAACCGGGACAAGCACAAATATCCACTTGG
 AGAATATCACCGAGCACAACTACTTGGTGATACTGGAAAGGTACGGCATTGTGAATGCCGGCTCTC
 TGGCCAGAACTGAAAACTGGTACAATCTTACCTTGGCACAGAGAGTGAAGAGCTAATTTATCAAA
 GGGACGATGCATATTTTCATGTTTGGTGATAACACCAACCCATATCCTCCCTTTGATTGTTATGATG
 GCTTAACGCTCAAAGTTTCGAGTGAGCTAGAGCGTGTGGCAAAGGAGCAGGCGCGCCAAAGATTTT
 ACAAGGAGGCGGCCAGGGCTCAGGTGAAAAACAAGGTGGCCCAAACCTAGTGTGGAAGAAATACCAT
 CCACCTCATTGCGCCACAAAGGTTGCCATGGAGAGTGGCAGTGTGGATAGCATGAAAAATGCTATTC
 AAGCTGAAGCTGCCAATGAAGCTGTAAGGCCCAATGAAGTTATGTTTGAATTTGGGCAAGAAATGA
 ATAATGAAGGTGCGACAGAGCTGGAATTACAACAACCAGCCTGCGTGGCCAGTAACCTCTTCTTCA
 ATGTTGGAGTTTTTTGAGTTTGCATGGAAGAAAAGCAGTTCTGTTGCTGCTGAGGTGCTATCACTGG
 CGCTCCCTGCGGCTCTCTTTGGTAAATCCAAGGAGATGTCAATGGGATCGCAAATGCTAAGGTATT
 ATGATGCCGCATTAATTATGTACAAGGTCTCTTGTATATTTCCGGCATGGGTGCAATTTCCGGGTC
 AGCTGGCCCTGGTTTGGGATGAGTGCAATGTGCTCAACAGAAAGAAGGAGTTTCATCAACATTGCCCT
 CTCTGTATGCCAGCAACATAGGCTGGTTTTCAGCATCTGAACAGAGTAGTGGGAATTTTGTTTT
 CACCTACGGGTATCGGCCAAATTCGTTCCACTTGATCCAGCCTCGGGGGCTTATGATCTGGGTAGCA
 TACGGGTGTTTGTGACGCACCCCTTGGCTAGTGCTACTGAATTGGAGAGCATACCTTGTACATCC
 ATCTGCAGTGTAAGGTGTTGTGACCAACATCATGCAGCCTCCTCGTTTGCAGACACAGGCACAAT
 TTGGTATGAAACCAGACCAGACACACTTTCACGATTTCCAACAAATCAGGTACTGTTACACTACA

Figura 5
(continuación de las codificaciones)

SEQ ID NO:1 (continuación)

ATTGGGGAGTGGCTGCTAGCATGGGTACTACCTTAGTTAGCATCTTCTCTCCGTCAGGCATATATG
AAAGTGACGGTACGCTGCAACCATCCTTGCTTGGAACATAGCACGCAATTGCAAATGGTGGACTG
GCACTTGCGTGTTTGAGATTTGTATTGAGAAGACTCAGTTCATTCTGGTAGTTTGGCCATTGGAC
TGGGTACACTGAACACAAGCATGTCCACCCCTCATGACATTTTAAATATGCCGCATGTTATTTGTA
ACCTTGAGATGGGACGAAAAGTTCTATTTTCAAGGTGTACGATAACCAATTGGAATGGGAAAAATCTTT
TGACCACTGGTTCGGAAGAGTTCTCTACCGCGGCCCAAGCATATGTCTCACATGAGGTTGTTTGCTA
CAGTCTTGAAACCCCTGGTATCAACTTCAATACATCTAGATACGGTCGGGGTAACAGTGCAGCTTA
AATGCATAGAAGATTTGGTCCTTGCGGGCACTGTGTCTGTTAAACCCATTTACGGACACTGGACTA
AAGGAAAGAATGCTGTGGACTTCTATTCTCTGAGATGGACTTGTCTCAGCGCAAAGAAATGAGA
AATTACGCAAGGAAAACGTTGAGACATTTGATGAGAAAGGAAAGAAGCAGCCACAGGTACAAGTGC
CGCTCAGAGACAAGTTTTCATATGGGGCTGTACAATATTTTGTGATGAATTGGAAGGACGAAGAGC
GACTGTTGGTTTTTACCATGCGCACCCCTGGTCCGTAAGATTCCCTCAGGGGGCACTGGTACAGGAGG
CCATCACATGCCCCATTCAATTGATTGGTGTCTTCTCTGTTATTGGTCTGGAAGTCTTGAATACA
CCATTATTGTACATAGAGTGCAGACTTCCAATAACATAGGAGGAGTGCTGAACATCACCTTAGATT
CATCAGGGTACCCTTTTCTCTTGGGAATCTCAAAGGGCACCTATGTTGTCTCTGCTGGTGGAGGAG
CAAAATGGGCTTTTCACTTATGGTATGAGCGACAACATCTTTTCTTTTGTGGTGCATGATGATGAGT
TTTTTCctAGaCGCCATACCAAAGCCAGAGCAATAGATCCAAATGCTTCAAGAATAATGACTCTGC
AAGATCGACTAGGAAATCTCATAATAAATTTACCAGCCAAGATGTGATAAGCTCTCTGGAAATCT
TGGTCAAGCCAGGACCTGATTTCAAATTGCAACTGGCTCAAGCTCCTTCAGCAAATCATGAGAAGC
ATTTGGGTGATATGCAAACGCATACCTACCTTTATACTCCTGATTTTTTCAGAACTAAGGAGTTTTG
AAAATTAATATCCTGTACGTGATATAGGAGCCGTGAGTCCGGCATGTGACTCATCATGTGCAGTT
AACATGTGTACTGTGAATAATGTAACTGTAAGGATAGTTAATTTTAACGGAGAGTACTGACTTTA
ACTAGTTGGGAGTCCGGCTCCATTTGGAGTACCAATGAATCTACATTGGTTAAAGAGATTTGCACG
CCTCTCTTTAAATATGGATCGTGACCTGCTTGGTTAGAAAGTACCTTTACTTAGGTTTACAAAG
TACGGGGAGCACTCCCTGGTTAACATAGTGCAGGTGCTATCCCATGATAGTCTTTAACTCAAGGG
TTGAGTTTCGGTTTGCATCTTTTGCCGTGATGAAAGATGAGGTAGCTTCCCCCTTATTGGGAGGCTG
AAACTACACATATGTAGTGGGTTTGACTGAGTCTTATAATCAGTCCGTTTGAAATTCGATAATTTT
CCGTAGCTTGCGTCAAGCTGCTCACGTTAGGGGCGTGAGTGAAGATGCGCCGTACCACGCCTTCCC
CGGCAATGCCAGTGGTTTCAAGCGGGCCCTCAGAATAGAGGTTAAAACTAGTGTGATGGTGTATAT
CACGATAAAAAGTGACACCCGGGTTGTGCTGCGCCTAGTTAACACGAGCACAGGTCCCACCCCTATA
GTGGAAGAACTTGGTTGAGTTTTAAAGAACAACCGTTTGAGCGACGACAAAGTTCGGTAGCTTG
CGACAAGCTGTTTGTGTTAGGGGCACAAATGAAGTTATAGCACACCACTTCTTCCCTAGGTTTCGTC
CAGTGGTTTACAGTGCTATCCTCAGAAAAGAGGTTAAATCTAGTGTGATGGTGTATATCACGATA
AAGAATGACACCCGGGATGTGCTTCTCCTAGTTAACTCGAGCACGGTTTTTACACCACAGTGAAC
TATCTTACTGCTTTAAATGTTGTTTGTGTTTACTTGTTTTATTGAGTGTGTTAATATCATGCAT
ATTTGCTGTTGAAGGTTCTGTGATGAGGTCAAATGGATACTCGGGAACACAGTAACCTTTGCATT
TGAATTGTTTTCAATTCAGTGTGTGAGTTTGAATATGTATTTTAAAAAAAAAAAAA

Figura 6

SEQ ID NO:2

(Secuencia completa del ARN1)

TTAAAAGAGTTATTTTGAGAATATAACCTACGTCGTTATTACAGACCAAGTCTCTGTTAATCAAA
 ATCTCCCTTTAAAACCTCATTCTACTTTTACATTTGGCAACATGTCTTTTCCAAGATGTTCCCGG
 TTTCAACTCAGTTACTGAAAAGTGCCTACCAGCTCCTCTGGTTCTTTCTTTTTCAGAGCTTACTGC
 TAGTATTAGTAATTTCTCCCGCACTCTGTCCAATGTTACCAAGGTTTCATCTCAAATTTCTTCTCA
 CATTGAAGATTTGAAGCCTTCAGTTACAGATGCTGCTTCTTCTTTTACCAGCACCTGTAACCTCTGT
 TACTAAATTTGTTAGATAAGATAATGACTTTAATTGAACCCTTCATCAAGGCTTACTCTTTTGTCTGC
 ATCCATGTACAAATCAATTTGTGATATGGTTGCAAGATTGTTGCAAGCATCAAAGATAAGTTCAC
 ACTTGGTTTAACTGGGTGTTGGACAAATCTGAGGATGTGGATGTTTTAGTTATAGCTTTTCTTAT
 TTTTGCAATTTCTATGTTAATAATTGTTTTCATTTGTCCAAGTAGTGTACTAGATGGAGTTGTACA
 GATGACTCACATAGTTTAAATACAGTAGGTAACCTTCTTTTTCAGCTTTGTACAAATTAGACTGGTT
 ACCGACATGGTCCCAAAAGTTTTCAATGATGGCACAAGCCAATGTTCTACCAGGGGAATCCATGTC
 AACTCACCCTTTTCAAGTGGTAGCATCCCTCATAGCCTTTGGGATTTCTACCCTTGTGTTCTGT
 GGCTGTACCTGGTAGACCCAATGGTCTATCCAACCGCTATCAAAAATTCTGTACTCAGCGGGAAG
 TGGTGTCTCAACAGTGCAATCAATTGTTTACCCTGTTTTCAGGAATATGAAAGATTGTACTTCCAGGC
 CTTTCTCTGGGTTCTGGAAATAATAGTAGACATTTTGGTTTTAAGAATCCAGTTTTGTCTGCTAT
 TAGTGCCACATTTGTCTACGGACTTATTCAGTGGATGGAAGAGGTGGATGCAGTGTGTGATCCAGC
 ACATCGCTTGGAAAATTTTGCAAACCTGCTTCACTATCAAGCTCCAACATCTAAGGGAGCAGGC
 TCTTAAAATCTCTGCTTACATTGCTACACATCCTGTAGCAGCCTTTATGAGCCACAGGGTAACGGC
 AGCAATARCCCATCTTGATAAGATATATGGGGAGAAGTCCAGCACACTGGCGTGGGCCAATACAG
 GGCAGAACCTTTTATGGTTCAATGGTATGGTGCCAGTGGTTGTGGGAAATCCACCAGCATGCGGCT
 GTTCATCAATGATGTTTTGGACCGCATGGAAGAGCCAAAGTTGAACAGGCCTATGCTGTGAGTAA
 GCGAGATGCTTACTGGTCAAATTATGCCCATCAAAGTCTATCCTGATGGATGACATGGGCGCTCT
 GAGAGATGGGGCAGGGCAATGCCAGGACATTAAGGATTTGATAGATATCAAGTCCACTCAACCAGC
 CCCCTTGCCCATGGCAGCAGTGGAGGATAAAGGCCGCCACTTTACCTCCCGATATATATTTGCCAC
 ATCCAACCTTATCTCAGCTCCTGCTCAGTGTGGTCTAACCTACCCCGATGCTTTTGAGAGAAGACG
 GGATGTTCTTGTGGAGTGCAGGAAGGTGGGTGAGTTTAACACTGATGCTCCCACTTCTCACCTTGA
 ATTTGATGTGGTTGAGAGCAAAGACCCCATGCAATAACACACAGGGGTTTGAGCTATGATGATTT
 GCTGGAATATGTGGTTGCCAAGTGCAAGGTTTCATGCAGAAATCTCAGGAAAACGTGATGGCGCCAC
 ATCAGGCAAGGTGGCACAGGTTGATGTGTACCTGAGGAAATAATAGCATCCATGGATATGTTGAA
 TATCCAAGATACCAAGCAGGATGCTAAGCTTCCCGTGGTTGTTGTAAGTGAAGAGGATAGGGTGGC
 CTACTCYCAGGAGTTGACAGTGAAGCTTTGAAATATGCTTATCAGGGTAGTCTGAATCCCGCAGC
 ATATTTCCCTCATGACATGCACAAACAGGCCATATTTGATGTGCTAAGTGAATCCGCCaAAGAAAC
 ATTCACCAGGTGGGTTAATGACATGCTGTATCAAGGTTGCTGTAATGAGAACTATCGCTGGCTGAT
 AAAGAATATCCCAGCTGATTATATCATGCATTTAAGAGCTTCATCTACGCTTCCACAATCAATGA
 GCGTAGCTTTGACGTTCAGAAGCAGCTGCCTGATGGAATGGCGCACCCTGCCATAGATGCTGATGT
 GGACACACTGATATGCGTGGAGCAGATGCCTGCCACGTACAATTCTGTACACAGCATTTGTGAG
 GTATTGGTGCCGCAGAAAGATGGAACAGCCTAGGCAATCCTGGGTGGTAGTTTGCTACCACAGTAT
 TGTGGATTATATCAAGAATGCTTGGTATGATTTACCGTACATCTTGAGAGTTCTGATTAAGGCTGG
 CCTTATTTTAATTGCACTCAATGGTGCATTTGGGGCTGTACAGCATTTCTGTGCTTGTGGCAATC
 CAACACTTTCCCTTCAGCAGAAGGAAGAGGAGGATTACCAACGAGTCAAATAGCATCTCCAGCCG
 GAAGAAACAAGGGAAGAGCATCTTTGCTCGATCTTTGCTGGCACAAAGCCAAGGGTGATATGCTGGA
 GAAATGGGCAAGTGATGATGGCTTCATCAATGAAGGATTGAAGAAAACCTAGTCGTCTTGAGACT
 AGGTGAAGGTGTCTACTTCAGAGGCACCTATGTCTGCTCGGGCTGGGTGATGACAGTGGCTCATGC
 TTTTTCAAGCCTCCGTGATGGCACAACCTTCTCAATAATACATGCCAGTCAATTTCCAAGGTGCA
 ATACAATGCCAAAACCTGCACGGTCTTGAAGGAGCAAGATATTGTCTGCTCAATGTTGGAAACCC
 CGATGGTCCCAAGCCTGATATTGCAACACTTTCCTGTACGGGATGGTGTtGTTTTTCTAAGGG

Figura 6
(continuación de las codificaciones a)

SEQ ID NO:2 (continuación)

CACTCAAGGGGTATGTGTGAGAGCAGTAGCATCAAAGGATGCTTCGCAAGGAAATCTTGAGTACTT
GCGTTTTAATGTGATGATGTCCAAGGGTTACCTTGAAAAGGTAACGTACCAGATGGACTCTAGTTC
CTTTAACTGGAGTCTCAAGCATCTTATGAGTATCACATGAATGGTGAAAATGGTGATTGTGGTAC
TCTTCTTCTTTTGCCCAACGTGCAAGACAAACAACCATGCATTGTGGGTATTCAATTGTGCTTCTTA
TGATGAAGAAGCTGCGCACAAAGGGTTTGTAGCATCCAATGCTACAGCTATTTTCCGAGATCAGTT
GGAAGATCTTCCGACTGGTCCGGTTAAAGTAGCAATGGTAAGGTGCCAGCTCCTTAAGGATCTACG
AGCCAGGGATGCGGCTCTTTTGAAGAAAAACAGGTGGCTTTTGTGGCACATTGCCAGCTGAACA
AGCAGCCACGGTCCCCACAAAACAACGCTGCGAAGGAGTGGCTTGTGTTGAAGCTTTTGGGCCTGC
AGAACTGCTCCATCTATCATTTTCACTTTCAGACAAAACGTGGGGAAGGTTTtGATCCGTACGTGGC
TGGCATACAAAAATACAATGAAACAGCACAAAATTTTGATGAGGACATTGCGAGGCTAGCCTATGA
AGGGCTACGTCAAGCAATTTTGCCTGTGCTGCACTCCAGCGAGTTCCTTTTGGAAAGCCCGTCAC
ACAGAAATGAAGATGTGGTGCTCAATGGTGTGATGGGTTTGACTATTTTGACGGGATGGAGTTGAG
TACCTCTTGCGGGTATCCGTACAACAAGTTGGGTATGGGCACTAGCAAGAGAGAGTTTGTGGAGCC
AAGTGGAGATGGAGATCGAGTCCAACCTCAAAGGACCACTCCAATTTTGTGACTGGGAGGCTTT
GGATGTGGAAATTCGCAAAGGAACTTTGTGGAACCTGGTCACCACCAATGTGCCAAAGATGAGCG
CTTGCCGTTGGAAAAGGtTTTTGGGAAGCGGAAAACCCGTTTGTGTTGAAATTCTTCCCTTCCATTA
CAATATGTTGGTTAGGAAGTATTTCTCGGATTTTTCCGCCAGTCTGATGGCATCCCACAATGCTCT
GCCATGCAAAGTGGGCATTAATCCTGGAGGTATTGAATGGACTCTGTTGGCTAATGGCTTCAGAGC
AGTCTCTGATACAGGATTTTCTGCTGACTATTCCAGTTTTGATGGGAGAGCTCCCATCTTGCCTT
TCAATGGTTTTGTGATCTTGTGGATGACTACTATGGATCACCTCCTGGTCTCCAGACTCCAATGC
CAGACATGTGCTTCTTATGATGGCTTCATGCCATTATACTATTTGTGAGAACAAAGGTTTTTAGGTT
GGTGGGAGGTATGCCTTCAGGATTTGCACTCACCGTTATCTTCAACTCTCTTCTCAATGAGTTTTA
TATGCGTTATGCATTTATTTCTCTATTGAGAAGACCACATATAGCAGCTCAAGCTATAGGGTGCAA
ACCTCTGATTTCAACAAGCTATTTGTGGCAGTCTATGGTGATGACAATCTAGTTGCAGTTCCTAT
GGAATTGCATTGGTATACTCTGCCAGCTATTGCCCAAGAATTGGAGATGGTGAATGTTATTATAAA
GAATGGCATCGACAAGAATGAGATGTTAGCAGTTCCAAAATGCTAGACTTGTCTGAGCTAACATT
TCTAAGCAGAGGTTTAAAGAGGCACCGTCTAGGATACGTTCAAGCTCCTCTGAAATGGGTATCTAT
CATAGAACCAATGTACTGGATAAGGCCTtCTGTTGGTTGTCCCGATGCTCTCGCTATGTTGAAAA
CATAGACACGGGAGTTAGAGAGGCATTTACCATGGGCCTCAGGTTTTTGAAAAGTTGGTGACAGA
TGTTCAAACGCTCTCAAGGAGCGGTGTTTCCAGCCACCACATTTCTACATATTTTGAATTGGA
GCAGGACTGGCTGGTGGAGGTTACAGGAAATCCAGCCATTGGGCTCATCAAGGAACTTCATATTGC
AGCTTCAGCTTTTGTGCTTTTGCCCCAGGCAATACTGTTCTGAATTTTCTGATGGAGTGACATAC
TTTTGCTGACCGAGTGAGTTTCTGCTCCTCGCGAACAGCTGCTGCACAGCAGTGGGACACCACCAC
TGTTTTGGTGAACTGCACTGGGGCAAAGAGACCCACATGGGTAAGAGGGCCCACCACATGGAGGGA
CTTTGAAGGGCTTATTTGGCCTTACACAATGGCTGCAATCAAGGACCACATCTGCAGCATTGTAAC
CAAAGGGGTGACCAAAACCACATGTGGTTTTTGTGTTGTGGCAATGGGTATGCTATTGGTCCAGTGTG
CGCTGCATTGTACTGTCTGTCCACTGGCCAATATTCTTCTCAGGATGTTGTTGTGAGATTGAGAAC
CATAGCAGATGTTACAGATCTCAGTCAATATCCAGGAGGTTGTGCCAAGTATCTTCTGAAATGTGC
TGATACAAGAGAAGAAGAGCTTGCAGATACATAAAATGCAACAAGCCAAGGGTGAGACACCAGC
ATACATACCTCAAGGAGGATTTTCCCTTGGAATTTTGAATTTGTGCAAGGGAGAATTGATCTACA
GTTGGCCAGCGCTTGCTTTTACAGTGGGACCTTATGGGGGATGGGGTCAACACACTACTAGAGA
GCTTAAGTTGCTGCTCAAGGACATGGAGAAGATATATCAAATTTTAGTCAAAGAGAGAGCTTCAT
CACTCTCTACTTTGACTATCTCAGTTCAGAGCAGGTGATGTTGTTGGTTGACTTTCTTAGGCTCCA
AGGGTTTTTTCCYCGCCAAAATGATGTGGATTACTTGCTTAAAGCCTTTAAGCTGAGCAAGCAGAG
GCACAATAAGGAAAACGTGCATACGGTTTACTTTAGAAAGCCTTTTCTCTCAAGGAAAATGACCAT

Figura 6

(continuación de las codificaciones b)

SEQ ID NO:2 (continuación)

GGGGTCCAAAGAAATTCTGTCCGCAACAGCTGCTGAGTCATTGTTTGGTATGGATGTTTCCGCTAA
TGTGCTCAAGAGTAGGCTACTTCATCTTCAGAAGCCCATAAAGTGTTTCATCCATGGAGTTGGCCTT
TAAAATTTATTGTGTTCATCCAGGGCCACCTGAGCAAGGAAGTTGTAACCTCAACGCATGTA
CCAACAAGATCTGACAGAAGGGATCATAGAGAAAGTGATATTGTGGTTAACCGCCACACTGTCGGA
GAGCTTCCAGTGGATCTTGTGATGTACCTTTAGGCTTGGATAACATAGAGATCCAGGATAAAGG
TTTTTCCCTAAATCCAAATAATATAAATATGAATGCATGTGATGCCATCTTGTTCAACTCACTGA
GTGTTACAACCGATCAACAAAGAAACATGTGTTCTGTGCTACACGACTGCATCCTCTCTTGTGTGT
TGCCTATGTGCTTGCACATAGACATCAGACAATTGATGAGTTGCCGTCCTTCTATGCAACACACCC
AGATGTGTTGCTTTTGACACCAATCCTAACAGGCTACAAAGCGCCTTGAGTCGGGCTAAATGACTC
AGCTTGTACATGCAATATGTGTACTGTGAATAATATTGCATGAGGATTAACGGAGAGTACTGACTT
TTGCTAGTCCGGGAGTCCGACCCACTATATGGGTACCTGTGAATCTACACGGGTTAGGAGATTTGCA
CGCCTCTCCATAAATATGGTTTCGTGTGCCCTGCCCTTGGTTAGACAGCCTTCCATGCCGGAAGTAAA
TGGCCTATAACGGAGAGTACTGACTTTAACTAGTTGGGAGTCCGGCTCCATTGGAGTACCAATGA
ATTTACATTGGTTAAAGAGATTTGCACGCCTCTCTTTAAATATGGATCGTGTACCCTGCTTGGTTA
GAAAGTTCCTTTACTTAGGTTTACAAAGTACGGGGAGCACTCCCTGGTTAACATAGTGCAGGTGCT
ATCCCATGATAGTCCTTTAACTCAAGGGTTGAGTTCCGTTTGCATCTTTTGCCGTGATGAAAGATG
AGGTAGCTTCCCCCTTATTGGGAGGCTGAACTACACATATGTAGTGGGTTTGACTGAGTCCCTATA
ATCAGTCCGTTTGAAATTCGATAATTTTCCGTAGCTTGCGTCAAGCTGCTCACGTTAGGGGTGTGA
GTGAAGATGCGCCGTACCACGTCTTCCCCGGCAATGCCAGTGGTTTCAAGCGGGCCCTCAGAATAG
AGGTTAAAACTAGTGTGATGGTGTATATCACGATAAAAGTGACACCCGGGTTGTGCTGCGCCTAGT
TAACACGAGCACAGGTCCCACCCTATAGTGGAAGAACTTGGTTGAGTTTTAAAAGAACAACCCGT
TTGAGCGACGACAAAGTTCGGTAGCTTGCAGCAGAGCTGTTTGTGTTAGGGGCACAAATGAAGTTAT
AGCACACCACTTCTTCCCTAGGTTTCGTCCAGATGGTTTACAGTGCTATCCTCAGAAAAGAGGTTA
AATCTAGTGTGATGGTGTATATCACGATAAAGAATGACACCCGGGGTGTGCTTCTCCTAGTTAACT
CGAGCACGGTTTTACACCACAGTGAACTATCTTATTGCTTTAAATGTTGTTTGTGTTTACT
TGTTTTATTGTGTGTTTAAATATCATGCATATTTGCTGTTGAAGGTTCTGTGATGAGGTCAAATGG
ATACTCGGGAACACAGTAACCTTGCATTTGAATTGTTTTCAATTCAGTGTGTGAGTTTGAATATG
TATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 7

