

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

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

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

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

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.01.2020** **EP 2723873**

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

30 Prioridad:

23.06.2011 EP 11171196

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
05.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 077 T5

DESCRIPCIÓN

Construcciones de silenciamiento del gen de P0 y su uso

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

- Se han publicado unos pocos ejemplos de tolerancia de ingeniería, por ejemplo, a BNYVV, transformando y expresando la secuencia de proteína de cápside de BNYVV en el genoma de la remolacha azucarera (WO91/13159), aunque solo hay informes esporádicos sobre plantas enteras de remolacha azucarera transgénicas funcionales, tales como las descritas en el documento EP 1 169 463 B1. En particular, los informes muestran datos limitados sobre el nivel de resistencia observado en condiciones infectadas con plantas de remolacha azucarera transgénicas transformadas con un gen codificante de una secuencia de proteína de cápside de BNYVV.
- 35

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

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

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

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

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

Estado de la técnica

- 5 La solicitud de patente WO 2007/128755 describe una secuencia de TGB-3 usada para reducir y/o suprimir los efectos nocivos de TGB-3 de tipo salvaje en las plantas, para generar plantas transgénicas resistentes a los virus, especialmente remolachas azucareras resistentes al virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha.
- 10 Carmen Simon-Mateo *et al.*, "Biochimica et Biophysica Acta", 1809 N° 11-12, páginas 722-731, 2011, describe diferentes estrategias antivirales usadas para obtener plantas resistentes a los virus en los últimos 25 años.
- A. Kozłowska-Makulska *et al.*, "Journal of General Virology", Vol. 91, N° 4, páginas 1082-1091, 2010, describe la actividad supresora del silenciamiento del ARN en proteínas P0 de diferentes aislados de polerovirus en remolachas infectadas, virus de la clorosis de la remolacha y virus de la amarillez de la remolacha.
- 15 Pu Yan *et al.*, "Journal of Virological Methods", Vol. 166, N° 1-2, páginas 101-105, 2010, describe construcciones de silenciamiento de ARN para desarrollar plantas resistentes a los virus mediante la expresión de ARNs en horquilla derivados de virus.

Compendio de la invención

- La presente invención proporciona métodos y medios para conferir tolerancia o resistencia viral sin presentar las desventajas del estado de la técnica, preferiblemente métodos y medios que confieren tolerancia, resistencia, preferiblemente resistencia extrema o total, especialmente tolerancia o resistencia viral al BMVYV (virus de la amarillez de la remolacha azucarera) (incluso resistencia extrema o total al BMVYV) o preferiblemente tolerancia o resistencia al BMVYV (virus de la amarillez de la remolacha azucarera) y al BNYVV (virus de la amarillez necrótica de las nervaduras de la remolacha) combinados (incluso resistencia extrema o total al BMVYV y al BNYVV) en una célula vegetal o en una planta, particularmente en una célula vegetal de remolacha azucarera o en una planta de remolacha azucarera (posiblemente generada a partir de esta célula vegetal).
- 20
- 25

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

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

- Un primer aspecto de la presente invención es una construcción de ARN que comprende una secuencia de segmentos sentido y una secuencia de segmentos antisentido con secuencias deducidas a partir del gen de P0 (o a partir del gen codificante de la proteína P0) del genoma del BMVYV o a partir de un gen ortólogo, en donde dichas secuencias de segmentos sentido y dichas secuencias de segmentos antisentido comprenden, ambas, un fragmento de nucleótidos en donde la secuencia comparte al menos el 95% de identidad de secuencia con el gen de P0 del genoma del BMVYV o de un gen ortólogo y que tiene un tamaño de al menos 20 nucleótidos..
- 35

- Preferiblemente, en esta construcción de ARN, la o las secuencias de segmentos sentido y/o antisentido comprende(n), además, un fragmento de nucleótidos en donde la o las secuencias comparte(n) al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia no traducida del extremo 5' (5'UTR) adyacente a la secuencia de nucleótidos del gen de P0.
- 40

Más preferiblemente en esta construcción de ARN, las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden un fragmento de nucleótidos en donde las secuencias comparten al menos el 100% de identidad de secuencia con el gen de P0 del genoma del BMVYV.

- 45 Ventajosamente, en esta construcción de ARN, las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, además, un fragmento de nucleótidos en el que las secuencias comparten al menos el 95% de identidad de secuencia con el gen de P1 del genoma del BMVYV.

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

- 50 Ventajosamente, en estas construcciones de ARN, las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, ambas, además, un fragmento de nucleótidos que comparte al menos el 95% de la identidad de secuencia con el genoma del BNYVV.

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

esta/estas construcción(es) de ARN.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

40 Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 2 (A y B) representa otro fragmento de la secuencia de P0 viral según la invención (Figuras 2A y 2B; SEQ. ID. NO: 14) con una secuencia de nucleótidos de P0 sentido y una secuencia de nucleótidos de P0 antisentido (en negrilla) intercalada con una secuencia de intrón de remolacha de 91 pb (en negrilla, subrayada, SEQ. ID. NO: 12). Unos pocos nucleótidos de la Figura 2B se indican en negrilla y bastardilla. Estos corresponden a la 5'UTR del genoma del virus BMV. Otros pocos nucleótidos en bastardilla y subrayados de la Figura 2B que ni pertenecen al P0 ni pertenecen al intrón pero que aún están presentes como tales son los restos de la estrategia de clonación. Las secuencias de nucleótidos de P0 sentido y antisentido de la presente memoria son las mismas que las dadas en la Figura 1B. Una construcción que comprende la horquilla completa (SEQ. ID. NO: 14) también es mencionado como

construcción hpP0 2.

La Figura 3 destaca las diferencias en el extremo 5' de la SEQ. ID. NO:1 comparado con el extremo 5' de la secuencia de codificación del BMV del P0 representada por la SEQ. ID. NO: 17. La secuencia subrayada de la Figura 3 corresponde a la secuencia líder 5' no funcional de la SEQ. ID. NO: 1.

5 La Figura 4 (A y B) es una representación esquemática del vector pFGC5941 en el que se introdujo un fragmento del gen de P0 en orientación sentido (SEQ. ID. NO: 1) y antisentido (SEQ. ID. NO: 3), intercalado con una secuencia intrónica del gen chalcona sintasa A de petunia (CHSA; SEQ. ID. NO: 11) (Figura 4A, pFGC5941, construcción 1; SEQ. ID. NO:13) o intercalado con una secuencia intrónica de remolacha (SEQ. ID. NO:12) de 91 nt (Figura 4B, pFGC5941, construcción 2; SEQ. ID. NO: 14). Promotor CaMV 35S: promotor 35S de CaMV; OCS 3': señal de poliadenilación del gen de octopina sintasa; promotor de MAS: promotor del gen de manopina sintasa; MAS 3': señal de poliadenilación del gen de manopina sintasa; BAR: gen de resistencia al herbicida Basta; pVS1: origen de replicación de pVS1; NPTII: gen de resistencia a la kanamicina; LB, RB: límites izquierdo y derecho del ADN de transferencia.

15 La Figura 5 es un análisis estadístico del ensayo de resistencia obtenido con la construcción 1 (hpP0u con el intrón de petunia). Cada histograma representa el título medio del BMV con error típico en 10 plantas inoculadas con BMV (Y). hp: horquilla; Inf: infectado. En el eje Y: densidad óptica (A_{405}) obtenida por ELISA 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2. En el eje X, de izquierda a derecha: líneas transgénicas: hpP0-7, hpP0-8, hpP0-9, hpP0-10, hpP0-11 y hpP0-12; control infectado por BMV: Col0 Inf; Col0 saludable.

20 La Figura 6 es un análisis estadístico del ensayo de resistencia obtenido con la construcción 2 (hpP0u con el intrón de remolacha). Cada histograma representa el título medio del BMV con error típico en 10 plantas inoculadas con BMV (Y). hp: horquilla; hpP0: construcción 1; hpP0remolacha: construcción 2; Inf: infectado. En el eje Y: densidad óptica (A_{405}) obtenida por ELISA 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3. En el eje X, de izquierda a derecha: líneas transgénicas: hpP0-12 (construcción 1), hpP0remolacha-1 (construcción 2), hpP0remolacha-2, hpP0remolacha-3, hpP0remolacha-4, hpP0remolacha-5, hpP0remolacha-6, hpP0remolacha-7 y hpP0remolacha-8, control infectado con BMV: Col0 Inf; Col0 saludable.

25 La Figura 7 es un análisis estadístico del ensayo de resistencia obtenido con las construcciones 1 y 2, respectivamente. Cada histograma representa el título medio del virus con error típico en 10 plantas inoculadas (Y). Los histogramas de color gris oscuro representan la infección con clon de BMV-EK y los histogramas en gris claro, la infección por aislado de BMV-2itb con el método de transmisión de pulgones, respectivamente. hp: horquilla; hpP0: construcción 1; hpP0remolacha: construcción 2; Inf: infectado. En el eje X: densidad óptica (A_{405}) obtenida por ELISA 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5. En el eje X, de izquierda a derecha: líneas transgénicas: hpP0-9 (construcción 1), hpP0-10, hpP0-12, hpP0remolacha-2 (construcción 2), hpP0remolacha-7 y hpP0remolacha-8; control infectado: Col0 Inf; Col0 saludable.

La Figura 8 representa la secuencia de WT P0 (SEQ. ID. NO: 17 y 18).

35 La Figura 9 (A y B) representa la secuencia de la construcción en horquilla hpP15A4-P0 según la invención (Figuras 9A y 9B, SEQ. ID. NO: 15) con una secuencia de nucleótidos P15A4-P0 sentido (SEQ. ID. NO: 7, nucleótidos en bastardilla para la secuencia P15A4 con las 3 mutaciones subrayadas y nucleótidos usuales para la secuencia de P0; comparado con WT P15: A es reemplazado con C y AG con GC) y SEQ. ID. NO: 8 correspondiente a una secuencia de nucleótidos P15A4-P0 antisentido (en negrilla y bastardilla para P15A4 y en negrilla para P0) intercalada con una secuencia intrón de remolacha de 91 pb (en negrilla, subrayada, SEQ. ID. NO: 12). Unos pocos nucleótidos de la Figura 9B se indican en negrilla, bastardilla y subrayados. Estos corresponden a la 5'UTR del genoma del BMV viral. Otros pocos nucleótidos subrayados de la Figura 9B que ni pertenecen al P15A4-P0 ni pertenecen al intrón pero que aún están presentes como tales son los restos de la estrategia de clonación. Una construcción que comprende la horquilla completa (SEQ. ID. NO: 15) también es mencionado como construcción 1 hpP15A4-P0.

40 La Figura 10 (A y B) representa la secuencia de las construcciones en horquilla hpP0-P15A4-A y hpP0-P15A4-B según la invención (Figuras 10A y 10B, SEQ. ID. NO: 16) con una secuencia de nucleótidos P0-P15A4 sentido (SEQ. ID. NO: 9 nucleótidos usuales para la secuencia de P0 y nucleótidos en bastardilla para la secuencia de P15A4 con las 3 mutaciones subrayadas) y SEQ. ID. NO: 10 correspondiente a una secuencia de nucleótidos P0-P15A4 antisentido (en negrilla para P0 y en negrilla y bastardilla para P15A4) intercalada con una secuencia intrón de la remolacha de 91 pb (en negrilla, subrayado, SEQ. ID. NO: 12). La diferencia entre las dos construcciones en horquilla es la presencia de dos nucleótidos adicionales en la secuencia de P15A4 (nucleótidos en los recuadros) para la construcción hpP0-P15A4-B. Unos pocos nucleótidos de la Figura 10B se indican en negrilla, bastardilla y subrayado. Estos corresponden a la 5'UTR del genoma del BMV viral. Otros pocos nucleótidos subrayados de la Figura 10B que ni pertenecen al P0-P15A4 ni pertenecen al intrón pero que aún están presentes como tales son los restos de la estrategia de clonación. Una construcción que comprende la horquilla completa (SEQ. ID. NO: 16) también es mencionado como construcción 2 hpP0-P15A4-A y como construcción 3 hpP0-P15A4-B.

La Figura 11 (A y B) es una representación esquemática del vector pFGC5941 en el que se introdujo una secuencia

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

Descripción detallada de la invención

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

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

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una construcción de ARN (tal como un ARN en horquilla preferiblemente descrita más adelante como hpP0) que comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) (ambos) que tienen secuencias deducidas (es decir, que comparten al menos el 95% de la identidad de secuencia) del gen de P0 (o secuencia de nucleótidos) o del gen (secuencia de nucleótidos que codifica la proteína P0) del genoma del BMVY o de genes ortólogos o que tienen secuencias deducidas (es decir, que comparten al menos el 95% de la identidad de secuencia) del genoma del BMVY y que tienen un tamaño de al menos 20 nucleótidos.

Ventajosamente, esta construcción de ARN (en horquilla, hpP0) comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) (ambos) que comprenden, además, fragmentos (sentido y/o antisentido) (ARN) deducidos (es decir, que comparten al menos el 95% de identidad) de la región 5' no traducida (5'UTR) del BMVY (adyacente a este gen codificante de P0 de BMVY o genes ortólogos) y/o esta construcción de ARN (horquilla) comprende un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido con secuencias deducidas tanto de un fragmento de nucleótidos de 5'UTR como de un fragmento de nucleótidos (adyacente) de la secuencia de nucleótidos de P0 del BMVY o de genes ortólogos.

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

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

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

Ventajosamente, esta(s) construcción(es) de ARN (horquilla; hpP0 y/o hpP0u) según la invención comprende(n) un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido que tiene, además, (un fragmento que son) secuencias deducidas del genoma del BNYVV, preferiblemente además de la secuencia de 5'UTR del genoma del BMVY (adyacente al P0) y/o esta/estas construcción(es) de ARN (horquilla; hpP0 y/o hpP0u) comprende(n) un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido (que comprenden un fragmento con una secuencia deducida del gen de P0) en los que ambos comprenden un fragmento de nucleótidos que comparte al menos el 95% de la identidad de secuencia con (una parte) del genoma del BNYVV.

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

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

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

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

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

- En el contexto de la presente invención, el término "segmento" hace referencia a una/s secuencia/s de nucleótidos sentido y/o antisentido de nucleótido (ARN) capaz/capaces de ser usada/s en el silenciamiento génico. Por lo tanto, un segmento puede ser tan corto como de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 o 40 nucleótidos, pero también puede abarcar varios genes y/o genes y regiones no traducidas adyacentes (5') (5'UTR). El segmento preferido abarca (la parte 5' del) gen de P0 (o secuencia de nucleótidos) y la 5'UTR adyacente.
- En el contexto de la presente invención, el término "fragmento" hace referencia a una secuencia de nucleótidos sentido y/o antisentido de nucleótidos (ARN) con una secuencia deducida de una secuencia de nucleótidos viral diana. Por lo tanto, un fragmento puede ser tan corto como de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 o 40 nucleótidos, pero también puede abarcar más de un gen.
- En el contexto de la presente invención, posiblemente, se asocian varios fragmentos para formar segmento/s sentido y/o antisentido (ARN).
- Posiblemente (en especial en el caso de dos fragmentos deducidos del genoma de diferentes virus asociados), los fragmentos se asocian mediante una secuencia enlazante o espaciadora (que no deriva de la secuencia viral diana) para formar un segmento sentido (ARN) y/o un/os segmento/s antisentido (ARN).
- Preferiblemente, en la presente invención, el fragmento de la 5'UTR y el fragmento de P0 adyacente se asocian sin una secuencia enlazante o espaciadora.
- Estas construcciones pueden comprender secuencias modificadas (secuencias mutadas).
- Por lo tanto, la expresión "secuencia deducida" hace referencia a secuencias de nucleótidos con al menos el 95% (más preferiblemente al menos el 96%, 97%, 98%, 99% o incluso el 100%) de la identidad de secuencia con el gen mencionado. Por ejemplo, una secuencia deducida del gen de P0 (o secuencia) del genoma del BMVYV hace referencia a una secuencia de nucleótidos con al menos el 95% de la identidad de secuencia con la secuencia SEQ. ID. NO: 17 y que tiene un tamaño de al menos 20 nucleótidos.
- Preferiblemente, estas construcciones no contienen más del 5% de restos mutados en comparación con la secuencia de tipo silvestre (SEQ. ID. NO: 17) y/o con la secuencia SEQ. ID. NO: 1 o la secuencia SEQ. ID. NO: 3.
- Ventajosamente, estas construcciones (ARN) (incluso los segmentos y, más preferiblemente, los fragmentos) tienen un tamaño mayor que aproximadamente 50 nucleótidos.
- Posiblemente, estas construcciones (ARN) (en forma de segmento sentido y/o de segmento antisentido) tienen un tamaño menor a aproximadamente 10.000 nucleótidos, posiblemente menor a aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000 o aproximadamente 1.000 nucleótidos.
- Preferiblemente, el segmento sentido (ARN) y/o el segmento antisentido (ARN) (con una secuencia deducida de la 5'UTR del P0) comprenden uno o más fragmentos que abarcan al menos 5 nucleótidos, más preferiblemente al menos 10 nucleótidos, más preferiblemente aún al menos 20 nucleótidos de la 5'UTR (adyacente al gen de P0), pero posiblemente menos de 40 nucleótidos y preferiblemente menos de 30 nucleótidos de esta 5'UTR (adyacente al gen de P0).
- La caracterización molecular del material vegetal demostró la presencia de pequeñas moléculas de ARN complementarias tanto a la secuencia sentido como antisentido del P0 del BMVYV, indicando que se obtuvo el mecanismo de silenciamiento y que se disparó la degradación del ARN genómico.
- Estas construcciones de ARN (horquilla) disparan eficazmente el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés), disparando la degradación del ARN transcrito del BMVYV (o tanto del BMVYV como de el

BNYVV).

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

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

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

Un aspecto relacionado es una construcción de ARN (tal como un ARN en horquilla) que comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) (ambos) con secuencias deducidas (es decir, que comparten al menos el 95% de la identidad de secuencia) del genoma del BMV (o su secuencia de nucleótidos).

- 15 Preferiblemente, la construcción de ARN (tal como un ARN en horquilla) deducida del genoma del BMV que comprende un segmento sentido (ARN) y un segmento antisentido (ARN) tiene una secuencia sentido deducida (es decir, que comparten al menos el 95% de la identidad de secuencia) de la mitad 5' del genoma del BMV y/o del grupo que consiste en nucleótidos del genoma del BMV que codifica las proteínas P0, P1, P2, P3, P4 y P5, más preferiblemente de los nucleótidos del genoma del BMV que codifica las proteínas P1 o P2.

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

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

25 Por el contrario, los inventores realizaron ensayos sobre el efecto de las construcciones de ARN (en forma de horquillas) con una secuencia deducida exclusivamente del genoma del BMV.

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

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

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

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

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

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

La presente invención también se refiere a una construcción de ADN con capacidad de transcribirse en la/las construcción(es) de ARN de la invención y a un vector que comprende esta construcción de ADN, en particular un vector de expresión (y/o vector autorreplicante (tal como un plásmido o un vector viral)) o un casete (o sistema) de expresión, preferiblemente codificando un segmento de ARN sentido y un segmento de ARN antisentido con

secuencias deducidas de la o las secuencias del P0, unidas operativamente con una o más secuencias reguladoras (secuencia operadora o promotora, inclusive una secuencia poliA), activas en una planta o en una célula vegetal, preferiblemente en un tejido específico (preferiblemente la raíz) de la planta.

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

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

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

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

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

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

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

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

- 35 Las secuencias (segmentos) de nucleótidos sentido y antisentido en la secuencia viral del P0 (genéticamente modificada) según la invención, preferiblemente están bajo el control de un solo promotor, especialmente cuando ambos segmentos están comprendidos en una sola secuencia de nucleótidos (horquilla). Sin embargo, también pueden estar, cada uno, bajo el control de un promotor diferente (por ejemplo, cuando la construcción de ARN está formado por segmentos que son 2 moléculas diferentes). Esto es que la secuencia de ADN sentido puede estar operativamente unida a un primer promotor y la secuencia de ADN antisentido, operativamente unida a un segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor pueden ser el mismo promotor o pueden ser promotores diferentes. El promotor puede ser un promotor divergente o bidireccional capaz de iniciar la transcripción de secuencias de ADN (en los dos segmentos de ARN) a cada lado del promotor.

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

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

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

- 55 Las secuencias preferidas de nucleótidos de intrones (o intrones) derivan de genes vegetales, como los genes de ARN ribosomal presuntos o genes vegetales altamente transcritos. Estos intrones pueden derivar de cualquier gen

vegetal, prefiriéndose los derivados de genes vegetales de dicotiledóneas, por ejemplo, genes de petunia, siendo los más preferidos los derivados de genes de remolacha (azucarera). También es posible emplear solo parte de estos intrones (planta), por ejemplo, al menos los bordes que contienen señales de unión (véase más abajo). La totalidad de estos intrones y sus partes en el contexto de la invención son mencionados como "fragmentos de intrones" o "secuencias de intrones".

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

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

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

- clonación de la región de ADN capaz de ser transcrita en una molécula de ARN con una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos (segmento) sentido de al menos 20 (preferiblemente al menos 21, 22, 23, 24, 25 o más) nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de entre 95% y 100% con (al menos parte de) la secuencia de nucleótidos de interés y un (segmento) nucleótido antisentido con al menos 20 nucleótidos, (preferiblemente al menos aproximadamente 50 nt, más particularmente al menos aproximadamente 100 nt, especialmente al menos aproximadamente 150 nt, más especialmente al menos aproximadamente 200 nt, 250 nt, 300 nt, bastante especialmente al menos aproximadamente 350 nt o aproximadamente 400 nt), y con entre aproximadamente 95% y aproximadamente 100% de una identidad de secuencia con el complemento de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos sentido (y con el ARNm diana), por el cual esta construcción de ARN (que comprende un segmento sentido y un segmento antisentido) es capaz de formar un ARN de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, dando lugar, por ejemplo, a una estructura de ARN en horquilla;

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

- aislamiento de las moléculas de ARN.

La invención también proporciona una planta resistente o tolerante al BMVYV y posiblemente al BNYVV que comprende en el genoma de al menos parte de sus células, preferiblemente en sustancialmente todas sus células, una secuencia de P0 (sentido y/o antisentido y/o en horquilla; genéticamente modificada) (y posiblemente también una secuencia sentido y/o antisentido y/o en horquilla deducida del genoma del BNYVV) según la invención y/o un vector que la comprende, que, al transcribirse, da una molécula de ARN que dispara el PTGS del BMVYV y posiblemente del BNYVV. Asimismo, se proporciona una planta resistente o tolerante al BMVYV y posiblemente al BNYVV que comprende, en al menos parte de sus células, preferiblemente en sustancialmente todas sus células, una molécula de ARN según la invención para lograr el efecto descrito más arriba.

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

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

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

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

Ejemplos

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

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

Se infectó material foliar de *Arabidopsis thaliana* transgénica con aislado natural de BMV-2itb usando transmisión por pulgones o por cepa de BMV-EK obtenida de un clon infeccioso y transmitida por pulgones.
- 15 En los experimentos de transmisión por pulgones: para adquirir el virus, se les dio a los pulgones un período de acceso y adquisición (AAP, por sus siglas en inglés) de 48 horas sobre una suspensión purificada de aislado de BMV-2itb o clon de BMV-EK. Después del AAP, se transfirieron los pulgones con un pincel de punta fina sobre hojas de *Arabidopsis thaliana* transgénica (10 pulgones por planta) por un período de acceso e inoculación (IAP, por sus siglas en inglés) de 96 horas. Luego, se mataron los pulgones mediante un tratamiento insecticida y se realizó una detección de virus por ELISA 3 semanas después en las hojas sistémicas.
- 20 Para todos los experimentos siguientes, los datos de ELISA fueron evaluados mediante el programa informático SAS 9.1 (método ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. El valor $P < 0,05$ indicó una diferencia significativa.

Ejemplo 1

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

- 25 Se supone que la expresión de las construcciones en horquilla con secuencias deducidas de partes conservadas del genoma viral da lugar (*in planta*) a la formación de ARNs que es reconocido y cortado en bicatenarios de aproximadamente 21-24 nt (ARNsi) por la enzima Dicer. Los ARNs específicos serán cargados en un complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) que a su vez, dirigirá el ARN genómico viral homólogo e inducirá la degradación de este último. Como tal, el metabolismo del virus se verá gravemente perjudicado, y se reducirán los síntomas de la infección viral. En los casos más favorables, se obtendrá una resistencia total.
- 30

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

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

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

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

Ejemplo 2

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

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

- 50 Se detectaron moléculas de ARNs de P0 específico en seis líneas, pero en niveles más elevados en tres líneas resistentes (hpP0-9, -10 y -12). No se detectó ARNs en las plantas susceptibles (Col 0).

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

Ejemplo 3

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

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

Ejemplo 4

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

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

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

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

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

25 Las construcciones de hpP0 de la invención indujeron exitosamente la resistencia de la planta derivada del patógeno. Todos las construcciones de hpP0 sometidas a ensayo indujeron una degradación del ARN genómico a través del PTGS, dando plantas resistentes al BMVYV.

Ejemplo 5

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

Listado de secuencias

35 <110> SES
<120> Construcciones en horquilla P0 y uso
<130> BPSESS009BWO
40 <160> 18
<170> PatentIn versión 3.3
45 <210> 1
<211> 659
<212> ADN
<213> Virus de la amarillez de la remolacha
50 <220>
<221> gene
<222> (1)..(659)
<223> BMVYV 5'UTR & P0
55 <220>
<221> 5'UTR

<222> (1)..(30)

<220>

<221> CDS

5 <222> (31)..(657)

<400> 1

```

caaaagaaac cagcaggat ctagcagtct atg caa ttt cag ctt aaa aca aac      54
                        Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn
                        1                      5

agt ttc act tgt tcg ttg aac cga ccg cta aca gct aca gag cga gtt      102
Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val
      10                      15                      20

tta aac acc gcg tat ttt ctt acg aat cat tta ccg ctc gta act ttt      150
Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe
      25                      30                      35                      40

gag aat gaa aac tgt att cgt tct ctt ctc gct gct ctg cct ttg ctg      198
Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu
                        45                      50                      55

ctc agt aag cag ctc gac ccc ggg agc ttt att tac gct ccc ggg aaa      246
Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly Ser Phe Ile Tyr Ala Pro Gly Lys
                        60                      65                      70

cgc cag tct tta cga ctg gcc agg ttc tac aat tac tgc gga gcc gtg      294
Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val
                        75                      80                      85

tta ccc agc act cgc aac att gac tta cga gtg ccc ccc aga aaa gac      342
Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp
                        90                      95                      100

gtt aaa aga ttt tac ctt gcc cga aat tca ggc aga gat ctg ggg gag      390
Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu
      105                      110                      115                      120

agg cta caa cgc cgc aga gaa att ttc tct cgc ggt gaa gca gag ttt      438
Arg Leu Gln Arg Arg Glu Ile Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe
                        125                      130                      135

aaa aag ttc ctt tca gta tgg tgt gct gaa agc gag aga aag cta cgg      486
Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg
                        140                      145                      150

gag agt cct aaa atc gat att aga atg gac cat att att atg gtc tta      534
Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg Met Asp His Ile Ile Met Val Leu
                        155                      160                      165

cgc gat atg ggc act ctc ttg cac cgt ctg gta ctt gtt gaa gaa cta      582
Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu
      170                      175                      180

tac cat aga aat act tat gct gag ctc gct ttt tgc gtt cac cac ctt      630
Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu Leu Ala Phe Cys Val His His Leu
      185                      190                      195                      200

ttt ggt gaa gct cgt ggt atg gat ttt tg
Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp Phe      659
      205

```

10

<210> 2

<211> 209

<212> PRT

15 <213> Virus de la amarillez de la remolacha

<400> 2

ES 2 647 077 T5

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

Phe

- 5 <210> 3
 <211> 659
 <212> ADN
 <213> Virus de la amarillez de la remolacha
- 10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(659)
 <223> PO&5'UTR antisentido
- 15 <400> 3

ES 2 647 077 T5

```

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

```

<210> 4

<211> 5722

5 <212> ADN

<213> Virus de la amarillez de la remolacha

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (1)..(5722)

<223> genoma BMV

<400> 4

```

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

```

ES 2 647 077 T5

tgcccgaaat tcaggcagag atctggggga gaggetacaa cgccgcagag aaattttctc	420
tcgcggtgaa gcagagttaa aaaagttcct ttcagtatgg tgtgctgaaa gcgagagaaa	480
gctacgggag agtcctaaaa tcgatattag aatggacat attattatgg tcttacgcga	540
tatgggcact ctcttgacc gtctgtact tgttgaagaa ctataccata gaaatactta	600
tgctgagctc gctttttgcg ttcaccacct ttttggtgaa gctcgtgga tggatttttg	660
gcggttggct aacttcctcg gtaaatggtt tatttgcct cagaaatgt attttgaana	720
ctctttcatc cagaaagagc tacgtttgtg agcgatctgt aaaaggtttt ctcacctta	780
ccatcaaaca aagcccgccg cgtaattgca tcttcaaat acaacacgca gacggttccc	840
atgccggtta tgcaacatgc gtaaccttat tcgacgggac aaacggattg ttgactgcgc	900
aacatgtagt tgacgatttt tacgaaggag acccgagaaa gactctaaaa gtcgtctcca	960
cccgaatgg aaacaaaatc ccccttgatg aattcagagt gacgtacaca tctgagaaaa	1020
gggatcagtt gttgatgcat gggccccc aaactgggaagg agttcttgcc tgcaaggcag	1080
ttcatatgat tccggcatcg agtggtgcaa aatcgaaagc aactttcttt gctctgtcgg	1140
atggtgaatg gcattcctct aatgccgagc tcgttggcac atccaagtgc ggaaaattca	1200
tttctgtact cagtgcaca aagagtggc attcgggcac tccctatttc aatggtaaga	1260
gtgttcttgg agttcacata ggctctccga aagaatttga gtcggaaaat gttaactaca	1320
tgtctctat accacgtttt cctggattaa ccagccgaa ctacatattt gaaaccacag	1380
cccttgctgg aaaatttttc agccaagagg aagtcgaaga gctaatggaa gacttctctc	1440
tccaagagat ttattctata gcgacggcac gtgggaagta cataaaatat gaggcttgct	1500
caggatgaaga gacattccat gatgtgctaa cagagtcctc cccgatgcag ggggaaggaa	1560
ggcggtctcc gaccgcccga acaaccggaa acgcaagcac ccacgagaga tccgcaggaa	1620
atggaaaaag ccctctgtct gctccttcta caccgcgga acccttggtg aaaactgcac	1680
cgcaagccac gtacattgta cctcaaaaga ggaatatgac gaatggccga gatgctggtg	1740
ccaaattgca ggccacgact gccactaccg atcaaatctc agagataaag aaggctctga	1800
tagacaaaat ggatttgaana tcgatcgaga gacaagtgg agagacacta tcgtcgatgg	1860
ccatgaagaa gccccgctca agagggcgga gaagatccaa gaacaagcaa aacaatttgg	1920
acgcttcttc aaaaccagt accactggga aagagccgca gaggtctgcc ccggtttcat	1980
caaagtgggt gagtcccca agttttactt ctctaaacaa aaaggatgct cggattgggg	2040
cacgaagctc accagcctcc acccagaatt ggaggagaaa acccgaggct tcgggtggcc	2100
caagtccgg ccagcgccgg aactgaaatc cttgcggcta caagccgcaa gatggctcga	2160
acgcgccgag caagttaaaa tcccttcaac tgaggaaagg gagcgctcg tgaggaaatg	2220
tgtggaagca ttctcgcca ctcaaacacg aggtcccatg gccacgagag gaaacaaact	2280
gtcttgaac aatttcttg aagattttta aacggcagtt ttctctctcg agctcgaagc	2340
cggcgtaggc gtcccgtatg ttgcttacgg tcgacgcacg cacagaggct ggattgaaga	2400
tccagatctg ttgccggttt tagctcgttt caccttcgat cgattacaga agttatcgga	2460

ES 2 647 077 T5

ggtgaaatth gagcatatga gccctgaaca attggttcag gaaggtctgt gtgaccaaat 2520
 acggttattc gtaaaaggcg agccacacaa acaatccaaa cttgatgaag gacgctaccg 2580
 cctcatcatg agtgtctcat tggttgatca actggtagcc cgggttctgt ttcaaaatca 2640
 gaacaagcgc gagatcgcgc tttggagggc gattccctca aaaccggat tcggattgtc 2700
 cacagacgga caagtcgtcg atttcatgca agcattatcg gcgcagggtg gagtgaacac 2760
 tgctgaatta ctccaaaatt ggaaatccca ccttattcct acagattgct ctggttttga 2820
 ctggagcgtt tcggactggc ttctagagga tgaaatggaa gtccggaaca ggctcacgtt 2880
 ggacataaat gatctaacca ggcgtctcg agctggatgg cttaaatgcc tcgcaaatag 2940
 tgttctctgt ctatcagatg gaacattgct ctgcagcaa gtgcctggtg tacaaaagag 3000
 tggcagctac aacacctcct cgtctaactc tagaattcga gtgatggcg cttaccactc 3060
 cggagcctcc tgggccatcg ccatgggtga tgatgccctt gaatctgtag atgcagacct 3120
 aagtcgatac tcattccttag gcttcaaagt cgaggtttct tcacaactgg aattctgctc 3180
 tcacattttt gaggaggaga acctcgccgt tccggtaaac aaagctaaaa tgctttataa 3240
 attgatacat ggttatgaac cggaatgtgg caaccttgaa gttctgacga actatcttgc 3300
 agcttgtttc tcaattttta acgagctgag atccgatcaa gaactcgttg cctccctcta 3360
 tcagtggctg gtccttcag tgcagccaca aaagatataa cgagggacaa tataaacagc 3420
 cgggtaaaca tcagttgcaa acgccggaag tttaaagtct gattacataa caagccaaaa 3480
 tagatttcaa gtttttagca ggattttcaa gtggtctatg tcagcaatac ctgtaacggt 3540
 agttggcttg tatttcgtct accttaagat ttctcaccac gtcagatcaa ttgttaatga 3600
 atacggctgt gggtaggaga acgatcaatg gaagaagacg accacgtagg caaacacgac 3660
 gcgctcagcg ctctcagcca gtggttgttg tccaagcctc tcggacaaca caacgccgac 3720
 ctagacgacg acgaagaggc aacaaccgga caagaagaac tgtttctacc agaggaaacag 3780
 gttcagcgca gacattcgtt ttctcaaaag acaatctcgc gggaagttcc agcggagcaa 3840
 tcacgttcgg gccgagtcta tcagactgcc cggcattcgc tgatggaatg ctcaaggcct 3900
 accatgagta taaaatctca atggtcattt tggagtctgt ctccgaggcc tcttcccaaa 3960
 attccggttc catcgcttac gagctggacc cacactgtaa actcagtgcc ctttcatcaa 4020
 ccattaacaa gttcgggacg acaaaaccg gcaggagggc atttgcagcg tcttacatca 4080
 acggggcgga ctggcatgac gttgccagg accaattcag gatcctctac aaaggcaatg 4140
 gttcttcacg gatagctggg tcttttagaa tcaccatgaa gtgccagttc cacaatccga 4200
 aataggtaga caaggaaccc ggccctagcc cagggccttc tccctctcca caaccacac 4260
 cctcaaagaa atatcgtttt atcgtctata ctggtgtccc tgtgaccggt ataatggccc 4320
 aatccactga tgacgccatc tctctgtacg acatgccttc ccaacgggtt cgctacatag 4380
 aagacgagaa tatgaactgg acaaacctcg attctcgatg gtattcccag aattctttga 4440
 aagccatccc aatgataata gtaccagtcc ctcaagggtga gtggactgtg gaaatttcga 4500
 tggaggggta tcaaccaacc tcaagcacca cagatcctaa taaggacaaa caagatggtc 4560

ES 2 647 077 T5

```

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

```

<210> 5

<211> 397

5 <212> ADN

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

<220>

<221> característica_misc

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

<223> P15 mutado (sentido)

<400> 5

```

ggtgcttggt gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttggtg 60

```

```

tgttgcagat atgttgtact caccgttttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc 120

```

```

gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg 180

```

```

gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aagggttgcca ccaaagagca 240

```

```

cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttgatga ctctcaccga 300

```

```

aactattttt ataataattat ctagattgtt tggtttggtg gtgtttttgt tcatgatatg 360

```

```

tttaatgtct atagtttggt tttggtatca tagataa 397

```

15

<210> 6

<211> 397

<212> ADN

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

20

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(397)

<223> P15 BNYVV mutado (antisentido)

25

ES 2 647 077 T5

	<400> 6	
	ttatctatga taccaaaacc aaactataga cattaaacat atcatgaaca aaaacaccgc	60
	caaaccaaac aatctagata atattataaa aatagtttcg gtgagagtca caacacgaac	120
	ggtcacttca ccccttttta ccattatgtc aacatcgtgc tctttggtgg caaccttagt	180
	gatggactcg gctacatgct ttggaatata gcaactccca aattgagcaa acgaattcgc	240
	ggccatgata cagccgctcc ccttaaaaat tgctcccgca tagctggacg ctttaacatc	300
	gttgctgaaa aacggtgagt acaacatact gacaacaaca caaccggcaa ctatgtacaa	360
	tacaatatta gataaatcta ctttaaccac aagcacc	397
5	<210> 7 <211> 1056 <212> ADN <213> BMYV & BNYVV	
10	<220> <221> característica_misc <222> (1)..(1056) <223> Sentido P15-P0	
	<400> 7	
	gggtgcttgtg gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttgtgt	60
	tgttgtcagt atgttgtact caccgttttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc	120
	gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg	180
	gagttgcat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aagggttgcca ccaaagagca	240
	cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttgtga ctctcaccga	300
	aactattttt ataataattat ctagattgtt tggtttggcg gtgtttttgt tcatgatatg	360
	tttaatgtct atagtttgggt tttggtatca tagataacaa aagaaaccag cgaggatcta	420
	gcagtctatg caatttcagc ttaaaacaaa cagtttccact tgttcgttga accgaccgct	480
	aacagctaca gagcgagttt taaacaccgc gtattttctt acgaatcatt taccgctcgt	540
	aacttttgag aatgaaaact gtattcgttc tcttctcgtc gctctgcctt tgctgctcag	600
	taagcagctc gaccccgga gctttattta cgctcccgga aaacgccagt ctttacgact	660
	ggccagggtc tacaattact gcggagccgt gttaccagc actcgcaaca ttgacttacg	720
	agtgtccccc agaaaagacg ttaaaagatt ttaccttgcc cgaaattcag gcagagatct	780
	gggggagagg ctacaacgcc gcagagaaat tttctctcgc ggtgaagcag agtttaaaaa	840
	gttcctttca gtatggtgtg ctgaaagcga gagaaagcta cgggagagtc ctaaaatcga	900
15	tattagaatg gaccatatta ttatggtctt acgcgatatg ggcactctct tgcaccgtct	960
	ggtacttggt gaagaactat accatagaaa tacttatgct gagctcgtt tttgcgttca	1020
	ccaccttttt ggtgaagctc gtggtatgga tttttg	1056
20	<210> 8 <211> 1056 <212> ADN <213> BMYV & BNYVV	
25	<220> <221> característica_misc <222> (1)..(1056) <223> Antisentido P15 P0	
	<400> 8	

ES 2 647 077 T5

```

caaaaatcca taccacgagc ttcacaaaa aggtggtgaa cgaaaaaagc gagctcagca    60
taagtatttc tatggtatag ttcttcaaca agtaccagac ggtgcaagag agtgcccata    120
tcgcgtaaga ccataataat atgggtccatt ctaatatcga ttttaggact ctcccgtagc    180
tttctctcgc tttcagcaca ccatactgaa aggaactttt taaactctgc ttcaccgcga    240
gagaaaaatt ctctgcggcg ttgtagcctc tccccagat ctctgcctga atttcgggca    300
aggtaaaatc ttttaacgct ttttctgggg ggcactcgta agtcaatggt gcgagtgtgt    360
ggtaacacgg ctccgcagta attgtagaac ctggccagtc gtaaagactg gcgtttcccg    420
ggagcgtaaa taaagctccc ggggtcgagc tgcttactga gcagcaaagg cagagcagcg    480
agaagagaac gaatacagtt ttcatttctc aaagttacga gcggtaaatg attcgtaaga    540
aaatcgcggg tgtttaaaac tcgctctgta gctgttagcg gtcggttcaa cgaacaagtg    600
aaactgtttg ttttaagctg aaattgcata gactgctaga tcctcgctgg tttcttttgt    660
tatctatgat accaaaacca aactatagac attaaacata tcatgaacaa aaacaccgcc    720
aaaccaaaca atctagataa tattataaaa atagtttcgg tgagagtcac aacacgaacg    780
gtcacttcac ccctttttac cattatgtca acatcgtgct ctttggtggc aaccttagtg    840
atggactcgg ctacatgctt tggaatatcg caactcccaa attgagcaa cgaattcgcg    900
gccatgatac agccgctccc cttaaaaatt gctcccgcat agctggacgc tttaacatcg    960
ttgctgaaaa acggtgagta caacatactg acaacaacac aaccggcaac tatgtacaat   1020
acaatattag ataaatctac ttttaaccaca agcacc                               1056

```

```

<210> 9
<211> 1058
5 <212> ADN
  <213> BMYV & BNYVV

```

```

<220>
10 <221> característica_misc
    <223> Sentido P0 P15

```

```

<400> 9
caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaaac aaacagtttc    60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatatt    120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc    180

```

ES 2 647 077 T5

gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctccc 240
 gggaaacgcc agtcttttacg actggccagg ttctacaatt actgcgagc cgtgttacct 300
 agcactcgca acattgactt acgagtgcgc cccagaaaag acgttaaaaag attttacctt 360
 gcccgaatt caggcagaga tctgggggag aggctacaac gccgcagaga aattttctct 420
 cgcggtgaag cagagtttaa aaagtctctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag 480
 ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcgat 540
 atgggcactc tcttgcccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat 600
 gctgagctcg ctttttgctg tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttga 660
 tgggtgcttggt ggttaaagta gatttatcta atattgtatt gtacatagtt gccggttggtg 720
 ttgtgtcag tatgtgttac tcaccgtttt tcagcaacga tgtaaagcg tccagctatg 780
 cgggagcaat ttttaagggg agcggctgta tcatggccgc gaattcgttt gctcaatttg 840
 ggagtgcga tattccaaag catgtagccg agtccatcac taagggtgcc accaaagagc 900
 acgatgttga cataatggta aaaaggggtg aagtgaccgt tcgtgttggtg actctcaccg 960
 aaactatttt tataatatta tctagattgt ttggtttggc ggtgtttttg ttcattgatat 1020
 gtttaatgtc tatagtttgg ttttggtatc atagataa 1058

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

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

<400> 10
 ggtgcttggt gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttggtg 60
 tgttgctcagt atgttggtact caccgttttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc 120
 gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg 180
 gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aagggttgcca ccaaagagca 240
 cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttggtga ctctcaccga 300
 aactattttt ataataattat ctagattggt tgggtttggc gtgtttttgt tcatgatatg 360
 ttttaatgtc atagtttgggt tttggtatca tagataacct aggaaattta aattaaatcc 420
 tggttttata tgtactactg ttgtagctga aatttaggtc ttcttgctga atttatttct 480
 gtttcgtttt cactgttatt caggggatcc taggttatct atgataccaa aaccaaacta 540
 tagacattaa acatatcatg aacaaaaaca ccgccaaacc aaacaatcta gataatatta 600
 taaaaatagt ttcggtgaga gtcacaacac gaacggtcac ttcaccctt tttaccatta 660
 tgtcaacatc gtgctctttg gtggcaacct tagtgatgga ctcggctaca tgctttggaa 720
 tatcgcaact cccaaattga gcaaacgaat tcgcggccat gatacagccg ctccccttaa 780

ES 2 647 077 T5

```

aaattgctcc cgcatagctg gacgctttaa catcgttgct gaaaaacggt gagtacaaca 840
tactgacaac aacacaaccg gcaactatgt acaatacaat attagataaa tctactttaa 900
ccacaagcac catcaaaaat ccataccacg agcttcacca aaaagggtgg gaacgcaaaa 960
agcgagctca gcataagtat ttctatggta tagttcttca acaagtacca gacggtgcaa 1020
gagagtgtccc atatcgcgta agaccataat aatatgggtcc attctaatat cgattttagg 1080
actctcccggt agcttttctct cgcttttcagc acaccatact gaaagggaact ttttaaaactc 1140
tgcttcaccg cgagagaaaa tttctctgctg gcgttgtagc ctctcccca gatctctgcc 1200
tgaatttcgg gcaaggtaaa atcttttaac gtcttttctg gggggcactc gtaagtcaat 1260
gttgcgagtgt ctgggtaaca cggctccgca gtaattgtag aacctggcca gtcgtaaaga 1320
ctggcgtttc ccgggagcgt aaataaagct cccggggtcg agctgcttac tgagcagcaa 1380
aggcagagca gcgagaagag aacgaatata gttttcattc tcaaaagtta cgagcggtaa 1440
atgattcgta agaaaatacg cgggtgtttaa aactcgctct gtagctgtta gcggtcgggtt 1500
caacgaacaa gtgaaactgt ttgttttaag ctgaaattgc atagactgct agatcctcgc 1560
tggtttcttt tg 1572

```

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

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

```

<400> 11
gtgtaagaat ttcttatgtt acattattac attcaacggt ttatcttaat tggctcttca 60
tttgattgaa atttgacaat tatttcttgt tttttttttt gtcacactct ttttgggttg 120
gggtggccga cgaattgtgg gaaggtagaa agaggggagg acttttggtta tactccatta 180
gtaattactg tttccgtttc aatttatgtg acaatatttc ctttttagtc ggttccaaaa 240
gaaaatgtca gcattataaa caatttaatt ttgaaattac aattttgcca ttaataaaat 300
gatttacaac cacaaaagta tctatgagcc tgtttggtg ggcttataag cagcttattt 360
taagtggctt ataagtcaaa aagtgaacant ttttgagaag ttagaaaatc ctaacttctc 420
aaaaagtagc ttttaagcca cttatgactt ataagtccaa aaatttttaa gttaccaaac 480
atatattaat gggtttataa gcttataagc cacttttaag ctacccaaa cgggttctat 540
gtctcacttt agactacaaa ttttaaaagt cttcatttat ttcttaatct ccgtggcgag 600
tnaaactata acacataaag tgaaacggag ggaataagat ggagtcataa actaatccaa 660
atctatactc tctccgttaa tttgtttttt agtttgattt ggtacattaa taaaacagat 720
ttttcgaagg ttataaacac agacagatgt ttcccagcga gctagcaaaa ttccaagatt 780
tctgtcgaaa attcgtgtgt ttctagctag tacttgatgt tatctttaac ctttttagtaa 840
ttttttgtcc ttttctttct atttttcatc ttacaatgaa ttatgagcaa gttccttaag 900

```

ES 2 647 077 T5

	tagcatcaca cgtgagatgt tttttatgat attgactaaa tccaatcttt accattcctt	960
	aactagtaaa atacaacaca tgtaattga tacattgctt aacactgagg ttagaaaatt	1020
	ttagaaatta gttgtccaaa tgctttgaaa ttagaaatct ttaatccctt attttttttt	1080
	aaaatgtttt ttctcactcc aaagaaagag aaactgacat gaaagctcaa aagatcatga	1140
	atcttactaa ctttgtggaa ctaaagtac atcagaatgt ttctgacatg tgaaaatgaa	1200
	agctcttaat tttcttcttt tatttattga gggtttttgc atgctatgca ttcaatttga	1260
	gtacttttaa gcacctataa acacttactt acacttgcct tggagtttat gtttttagtgt	1320
	tttcttcaca tcttttttgg tcaatttgca g	1351
	<210> 12	
	<211> 91	
5	<212> ADN	
	<213> Beta vulgaris	
	<220>	
	<221> característica_misc	
10	<222> (1)..(91)	
	<223> intrón remolacha	
	<400> 12	
	taaatcctgg ttttatatgt actactgttg tagctgaaat ttaggtcttc ttgctgaatt	60
	tatttctggt tcgttttcac tgttattcag g	91
15		
	<210> 13	
	<211> 2701	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20		
	<220>	
	<223> P0 en horquilla	
	<220>	
25	<221> característica_misc	
	<222> (1064)..(1064)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<220>	
30	<221> característica_misc	
	<222> (1277)..(1277)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 13	
	caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaaac aaacagtttc	60
	acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatttt	120
	cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc	180
	gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctccc	240
	gggaaacgcc agtcttttacg actggccagg ttctacaatt actgcggagc cgtgttacct	300
	agcactcgca acattgactt acgagtcccc ccagaaaaag acgttaaaag attttacctt	360
	gccccgaaatt caggcagaga tctgggggag aggtacaac gccgcagaga aattttctct	420
35	cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag	480

ES 2 647 077 T5

ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcgat 540
atgggcactc tcttgcaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat 600
gctgagctcg ctttttgcgt tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttgc 660
ctaggaaatt taaatgtgta agaatttctt atgttacatt attacattca acgttttatc 720
ttaattggct cttcatttga ttgaaatttg acaattatth cttgtttttt tttttgtcac 780
actctttttg gggtgggggt gccgacgaat tgtgggaagg tagaaagagg ggaggacttt 840
tggtatactc cattagtaat tactgtttcc gtttcaattt atgtgacaat atttcctttt 900
tagtcggttc caaaagaaaa tgtcagcatt ataacaatt taattttgaa attacaattt 960
tgccattaat aaaatgattt acaaccacaa aagtatctat gagcctgttt gggtgggctt 1020
ataagcagct tattttaagt ggcttataag tcaaaaagt acantttttg agaagttaga 1080
aaatcctaac ttctcaaaaa gtagctttta agccacttat gacttataag tccaaaaatt 1140
tttaagttac caaacatata ttaatgggtt tataagctta taagccactt ttaagctcac 1200
ccaaacgggt tctatgtctc acttttagact acaaatthta aaagtcttca tttatttctt 1260
aatctccgtg gcgagtnaaa ctataacaca taaagtgaag cggagggaat aagatggagt 1320
cataaactaa tccaaatcta tactctctcc gttaatthgt tttttagttt gatttggtac 1380
attaataaaa cagatttttc gaaggttata aacacagaca gatgtttccc agcgagctag 1440
caaaattcca agatttctgt cgaaaattcg tgtgtttcta gctagtactt gatgttatct 1500
ttaacctttt agtaattttt tgtccttttc tttctatttt tcatcttaca atgaattatg 1560
agcaagttcc ttaagtagca tcacacgtga gatgtttttt atgatattga ctaaatccaa 1620
tctttaccat tctttaacta gtaaaatata acacatgtta attgatacat tgcttaacac 1680
tgaggttaga aaattttaga aattagttgt ccaaagtctt tgaaattaga aatctttaat 1740
cccttatttt tttttaaaat gttttttctc actccaaaga aagagaaact gacatgaaag 1800
ctcaaagat catgaatctt actaactttg tggaactaaa tgtacatcag aatgtttctg 1860
acatgtgaaa atgaaagctc ttaattttct tcttttattt attgaggggt tttgcatgct 1920
atgcattcaa tttgagtact ttaaagcacc tataaacact tacttacact tgccttgag 1980
tttatgtttt agtgttttct tcacatcttt tttggtcaat ttgcaggtat ttggatccta 2040
ggcaaaaatc cataccacga gcttcaccaa aaaggtggtg aacgcaaaaa gcgagctcag 2100
cataagtatt tctatggtat agttcttcaa caagtaccag acggtgcaag agagtgccca 2160
tatcgcgtaa gaccataata atatggtcca ttctaataatc gatttttagga ctctcccgt 2220
gctttctctc gctttcagca caccatactg aaaggaactt tttaaactct gcttcaccgc 2280
gagagaaaat ttctctgcgg cgtttagacc tctccccag atctctgcct gaatttcggg 2340
caaggtaaaa tcttttaacg tcttttctgg ggggcactcg taagtcaatg ttgcgagtg 2400
tggtgaacac ggctccgcag taattgtaga acctggccag tcgtaaagac tggcgtttcc 2460
cgggagcgta aataaagctc ccggggtcga gctgcttact gagcagcaaa ggcagagcag 2520
cgagaagaga acgaatacag ttttcattct caaaagttac gagcggtaaa tgattcgtaa 2580
gaaaatacgc ggtgttttaa actcgctctg tagctgttag cggtcggttc aacgaacaag 2640
tgaaactgtt tgttttaagc tgaaattgca tagactgcta gatcctcgct ggtttctttt 2700
g 2701

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

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

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

10 <400> 14

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

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

20 <220>
 <223> P15 P0 en horquilla

<400> 15

ES 2 647 077 T5

```

ggTgcttgTg gTtaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttgTgt      60
tgTtgTcagt atgttgTact caccgttttt cagcaacgat gTtaaagcgt ccagctatgc      120
gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg      180
gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aagggttgcca ccaaagagca      240
cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttgTga ctctcaccga      300
aactatTTTT ataatattat ctagattgtt TggTttggcg gtgtttttgt tcatgatatg      360
tttaatgtct atagtttggt tttggTatca tagataacaa aagaaaccag cgaggatcta      420
gcagTctatg caatttcagc ttaaaacaaa cagtttTact TgttcgtTga accgaccgct      480
aacagctaca gagcgagttt taaacaccgc gtattttctt acgaatcatt taccgctcgt      540
aacttttgag aatgaaaact gtattcgttc tcttctcgtc gctctgcctt Tgctgctcag      600
taagcagctc gaccccgTga gctttattta cgctcccgTg aaacgcccagT ctttacgact      660
ggccaggttc tacaattact gcggagccgt gttaccagc actcgcaaca ttgacttacg      720
agtgcTcccc agaaaagacg ttaaaagatt ttaccttgcc cgaaattcag gcagagatct      780
gggggagagg ctacaacgcc gcagagaaat tttctctcgc ggtgaagcag agtttaaaaa      840
gttcctttca gtatggTgtg ctgaaagcga gagaagcta cgggagagtc ctaaaatcga      900
tattagaatg gaccatatta ttatggTctt acgcgatatg ggcactctct Tgcaccgtct      960
ggTacttgTt gaagaactat accatagaaa tacttatgct gagctcgttt tttgcgttca      1020
ccaccttttt ggtgaagctc gtggTatgga tttttgccta ggaaatttaa attaaatcct      1080
ggTtttatat gtactactgt Tgtagctgaa atttaggtct tcttgctgaa tttatttctg      1140
tttcgttttc actgttattc aggggatcct aggcaaaaat ccataccacg agcttcacca      1200
aaaaggTggt gaacgcaaaa agcgagctca gcataagtat ttctatggta tagttcttca      1260
acaagTacca gacggtgcaa gagagtgcct atatcgcgta agaccataat aatatggTcc      1320
attctaatat cgattttagg actctcccgt agctttctct cgctttcagc acaccatact      1380
gaaaggaact ttttaaactc Tgcttcaccg cgagagaaaa tttctctcgc gcgttgtagc      1440
ctctcccccT gatctctgcc Tgaatttcgg gcaaggtaaa atcttttaac gtcttttctg      1500
gggggcactc gtaagtcaat gttgcgagtg ctgggtaaca cggtccgca gtaattgtag      1560
aacctggcca gtcgtaaaga ctggcgtttc ccgggagcgt aaataaagct cccggggTcg      1620
agctgcttac Tgagcagcaa aggcagagca gcgagaagag aacgaataca gttttcattc      1680
tcaaaagtta cgagcggtaa atgattcgta agaaaaatcg cggtgtttaa aactcgctct      1740
gtagctgtta gcggTcggtt caacgaacaa gtgaaactgt ttgttttaag ctgaaattgc      1800
atagactgct agatcctcgc TggTttcttt Tgttatctat gataccaaaa ccaaactata      1860
gacattaaac atatcatgaa caaaaacacc gccaaaccaa acaatctaga taatattata      1920
aaaatagttt cggtgagagt cacaacacga acggtcactt caccctttt taccattatg      1980
tcaacatcgt gctctttggt ggcaacctta gtgatggact cggtacatg ctttggata      2040
tcgcaactcc caaattgagc aaacgaattc gcggccatga tacagccgct ccccttaaaa      2100
attgctcccg catagctgga cgctttaaca tcgttgctga aaaacggtga gtacaacata      2160
ctgacaacaa cacaaccggc aactatgtac aatacaatat tagataaatc tactttaacc      2220
acaagcacc                                     2229

```

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

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> P0 P15 en horquilla

5

<400> 16

caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaaac aaacagtttc	60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaaccac cgcgtatttt	120
cttacgaatc attttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc	180
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctccc	240
gggaaacgcc agtcttttac actggccagg ttctacaatt actgcggagc cgtgttacct	300
agcactcgca acattgactt acgagtgtccc cccagaaaag acgttaaaag attttacctt	360
gccccgaaatt caggcagaga tctgggggag aggtacaac gccgcagaga aattttctct	420
cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag	480
ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcgat	540
atgggcactc tcttgaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat	600
gctgagctcg ctttttgctg tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttga	660
tggtgcttgt ggttaaagta gatattatcta atattgtatt gtacatagtt gccggttgtg	720
ttggtgtcag tatgttgtac tcaccgtttt tcagcaacga tgttaaagcg tccagctatg	780
cgggagcaat ttttaagggg agcggctgta tcatggccgc gaattcgttt gctcaatttg	840
ggagttgcga tattccaaag catgtagccg agtccatcac taaggttgcc accaaagagc	900
acgatgttga cataatggta aaaaggggtg aagtgaccgt tcgtgttgtg actctcaccg	960
aaactatttt tataatatta tctagattgt ttggtttggc ggtgtttttg ttcattgatat	1020
gtttaatgtc tatagtttgg ttttggtatc atagataacc taggaaattt aaattaaatc	1080
ctggtttttat atgtactact gttgtagctg aaatttaggt cttcttgctg aatttatctc	1140
tgtttcgttt tctactgttat tcaggggatc ctaggttatc tatgatacca aaaccaaact	1200
atagacatta aacatatcat gaacaaaaac accgccaac caaacaatct agataatatt	1260
ataaaaatag tttcggtgag agtcacaaca cgaacggtca cttcaccctt ttttaccatt	1320

```

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

```

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

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

```

<400> 17
atg caa ttt cag ctt aaa aca aac agt ttc act tgt tcg ttg aac cga 48
Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg
1 5 10 15

ccg cta aca gct aca gag cga gtt tta aac acc gcg tat ttt ctt acg 96
Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr
20 25 30

aat cat tta ccg ctc gta act ttt gag aat gaa aac tgt att cgt tct 144
Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser
35 40 45

ctt ctc gct gct ctg cct ttg ctg ctc agt aag cag ctc gac ccc ggg 192
Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly
50 55 60

agc ttc att tac act ccc ggg aaa cgc cag tct tta cga ctg gcc agg 240
Ser Phe Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg
65 70 75 80

ttc tac aat tac tgc gga gcc gtg tta ccc agc act cgc aac att gac 288
Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp
85 90 95

```

ES 2 647 077 T5

tta cga gtg ccc ccc aga aaa gac gtt aaa aga ttt tac ctt gcc cga	336
Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg	
100 105 110	
aat tca ggc aga gat ctg ggg gag agg cta caa cgc cgc aga gaa att	384
Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Glu Ile	
115 120 125	
ttc tct cgc ggt gaa gca gag ttt aaa aag ttc ctt tca gta tgg tgt	432
Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys	
130 135 140	
gct gaa agc gag aga aag cta cgg gag agt cct aaa atc gat att aga	480
Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg	
145 150 155 160	
atg gac cat att att atg gtc tta cgc gat atg ggc act ctc ttg cac	528
Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His	
165 170 175	
cgt ctg gta ctt gtt gaa gaa cta tac cat aga aat act tat gct gag	576
Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu	
180 185 190	
ctc gct ttt tgc gtt cac cac ctt ttt ggt gaa gct cgt ggt atg gat	624
Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp	
195 200 205	
ttt tgg cgg ttg gct aac ttc cct ggt aaa tgg ttt att tgc tct cac	672
Phe Trp Arg Leu Ala Asn Phe Pro Gly Lys Trp Phe Ile Cys Ser His	
210 215 220	
gaa atg tat ttt gaa aac tct ttc atc cag aaa gag cta cgt ttg tga	720
Glu Met Tyr Phe Glu Asn Ser Phe Ile Gln Lys Glu Leu Arg Leu	
225 230 235	

<210> 18

<211> 239

<212> PRT

<213> Virus de la amarillez de la remolacha

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 647 077 T5

Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile
 115 120 125
 Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys
 130 135 140
 Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg
 145 150 155 160
 Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His
 165 170 175
 Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu
 180 185 190
 Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp
 195 200 205
 Phe Trp Arg Leu Ala Asn Phe Pro Gly Lys Trp Phe Ile Cys Ser His
 210 215 220
 Glu Met Tyr Phe Glu Asn Ser Phe Ile Gln Lys Glu Leu Arg Leu
 225 230 235

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ARN que comprende una secuencia de segmentos sentido y una secuencia de segmentos antisentido que tienen secuencias deducidas del gen de P0 del genoma del BMVYV o de un gen ortólogo, en donde dichas secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, ambas, un fragmento de nucleótidos que tienen una secuencia que comparte al menos el 95% de la identidad de secuencia con el gen de P0 (SEQ. ID. NO: 17) del genoma del BMVYV o de un gen ortólogo y que tiene un tamaño de al menos 20 nucleótidos.
2. La construcción de ARN según la reivindicación 1, en donde la o las secuencias de segmentos sentido y/o de segmentos antisentido comprende(n), además, un fragmento de nucleótidos que tienen secuencia(s) que comparte(n) al menos el 95% de la identidad de secuencia con la secuencia no traducida del extremo 5' (5'UTR) adyacente a la secuencia de nucleótidos del gen de P0 del genoma del BMVYV.
3. La construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden un fragmento de nucleótidos que tienen secuencias que comparten 100% de la identidad de secuencia con el gen de P0 del genoma del BMVYV.
4. La construcción de ARN según la reivindicación 3, en donde las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden, además, un fragmento de nucleótidos que tienen secuencias que comparten al menos el 95% de la identidad de secuencia con el gen de P1 del genoma del BMVYV.
5. La construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el segmento sentido comprende o consiste en la secuencia SEQ. ID. NO: 1 y/o el segmento antisentido comprende o consiste en la secuencia SEQ. ID. NO: 3.
6. La construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las secuencias de segmentos sentido y de segmentos antisentido comprenden ambas, además, un fragmento de nucleótidos que comparte al menos el 95% de la identidad de secuencia con el genoma de el BNYVV y preferiblemente en donde dicho segmento sentido comprende un fragmento de la SEQ. ID. NO: 5 y dicho segmento antisentido comprende un fragmento de la SEQ. ID. NO: 6.
7. Una construcción de ADN con capacidad de transcribirse en la construcción de ARN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 6.
8. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de la construcción de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 7.
9. Una molécula de ARN autocomplementaria de doble cadena expresada por la construcción de ADN según la reivindicación 7 o el vector según la reivindicación 8.
10. Un método para inducir tolerancia o resistencia, preferiblemente resistencia total a al menos el virus BMVYV y posiblemente a otros virus, en una planta o en una célula vegetal, método que comprende las etapas de: preparar la construcción de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 8, operativamente unida a una o más secuencias reguladoras activas en la planta o la célula vegetal, y transformar la célula vegetal con la construcción de ácido nucleico, lo que induce a la resistencia a al menos el virus BMVYV en la planta o en la célula vegetal.
11. El método según la reivindicación 10, en donde el otro virus se selecciona del grupo que consiste en el virus del mosaico amarillo del nabo, el virus de la amarillez de las cucurbitáceas transmitido por pulgones, el virus del enrollamiento de la hoja de la patata, el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, el virus del mosaico del guisante, el virus de la amarillez de la remolacha occidental (EE. UU.), el virus de la clorosis de la remolacha, el virus del enanismo amarillo del cereal y el virus BNYVV, preferiblemente el virus BNYVV.
12. Una planta transgénica o una célula vegetal transgénica tolerante o resistente, preferiblemente completamente resistente a al menos el virus BMVYV y posiblemente a uno o más de otros virus y que comprende una construcción de ácido nucleico capaz de expresar la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, preferiblemente la construcción de ADN según la reivindicación 7 operativamente unida a una o más secuencias reguladoras activas en la planta o en la célula vegetal, y/o que comprende un vector según la reivindicación 8, y/o que comprende una molécula de ARN autocomplementaria de doble cadena según la reivindicación 9.
13. La planta transgénica o célula vegetal transgénica según la reivindicación 12, seleccionada del grupo que consiste en lechuga, pepino, patata, caña de azúcar, guisante, cebada y remolacha azucarera, prefiriéndose una remolacha azucarera o una célula de remolacha azucarera.
14. Un tejido vegetal transgénico y/o estructura reproducible derivada de la célula vegetal transgénica según las reivindicaciones 12 o 13, en donde dicho tejido se selecciona del grupo que consiste en fruto, tallo, raíz, tubérculo y semilla o en donde dicha estructura reproducible se selecciona del grupo que consiste en callos, yemas o embriones.

FIG. 2A

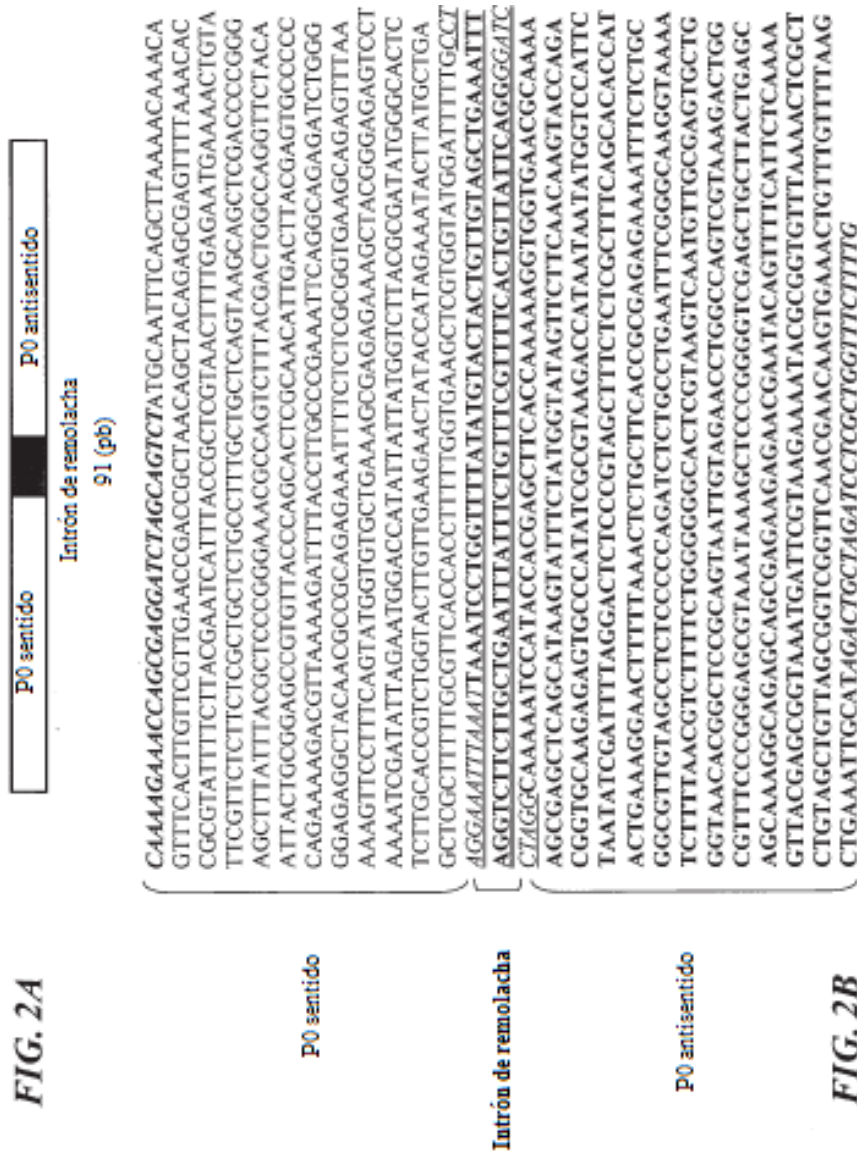


FIG. 2B

Fig. 2

Intervalo de secuencia: 1 a 659

```

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

```

Fig. 3

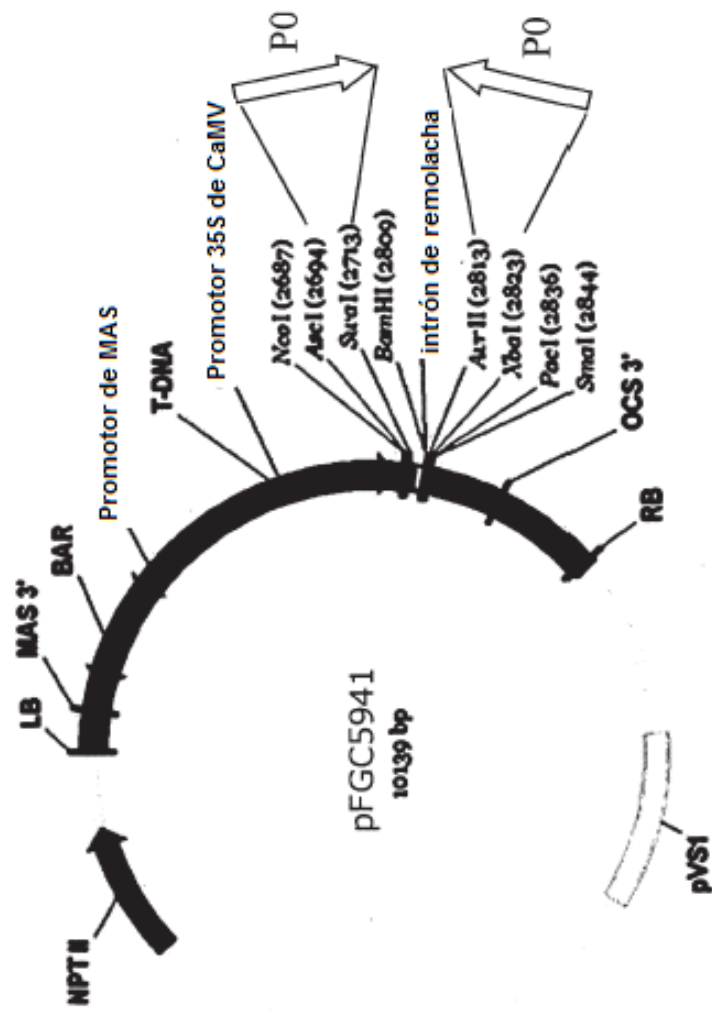


Fig. 4A

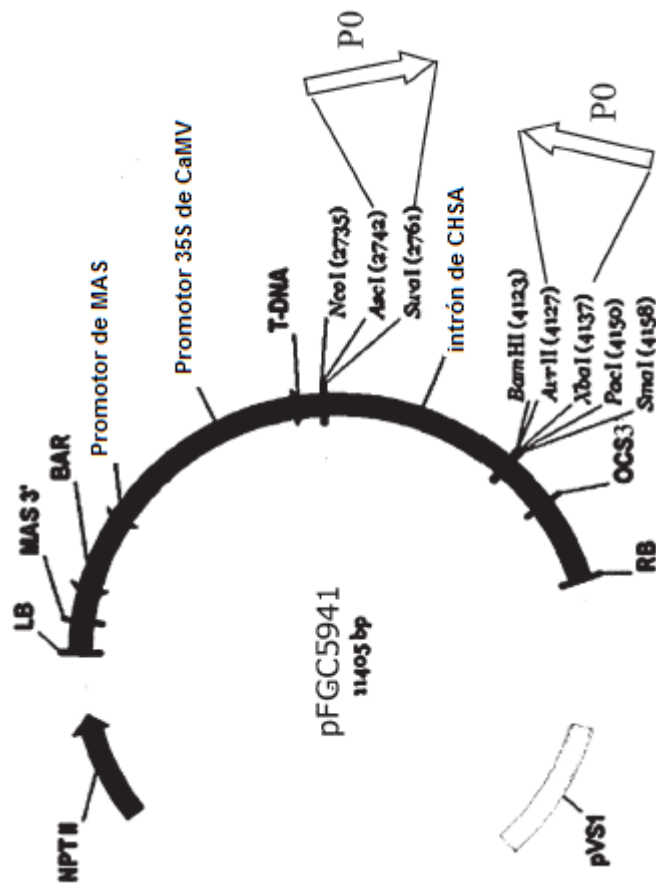


Fig. 4B

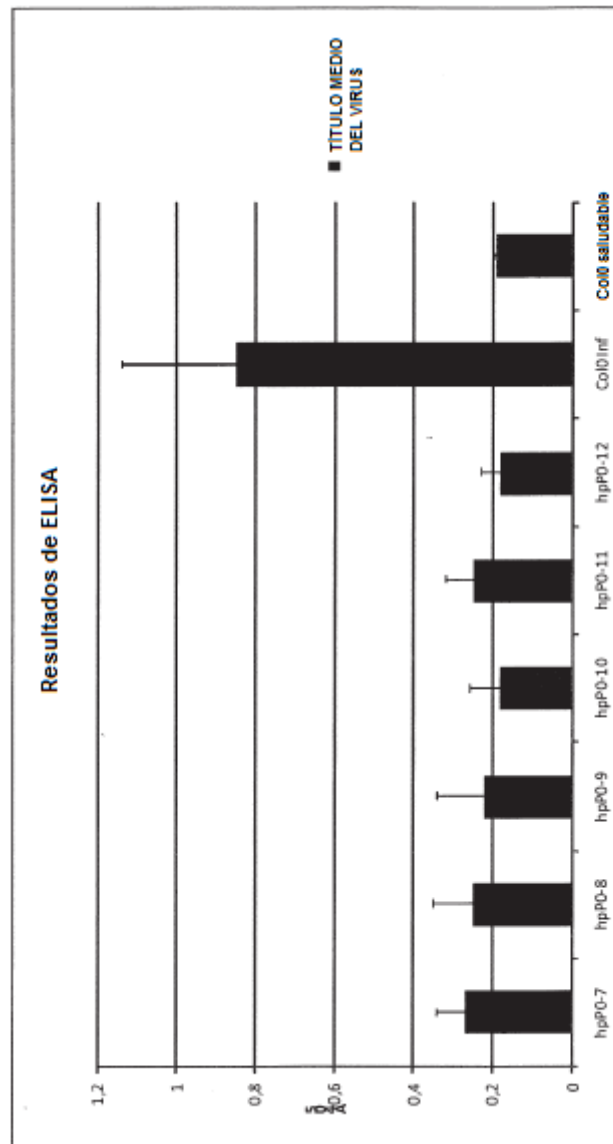


Fig. 5

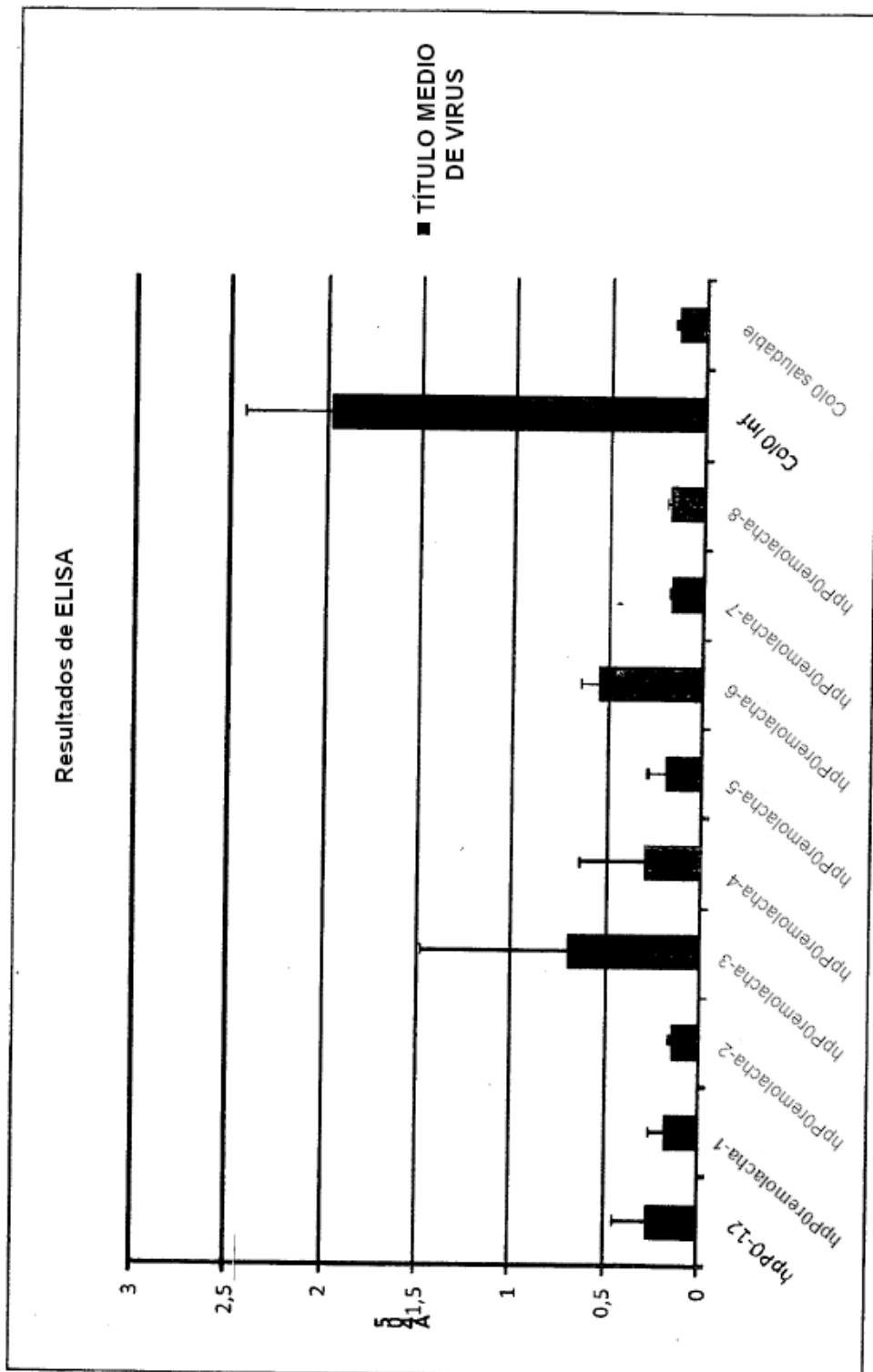


Fig. 6

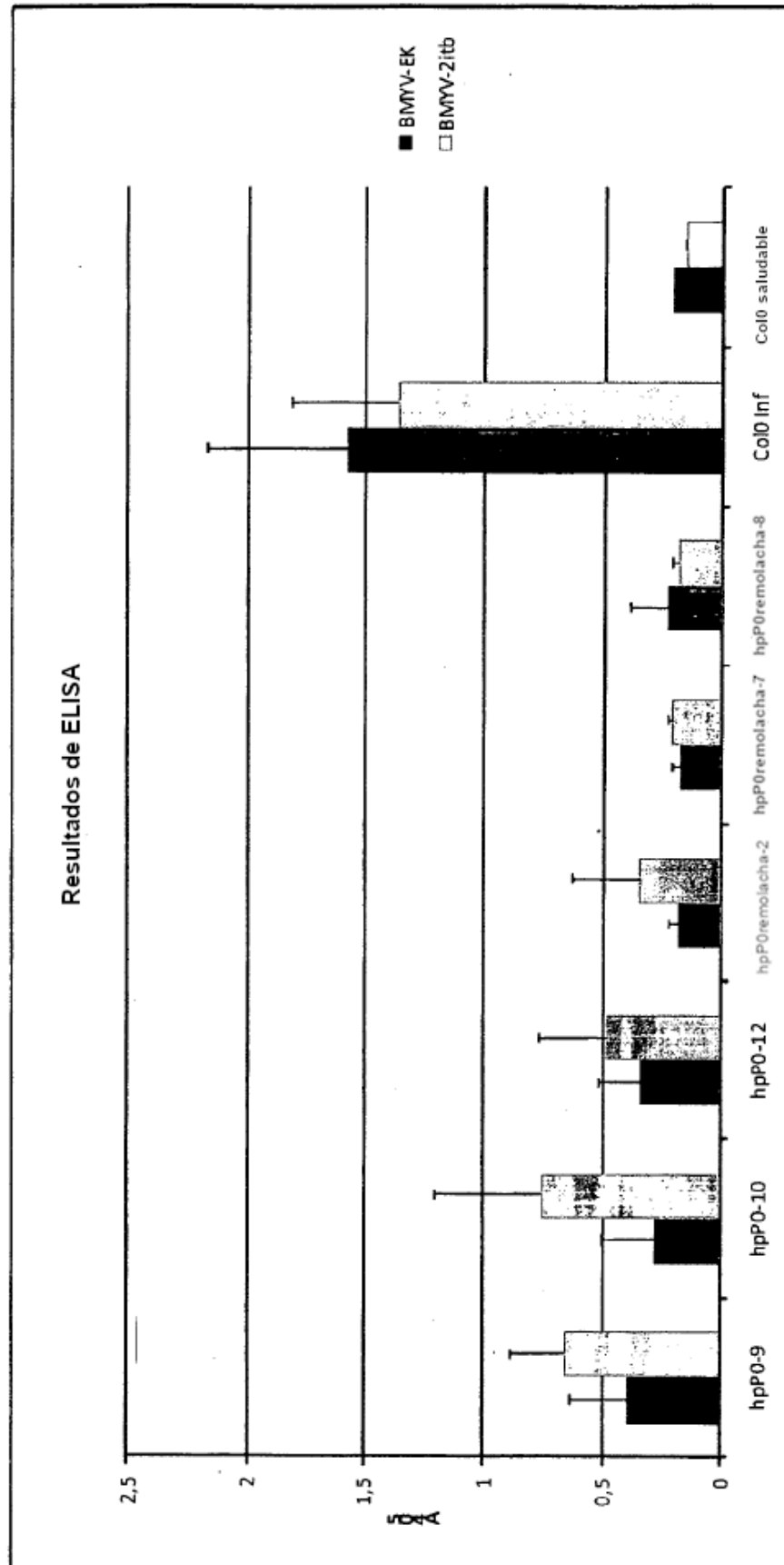


Fig. 7

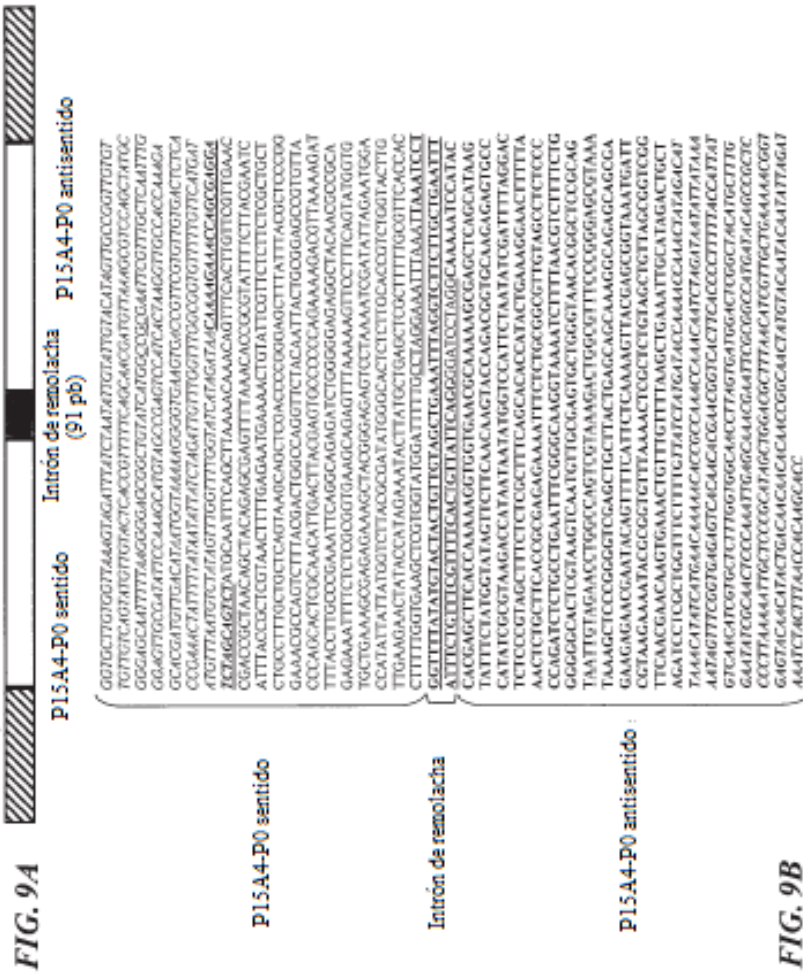


Fig. 9

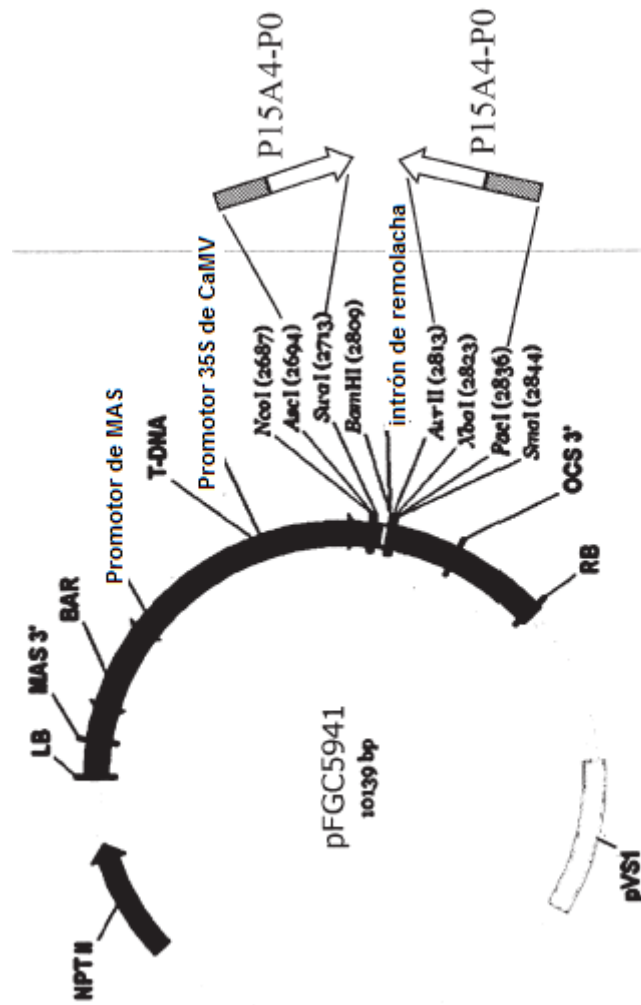


Fig. 11A

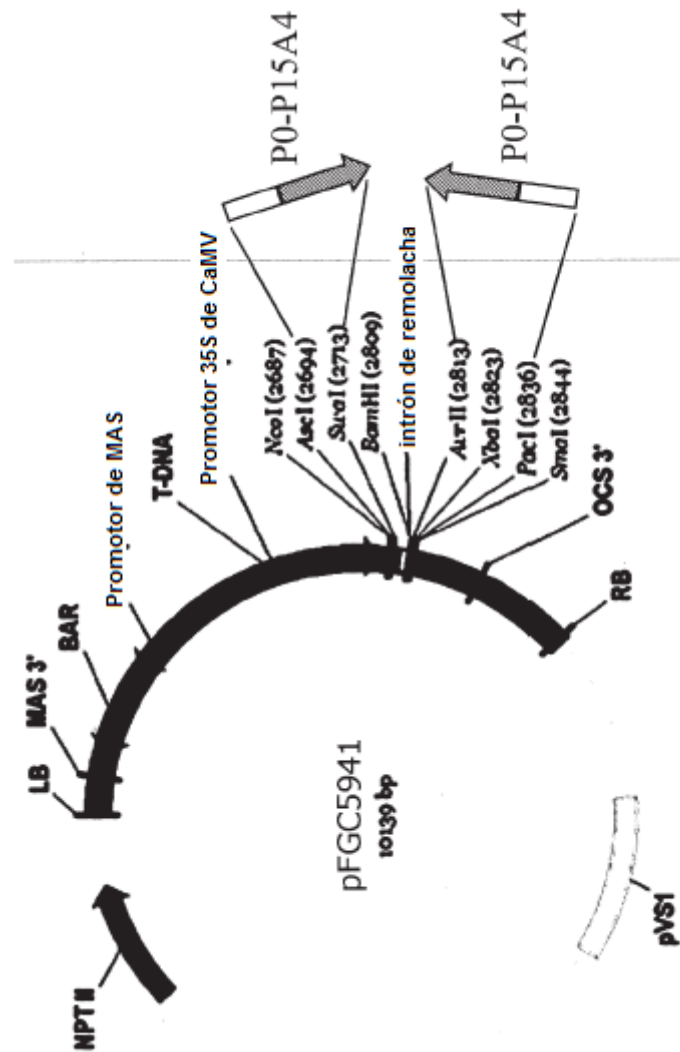


Fig. 11B