

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/001294 A2

(43) Fecha de publicación internacional
6 de enero de 2011 (06.01.2011)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/IB2010/002110
- (22) Fecha de presentación internacional: 27 de agosto de 2010 (27.08.2010)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P200930391 30 de junio de 2009 (30.06.2009) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28035 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **NAVARRO SEMPERE, Raquel** [ES/ES]; Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES). **GOMEZ-LOPEZ, Pedro** [ES/ES]; Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES). **TRUNIGER RIETMANN, Veronica** [ES/ES]; Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES). **ARANDA REGULES, Miguel Angel** [ES/ES]; Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
- la fecha de presentación de la solicitud internacional está dentro del plazo de dos meses a partir de la fecha de expiración del periodo de prioridad (Regla 26bis.3)
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: VIRAL SEQUENCE INVOLVED IN THE REGULATION OF GENE EXPRESSION, EXPRESSION VECTOR, CELL AND PLANT CONTAINING SAME

(54) Título : SECUENCIA VIRAL IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA, VECTOR DE EXPRESIÓN, CÉLULA Y PLANTA QUE LA COMPRENDE

(57) Abstract: The invention relates to an isolated nucleotide sequence corresponding to an RNA sequence of the pepino mosaic virus, PepMV, involved in the regulation of gene expression. The invention also relates to a vector comprising this sequence, and a cell or a plant comprising said sequence or vector. The invention further relates to the use of, and method involving, any sequence or vector of the invention for detecting at least one plant of the genus *Solanum* resistant to the PepMV virus; or to the method for producing a functional or non-functional protein in the cell or the plant according to the invention, comprising cotransfection with a nucleotide sequence coding for a capsid protein (CP) of a potexvirus.

(57) Resumen: La invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada, correspondiente a una secuencia de ARN del Virus del mosaico del pepino dulce, PepMV, implicada en la regulación de la expresión génica. Además, la presente invención se refiere a un vector que comprende la secuencia anterior, una célula o una planta que comprende dichas secuencia o vector. Asimismo, la invención se refiere; al uso y método de cualquier secuencia o vector de la invención para la detección de al menos una planta del género *Solanum* resistente al virus PepMV; o al método para producción de una proteína funcional o no funcional, en la célula o la planta de la invención que comprende la cotransfección con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína de la cápsida (CP) de un potexvirus.

WO 2011/001294 A2

**SECUENCIA VIRAL IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN GÉNICA, VECTOR DE EXPRESIÓN, CÉLULA Y PLANTA
QUE LA COMPRENDE**

La invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada, correspondiente a una secuencia de ARN del Virus del mosaico del pepino dulce, PepMV, implicada en la regulación de la expresión génica. En varias realizaciones preferidas, dicha secuencia comprende; una secuencia MCS reconocida por al menos una enzima de restricción única; una secuencia nucleotídica (P) que codifica para una proteína funcional o no funcional; una secuencia nucleotídica que codifica para una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RpRd) y para una secuencia triple gene block (TGB) de un potexvirus (RpRd-TGB); o cualquier combinación de las anteriores. Además, la presente invención se refiere a un vector que comprende cualquier secuencia anterior, una célula o una planta que comprende cualquiera de dichas secuencias o vectores. Asimismo, la invención se refiere; al uso y método de cualquier secuencia o vector de la invención para la detección de al menos una planta del género *Solanum* resistente al virus PepMV; o al método para producción de una proteína funcional o no funcional, en la célula o la planta de la invención que comprende la cotransfección con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína de la cápsida (CP) de un potexvirus.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV; *Potexvirus*) es un virus frecuente en cultivos de tomate en España, en el resto de Europa y también en América del Norte. Se trata de un virus compuesto por una sola cadena de ARN de sentido positivo con un tamaño de 6,4 kb (Aguilar et al., 2002. Arch Virol, 147: 2009-2015). Su genoma codifica 5 ORFs. El más próximo al extremo 5'; supuestamente codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN (RpRd) (163-164 kDa). Los siguientes ORFs, 2, 3 y 4, los cuales se solapan parcialmente en

diferentes marcos de lectura, poseen la organización típica de potexvirus, de proteínas implicadas en el movimiento (*triple gene block*, TGB), y codifican péptidos de 26 kDa, 14 kDa y 9 kDa, respectivamente (Aguilar et al., 2002. Arch Virol, 147: 2009-2015). El ORF más cercano al extremo 3'; codifica la CP, con un tamaño de 25 kDa, responsable de la encapsidación del genoma viral e implicada en el movimiento célula a célula.

La facultad que poseen los virus de ARN de una sola cadena para alterar el metabolismo celular y expresar proteínas codificadas por el genoma viral condujo a muchos investigadores a postular que los virus de ARN podían ser usados para producir proteínas recombinantes en las plantas infectadas (Pogue et al., 2002. Annu Rev Phytopathol, 40: 45-74). Existen diferentes estrategias para convertir el genoma de un virus en vector viral (Scholthof et al., 2002. Genetic engineering, 24: 67-85) pero este tipo de vectores, presenta a menudo una serie de limitaciones como son la inestabilidad (debido a fenómenos de recombinación homóloga o no homóloga) (Dawson et al., 1989. Virology, 172: 285-292), incapacidad del virus de colonizar homogéneamente todos los tejidos de la planta o problemas asociados a la bioseguridad.

La posibilidad de manipular el genoma de un virus *in vitro* mediante clones infectivos permite explotar la capacidad de algunos virus para expresar proteínas foráneas, no codificadas de forma natural por el genoma viral (Scholthof y col., 1996. Annu Rev Phytopathol, 34: 299-323). Los clones infectivos de vector de clonaje (plásmido bacteriano). En la actualidad existen varios ejemplos de virus utilizados como vectores virales (Lico et al., 2008. J Cell Physiol, 216: 366-377).

No obstante, la selección de las secuencias reguladoras de la expresión de dichas proteínas foráneas óptimas, es un aspecto clave en la eficacia del sistema. Por tanto, se requiere un estudio pormenorizado de las secuencias de cada tipo viral para delimitar la secuencia que presente mayor eficacia. La selección de una secuencia mínima del virus PepMV que permita la expresión eficaz de proteínas foráneas en huéspedes naturales de dicho virus, supondría una potente herramienta que podría formar parte de un vector de expresión que permitiera producir proteínas *in*

vivo con alto rendimiento.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada, correspondiente a una secuencia de ARN del Virus del mosaico del pepino dulce, PepMV, implicada en la regulación de la expresión génica. En varias realizaciones preferidas, dicha secuencia comprende; una secuencia MCS reconocida por al menos una enzima de restricción única; una secuencia nucleotídica (P) que codifica para una proteína funcional o no funcional; una secuencia nucleotídica que codifica para una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RpRd) y para una secuencia triple gene block (TGB) de un potexvirus (RpRd-TGB); o cualquier combinación de las anteriores. Además, la presente invención se refiere a un vector que comprende cualquier secuencia anterior, una célula o una planta que comprende cualquiera de dichas secuencias o vectores. Asimismo, la invención se refiere; al uso y método de cualquier secuencia o vector de la invención para la detección de al menos una planta del género *Solanum* resistente al virus PepMV; o al método para producción de una proteína funcional o no funcional, en la célula o la planta de la invención que comprende la cotransfección con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína de la cápsida (CP) de un potexvirus.

El virus PepMV reúne varias características que lo hacen un excelente candidato para utilizar sus secuencias como parte de un vector de expresión de proteínas de interés: 1.) Algunas de las proteínas que expresa su genoma, como la CP, se acumulan a muy altos niveles en las plantas inoculadas; 2.) Los síntomas que induce en las plantas inoculadas son suaves y no conducen a la muerte de éstas; 3.) Está presente en los agroecosistemas de forma natural; 4.) Se acumula en grandes cantidades en *N. benthamiana* (planta candidata para la expresión de proteínas). En este trabajo se ha obtenido un vector de expresión autónomo capaz de expresar la GFP en plantas de *N. benthamiana*. Mediante la sustitución del gen *GFP* por otro de interés, se consigue la expresión del gen de interés en plantas.

Tal como se describe en los ejemplos, en la presente invención se delimita una región del genoma del virus PepMV que actúa como promotora del ARN del ORF de la proteína CP. Los resultados obtenidos tras el ensayo de los mutantes permitieron: 1) delimitar el extremo 3' de esta región (a 36 nt aguas abajo del codón de inicio del ORF de la CP) y 2) mostrar su implicación en la capacidad de los mutantes para iniciar focos de infección. Para el desarrollo de un vector de expresión se delimitó también el extremo 5', el cual fue situado a 75 nt aguas arriba del codón de inicio del ORF de la CP. De la viabilidad de los vectores virales diseñados de PepMV se pudo deducir que la región seleccionada de 111 nucleótidos (SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2) contenía todos los elementos funcionales necesarios para su actividad. Por tanto, se descartaron construcciones que no fueron infectivas con potenciales secuencias reguladoras de la expresión génica que tenían 88, 106 ó 124 nucleótidos (FIG. 19). Además, se demuestra que la sustitución de la secuencia reguladora de la expresión génica, SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2, por una secuencia heteróloga, también produce la expresión de la secuencia P.

La secuencia heteróloga tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una secuencia procedente de una cepa distinta de la cepa PepMV-Sp13. Por ejemplo, pero sin limitarse, la secuencia heteróloga procede de la cepa de Virus PepMV-Ch2. Preferiblemente, la secuencia heteróloga de la presente invención es una secuencia homóloga. Las secuencias homólogas se refieren a secuencias de cepas distintas con expresiones fenotípicas similares que proceden de una secuencia ancestral común.

Los ensayos de agroinfiltración llevados a cabo con las secuencias de la invención, mostraron la capacidad de las mismas (así como del vector de expresión que las contiene) para expresar GFP (que sustituye la secuencia que codifica para la proteína CP) e infectar sistémicamente plantas de *N. benthamiana*. La realización de ensayos de complementación en los que se aportó la proteína CP en *trans* (mediante co-transformación) demostró que era posible restaurar el movimiento célula a célula de mutantes que no

expresan la CP, con lo cual se aumenta la capacidad de producción de proteínas por medio de este sistema.

Adicionalmente, una aplicación de alto interés comercial de un vector de expresión que expresa un gen reporter (en este caso, GFP) bajo el control de la secuencia reguladora de la expresión génica SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2, es su uso para la búsqueda de plantas resistentes al virus PepMV en colecciones de mutantes del género *Solanum* y preferiblemente de la especie *Solanum lycopersicum*.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, implicada en la regulación de la expresión génica. Una realización preferida se refiere a la secuencia nucleotídica, donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 1.

La secuencia SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ADN que corresponde a una secuencia de ARN perteneciente al virus PepMV. La secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde a un fragmento de la región reguladora de la expresión (región promotora o promotor) del gen que codifica para la proteína de la cápsida (CP) del virus PepMV (*Pepino mosaic virus*), Virus del mosaico del pepino dulce. El PepMV pertenece a la familia potexvirus. Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, este fragmento presenta una función clara en la regulación de la expresión de secuencias situadas aguas abajo de la misma. La extensión (nº de nucleótidos) y composición de esta secuencia han sido seleccionadas teniendo en cuenta que mutaciones de cualquiera de sus nucleótidos, provocan la reducción o incluso la pérdida de la capacidad de promover la expresión de secuencias situadas aguas abajo de la misma (ver ejemplos). No obstante, dicha secuencia admite cierta variación. Por ejemplo, esta secuencia, en la cepa CH2 de PepMV tiene siete nucleótidos variantes, lo cual supone que es una secuencia con un 84 % de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1. La secuencia SEQ ID NO: 1 contiene la secuencia conservada GTTAAGTTT, presente tanto en las cepas Sp13, US2 o CH2 del virus PepMV como en otro tipo de virus pertenecientes al mismo

género como por ejemplo, PVX, BaMV o WCIMV. La secuencia con al menos un 80% de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1 es una secuencia heteróloga. Más preferiblemente, la secuencia heteróloga es una secuencia homóloga de SEQ ID NO: 1.

Otra realización preferida se refiere a la secuencia nucleotídica aislada que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a la secuencia SEQ ID NO: 1, unida por su extremo 3' a la secuencia SEQ ID NO: 2.

La secuencia SEQ ID NO: 2 es la secuencia nucleotídica de ADN que corresponde a una secuencia de ARN perteneciente al virus PepMV, situada a continuación de la secuencia de ARN codificada por SEQ ID NO: 1, es decir, unida al extremo 3' de la secuencia de ARN, en el genoma del virus, codificada por SEQ ID NO: 1. La secuencia SEQ ID NO: 2 contiene un triplete de nucleótidos ATG, o codón de inicio de la traducción, que indica el comienzo de la secuencia codificante del gen CP. De acuerdo con lo que se muestra en los ejemplos de la presente invención, dicha secuencia contribuye a la expresión de una secuencia nucleotídica situada aguas abajo, es decir, también está implicada en la regulación de la expresión génica. Concretamente, la timina situada en la posición central del codón de inicio (ATG), es importante para el desempeño de dicha función reguladora.

En la presente invención, el término "implicada en la regulación de la expresión génica" hace referencia al efecto sobre la funcionalidad de un gen en lo referido al control de la transcripción de una secuencia de ADN, al control de la replicación de una secuencia de ARN, a la generación de ARNs mensajeros a partir de ARNs policistrónicos, o al control de la traducción de una secuencia de ARN u otras secuencias no descritas. En la presente invención, para referirse a la implicación de una secuencia en la regulación de la expresión génica se puede emplear la expresión "reguladora de la expresión génica". Por ejemplo, entre las secuencias reguladoras de la expresión génica están los promotores y otras menos comunes como determinados intrones.

Otra realización preferida se refiere a la secuencia nucleotídica aislada que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1; o a la secuencia SEQ ID NO: 1; o a cualquiera de las secuencias anteriores, unida a la secuencia SEQ ID NO: 2 (del modo descrito anteriormente); que está unida por su extremo 3' a una secuencia nucleotídica (MCS), donde la secuencia MCS es reconocida por al menos una enzima de restricción única. Para hacer referencia a la secuencia MCS (de las siglas en inglés, *Multicloning Site*) se puede emplear el término polilinker. Tal como se entiende en la presente invención, la secuencia MCS o polilinker es una secuencia corta de ADN que contiene al menos un sitio de restricción único. Es decir, el sitio de restricción es reconocido por una enzima capaz de cortar solamente en dicho sitio de restricción ya que dicha enzima no reconoce otros sitios de restricción en cualquiera de las secuencias descritas en párrafos anteriores o en secuencias de vectores descritas más adelante. La secuencia MCS puede contener otros sitios de restricción reconocidos por una o varias enzimas capaces de reconocer otros sitios de restricción de la secuencia nucleotídica de un vector de expresión en el cual se integra cualquiera de las secuencias de la invención descritas en párrafos precedentes. La secuencia MCS no modifica las pautas de lectura de las secuencias codificantes, sino que proporciona un lugar para la introducción de un número de nucleótidos a continuación de la/s secuencia/s reguladora/s de la expresión génica. De esta manera se posibilita la clonación de uno o varios fragmentos de ADN dentro de la secuencia MCS.

En adelante, para hacer referencia a la secuencia nucleotídica aislada que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1; o a la secuencia SEQ ID NO: 1; o a cualquier secuencia anterior, unida a la secuencia SEQ ID NO: 2 del modo descrito anteriormente; o a cualquier secuencia anterior unida por su extremo 3' a la secuencia MCS; se podrá emplear el término "secuencia/s de la invención" o "secuencia/s de la presente invención"

Según otra realización preferida, la secuencia de la invención se une por su extremo 3' a una secuencia nucleotídica (P) que codifica para una

proteína funcional o no funcional. La secuencia P está unida funcionalmente a la secuencia de la invención. La unión funcional es aquella que permite el comienzo de la transcripción de la secuencia P y el inicio de traducción de dicha secuencia.

La proteína funcional es aquella que desempeña una o varias funciones *in vivo* o *in vitro*. Dicha función puede ser una función esperada o no, es decir, la función no esperada puede ser la consecuencia de la modificación de alguno de sus nucleótidos. La proteína no funcional es aquella que no desempeña ninguna función *in vivo* o *in vitro* o, la proteína cuyo resultado de la traducción no consiste inmediatamente en proteínas funcionales, sino por ejemplo, pero sin limitarse, en una poliproteína que dará lugar a una o varias proteínas funcionales después de ser procesada. La secuencia de la presente invención es capaz de regular la expresión génica de la secuencia P, funcional o no funcional. El sistema que se presenta en la presente invención puede ser empleado para determinar la funcionalidad de secuencias P llevando a cabo, por ejemplo, pero sin limitarse, modificaciones en la secuencia original P, como consecuencia de ello, alguna de las secuencias P empleadas puede resultar no funcional.

Una realización más preferida se refiere a la secuencia donde la secuencia nucleotídica P codifica para una proteína funcional reporter (o informadora). La proteína reporter es una proteína que puede detectarse fácilmente ya que no está presente normalmente en la célula u organismo en el cual se expresa. La proteína funcional reporter se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, beta-galactosidasa, luciferasa, cloramfenil acetiltransferasa (CAT), beta-glucuronidasa (GUS) o la proteína verde fluorescente (GFP). Una realización más preferida se refiere a la secuencia donde la secuencia nucleotídica P codifica para la proteína funcional reporter GFP.

Otra realización preferida se refiere a la secuencia de la presente invención unida por su extremo 5' al extremo 3' de una secuencia nucleotídica que codifica para una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RpRd o también empleado el término replicasa) y para una

secuencia *triple gene block* (TGB) de un potexvirus. En la presente invención, esta secuencia se denomina RpRd-TGB. La secuencia RpRd-TGB comprende tanto los ORF (ORF1 correspondiente a RpRd; ORF2 correspondiente al TGB1; ORF3 correspondiente al TGB2; ORF4 correspondiente al TGB3) como las secuencias reguladoras de la expresión génica de dichos ORF. Los ORFs 2, 3 y 4 se solapan parcialmente en diferentes marcos de lectura.

En una realización más preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia RpRd-TGB pertenece al virus PepMV. En este caso, es decir, en el caso de que la secuencia RpRd-TGB pertenezca al virus PepMV, la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RpRd) tiene un tamaño de entre 163 y 164 kDa y las secuencias TGB codifican péptidos de 26 kDa, 14 kDa y 9 kDa, respectivamente.

Otro aspecto de la presente invención es un vector de expresión que comprende la secuencia de la invención; o dicha secuencia unida a la secuencia P; o cualquier secuencia anterior unida a una secuencia RpRd-TGB.

El término "vector" se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender cualquier secuencia descrita según los aspectos y realizaciones anteriores que, fusionada al mismo puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

Según una realización preferida, el vector de expresión es un vector binario, es decir, es un vector capaz de replicarse en dos tipos de célula huésped. La célula huésped debe ser aquella célula adecuada al tipo de vector de expresión empleado, es decir, el vector debe comprender los

elementos genéticos necesarios para la autorreplicación y/o expresión en dicha célula huésped. Dicho vector puede replicarse y/o expresarse, por ejemplo pero sin limitarse, en dos especies diferentes de bacterias o en una especie de bacteria y otra de levadura. Una realización más preferida es el vector de expresión donde la célula huésped es una bacteria. El artículo "una" no pretende limitar el nº de cepas, especies o células de bacteria sino que indica que la célula huésped pertenece de forma indeterminada, a una bacteria.

Otra realización preferida se refiere a un vector de expresión donde la secuencia de la invención; o la secuencia de la invención unida a la secuencia P; o cualquier secuencia anterior unida a una secuencia RpRd-TGB, forma parte de un ADNt. El ADN de transferencia (ADNt) es un segmento del plásmido Ti (inductor de tumores) de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, que puede ser transferido a células vegetales, donde se integra en el genoma. El ADNt no contiene ningún gen importante para el proceso de transferencia, salvo dos cortas secuencias con repeticiones imperfectas situadas en sus bordes (LB y RB). Mediante manipulación genética se han sustituido las secuencias originales del ADNt del microorganismo, que convertían a la planta en una fábrica de nutrientes de *A. tumefaciens*, por otras que suelen permitir la selección del tejido o planta transformados y/o por genes de interés científico o biotecnológico (NPTII, genes marcadores u otros genes).

En adelante para hacer referencia a cualquier vector de expresión descrito anteriormente se empleará el término "vector de la invención" o "vector de la presente invención".

El vector de la invención puede contener una o más repeticiones de cualquiera de las secuencias implicadas en la regulación de la expresión génica.

Otro aspecto de la presente invención es una célula que comprende de forma transitoria o de forma estable la secuencia de la invención, o dicha secuencia unida a la secuencia P; o cualquier secuencia anterior unida a

una secuencia RpRd-TGB; o el vector de la invención. El término "célula" tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

Según una realización preferida dicha célula pertenece a una especie vegetal. La célula vegetal hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino Plantae.

En adelante para hacer referencia a cualquier célula descrita anteriormente se empleará el término "célula de la invención/de la presente invención" o "célula vegetal de la invención/de la presente invención".

Otro aspecto de la presente invención se refiere a polen que comprende la célula vegetal de la invención. Este aspecto tiene elevado interés puesto que la transmisión de los caracteres genéticos y fenotípicos puede llevarse a cabo por la polinización de cualquier variedad vegetal compatible con el polen al que se hace referencia. De este modo se consigue una planta que comprende cualquiera de las secuencias descritas en la presente invención y, tras los respectivos cruces y selecciones, se puede obtener una planta en la que la secuencia se integra de forma estable y en un número de copias adecuado para obtener los mismos caracteres deseables en las posteriores generaciones.

Otro aspecto de la presente invención es una planta que comprende la célula de la presente invención. Según una realización preferida, la planta pertenece al género *Solanum*. Según una realización más preferida, la planta pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.

El término "planta" engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación. La planta puede contener cualquier secuencia de la invención descrita en párrafos anteriores, en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis.

En adelante para hacer referencia a la planta descrita, se empleará el término "planta de la invención" o "planta de la presente invención".

La planta de la invención puede conseguirse por transformación genética mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la planta, ya sea éste genómico, cloroplástico o mitocondrial. Asimismo, la planta también puede conseguirse por transferencia de cualquiera de las secuencias de la invención por cruzamiento, es decir, empleando polen de la planta de la invención para polinizar cualquier otra planta que no contenga cualquiera de las secuencias de la invención o polinizando los gineceos de plantas que contengan cualquiera de las secuencias de la invención con otro polen de plantas que no contengan estas secuencias. Los métodos para conseguir la planta de la invención no se limitan exclusivamente a las técnicas descritas en este párrafo. Así, por ejemplo, la transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens* mediante agroinfiltración, puede llevarse a cabo por "magnificación", es decir, por inmersión de la planta entera en una suspensión diluida de *Agrobacterium tumefaciens* (que comprenda la secuencia de la invención) y posterior aplicación de vacío (0,5-1 bar) durante 1-2 minutos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al germoplasma de la planta de la invención. El germoplasma queda definido por aquel material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o a los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo. Así pues germoplasma es la semilla, cultivo de tejido de cualquier parte de la planta o plantas establecidas en colecciones *ex situ*, sin excluir cualquier otro material que sea contemplado en esta definición.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso de cualquier secuencia de la invención definida en párrafos precedentes, para la construcción de un vector de expresión.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de cualquier secuencia de la invención definida en párrafos precedentes, o del vector de la invención, para la detección de al menos una planta del género *Solanum* resistente al virus PepMV. Según una realización preferida, la planta es de la especie *Solanum lycopersicum*.

Para la detección de al menos una planta del género *Solanum* o de al menos una planta de la especie *Solanum lycopersicum*, resistente al virus PepMV, es necesario inocular o transfectar con cualquiera de las secuencias de la presente invención que sean capaces de expresar una secuencia P en cualesquiera de dichas plantas y proceder a la detección del ARN mensajero (ARNm) codificado por la secuencia nucleotídica P o la detección de la proteína. La planta en la que se detecte dicho producto, será una planta susceptible a la infección por el virus PepMV. Por el contrario, la planta en la que no se detecte dicho producto, presentará resistencia frente al virus PepMV. Existe la posibilidad de encontrar resultados intermedios en cuanto a la detección de dichos productos codificados por la secuencia P. En este caso, se compara la cantidad de producto detectado en la planta problema inoculada o transfectada, con la cantidad de producto detectado en una planta control inoculada o transfectada con las mismas secuencias que la planta problema. La detección se lleva a cabo por medio de cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica. La planta control es una planta sensible o resistente al virus PepMV.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso de la célula de la invención o de la planta de la invención, para la producción de una proteína funcional o no funcional.

Una realización preferida se refiere al uso de la célula de la invención o de la planta de la invención, donde la producción de la proteína funcional o no

funcional comprende la cotransfección, simultánea o no, de dicha célula o de dicha planta, con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína de la cápsida (CP) de un potexvirus. Según una realización más preferida, el potexvirus es el virus PepMV, es decir, la secuencia que codifica para la proteína CP es del virus PepMV

La producción de una proteína funcional o no funcional puede llevarse a cabo mediante cualquier célula o planta que comprenda cualquier secuencia de la presente invención donde SEQ ID NO: 1 está unida por su extremo 5' al extremo 3' de una secuencia nucleotídica que codifica para una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RpRd) y para una secuencia *triple gene block* (TGB) de un potexvirus (preferiblemente el virus PepMV). Tal como se ha explicado en un párrafo precedente, también están incluidas tanto los ORF de estas secuencias como las secuencias reguladoras de la expresión génica (en los párrafos posteriores que hagan mención a esta secuencia también se entiende esta definición, aunque no se mencione).

La cotransfección es la transfección conjunta de una célula transfectada, en el mismo momento (simultánea) o ya transfectada previamente (no simultánea), con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína CP. Dicha secuencia que codifica para CP puede cotransfectarse mediante cualquier técnica ya mencionada en apartados anteriores. Asimismo, dicha secuencia puede formar parte de un vector de expresión. La proteína CP de PepMV no es necesaria para su multiplicación a nivel unicelular, pero sí para el movimiento célula a célula del virus PepMV. Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la aportación de la secuencia que codifica para la proteína CP aportada por cotransfección (integración transitoria o estable), es decir, aportada en trans, aumenta la infectividad de las secuencias transfectadas en dicha planta (preferiblemente cualquier secuencia de la presente invención donde SEQ ID NO: 1 está unida por su extremo 5' al extremo 3' de una secuencia nucleotídica que codifica para una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RpRd) y para una secuencia *triple gene block* (TGB) de un potexvirus [preferiblemente el virus PepMV]). Este aumento de

infectividad produce la expresión de la secuencia P de interés en mayor cantidad de células vegetales, lo que supone un mayor rendimiento en la producción de la proteína para la que codifica. En los ejemplos de la presente invención se demuestra que la realización de ensayos de complementación en los que se aportó la CP en *trans* demostró que era posible restaurar el movimiento célula a célula de plantas que no expresan la secuencia que codifica para la proteína CP.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención del vector de la invención, que comprende:

- a. Seleccionar cualquier secuencia descrita en la presente invención,
- b. insertar la secuencia del apartado (a) en un vector de expresión capaz de replicarse en al menos un tipo de célula huésped, y
- c. seleccionar el vector obtenido según el apartado (b) que comprende dicha secuencia.

La inserción de cualquiera de las secuencias seleccionadas en el apartado (a) en un vector de expresión se puede llevar a cabo por medio de los métodos de clonación que forman parte del conocimiento general común, mediante corte de las secuencias y el vector con enzimas de restricción y su posterior ligación, de forma que la secuencia del vector integre la secuencia seleccionada en el apartado (a).

La selección del vector obtenido en el apartado (c), puede llevarse a cabo mediante técnicas como, pero sin limitarse, la selección de células que contengan los vectores de la invención mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de productos codificados por una secuencia contenida en la secuencia del vector. Para la selección del vector obtenido en el apartado (c) debe llevarse a cabo la determinación de la presencia de la secuencia insertada en el apartado (b) mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, análisis de tamaño de fragmentos obtenidos por

digestión con enzimas de restricción y/o secuenciación de dichos fragmentos o del vector.

Otro aspecto más de la presente invención es un método para la obtención de la célula de la invención, que comprende:

- a. Obtener una célula de una muestra biológica,
- b. transfectar la célula huésped aislada del apartado (a) con el vector de la invención, y
- c. seleccionar la célula transfectada según el apartado (b) que comprende dicha secuencia.

En la presente invención, el término "muestra biológica" hace referencia a una muestra tanto de microorganismos como de tejido vegetal. La obtención de la célula es intrínseca a la obtención del tejido. Los tejidos vegetales están formados por células diferenciadas, salvo excepciones, como es el caso de tejidos meristemáticos donde las células son indiferenciadas. Las células vegetales son totipotentes, es decir, contienen una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa.

La muestra biológica y, en concreto, la célula, se obtiene de cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens*) o tejido vegetal.

La transfección consiste en la introducción de material genético externo en el núcleo de células eucariotas. En la presente invención, el término transformación puede emplearse como sinónimo de transfección. La transformación genética de las células obtenidas en el apartado (a) se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, transformación genética mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la célula. Mediante estas técnicas se consigue introducir, de forma transitoria o estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias

descritas en la presente invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada siga expresándose, en el caso de una inserción estable, o deje de expresarse, en el caso de una inserción transitoria. La célula transformada con el vector de la invención puede integrar cualquier secuencia descrita en la invención, en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico o, permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse.

La selección de la célula del apartado (c) se puede llevar a cabo por medio de cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, la adición de antibióticos al medio de cultivo que suministra nutrientes a las mismas.

Las células seleccionadas, si son vegetales, pueden someterse a un programa de organogénesis o embriogénesis somática mediante el cual, tras la dediferenciación de las mismas mediante una combinación adecuada de hormonas vegetales y otros compuestos, se da lugar a un tallo o una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que procede.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección de al menos una planta del género *Solanum*, resistente al virus PepMV, que comprende:

- a. seleccionar al menos una planta de una colección de líneas mutantes del género *Solanum*,
- b. inocular al menos una planta del apartado (a) con cualquier secuencia de la invención unida a una secuencia nucleotídica P, o con el vector de la invención que comprende cualquiera de las secuencias correspondientes a este apartado, y
- c. seleccionar al menos una planta resistente al virus PepMV que no exprese la proteína funcional o no funcional.

Según una realización preferida del método, la planta del género *Solanum* pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.

La colección de líneas mutantes del género *Solanum* (o de la especie *Solanum lycopersicum*) puede obtenerse, por ejemplo, pero sin limitarse, por medio de mutagénesis química. Preferiblemente los mutantes pertenecen a la generación F2, es decir, a las plantas obtenidas a partir de la germinación de las semillas producidas por las plantas F1. Las plantas F1 son plantas procedentes de la germinación de semillas obtenidas de las plantas mutantes parentales.

Las plantas del género *Solanum* (o de la especie *Solanum lycopersicum*) no presentan síntomas evidentes de infección tras 10 días post-inoculación con el virus PepMV. La detección de la infección viral requiere pues de una técnica complementaria para la evaluación de la susceptibilidad. El desarrollo de estas construcciones portadoras de un gen reporter evitaría el uso de estas técnicas complementarias ya que la detección se realizaría por medio de lámparas de luz ultravioleta por ejemplo, expresando fluorescencia (debido a la presencia de la proteína reporter) sólo las plantas susceptibles, que permiten la replicación del virus.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Muestra la estrategia utilizada para la generación del fragmento PepXL6agg. Se indica la posición y orientación de los iniciadores

FIG. 2. Muestra el esquema seguido para la generación de los mutantes PepGFP Δ CP.

Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores en cada caso y los sitios de restricción utilizados. 1) PepGFP Δ CP1, 2) PepGFP Δ CP2, 3) PepGFP Δ CP3 y 4) PepGFP Δ CP4.

FIG. 3. Muestra el esquema seguido para la generación de la construcción pBPep501.

Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores.

FIG. 4. Muestra el esquema seguido para la generación de la construcción pBPep5.128

Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores.

FIG. 5. Muestra los pasos seguidos para el desarrollo de la construcción pBPepGFP Δ CPCh2.

Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores en cada caso y los sitios de restricción utilizados en el subclonaje.

FIG. 6. Muestra el producto de RT-PCR utilizando los iniciadores CE-42 y CE-43 sobre extracto de ARN total *N. benthamiana* inoculada con PepMV-SP13. Marcador DNA lambda\Hind III (calle 0) y producto de RT-PCR (calle 1)

FIG. 7. Muestra el resultado de una hibridación en membrana mostrando la presencia de PepMV en plantas agroinfiltradas con los clones pBPepXL6.3, pBPepXL7.7 y pBPepXL 9.1 a 5 dpi.

En la parte superior aparecen numeradas de 1 a 3 las improntas de secciones de pecíolos de 3 plantas agroinfiltradas. Se incluyen dos improntas, una de hoja agroinfiltrada (impronta izquierda) y otra de hoja infectada sistémicamente (impronta derecha). C- corresponde a las improntas de plantas agroinfiltradas con los controles negativos, pBIN61 y pBGFP. En la parte inferior derecha se encuentra un control positivo de ARN transcrito a partir del clon pLMPepMV 0.5. El ARN viral fue detectado con una sonda marcada con digoxigenina complementaria al gen de la replicasa de PepMV.

FIG. 8. Muestra las construcciones de ADN utilizadas para el estudio de la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV.

A) PepXL6 (del clon agroinfectivo), genoma de PepMV sin modificar. B) Construcción PepXL6agg, la flecha indica mutación puntual de ATG a AGG del codón de inicio de la CP. C) Construcción PepGFP Δ CP, en la que se ha sustituido parte del ORF de la CP por el ORF completo de la GFP.

FIG. 9. Muestra el análisis por Northern-blot de extractos de ARN total de protoplastos de *N. benthamiana* inoculados PepXL6 (XL6), PepXL6agg (XL6agg) y PepGFP Δ CP1 (Δ CP1).

C- corresponde a extractos de ARN total de protoplastos sin inocular y C+ corresponde a extractos de ARN total de hoja agroinfiltrada con el clon agroinfectivo. El ARN viral fue detectado por hibridación molecular con una sonda marcada con digoxigenina complementaria a la replicasa de PepMV. El control de carga se muestra en el panel inferior. Se indica el tamaño del ARN genómico de PepMV (ARNg)

FIG. 10. Muestra los focos de infección iniciados por PepGFP Δ CP1 en células de la epidermis y mesófilo de hoja *N. benthamiana* directamente agroinfiltrada.

A) Célula aislada de la epidermis. B) Grupo de 3 células del mesófilo. C) Área agroinfiltrada donde se observan varios focos de infección. D) Área agroinfiltrada con la construcción control pBGFP. Todas las imágenes fueron tomadas a 6 dpi en el microscopio confocal.

FIG. 11. Muestra las construcciones virales utilizadas en los ensayos de agroinfiltración en *N. benthamiana*.

A) Clon pBPepGFP Δ CP1, B) Clon pBPepGFP Δ CP2 C) Clon pBPepGFP Δ CP3 y D) pBPepGFP Δ CP4. La expresión de los insertos clonados entre el extremo izquierdo (LB) y derecho (RB) del plásmido Ti de *A. tumefaciens* está controlada por el promotor y el terminador 35S. Todas las construcciones se transformaron en *A. tumefaciens* (cepa C58C1 y plásmido de virulencia pCH32).

FIG. 12. Muestra hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las diferentes combinaciones de plásmidos utilizadas.

Las regiones agroinfiltradas se encuentran marcadas con línea discontinua. Dentro de cada región agroinfiltrada se indica la combinación utilizada. Δ CP1: pBPepGFP Δ CP1, Δ CP2: pBPepGFP Δ CP2, Δ CP3: pBPepGFP Δ CP3, Δ CP4: pBPepGFP Δ CP4, p19: pB19 y CP: pBINCPep. En la imagen de la izquierda se muestran las agroinfiltraciones en ausencia de CP y en la imagen de la derecha agroinfiltraciones en presencia de CP.

FIG. 13. Muestra el n° de focos de infección iniciados tras agroinfiltración por mutantes de PepMV que no expresan la CP.

Clones utilizados: pBPepGFP Δ CP1 (Δ CP1), pBPepGFP Δ CP2 (Δ CP2), pBPepGFP Δ CP3 (Δ CP3) y pBPepGFP Δ CP4 (Δ CP4). Las infiltraciones se realizaron en presencia de p19 (clon pB19). Se contaron células aisladas que expresaban GFP en discos de hojas de 0,5 cm² a 6 y a 10 dpi. El experimento se repitió tres veces y cada medida resulta de la media de los valores obtenidos en 9 discos de hoja/construcción. A, B, B,C, C, a, b y c

representan grupos homogéneos de acuerdo al valor medio de número de células que expresan GFP/construcción; construcciones con la misma letra no muestran diferencias significativas al mismo nivel de probabilidad del 95%, de acuerdo con un test de Tukey.

FIG. 14. Muestra la restauración del movimiento de mutantes de PepMV que no expresan la CP mediante la aportación de la CP en *trans* por agroinfiltración.

Clones utilizados: pBPepGFP Δ CP1 (Δ CP1), pBPepGFP Δ CP2 (Δ CP2), pBPepGFP Δ CP3 (Δ CP3) y pBPepGFP Δ CP4 (Δ CP4). La agroinfiltración de las construcciones se realizó en presencia de CP (clon pBINCPep) y p19 (clon pB19). Imágenes tomadas a 6 (Panel A) y 10 dpi (Panel B) bajo la iluminación de luz UV.

FIG. 15. Muestra la inserción del ORF de la GFP en el genoma de PepMV y representación de los ARNs subgenómicos que supuestamente deberían generarse.

El ORF de la GFP debería expresarse desde una duplicación del promotor del ARN subgenómico de la CP. En la figura se muestran los ORFs originales, la región propuesta como promotora del ARN subgenómico (SGP y SGPd) de la CP, y el ORF de la GFP. El tamaño aproximado de los ARNs subgenómicos se indica a la derecha.

FIG. 16. Muestra el esquema de las construcciones de PepMV marcadas con GFP generadas. Arriba pBPep501 y abajo pBPep5.128.

FIG. 17. Muestra la comparación entre el n° de focos de infección iniciados por PepGFP Δ Ch2 y otros mutantes de PepMV que no expresan la CP tras agroinfiltración.

Clones utilizados: pBPepGFP Δ CP1 (Δ CP1), pBPepGFP Δ CP2 (Δ CP2), pBPepGFP Δ CP3 (Δ CP3), pBPepGFP Δ CP4 (Δ CP4) y pBPepGFP Δ CPCh2 (Δ CPCh2). Las infiltraciones se realizaron en presencia de p19 (clon

pB19). Se contaron células aisladas que expresaban GFP en discos de hojas de 0,5 cm² a 6 y a 10 dpi. El experimento se repitió tres veces y cada medida resulta de la media de los valores obtenidos en 9 discos de hoja/construcción. A, A,B, B,C, C, a, b, b,c y c representan grupos homogéneos de acuerdo al valor medio de número de células que expresan GFP/construcción; construcciones con la misma letra no muestran diferencias significativas al mismo nivel de probabilidad del 95%, de acuerdo al Test de Tukey.

FIG. 18. Muestra la restauración del movimiento del mutante quimérico PepGFP Δ CPCh2 (B) y comparación con el mutante PepGFP Δ CP1 (A).

La agroinfiltración de las construcciones se realizó en presencia de CP (clon pBINCPep) y p19 (clon pB19). Imágenes tomadas a 6 y 10 dpi bajo la iluminación de luz UV.

FIG. 19. Muestra los diseños de las construcciones de ADN conteniendo diferentes secuencias reguladoras de la expresión génica cuya infectividad fue probada.

Las construcciones 1, 2 y 3 (pBINPepGFP1, 2 y 3) no fueron infectivas, es decir, no expresaban el gen *GFP*. La estrategia para la expresión de *GFP* es la misma en todos los casos, es decir, duplicación de la secuencia reguladora de la expresión génica. La construcción 4 (pBPep501) fue infectiva.

A continuación se detalla el tamaño de las secuencias reguladoras de la expresión génica (SGP; *Subgenomic Promoter*) de cada una de las construcciones:

- 1.- 124 nt; 72 nt (3' ORF4) + 38 nt región UTR + 14 nt (5' CP).
- 2.- 106 nt; 54 nt (3' ORF4) + 38 nt región UTR + 14 nt (5' CP).
- 3.- 88 nt; 36 nt (3' ORF4) + 38 nt región UTR + 14 nt (5' CP).
- 4.- 111 nt; 37 nt (3' ORF4) + 38 nt región UTR + 36 nt (5' CP).

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos necesarios para llevar a cabo la presente invención, se describen en primer lugar ya que es necesario conocer este apartado para entender los ejemplos descritos a continuación.

1. Aislados virales y material vegetal

El aislado viral empleado para el desarrollo del clon agroinfectivo (PepMV-Sp13) se revivió a partir de material infectado y liofilizado de *N. benthamiana* (Aguilar et al., 2002. Arch Virol, 147: 2009-2015). Para ello, se inocularon plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente 25 días (5-6 hojas). Tras la inoculación las plantas fueron mantenidas en un invernadero con unas condiciones de día y noche de 16 h a 25-26° C y 8 h a 19° C, respectivamente.

2. Desarrollo de un clon agroinfectivo de PepMV

Para la generación de un clon agroinfectivo de PepMV se siguieron los pasos que se detallan a continuación.

2.1. Síntesis de un ADN complementario (ADNc) a la longitud total del genoma

La generación del ADNc correspondiente a la longitud total del ARNg de PepMV se realizó por RT-PCR usando como molde el ARN total obtenido con *TRI-reagent* e iniciadores con secuencias nucleotídicas específicas de los extremos 5' y 3' del genoma viral PepMV-Sp13.

Para la preparación de ARN total de hoja se partió de 0,1 g de tejido vegetal fresco. El tejido fue triturado con nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1,5 ml y se homogeneizó con 1 ml de TRI-reagent (Sigma). En el caso de las preparaciones a partir de protoplastos, el pellet resultante fue homogeneizado con 0,25 ml de TRI-reagent. En ambos casos las preparaciones de ARN total se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los iniciadores fueron: CE-42 complementario al extremo 5' de la secuencia del virus, que contiene una diana *Bam* HI, y CE-43, complementario al extremo 3', que contiene una cola de 20 dTTP seguida de las dianas de restricción: *Xma* I, *Sma* I, *Apa* I, *Sac* II y *Kpn* I (Tabla 1).

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc, se emplearon 3 μ l (aprox. 2 μ g) de ARN total. La reacción de transcripción reversa se hizo en un volumen final de 20 μ l que contenía 4 μ l del tampón de transcriptasa reversa concentrado 5 veces, 7,5 μ l del iniciador CE 43 10 μ M, 1,5 μ l de una mezcla de dNTPs 10 mM, 1,5 μ l de DTT 100 mM, 20 U de inhibidor de ARNasas (Roche) y 100 U de transcriptasa reversa (Roche). Esta mezcla se incubó a 43°C durante 70 min. Tras la reacción de retrotranscripción el producto se purificó utilizando columnas GENE CLEAN turbo (Q-Biogene) para eliminar las sales de la reacción.

La primera cadena del ADNc se amplificó por PCR en un volumen final de 50 μ l. En la PCR se utilizaron 6 μ l del producto de transcripción reversa, 0,8 μ M de cada iniciador (CE 42 y CE 43), 200 μ M de la mezcla de dNTPs y 3,75 U de Pfu Pyrobest (Takara) en el tampón suministrado por el fabricante, en un volumen final de 50 μ l. El ADN se desnaturalizó durante 2 min a 94°C y se realizaron 20 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridación a 55°C y 12 min de polimerización a 72°C. Al final de los 20 ciclos se dio un tiempo de elongación de 10 min a 72°C.

Tabla 1. Iniciadores empleados en la amplificación del ADNc de longitud total de PepMV.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-42	SEQ ID NO: 3	54
CE-43	SEQ ID NO: 4	62

2.2. Clonaje en pTOPO-XL

Los fragmentos amplificados por PCR se purificaron de un gel de agarosa al 0,8% con cristal violeta recomendado para la purificación de fragmentos de 3-10 kb que ofrece el kit TOPO-XL PCR *Cloning Kit* (Invitrogen).

Una vez purificadas las bandas se sometieron a una reacción de *A-tailing* con el fin de añadir un dATP en los extremos 5' del inserto y prepararlo para la ligación en el pTOPO-XL. La adición de los dATPs en los extremos se realizó en un volumen de reacción de 20 µl. Para ello se emplearon 16 µl (aprox. 150 ng) del producto de PCR purificado, 0,8 µl de dATP a una concentración final de 0,2 mM, 2 µl de tampón 10x de reacción de la Taq polimerasa y 10 unidades de EcoTaq (Ecogen). La mezcla se incubó a 72°C durante 30 min. Finalizada la incubación la reacción fue purificada con el kit ULTRAKIT™ 15 (MO BIO) para la eliminación de sales.

La banda purificada se sometió a una reacción de ligación estándar siguiendo el manual del Kit pTOPO-XL. El producto final fue transformado en *Escherichia coli* TOP10 mediante electroporación (*Gene pulser II* y *capacitance extender*, Bio-Rad laboratories, CA, USA) siguiendo las instrucciones del kit.

Las colonias obtenidas fueron analizadas tras su multiplicación en medio LB (Luria-Bertoni). La preparación del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante cultivos a partir de colonias aisladas en 3 ml de medio LB a 37°C toda la noche. Los cultivos se centrifugaron durante 3 min a 7.500 rpm a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 250 µl de tampón de resuspensión 1 (Tris-Cl 50 mM pH8,0; EDTA 10 mM; 100µg/ml de RNase A, Qiagen). Posteriormente se añadieron 250 µl de tampón de lisis 2

(NaOH 200 mM, 1% SDS), se agitó 6-7 veces y se añadieron 250 μ l del tampón de neutralización 3 (AcNa 3M pH5,5), se agitó 6-7 veces y se dejó incubar en hielo 5 min. Tras la incubación se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se añadió 1 ml de Et-OH 100% para precipitar el ADN. Seguidamente se centrifugó a 14.000 rpm, 15 min a 4°C. El pellet final se resuspendió en 50 ml H₂O estéril.

Una alícuota del ADN obtenido fue digerido con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI (*New England Biolabs*) para realizar un análisis de restricción y comprobar la dirección del inserto. Los clones portadores del inserto fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Xma* I, dianas de corte único situadas en los extremos del genoma del virus y que liberan al inserto del vector preparándolo así para el clonaje en el vector binario pBIN61. Los clones seleccionados fueron denominados pTPepXL6, pTPepXL7 y pTPepXL9.

2.3. Clonaje en pBIN61

El vector binario pBIN61 y los clones portadores de los insertos fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Xma* I. Para ello se emplearon 1,5 μ g de ADN en cada caso, a los que se le añadieron 10 unidades de cada enzima y el tampón recomendado por el fabricante para digestiones dobles en un volumen final de 50 μ l. La reacción se llevó a cabo durante 3 horas a 37°C. Los ADNs digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0,7%, se recuperaron las bandas de interés del gel y se purificaron utilizando el kit GENCLEAN Turbo (Q-biogene). Una vez purificadas las bandas se estimó la concentración del ADN por electroforesis.

En las ligaciones se emplearon 100 ng de vector defosforilado y 100 ng de inserto (ratio 1:2) a los que se le añadieron 40 unidades de ligasa (*T4 DNA ligase; New England Biolabs*) más el tampón adecuado en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche para obtener el máximo número de transformantes. El producto de la ligación

fue concentrado a un volumen final de 3 μ l por medio de precipitación etanólica sin sales con glicógeno (Roche) y se transformó en *E. coli* TOP10 mediante electroporación.

Para la electroporación se siguieron las condiciones estándar recomendadas para *E. coli* (25 μ F de capacitancia, 200 Ω de resistencia, 2500 V) en cubetas de 0,2 cm. Se añadieron 1,5 μ l de la reacción de ligación concentrada a 40 μ l de células competentes. Después de la electroporación, las células se transfirieron a 1 ml de LB y se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación suave (100 rpm), para dejar que las células pudieran expresar el gen de resistencia al antibiótico. Posteriormente se sembraron en placas Petri con medio LB-Agar que contenían kanamicina (50 ng/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

La preparación del ADN plasmídico se realizó del mismo modo que para los clones de pTOPO-XL, es decir, a partir de colonias aisladas en 3 ml de LB. El pellet en este caso fue resuspendido en 30 μ l. Alícuotas de 4 μ l del ADN obtenido fueron digeridas con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI (*New England Biolabs*) para realizar el análisis de restricción. De cada reacción de ligación fueron seleccionados de nuevo tres clones. Las construcciones fueron denominadas: pBPepXL6.1, pBPepXL6.2, pBPepXL6.3, pBPepXL7.7, pBPepXL7.8, pBPepXL7.9, pBPepXL9.1, pBPepXL9.2 y pBPepXL9.3.

3. Construcciones de ADN derivadas del clon infectivo de PepMV

Para la realización de los estudios sobre la implicación de la CP y de posibles regiones reguladoras de la expresión génica en la multiplicación viral fueron desarrolladas una serie de construcciones que dieron lugar a mutantes de PepMV que no expresaban la CP, denominadas pT7PepXL6agg y pBPepGFP Δ CP1, 2, 3, y 4 (a las que se les introdujeron diferentes modificaciones) y pT7PepGFP Δ CP1, además de la construcción pBINCPep.5, en la cual se encuentra clonada la CP de PepMV. Para el desarrollo del vector viral se generaron dos construcciones portadoras del gen *GFP* que darían lugar a dos versiones de un mismo vector,

denominadas: pBPep501 y pBPep5.128. Para el ensayo de un promotor (en la presente invención, secuencia reguladora de la expresión génica) heterólogo fue generada la construcción pBPepGFP Δ CPCh2. A continuación se presentan con detalle los pasos realizados para la obtención de cada una de las construcciones mencionadas.

3.1. Construcción pT7PepXL6agg

La obtención del fragmento PepXL6agg se realizó por mutagénesis dirigida utilizando el método de PCR solapante (FIG. 1). La mutación consistió en el cambio del segundo nucleótido del codón de inicio de la traducción de la CP, de ATG a AGG. Se llevaron a cabo tres PCRs. En la PCR1 se amplificaron 5.640 nt, los cuales contienen el gen de la replicasa (en la presente invención, polimerasa de ARN dependiente de ARN [RpRd]), el TGB y los 11 primeros nt de la proteína de la cápsida (proteína CP); los iniciadores empleados fueron CE-42 (Tabla 1) y CE-199 (Tabla 2) portador de la mutación deseada. Paralelamente, en la PCR2 se amplificó la CP completa y el extremo 3'UTR utilizando los iniciadores CE-198 (con el mismo cambio de nucleótido que el CE199) y el CE-43 (Tabla 1).

Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde (el plásmido pTPepXL6), 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,8 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. La mezcla se sometió a los siguientes ciclos de PCR: un ciclo durante 2 min a 94°C, 15 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de hibridación a 51°C y 10 min (PCR1) o 4 min (PCR2) de polimerización a 72°C. Al final de los 15 ciclos se dio un tiempo de elongación de 12 min (PCR1) o 6 min (PCR2) a 72°C.

Para la PCR3 el molde utilizado fue el producto mezclado de las PCRs 1 y 2 previamente purificados. La mezcla de PCR3 se desnaturalizó durante 2 min a 94°C y se realizaron en primer lugar 3 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 1 min de hibridación a 40°C y 12 min de polimerización a 72°C, posteriormente se sometió a 15 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de hibridación a 52°C y 12 min

de polimerización a 72°C. Al final de los 15 ciclos se dio un tiempo de elongación de 12 min a 72°C.

El fragmento resultante fue clonado en el vector pTOPO-XL, dando lugar al clon pTPepXL6agg. A continuación para situar la construcción bajo el control del promotor de transcripción T7, se clonó dicho promotor. El fragmento resultante fue clonado en el vector pTOPO-blunt dando lugar al clon pT7PepXL6agg.

Tabla 2. Iniciadores empleados para generación del mutante PepXL6agg. Los nucleótidos subrayados introducen la mutación correspondiente.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE198	SEQ ID NO: 5	48
CE-199	SEQ ID NO: 6	48

3.2. Construcciones pBPepGFP Δ CP

Se generaron cuatro construcciones diferentes en las que la CP de PepMV fue reemplazada por la GFP: pBPepGFP Δ CP1, pBPepGFP Δ CP2, pBPepGFP Δ CP3 y pBPepGFP Δ CP4 (FIG. 2). Es decir, las construcciones conseguidas comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1–SEQ ID NO: 2 unidas por el extremo 3' (correspondiente al extremo 3' de SEQ ID NO: 2) a una secuencia nucleotídica (P) que codifica para una proteína funcional o no funcional y a su vez, este bloque de secuencias SEQ ID NO: 1–SEQ ID NO: 2–P, está unido por su extremo 5' (correspondiente al extremo 5' de SEQ ID NO: 1) al bloque RpRd-TGB perteneciente al virus PepMV. Es decir, estas construcciones tienen una estructura RpRd–TGB–SEQ ID NO: 1–SEQ ID NO: 2–P. En este caso, la secuencia P es la secuencia que codifica para la proteína GFP. Los principales pasos para la generación de dichas construcciones fueron los siguientes:

Paso 1: PCR solapante que diera lugar a un fragmento GFP-3'UTR (en el caso de las construcciones 1 y 2) o fragmento GFP-120.3'UTR (en el caso

de las construcciones 3 y 4), portador del gen de la GFP fusionado al extremo 3' de PepMV.

Para la obtención del fragmento GFP-3'UTR, se amplificó en primer lugar el gen de la GFP (PCR1) con los iniciadores CE-236 (Tabla 3) y CE-456 (Tabla 3), el cual incluye una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 3'UTR de PepMV. Paralelamente, en la PCR 2 se amplificó el extremo 3'UTR de PepMV utilizando los iniciadores CE-457 (Tabla 3), que incluye una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 3' del gen de la GFP y CE-43 (Tabla 1). Los iniciadores CE-456/CE-457 complementarios entre sí, permitieron el solapamiento de los fragmentos anteriores utilizando la combinación de los iniciadores CE-236 y CE-43.

En el fragmento GFP-120.3'UTR se incluyeron 120 nt adicionales del extremo C-terminal de la CP. Este fragmento fue generado del mismo modo que GFP-3'UTR utilizando como iniciadores complementarios CE-460 y CE-461.

Como molde de la PCR1 se utilizó un plásmido pTOPO-GFP y como molde de la PCR2 se tomó el plásmido pTPepXL6. Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,4 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las utilizadas en la generación de la construcción pT7PepXL6agg ajustando las condiciones de temperatura de hibridación y tiempos de polimerización a la temperatura de los iniciadores (T_m) utilizados y el tamaño del fragmento amplificado en cada caso.

Paso 2: PCRs solapantes para la generación de fragmentos PepGFP Δ CP

Los fragmentos PepGFP Δ CP fueron generados a través de PCRs solapantes. En la FIG. 2 se especifican los plásmidos, regiones amplificadas e iniciadores específicos utilizados en cada caso.

En la PCR1 se amplificaron 1.100 nt del genoma de PepMV los cuales contienen parte del TGB y el inicio del ORF de la CP con los iniciadores Pep303 y CE-458/CE-351 (Tabla 3) según el caso, que incluyen una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 5' del gen del *GFP*. Para la obtención de los fragmentos PepGFP Δ CP1 y 3 se tomó como molde de la PCR1 el plásmido pTPepXL6 con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-458, que sitúa el ORF de la GFP (codón de inicio modificado a AGG) a 36 nt del codón de inicio de la CP. Para la obtención de los fragmentos de PepGFP Δ CP 2 y 4 como molde de la PCR1 fue utilizado el plásmido pTPepXL6agg con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-351, que sitúa el ORF de la GFP (con su propio ATG) a 38 nt del codón de inicio de la CP (codón de inicio modificado a AGG), y además incluye una diana *Sac* II justo aguas arriba del codón de inicio del ORF de la GFP.

En la PCR2 se amplificó el fragmento GFP-3'UTR o GFP-120.3'UTR utilizando los iniciadores CE-459 (en el caso de PepGFP Δ CP 1 y 3) o CE-353 (en el caso PepGFP Δ CP 2 y 4) (Tabla 3) que incluyen una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 5' de la CP y el CE-43. Los iniciadores CE-458/CE-459 y CE-351/CE-353 complementarios entre sí, permitieron el solapamiento de los fragmentos anteriores utilizando la combinación de los iniciadores Pep303 y CE-43.

Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,4 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las utilizadas en la generación de la construcción pT7PepXL6agg ajustando las condiciones de temperatura de hibridación y tiempos de polimerización a la T_m de los iniciadores utilizados y el fragmento amplificado en cada caso.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la generación de los mutantes PepGFP Δ CP.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-236	SEQ ID NO: 7	59
Pep303	SEQ ID NO: 8	52
CE-351	SEQ ID NO: 9	65
CE-353	SEQ ID NO: 10	65
CE-456	SEQ ID NO: 11	54
CE-457	SEQ ID NO: 12	54
CE-458	SEQ ID NO: 13	59
CE-459	SEQ ID NO: 14	59
CE-460	SEQ ID NO: 15	57
CE-461	SEQ ID NO: 16	57

Paso 3: Los fragmentos resultantes de la PCR 3 fueron clonados en el vector: pTOPO-blunt y posteriormente secuenciados. Una vez confirmadas las secuencias, los clones fueron digeridos con *Xmn* I y *Xho* I (flanquean la región modificada dentro del pTPepXL6) y subclonados en pTPepXL6. De este modo se obtuvieron los clones: pTPepGFP Δ CP1, 2, 3 y 4. Por último los fragmentos fueron situadas bajo el control del promotor 35S en pBIN61, entre las dianas *Bam*H I y *Xma* I dando lugar a los clones pBPepGFP Δ CP1, 2, 3 y 4.

3.3. Construcción pT7PepGFP Δ CP1

Para la generación de la construcción pT7PepGFP Δ CP1 se insertó la secuencia del promotor T7 en el extremo 5' clon pTPepGFP Δ CP1, obtenido en el apartado anterior.

3.4. Construcción pBINCPep

La construcción pBINCPep se empleará para cotransformar (cotransfectar) plantas junto con otras construcciones que carecen de la secuencia que codifica para la proteína CP de PepMV. Se obtuvo a partir de la amplificación del ORF de la CP del plásmido pTPepXL6 con los iniciadores CE-356, complementario al extremo 5' de la CP, y un oligo d(T) (Tabla 4). El fragmento obtenido fue clonado en pBIN61 previamente digerido con *Sma* I que permite la ligación de extremos romos.

La amplificación de la CP se llevó a cabo por PCR. Se utilizaron 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,5 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. La mezcla se sometió a los siguientes ciclos de PCR: un ciclo durante 2 min a 94°C, 20 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de hibridación a 40°C y 2 min de polimerización a 72°C. Al final de los 20 ciclos se dio un tiempo de elongación de 5 min a 72°C.

Tabla 4. Iniciadores empleados para generación del clon pBINCPep.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-356	SEQ ID NO: 17	58
Oligo d(T)	SEQ ID NO: 18	40

3.5. Construcciones PepMV:GFP: pBPep501 y pBPep5.128

Fueron generadas dos construcciones de PepMV portadoras del gen *GFP*: pBPep501 y pBPep5.128. La estrategia utilizada en los dos casos fue básicamente la misma que para la generación de las construcciones pBPepGFP Δ CP, es decir a través de PCRs solapantes y posterior subclonaje en pTPepXL6. Para la generación de la construcción pBPep501 (FIG. 3) se tomaron como moldes en la PCR1 el plásmido pTPepGFP Δ CP1 con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-502 (Tabla 5) y en la PCR2 el plásmido pTPepXL6 con la combinación de iniciadores CE-501 (Tabla 5) y CE-43 (Tabla 1).

Para la generación de la construcción pBPep5.128 (FIG. 4) se tomaron como moldes en la PCR1, el plásmido pTPepXL6 con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-503 (Tabla 5) y en la PCR2 el plásmido pTPepGFPΔCP1 con la combinación de iniciadores CE-504 (Tabla 5) y CE-43.

Tabla 5. Iniciadores empleados para generación de los mutantes Pep501 y Pep5.128.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-501	SEQ ID NO: 19	56
CE-502	SEQ ID NO: 20	56
CE-503	SEQ ID NO: 21	58
CE-504	SEQ ID NO: 22	58

Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,4 μM de los iniciadores, 200 μM de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μl. Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las utilizadas en la generación de la construcción pT7PepXL6agg ajustando las condiciones de temperatura de hibridación y tiempos de polimerización a la Tm de los iniciadores utilizados y el fragmento amplificado en cada caso.

3.6. Construcción pBPepGFPΔCPCh2

El fragmento PepGFPΔCPCh2 fue el resultado de la sustitución de la secuencia seleccionada como SGP (*Subgenomic Promoter*) de la CP de PepMV-Sp13 (es decir, SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 de la presente invención) por la secuencia homóloga PepMV-Ch2 (PeMU08/44), que tiene más de un 80% de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2. Para ello se siguieron los pasos que se detallan a continuación y se muestran en la FIG. 5:

1º) Amplificación del homólogo de SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 perteneciente a PepMV-Ch2 con la pareja de iniciadores CE-497 (incluye una secuencia adicional de 17 nt complementarios al extremo 3' del ORF 4 de PepMV-Sp13) y CE-498 (incluye una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 5' del ORF de la GFP). Como molde de la reacción se utilizó el plásmido PeMU08/44.

2º) Amplificación del ORF de la GFP con los iniciadores CE-499 (incluye secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 3' de la secuencia homóloga de SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 perteneciente a PepMV-Ch2) y CE-43. Como molde de la reacción se utilizó el plásmido pTPepGFPΔCP1.

3º) PCR solapante de los fragmentos 1 y 2 obtenidos en los pasos anteriores utilizando la pareja de iniciadores CE-497 y CE-43.

4º) Amplificación de parte del TGB de PepMV-Sp13 con los iniciadores Pep303 y CE-500 (incluye una secuencia adicional de 16 nt complementarios al extremo 5' de la secuencia homóloga de SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 perteneciente a PepMV-Ch2).

5º) PCR solapante de los fragmentos obtenidos en los pasos 3 y 4 utilizando la pareja de iniciadores Pep303 y CE-43.

6º) Clonaje de la PCR resultado del paso 5 en pTOPOblunt.

7º) Subclonaje a pTPepXL6 entre las dianas *Xmn* I y *Xho* I, dando lugar a la construcción pTPepGFPΔCP1.

8º) Subclonaje a pBIN61 entre las dianas *Bam*H I y *Xma* I.

Tabla 6. Iniciadores empleados para generación de la construcción PepGFPΔCPCh2.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-497	SEQ ID NO: 23	58

CE-498	SEQ ID NO: 24	57
CE-499	SEQ ID NO: 25	57
CE-500	SEQ ID NO: 26	58

4. Aislamiento e inoculación de protoplastos de *N. benthamiana*.

El protocolo de aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana* que se utilizó es una adaptación del protocolo descrito en *Plant Virology Protocols*, (Weston y Turner, 1998. *Methods in Molecular Biology*. Edited by G. D. Foster y S. C. Taylor. Totowa, NJ: Humana Press, 81: 301-305). Para el aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana* se partió de plantas de 5 semanas de edad cultivadas en fitotrón con un fotoperiodo de 16 h de luz a 25°C y 8 h de oscuridad a 18°C. Las hojas totalmente expandidas se esterilizaron superficialmente por inmersión, durante 30 min, en una solución de hipoclorito sódico al 10% a la que se le añadieron 2-3 gotas de Tween-20. La solución desinfectante se eliminó mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 min respectivamente) con agua destilada estéril. Los procesos de desinfección y lavado se realizaron bajo una suave y discontinua agitación manual. Una vez desinfectadas, se realizaron cortes transversales desde el nervio central hacia el borde de la hoja, dejando una distancia aproximada entre cortes de 1-2 mm. Las hojas cortadas fueron colocadas (haz hacia arriba) en placas Petri grandes (15 cm de diámetro), conteniendo 25 ml de tampón MMC (13% Manitol, 5mM MES y 10 mM CaCl₂, pH 5,8) y se mantuvieron así 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó el tampón MMC y se añadieron 25 ml de solución enzimática por placa. La solución enzimática consistió en 0,5 g *Onozuka Cellulase R-10* (*Yakult Honsha*), 0,25 g *Macerozime R-10* (*Duchefa Biochemies*), y 100 ml tampón MMC, a pH 5,8. La esterilización del medio enzimático se realizó por filtración a través de filtros de 45 µm de tamaño de poro (*Millipore Corporation*, Bedford,

Madison, USA). Las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron en oscuridad a 25°C toda la noche. Finalizada la digestión, la suspensión cruda de protoplastos fue retirada de las placas con cuidado de no coger restos vegetales, y se distribuyó en tubos falcon de 50 ml. Se centrifugaron a 1.000 rpm durante 4 min a 20°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el precipitado en 15 ml de tampón MMC. La suspensión de protoplastos fue centrifugada de nuevo a 1.000 rpm durante 4 min a 20°C. El precipitado resultante fue resuspendido en 6 ml de tampón MMC y situado sobre un colchón de sacarosa (tubo falcon de 15 ml el cual contenía 7 ml de sacarosa al 20,5%). Tras una centrifugación a 1.500 rpm durante 15 min, el anillo de protoplastos formado en la interfase se recogió con una pipeta Pasteur, se resuspendió en 50 ml de tampón de electroporación frío (150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0,4 M Manitol y 10 mM Hepes, pH 5,8) y se procedió al recuento. Se centrifugaron a 1.000 rpm durante 4 min y el precipitado se resuspendió de modo que contuviese 1x10⁶ protoplastos/ 500 µl de tampón de electroporación. Se repartieron en tubos eppendorf y se mantuvieron en hielo.

Los protoplastos fueron inoculados con ARN transcrito mediante electroporación. Para ello, se mezclaron 5 y/o 10 µg de ARN transcrito con 1x10⁶ de protoplastos. La electroporación se llevó a cabo en el *Gene pulser II y capacitance extender* (Bio-Rad laboratories, CA, USA) a 1.000 µF, 180 V y 100 Ω. Tras la electroporación, los protoplastos se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 ml, se dejaron en hielo durante 20 min y se centrifugaron a 70 g, 5 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 1,5 ml de medio de cultivo Aoki y Takebe (13% Manitol, 5 mM MES y 10x Sales Aoki y Takebe: 2mM KH₂PO₄, 10mM KNO₃, 10mM MgSO₄, 10 µM KI, 1µM CuSO₄, 100mM CaCl₂) y se sembraron en placas de Petri con un diámetro de 2,5 cm que previamente se habían recubierto con una solución que contenía 1% de agarosa, 13% de manitol y 1% de sacarosa. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C. Finalizada la incubación se recogieron los protoplastos y se centrifugaron a 70 g, 5 min a 4°C. El pellet resultante fue congelado inmediatamente con Nitrógeno líquido y se procedió a la extracción de ARN.

5. Ensayos de Agroinfiltración

5.1. Transformación de *Agrobacterium*

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1 y plásmido de virulencia pCH32) se transformaron por electroporación con el vector correspondiente en cada caso (portando alguna de las secuencias descritas en la presente invención). Las electroporaciones se llevaron a cabo en el electroporador *Gene pulser II y capacitance extender*, en cubetas enfriadas en hielo y de acuerdo con las instrucciones del fabricante (25 μ F de capacitancia, 400 Ω de resistencia, 2500 V). Se añadieron 0,5 μ l de plásmido a 20 μ l de células electrocompetentes de *Agrobacterium*. Después de la electroporación, las células se transfirieron a 1 ml de medio LB y se cultivaron durante 3 h a 28°C con agitación suave (80 rpm) para permitir que las células expresaran los genes de resistencia a los antibióticos. Se sembraron en placas de Petri con medio LB-Agar que contenían los antibióticos correspondientes y se cultivaron a 28°C durante 48 h.

5.2. Agroinfiltración.

La agroinfiltración consiste en una transformación (o transfección) de hojas de *N. benthamiana* mediante infiltración de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas según el apartado anterior. Las colonias aisladas de *Agrobacterium* transformadas se inocularon en 3 ml de medio LB con los antibióticos tetraciclina (5 ng/ml) y kanamicina (50 ng/ml) y fueron incubadas a 28°C durante la noche con agitación enérgica (150 rpm). Las células se precipitaron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6 en la solución de agroinfiltración (MgCl₂ 10 mM; MES 10 mM pH 5,6 y acetosiringona 150 μ M [Sigma]). Los cultivos se incubaron durante un mínimo de 2 h a temperatura ambiente antes de la agroinfiltración. En las co-infiltraciones de las construcciones de los mutantes de PepMV en

presencia de CP, se mezclaron volúmenes iguales de ambos cultivos antes de la agroinfiltración.

Las agroinfiltraciones se realizaron sobre el envés de hojas de *N. benthamiana* (de unos 25 días aproximadamente) con la ayuda de una jeringuilla de 1 ml.

6. Extracción de ARN total de hojas y de protoplastos de *N. benthamiana*

Para la preparación de ARN total de hoja se partió de 0,1 g de tejido vegetal fresco. El tejido fue triturado con nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1,5 ml y se homogeneizó con 1 ml de TRI-reagent (Sigma). En el caso de las preparaciones a partir de protoplastos, el pellet resultante fue homogeneizado con 0,25 ml de TRI-reagent. En ambos casos las preparaciones de ARN total se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. Detección del ARN viral de PepMV

7.1. Síntesis de sondas

Las sondas utilizadas para detectar el ARN de PepMV se obtuvieron por transcripción *in vitro* del ADN insertado en los plásmidos pGPepORF1+ y pGPepCP0.3. El plásmido pGPepORF1+ lleva inserto un fragmento de 3.500 pb correspondiente a una región del gen de la replicasa viral del genoma del virus. El plásmido pGPepCP0.3 lleva un inserto 850 pb complementario a parte del TGB y parte de la CP.

La sonda utilizada para la detección de GFP se obtuvo a partir del plásmido pG208GFP (Baulcombe et al., 1995. Plant J, 7: 1045-1053). Este plásmido lleva inserto un fragmento complementario al gen GFP10 y a la CP de PVX.

Para preparar las sondas, se emplean técnicas conocidas en el estado de la técnica que emplean DIG-11-UTP para marcar las secuencias aisladas.

7.2. Análisis por *dot blot* y *tissue-print*

El análisis de las muestras por *tissue-print* se efectuó sobre improntas de peciolo de hoja y el análisis por *dot-blot* sobre extractos de ARN total, ambos en membranas de nailon cargadas positivamente (Roche). El proceso de hibridación y detección por quimioluminiscencia se llevó a cabo esencialmente siguiendo el protocolo propuesto por Roche (*RNA labeling and detection kit*): tras la fijación de los ácidos nucleicos con luz ultravioleta (CL-1000 "Ultraviolet Crosslinker" UPV) se prehibridó la membrana durante dos horas en tampón estándar a 68°C y se hibridó durante toda la noche a 68°C con la sonda en este mismo tampón, al que se le añadió la sonda. Tras la hibridación las membranas se lavaron una vez con 2XSSC, 0,1%SDS durante 5 min a temperatura ambiente y dos veces con 1XSSC, 0,1% SDS, durante 15 min a 68°C. Seguidamente se realizó el proceso de detección a temperatura ambiente y con agitación suave: se enjuagó durante 5 min la membrana en solución de lavado (0,1 M ácido maléico, 0,15 M NaCl, pH 7,5 y 0,3% tween 20 v/v) 15 min en solución I (0,1 M ácido maléico, 0,15 M NaCl, pH 7,5), 30 min en solución II (solución I más 1% agente bloqueante), 30 min en solución II más el anticuerpo de la DIG conjugado con la fosfatasa alcalina (PA) a la dilución recomendada, y 2x15 min en solución de lavado. Finalmente se equilibró la membrana durante 5 min en solución III (0,1 M Tris-HCl, 0,1 NaCl, pH 9,5), se añadió el sustrato luminiscente de la PA (CSPD, Roche, dilución 1:100 en solución III) y se incubó en oscuridad 5 min. La luz emitida impresionó películas para rayos X (Roche) que se revelaron según métodos convencionales.

7.3. Análisis por Northern blot

Para el análisis por Northern blot se desnaturalizaron 5 µg de ARN total durante 4 min a 65°C en el volumen correspondiente del tampón de carga 5X (bromofenol, EDTA, formaldehído, glicerol, FA y agua estéril), después se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser cargadas en el gel. Las muestras desnaturalizadas se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón que contenía HEPES 20 mM, EDTA 1 mM pH

8,0 y formaldehído al 6%. La electroforesis se realizó a 30 V durante 4 h aproximadamente. Tras la electroforesis, los ARNs se transfirieron a una membrana de nailon⁺, se fijaron mediante luz ultravioleta y se hibridaron con sondas de ARN marcadas con DIG según se describe en el apartado anterior.

8. Análisis de secuencias

El análisis y la alineación de las secuencias se llevó a cabo utilizando los programas ClustalXW disponible en www.ebi.ac.uk/clustlw (Thompson et al., 1997. *Nucl Acids Res*, 25: 4876-4882) y Bioedit v.7.0 disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>. A partir de los alineamientos se calcularon los porcentajes de similitudes nucleotídicas con ClustalXW.

9. Visualización de la GFP

La fluorescencia emitida por la GFP en las hojas de *N. benthamiana* se visualizó con una lámpara de ultravioleta 100 W Handheld long-wave (UV products, Upland, CA 91786, Black Ray model B 100AP) y con un microscopio láser confocal invertido Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Alemania).

EJEMPLO 1. Obtención de un clon “agroinfectivo” de PepMV

Para el desarrollo de un clon infectivo de PepMV se planteó una estrategia basada en los siguientes pasos: 1) obtención de ADNc que cubriese la longitud completa del genoma del virus, 2) clonación de los ADNc en un vector intermediario (pTOPO-XL) y 3) subclonación en un vector binario (pBIN61) de modo que el ADNc quedase bajo el control del promotor 35S (hay que indicar que dentro del citado ADNc se encuentran las secuencias reguladores de la expresión génica SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2). Este vector binario permite la síntesis del ARN viral *in vivo*.

En base a la secuencia del aislado PepMV-Sp13 se diseñaron los iniciadores CE-42 y CE-43 (Tabla 1). Estos iniciadores incluían dianas

Bam HI y *Xma* I para los extremos 5' y 3', respectivamente, de forma que los ADNc obtenidos pudiesen ser clonados direccionalmente en pBIN61. Utilizando estos iniciadores en experimentos de RT-PCR sobre un extracto de ARN total de una planta de *N. benthamiana* infectada, se obtuvieron ADNc correspondientes a la longitud total del ARN genómico (ARNg) de PepMV-Sp13 (6,4 Kb). Además del fragmento de ADN del tamaño esperado, en la RT-PCR se generaron otros fragmentos de menor tamaño, posiblemente producto de iniciación inespecífica de los iniciadores (FIG. 6).

El fragmento de ADN de 6,4 Kb fue purificado, ligado y clonado en *E. coli* en el plásmido pTOPO-XL como se describe en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Se decidió seguir adelante con tres clones resultantes de la ligación, ya que, a pesar de utilizar polimerasas de alta fidelidad en la amplificación y un número de ciclos bajo, podrían introducirse mutaciones deletéreas que se individualizarían en cada clon independiente. Los clones generados fueron pTPepXL6, pTPepXL7 y pTPepXL9. A continuación, el fragmento de ADN de 6,4 Kb fue subclonado en pBIN61 entre las dianas *Bam* HI y *Xma* I. De nuevo se seleccionaron tres clones para cada uno de los clones de partida dando lugar a nueve clones: pBPepXL6.1, pBPepXL6.2, pBPepXL6.3, pBPepXL7.7, pBPepXL7.8, pBPepXL7.9, pBPepXL9.1, pBPepXL9.2 y pBPepXL9.3.

Se transformó *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones en pBIN61, y los cultivos líquidos de las cepas resultantes se infiltraron en plantas de *N. benthamiana*. Tras 5 días post-agroinoculación (dpi) se observaron síntomas en el 100% de las plantas agroinfiltradas con los clones pBPepXL6 (1 a 3) y pBPepXL9 (1 a 3). Las plantas agroinfiltradas con los clones pBPepXL7 (1 a 3) mostraron síntomas a los 7 dpi. Los síntomas fueron similares a los típicamente inducidos por PepMV-Sp13.

Para verificar la presencia de virus en las plantas agroinoculadas se realizó un ensayo de hibridación (FIG. 7). El análisis se realizó en improntas de secciones de pecíolos de hojas agroinoculadas y de hojas no

inoculadas a 5 dpi. El resultado de la hibridación fue, como cabía esperar, positivo para todas las plantas, por lo que se pudo deducir que los clones eran efectivamente infectivos.

De los clones obtenidos se optó por el pBPepXL6.3 (a partir de ahora pBPepXL6) para trabajar en posteriores ensayos. La secuenciación parcial de este clon reveló la existencia de mutaciones que provocaban cambios de aminoácidos y mutaciones silenciosas con respecto a la secuencia publicada de PepMV-Sp13. Se detectaron un total de 4 mutaciones, de las cuales sólo una, situada en el gen *TGB3*, da lugar a un cambio de aminoácido. Sin embargo, éstas parecieron no afectar a la infectividad del clon.

EJEMPLO 2. Estudio de la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV

Puesto que la construcción de un vector viral basado en PepMV podía afectar a la expresión del gen CP (ver más adelante), previamente se decidió realizar un estudio sobre la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV.

Para llevar a cabo este estudio se diseñaron a partir del clon agroinfectivo de PepMV construcciones que alteraran la expresión de la CP. Se introdujeron dos tipos de modificaciones. Por un lado, se introdujo una mutación puntual en el supuesto codón de inicio del ORF de la CP, cambiándolo de ATG a AGG (Fig. 8, B). Muy posiblemente esta mutación anule la iniciación de la traducción de la CP ya que los siguientes codones ATG del ORF de la CP de PepMV no se encuentran en un contexto favorable para el inicio de su traducción. Por otro lado, se sustituyó parte del ORF de la CP por el ORF completo de la GFP, situándolo a 36 nt del codón de inicio de la CP y en la misma pauta de lectura (Fig. 8, C). El efecto de las modificaciones realizadas fue evaluado en protoplastos de *N. benthamiana* y mediante ensayos de agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. Con el primer tipo de ensayos pretendíamos determinar efectos en células únicas directamente inoculadas, y con el segundo tipo

de ensayos pretendíamos analizar también posibles efectos de las mutaciones en el movimiento célula a célula y a larga distancia del virus.

EJEMPLO 3. Efecto de la CP sobre la multiplicación de ARN viral en protoplastos de *N. benthamiana*

Para estudiar el efecto de las mutaciones en células aisladas, se generaron los clones pT7PepXL6agg (PepXL6agg), pT7PepGFP Δ CP1 (PepGFP Δ CP1) y pT7PepXL6 (PepXL6, clon infectivo), de modo que cada una de las construcciones de ADN quedase situada bajo el control del promotor de transcripción T7.

En primer lugar se estudió el comportamiento de PepXL6agg. Para ello, se inocularon protoplastos de *N. benthamiana* por electroporación con ARNs transcritos sintetizados *in vitro* a partir de pT7PepXL6agg y pT7PepXL6. Transcurridas 24 h post-inoculación se realizaron extracciones de ARN total.

El análisis por Northern blot de las muestras obtenidas mostró una diferencia notable de acumulación de ARN viral entre los extractos de ARN total procedentes de protoplastos inoculados con ARN de PepXL6 y los inoculados con ARN de PepXL6agg (FIG. 9). Estos resultados, que se repitieron consistentemente en tres experimentos independientes, indicaban que la modificación introducida en PepXL6agg provoca una reducción de los niveles de acumulación de ARN viral en células inoculadas. Esta reducción podría deberse a una implicación directa o indirecta de la CP en la multiplicación a nivel unicelular de PepMV, pero también podrían ser el resultado de la inestabilidad del ARN viral debida a la no traducibilidad del ORF de la CP. Para investigar este aspecto, se preparó y ensayó PepGFP Δ CP1 (FIG. 9).

En las muestras procedentes de extractos de ARN total de protoplastos inoculados con ARN de PepXL6 y PepGFP Δ CP1 (FIG. 9, calles 1 y 3, respectivamente) se detectaron niveles similares de ARN viral genómico (ARNg), significativamente superiores a los obtenidos con PepXL6agg

(FIG. 9, calle 2). Los resultados obtenidos indican que la CP no es necesaria para la multiplicación de PepMV a nivel unicelular y sugieren que la reducida acumulación de ARN viral de PepXL6agg se deba a la inestabilidad del ARN asociada con la no traducibilidad del ORF de la CP.

Este hecho permite la clonación de una secuencia nucleotídica P que codifica para una proteína funcional o no funcional, como por ejemplo una proteína reporter ya que, tal como se ha comentado, dicha proteína vírica CP no es necesaria para la multiplicación del virus. Tal como se describe en la presente invención, las secuencias SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2, situadas en la región aguas arriba del codón de inicio del gen *CP* y aguas abajo del mismo, se seleccionan para permitir la producción de proteínas codificadas por una secuencia nucleotídica cuya expresión es regulada por SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2.

EJEMPLO 4. Efecto de la CP sobre la multiplicación de ARN viral en tejido agroinfiltrado.

A continuación estudiamos el comportamiento de PepGFP Δ CP1 en tejido agroinfiltrado. Para ello, la misma construcción utilizada en el apartado anterior fue situada bajo el control del promotor 35S en pBIN61, dando lugar a pBPepGFP Δ CP1.

Esta construcción fue ensayada mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* totalmente expandidas. Como controles de la agroinfiltración se utilizaron los clones pBGFP (expresa el ORF de la GFP) y pBIN61 (control negativo). pBPepGFP Δ CP1 y pBGFP se co-agroinfiltraron con pB19 (p19), que expresa el ORF de la P19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), supresor del silenciamiento de ARN, para evitar el decaimiento de la expresión de la GFP tras varios días post-inoculación. Estas plantas fueron expuestas a luz UV mediante una lámpara de mano y observadas por microscopía láser confocal a 4, 6 y 10 dpi.

Bajo la lámpara UV ninguna de las plantas agroinfiltradas con

pBPepGFP Δ CP1 emitió fluorescencia verde, mientras que el control positivo pBGFP generó fluorescencia a 4 dpi. Sin embargo, la observación de las regiones agroinfiltradas con pBPepGFP Δ CP1 mediante microscopía láser confocal mostró la expresión de GFP en células aisladas a partir de 4 dpi (FIG. 10).

Al observar las imágenes de la figura, se puede apreciar cómo los focos de infección iniciados por PepGFP Δ CP1 permanecieron restringidos a una única célula o unas pocas transcurridos varios días post-infiltración. Se observó fluorescencia verde en células aisladas de la epidermis y en células del mesófilo (FIG. 10, paneles A y B, respectivamente). Con menor frecuencia aparecieron grupos de hasta tres células (FIG. 10, panel B); estos grupos no aumentaron de tamaño en ningún momento. Por otro lado, cabe resaltar el reducido número de células que expresaron GFP en un área determinada de tejido agroinfiltrado con pBPepGFP Δ CP1 (FIG. 10, panel C) en comparación con el elevado número de células (casi la totalidad) que expresaron fluorescencia en tejido agroinfiltrado con el clon pBGFP (FIG. 10, panel D). Estos resultados confirman que la CP no es necesaria para la multiplicación de PepMV en células inoculadas, pero sí para el movimiento célula a célula del virus. Además, estos resultados indican que es posible la expresión de un gen foráneo (*GFP*) a partir de las secuencias SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 del genoma de PepMV.

EJEMPLO 5. Suministro de la CP en *trans* mediante agroinfiltración

Los resultados anteriores mostraban la capacidad de PepGFP Δ CP1 de multiplicarse e iniciar focos de infección. En este apartado se describe la restauración del movimiento de PepGFP Δ CP1 mediante un nuevo ensayo de agroinfiltración en el que se aportó la CP en *trans* (por cotransformación).

Para llevar a cabo este ensayo se clonó el gen de la CP de PepMV bajo el control del promotor 35S en pBIN61 resultando la construcción pBINCPep. Se realizaron co-infiltraciones de pBPepGFP Δ CP1 más p19 en presencia y ausencia de la CP. Las hojas agroinfiltradas fueron observadas por

microscopía láser confocal y expuestas a luz UV mediante una lámpara de mano a 4, 6 y 10 dpi.

La aportación de la CP en *trans* mediante agroinfiltración restauró el movimiento del mutante PepGFP Δ CP1 de un modo muy eficiente. Transcurridos 4 dpi en las regiones agroinfiltradas en presencia de CP, se detectaron focos de infección formados por grupos de alrededor de 4-9 células. También a 4 dpi se observaron otros focos en los que la infección permaneció restringida a una o tres células. A 6 dpi, los focos de infección aumentaron de tamaño pudiendo distinguirse grupos de células de diferentes tamaños. Finalmente a 10 dpi, casi la totalidad de los focos estaban formados por grupos de más de 20 células, visibles bajo luz UV. En las regiones agroinfiltradas en ausencia de CP los focos de infección permanecieron restringidos a una única célula, transcurridos 10 dpi.

Estos resultados indicaron que es posible restaurar el movimiento de mutantes de PepMV aportando la CP en *trans*. Además, estos resultados confirmaron que el número de focos iniciales de infección a que da lugar la agroinfiltración de clones derivados de PepMV es pequeño.

El análisis por Northern blot de extractos de ARN total de las regiones agroinfiltradas en ausencia y presencia de CP confirmó la restauración del movimiento de los mutantes mediante la aportación de la CP en *trans*.

EJEMPLO 6. Efecto de modificaciones en las regiones 5' y 3' terminales del ORF de GFP de PepGFP Δ CP1 sobre el número de focos de infección visibles tras agroinfiltración

En este apartado estudiamos si modificaciones en las regiones 5' y 3' terminales del gen CP podrían afectar a la eficiencia de un vector viral derivado de PepMV tras agroinfiltración.

Para llevar a cabo el experimento se diseñaron específicamente tres construcciones basadas en pBPepGFP Δ CP1, las cuales incluían

diferentes tipos de mutaciones (Fig. 11). Se estableció como parámetro de medida de eficiencia el número de células que expresan GFP tras agroinfiltración de los clones, asumiendo que éste es equivalente al número de focos de infección que se pueden iniciar tras agroinoculación.

Las construcciones fueron clonadas bajo el control del promotor 35S en pBIN61 resultando los clones: pBPepGFP Δ CP1, pBPepGFP Δ CP2, pBPepGFP Δ CP3 y pBPepGFP Δ CP4 (Fig. 11). En pBPepGFP Δ CP1, se introdujo el ORF de la GFP (con el codón de inicio modificado de ATG a AGG) en fase con el ORF de la CP, a 36 nt de codón de inicio de la CP, de modo que la región aguas arriba de la GFP quedase sin modificar y la GFP se expresase como una proteína de fusión que contendría los 12 aminoácidos amino-terminales de la CP. En pBPepGFP Δ CP2, se modificó el codón de inicio de la CP de ATG a AGG y se introdujo el ORF de la GFP (con su propio ATG) a 38 nt del codón de inicio de la CP (además contiene justo aguas arriba del codón de inicio de la GFP una diana *Sac* II: CCGCGG). pBPepGFP Δ CP3 y pBPepGFP Δ CP4 son idénticas a pBPepGFP Δ CP1 y pBPepGFP Δ CP2, respectivamente, pero incluyen 120 nt del extremo 3' del ORF de la CP a continuación del ORF de la GFP. Estos 120 nt no se deberían expresar puesto que el codón de terminación de la GFP se mantuvo. El resultado de la secuenciación de las regiones modificadas confirmó la existencia de las mutaciones deseadas.

Se realizaron agroinfiltraciones en hojas de *N. benthamiana* con cada una de las construcciones en presencia y ausencia de la CP. Para poder comparar el efecto de las mutaciones dentro de un mismo contexto y evitar la posible influencia de factores externos, las diferentes combinaciones de clones fueron comparadas dentro de una misma hoja (FIG. 12). Todos los tratamientos fueron co-infiltrados en presencia de p19.

Para estimar el número de focos de infección iniciados con cada mutante de PepMV se tomaron discos de hojas de 0,5 cm² de las regiones agroinfiltradas a 6 y a 10 dpi. La observación de los discos al microscopio confocal permitió contar el número de células aisladas que expresaban GFP dentro de cada disco.

Los valores obtenidos relativos al número de focos de infección iniciados

con cada uno de los mutantes se encuentran representados gráficamente en la FIG. 13. Como puede observarse en dicha figura, se encontraron diferencias significativas entre ellos, prevaleciendo PepGFP Δ CP1 por iniciar un mayor número de focos de infección. Cabe resaltar diferencias significativas como las encontradas entre PepGFP Δ CP1 y PepGFP Δ CP2, pues difieren en muy pocos nucleótidos (ver FIG. 11). Además, también destaca, a 6 dpi, el retraso en la iniciación de focos de infección observado con PepGFP Δ CP3 y PepGFP Δ CP4 en comparación con los otros dos mutantes. Estos resultados indican que las modificaciones introducidas en PepGFP Δ CP1 pueden dar lugar a diferencias significativas en el número de focos de infección iniciados y el tiempo requerido para establecerlos tras agroinfiltración.

A continuación se realizó un experimento de agroinfiltración con las diferentes construcciones generadas a las que se les añadió la construcción pBINCPep (expresa la CP de PepMV). Los resultados obtenidos de la complementación en *trans* del movimiento célula a célula de los mutantes que no expresan la CP se muestran en la FIG. 14.

Todos los mutantes generaron focos de infección visibles bajo luz UV a 6 dpi (FIG. 14, panel A), siendo el tamaño de los focos similar en todos los casos. A 6 dpi, también puede apreciarse como PepGFP Δ CP1 y PepGFP Δ CP2 iniciaron más focos de infección que PepGFP Δ CP3 y PepGFP Δ CP4, como ocurrió en el ensayo anterior. Destaca la región agroinfiltrada con PepGFP Δ CP1 (FIG. 14, panel B) por presentar mayor número de focos de infección tanto a 6 como a 10 dpi (donde casi la totalidad del tejido agroinfiltrado emite fluorescencia verde) en comparación con el resto de construcciones. Los resultados obtenidos con este ensayo de complementación son consistentes con los obtenidos en el ensayo anterior e indican que la alteración de las regiones 5' y 3' terminales del ORF de la GFP de PepGFP Δ CP1 afecta el número de focos de infección visibles tras agroinfiltración. Por tanto, la modificación de estas regiones podría afectar a la eficiencia de un vector viral basado en PepMV.

EJEMPLO 7. Diseño de un vector viral (vector de la invención)

derivado de PepMV

Con la información obtenida en apartados anteriores se manipuló el clon agroinfectivo de PepMV para insertarle el gen *GFP*. Como estrategia para expresar el nuevo ORF se decidió duplicar la secuencia reguladora de la expresión génica del ARN del gen *CP* de PepMV, es decir, las secuencias SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 (SGP y SGPd) (FIG. 15).

7.1. Predicción de la secuencia reguladora de la expresión génica (promotor subgenómico; SGP) del gen *CP* de PepMV

Se ha demostrado para algunos potexvirus que las secuencias reguladoras de la expresión génica contienen una secuencia de 8 nt altamente conservada (5'-GTTAAGTTT-3'), la cual se ha demostrado que es indispensable para su actividad. En el caso de PepMV, las regiones que actúan como promotoras de los sgARNs (codificados por TGBs y CP) se desconocen. Sin embargo, los resultados obtenidos en apartados anteriores muestran la posibilidad de expresar el ORF de la GFP situándolo a 36 nt aguas abajo del codón de inicio del ORF de la CP. Así, el extremo 3' de la secuencia reguladora de la expresión génica se delimitó a la distancia de 36 nt, quedando por delimitar el extremo 5'.

El alineamiento de las secuencias reguladoras de la expresión génica de la CP de diferentes potexvirus junto con la secuencia aguas arriba del codón de inicio de la CP de PepMV mostró que para este último también se encuentra conservado el motivo de 8 nt mencionado más arriba.

Por otro lado, a menudo dentro de las secuencias reguladoras de la expresión génica se encuentran estructuras tipo tallo-bucle (*Stem Loop*; SL) que facilitan la interacción con la transcriptasa. Generalmente la combinación de la secuencia primaria y la estructura secundaria es requerida para la transcripción *in vivo*. Así pues, se realizó una predicción de la estructura secundaria de una secuencia que abarcaba un total de 150 nt, 114 nt aguas arriba del primer ATG del ORF de la CP y 36 nt aguas abajo. Un análisis de esta posible estructura secundaria mostró la

posible existencia de tres SLs dentro de la región analizada. El SL1, se encuentra aguas arriba de la secuencia conservada y los SL2 y 3 aguas abajo, situándose este último 8 nt aguas arriba del ATG de la de la CP. En base a los análisis anteriores, finalmente fue seleccionada como región candidata a contener una secuencia reguladora de la expresión génica eficaz, una región de 111 nt (SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2): 37 nt del extremo 3' del ORF4 más 38 nt de la región UTR más 36 nt del inicio de la CP. La región seleccionada contiene el motivo de 8 nt conservado y los SL 2 y 3 presentes hasta el codón de inicio de la CP más 36 nt de la secuencia nucleotídica que codifica para dicha proteína.

7.2. Generación de clones PepMV:GFP. Expresión de la GFP a través de la duplicación de la secuencia reguladora de la expresión génica del gen CP

Como se ha descrito en un ejemplo anterior, la estrategia seleccionada para la expresión del ORF de la GFP fue a través de la duplicación de la supuesta secuencia reguladora de la expresión génica de la CP. Se diseñaron dos versiones diferentes de un posible vector viral (FIG. 16).

La estrategia utilizada para el desarrollo de las construcciones fue a través de PCRs solapantes (ver apartado correspondiente de materiales y métodos). Como moldes de la reacción se utilizaron ADNs procedentes del clon agroinfectivo (pBPepXL6) y de la construcción pBPepGFP Δ CP1. De este modo se obtuvieron dos nuevas construcciones (FIG. 16): (1) pBPep501 (Pep501), en la que el ORF de la GFP se encuentra aguas arriba del ORF de la CP y (2) pBPep5.128 (Pep5.128) en la que el ORF de la GFP se encuentra aguas abajo del ORF de la CP (en el extremo 3' del genoma). En ambos casos los ORFs de la GFP y la CP van fusionados a la secuencia reguladora de la expresión génica SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 (en la FIG. 16 se denomina SGP). Dichas construcciones fueron clonadas bajo el control del promotor 35S en pBIN61.

Las construcciones fueron agroinfiltradas en hojas de *N. benthamiana* en presencia de p19. A partir de 3 dpi las plantas agroinfiltradas fueron

expuestas a luz UV para realizar el seguimiento de la infección.

A 3 dpi, la observación de algunas de las hojas agroinfiltradas mediante microscopía confocal desveló la existencia de focos de infección formados en la mayoría de los casos por grupos de alrededor de 4-9 células, no visibles bajo lámpara de luz UV. Ninguna de las plantas mostró síntomas de infección típicos de PepMV transcurridos 10 dpi mientras que las plantas agroinoculadas con el clon agroinfectivo mostraron síntomas transcurridos 5 dpi. No obstante, la iluminación con luz UV de las plantas completas mostró expresión de GFP tanto en hojas agroinfiltradas como en hojas no agroinfiltradas. Además, no se observaron diferencias entre las plantas agroinfiltradas con pBPep501 y pBPep5.128.

7.3. Selección y ensayo de una secuencia reguladora de la expresión génica heteróloga

Se decidió usar una secuencia reguladora de la expresión génica procedente de otro aislado de PepMV, PepMV-Ch2 (Ling, 2007. Virus Genes, 34: 1-8). PepMV-Ch2 reúne características que lo hacen un buen candidato a contener una secuencia reguladora de la expresión génica válida, entre ellas: (1) Presenta una homología de secuencia del 78% respecto de Sp13 y (2) al ser un aislado de PepMV, presumiblemente contenga elementos que actúan en *cis* conservados, necesarios para la expresión de sgARN de la CP.

Se estudió la secuencia completa de PepMV-Ch2 con el fin de localizar la región correspondiente a la secuencia reguladora de la expresión génica de la CP. Los análisis realizados desvelaron la existencia de una región conservada de 20 nt en el extremo 3' del ORF 4 (TGB3) entre los dos aislados. Esta región coincide con el inicio de la región seleccionada como la secuencia reguladora de la expresión génica de la CP de Sp13 y además contiene el motivo de 8 nt conservado entre potexvirus.

A continuación, se delimitaron los extremos 5' y 3' de la secuencia reguladora de la expresión génica heteróloga (dándole el mismo tamaño

que a la secuencia reguladora de la expresión génica de PepMV-Sp13) y se realizó un alineamiento de las secuencias. El resultado del alineamiento entre ambas regiones mostró porcentaje de identidad de las secuencia SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2 del 58,4 % entre PepMV-Sp13 y -Ch2. Cuando se comprobó el porcentaje de identidad de las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 por separado, se observó que la secuencia SEQ ID NO: 1 correspondiente a PepMV-Sp13 tenía un porcentaje de identidad de un 84 % respecto de la secuencia heteróloga correspondiente a PepMV-Ch2. Sin embargo, la secuencia SEQ ID NO: 2 correspondiente a PepMV-Sp13 tenía un porcentaje de identidad de un 48,78 % respecto de la secuencia heteróloga correspondiente a PepMV-Ch2.

Por tanto, se comprobó la posibilidad de usar la secuencia reguladora de la expresión génica procedente del aislado PepMV-Ch2 y su eficiencia para expresar el gen de la GFP desde el genoma de PepMV-Sp13. Para ello se diseñó una construcción de PepMV quimérica (PepGFP Δ CPCh2), basada esencialmente en el diseño de PepGFP Δ CP1, en la cual el ORF de la GFP se encuentra bajo el control de la secuencia reguladora de la expresión génica de Ch2.

Dicha construcción fue clonada bajo el control del promotor 35S en pBIN61 resultando el clon pBPepGFP Δ CPCh2.

Se realizaron ensayos de agroinfiltración con pBPepGFP Δ CPCh2 en plantas de *N. benthamiana*. Las agroinfiltraciones se realizaron en presencia de p19. Las regiones agroinfiltradas fueron observadas mediante microscopía confocal a 6 y a 10 dpi. La emisión de fluorescencia verde por parte de células de la epidermis a 4 dpi en los tejidos agroinfiltrados demostró la capacidad de PepGFP Δ CPCh2 de replicarse e iniciar focos de infección. Estos resultados indican que es posible la expresión de un gen foráneo desde el genoma de PepMV-Sp13 a partir del SGP de Ch2.

Una vez establecida la infectividad de PepGFP Δ CPCh2 se decidió estimar el número de focos de infección iniciados y realizar una comparación con

los datos obtenidos para la secuencia reguladora de la expresión génica de PepMV-Sp13. Para ello se tomaron discos de hojas de 0,5 cm² de las regiones agroinfiltradas a 6 dpi y a 10 dpi y se contó el número de células aisladas que expresaban GFP dentro de cada disco. La comparación de los resultados obtenidos con PepGFP Δ CPCh2 y los obtenidos en ensayos anteriores con PepGFP Δ CP1, 2, 3 y 4 se muestran en la FIG. 17.

El resultado del análisis estadístico mostró que a 6 dpi el número de focos de infección iniciados por PepGFP Δ CPCh2 fue significativamente menor que el número de focos iniciados por PepGFP Δ CP1. Sin embargo, a 10 dpi se observó cómo la diferencia entre PepGFP Δ CPCh2 y PepGFP Δ CP1 se redujo, situándose PepGFP Δ CPCh2 como el segundo mutante que mayor número de focos de infección iniciaba.

También se estudió el comportamiento de PepGFP Δ CPCh2 aportando la CP en *trans* mediante agroinfiltración comparando con la construcción PepGFP Δ CP1. Bajo luz UV, los resultados obtenidos con PepGFP Δ CPCh2 fueron similares a los obtenidos con PepGFP Δ CP1. En la FIG. 18 se muestra la comparación de los resultados obtenidos con las dos construcciones a 10 dpi.

En la FIG. 18 se puede apreciar como tanto el tamaño como la densidad de los focos de infección generados a los 10 dpi fue muy similar con las dos construcciones. Los resultados obtenidos indicaron que fue posible restaurar el movimiento del mutante quimérico PepGFP Δ CPCh2 de un modo eficiente. Estos resultados también indicaron que la sustitución de la secuencia reguladora de la expresión génica de PepMV-Sp13 por el de PepMV-Ch2 en PepGFP Δ CP1 no provoca diferencias significativas en el número de focos de infección iniciados ni en la eficiencia de la restauración del movimiento.

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que una secuencia reguladora de la expresión génica (SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 2) heteróloga podría ser utilizada en un vector viral derivado de PepMV.

REIVINDICACIONES

1. Secuencia nucleotídica aislada que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, implicada en la regulación de la expresión génica.
2. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 1.
3. Secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, unida por su extremo 3' al extremo de la secuencia SEQ ID NO: 2.
4. Secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, unida por su extremo 3' a una secuencia nucleotídica (MCS), donde MCS es reconocida por al menos una enzima de restricción única.
5. Secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, unida por su extremo 3' a una secuencia nucleotídica (P) que codifica para una proteína funcional o no funcional.
6. Secuencia según la reivindicación 5, donde la secuencia nucleotídica P codifica para una proteína funcional reporter.
7. Secuencia según la reivindicación 6, donde la proteína funcional reporter es GFP.
8. Secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, unida por su extremo 5' al extremo 3' de una secuencia nucleotídica que codifica para una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RpRd) y para una secuencia *triple gene block* (TGB) de un potexvirus (RpRd-TGB).
9. Secuencia según la reivindicación 8, donde la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia RpRd-TGB pertenece al virus PepMV.

10. Vector de expresión que comprende la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Vector de expresión según la reivindicación 10, donde dicho vector es binario.
12. Vector de expresión según la reivindicación 11, donde dicho vector binario se expresa en una bacteria.
13. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 forma parte de un ADNt.
14. Célula que comprende de forma transitoria o de forma estable:
 - a. la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 - o
 - b. el vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.
15. Célula según la reivindicación 14, que pertenece a una especie vegetal.
16. Polen que comprende la célula vegetal según la reivindicación 15.
17. Planta que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15.
18. Planta según la reivindicación 17 que pertenece al género *Solanum*.
19. Planta según la reivindicación 18 que pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.
20. Germoplasma de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.

21. Uso de la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la construcción de un vector de expresión.
22. Uso de la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o del vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la detección de al menos una planta del género *Solanum* resistente al virus PepMV.
23. Uso de la secuencia o del vector según la reivindicación 22, donde la planta es de la especie *Solanum lycopersicum*.
24. Uso de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, o de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, para la producción de una proteína funcional o no funcional.
25. Método para la producción de una proteína funcional o no funcional que comprende:
 - a. Seleccionar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, o la planta según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, y
 - b. cotransfectar, de forma simultánea o no, dicha célula o de dicha planta, con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína de la cápsida (CP) de un potexvirus.
26. Método según la reivindicación 25, donde el potexvirus es el virus PepMV.
27. Método para la obtención del vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 que comprende:
 - a. Seleccionar la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 - b. insertar la secuencia del apartado (a) en un vector de expresión capaz de replicarse en al menos un tipo de célula huésped, y

- c. seleccionar el vector obtenido según el apartado (b) que comprende dicha secuencia.

28. Método para la obtención de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, que comprende:

- a. Obtener una célula de una muestra biológica,
- b. transfectar la célula huésped aislada del apartado (a) con un vector que comprende la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y
- c. seleccionar la célula transfectada según el apartado (b) que comprende dicha secuencia.

29. Método para la detección de al menos una planta del género *Solanum*, resistente al virus PepMV, que comprende:

- a. seleccionar al menos una planta de una colección de líneas mutantes del género *Solanum*,
- b. inocular al menos una planta del apartado (a) con la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, o con el vector de expresión correspondiente según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, y
- c. seleccionar al menos una planta resistente al virus PepMV que no exprese la proteína funcional o no funcional.

30. Método según la reivindicación 29, donde la planta del género *Solanum* pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.

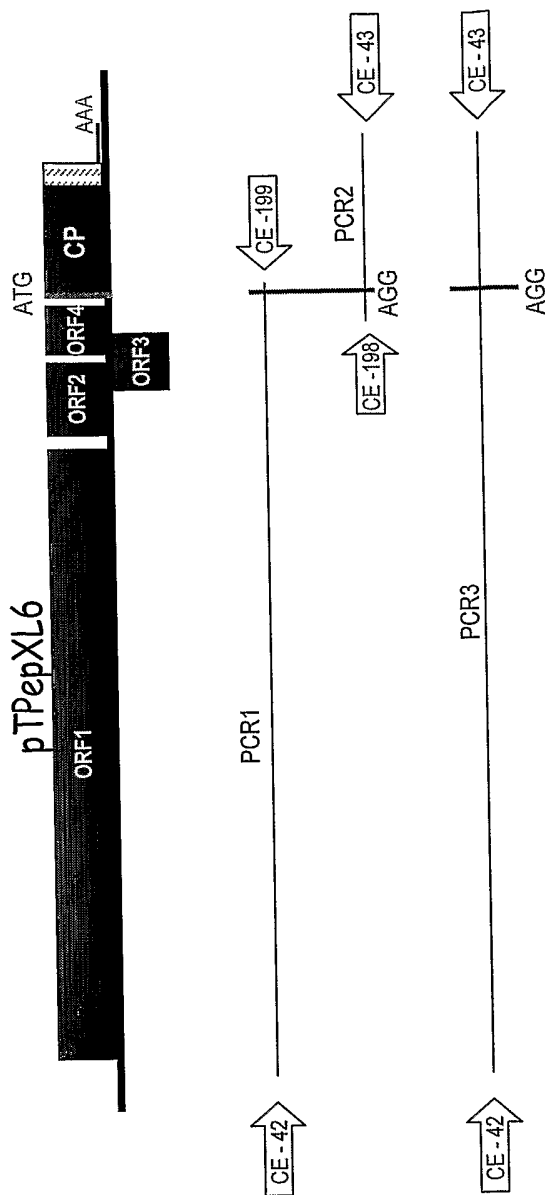


FIG. 1

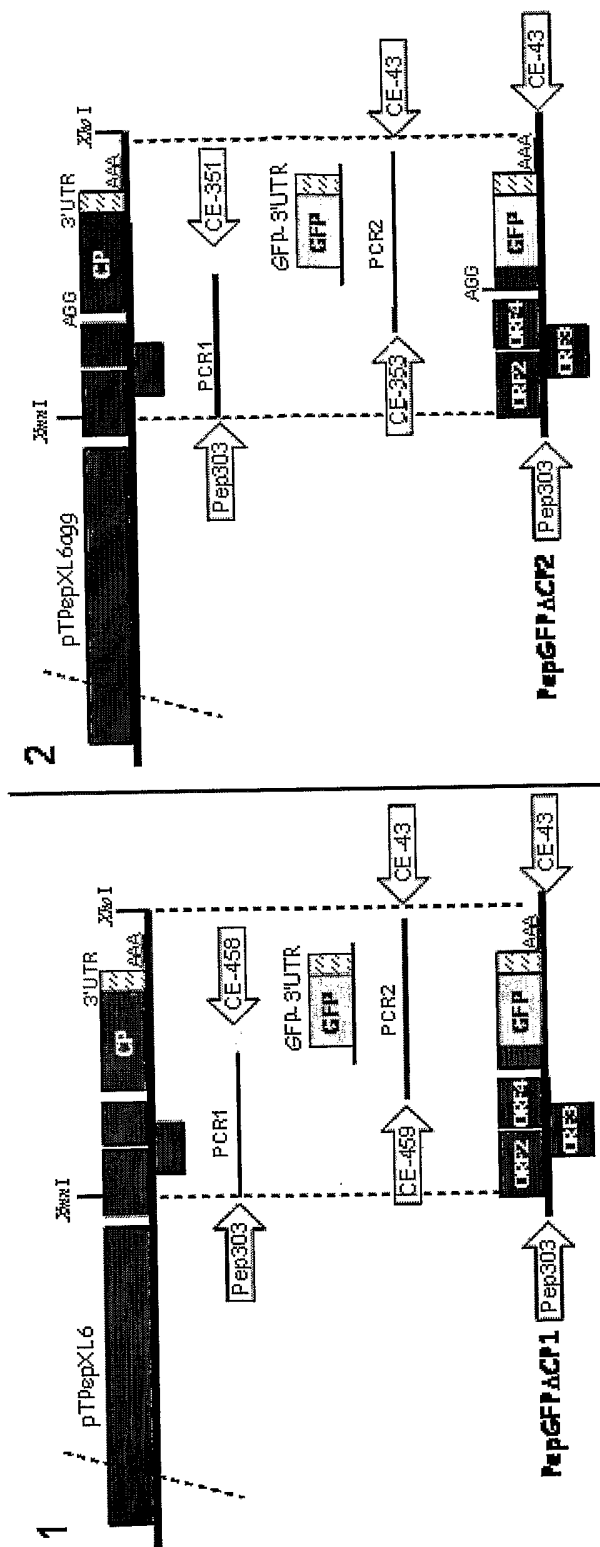


FIG. 2

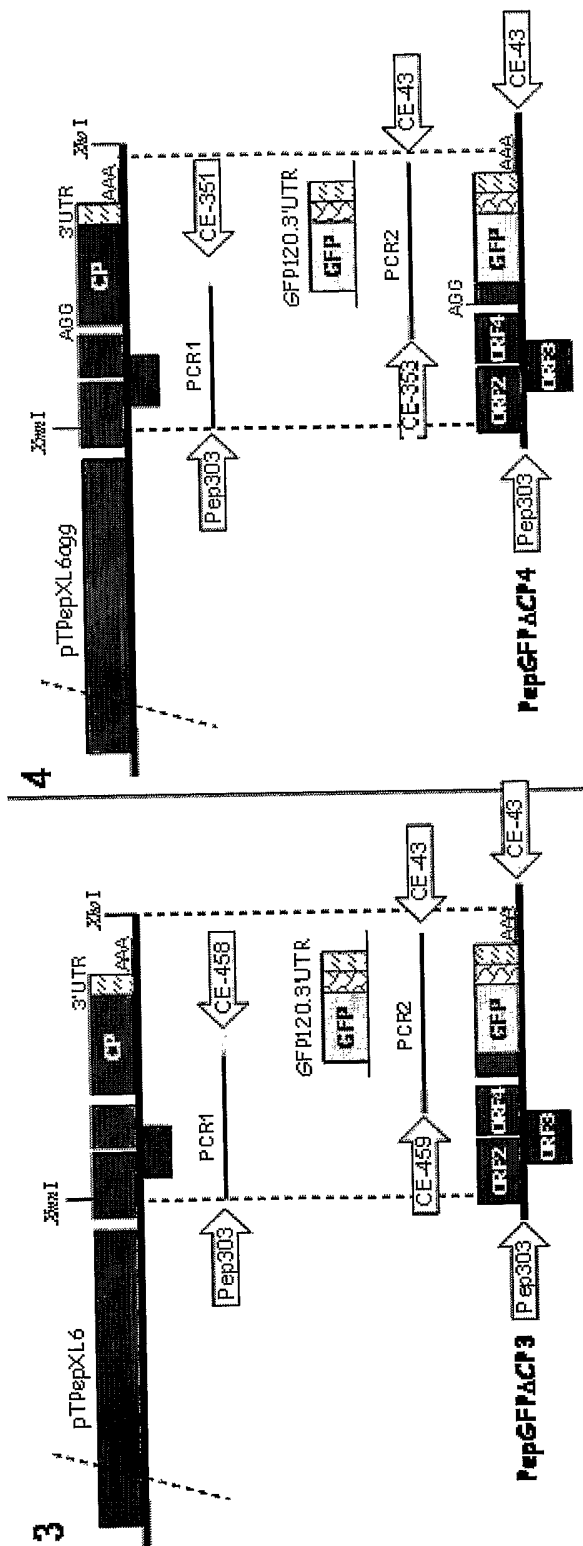


FIG. 2 (cont.)

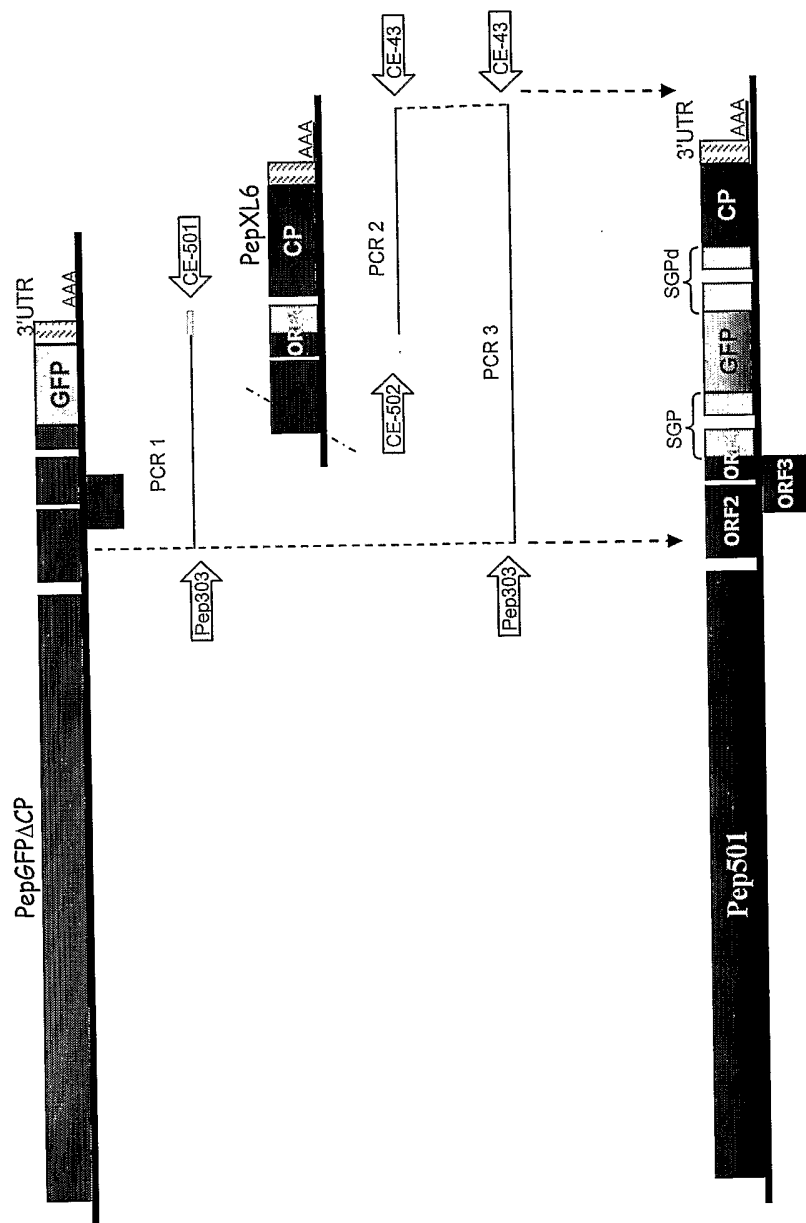


FIG. 3

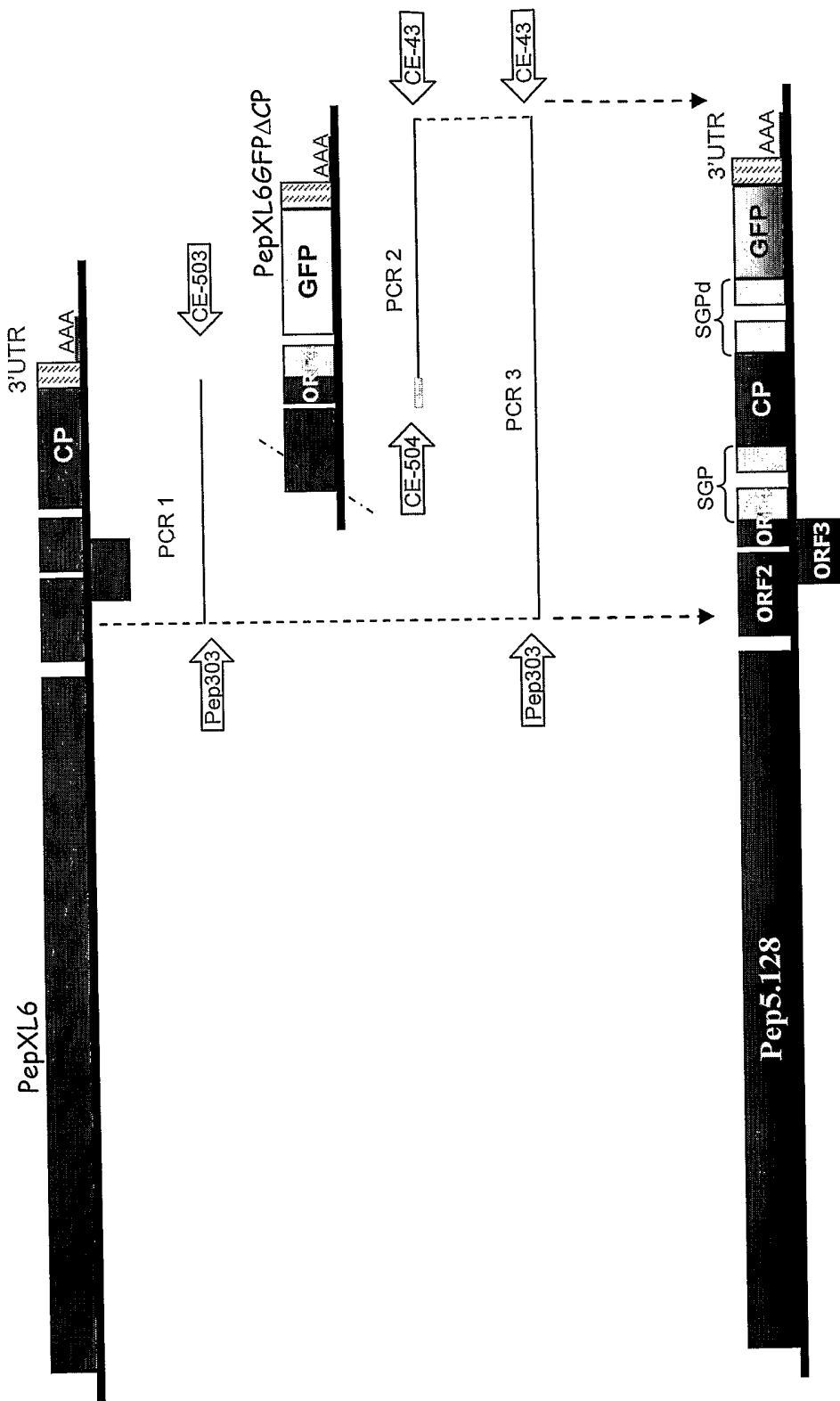


FIG. 4

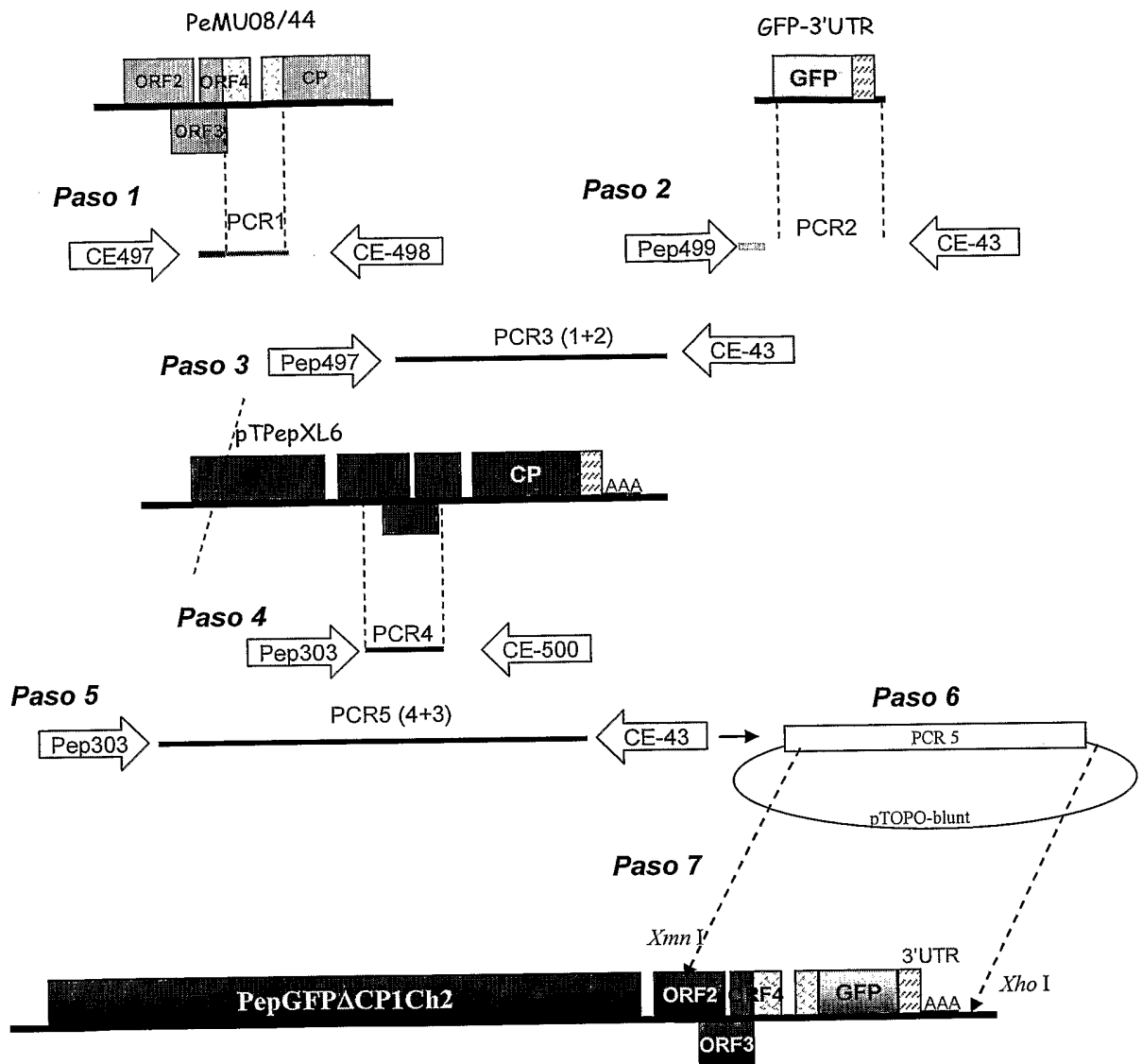


FIG. 5

7/14

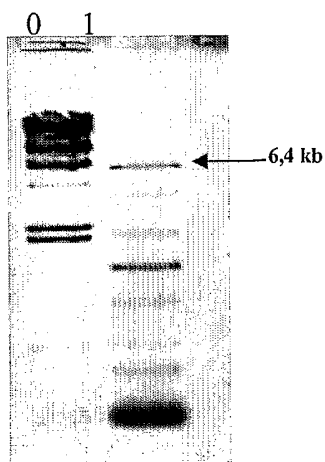


FIG. 6

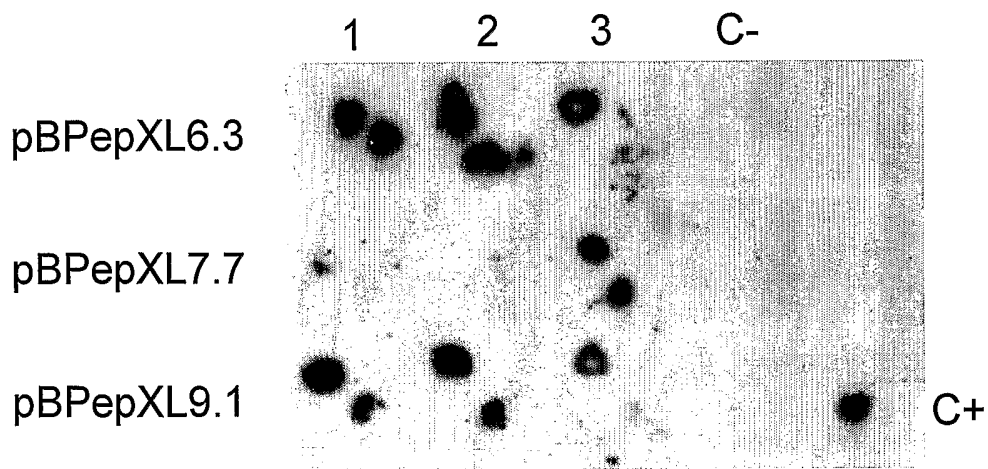


FIG. 7

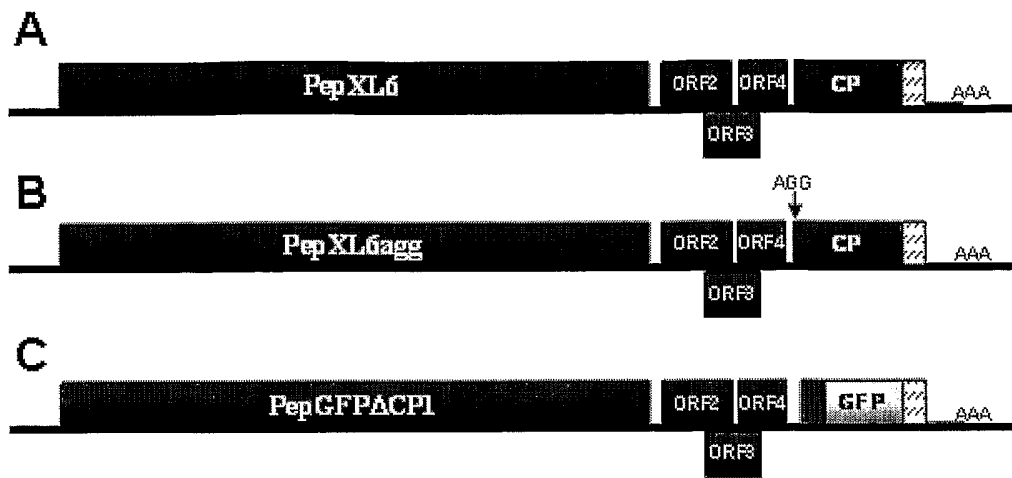


FIG. 8

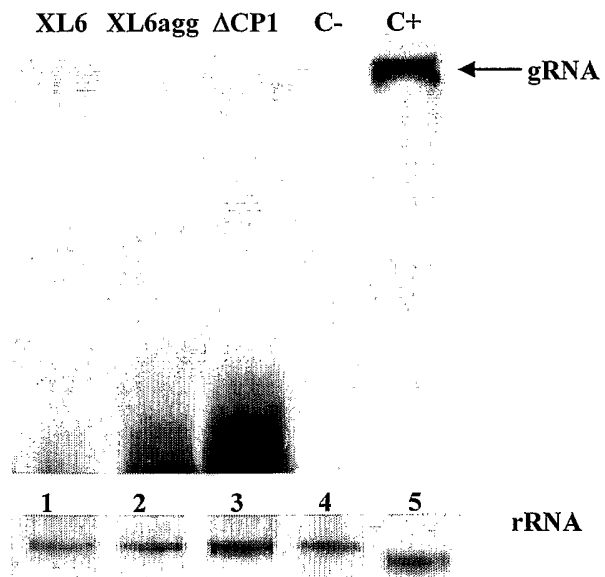


FIG. 9

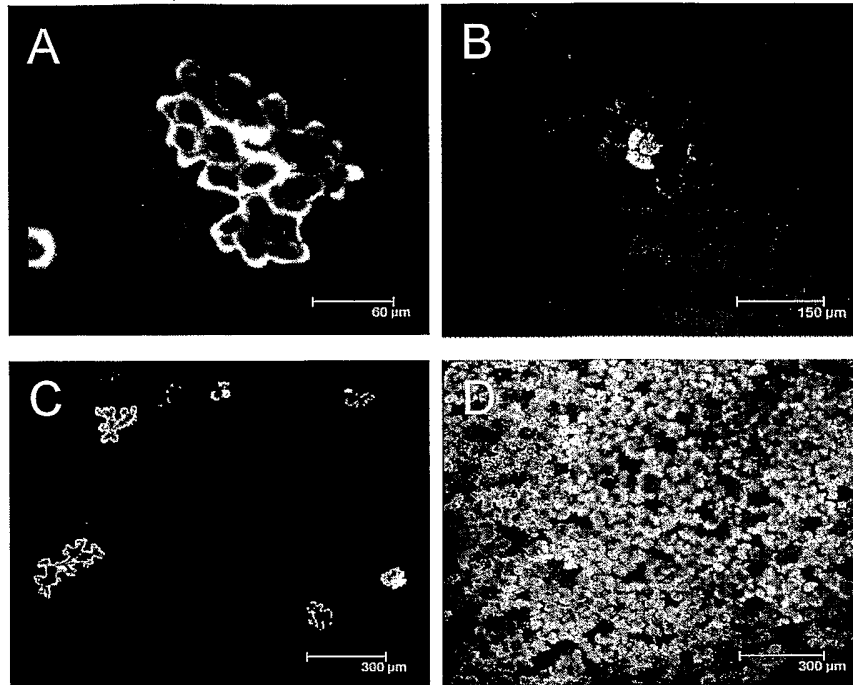


FIG. 10

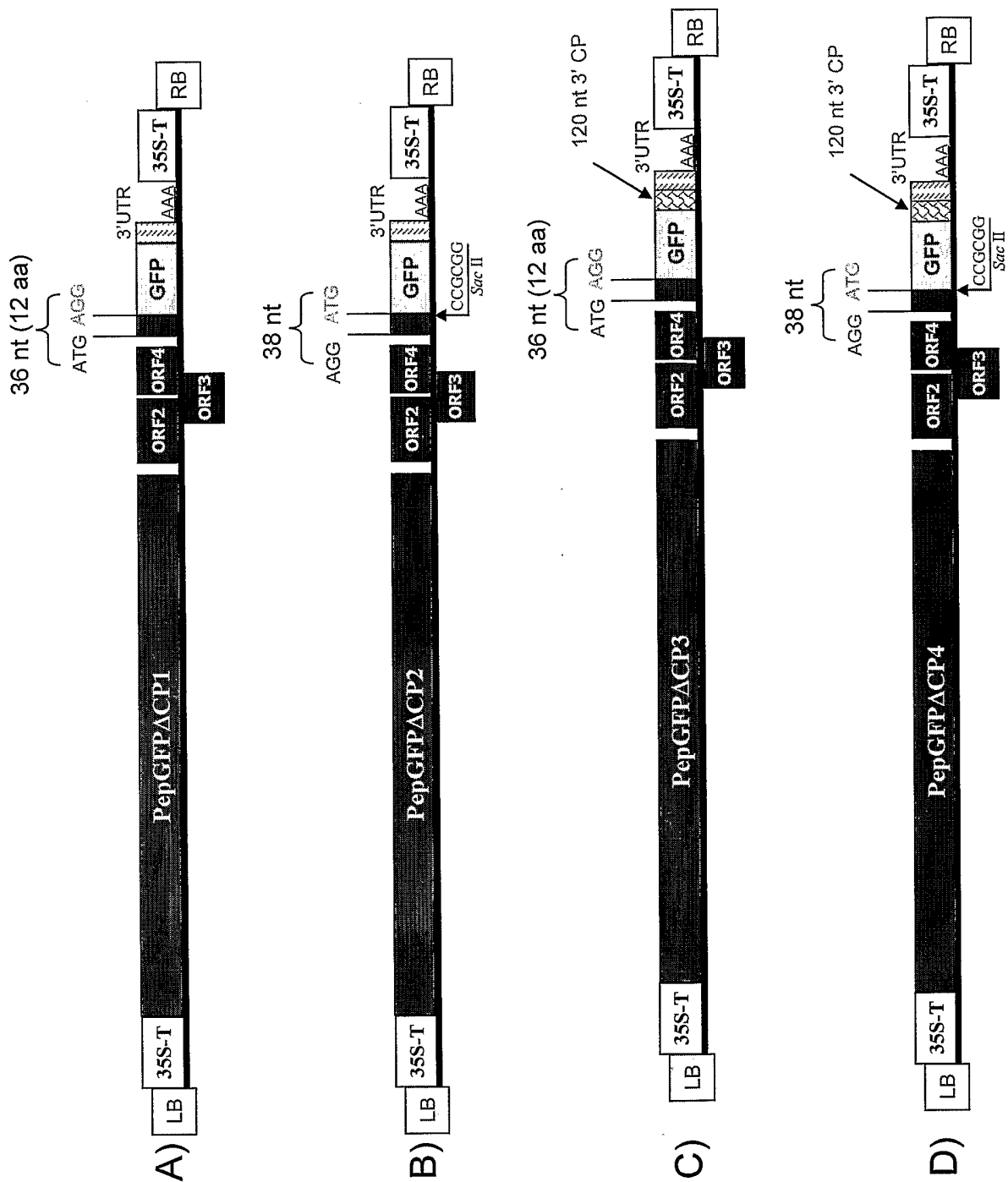


FIG. 11

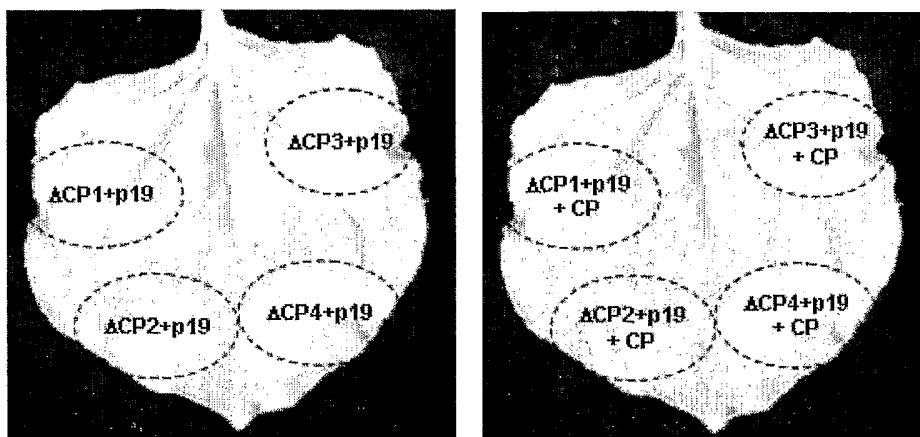


FIG. 12

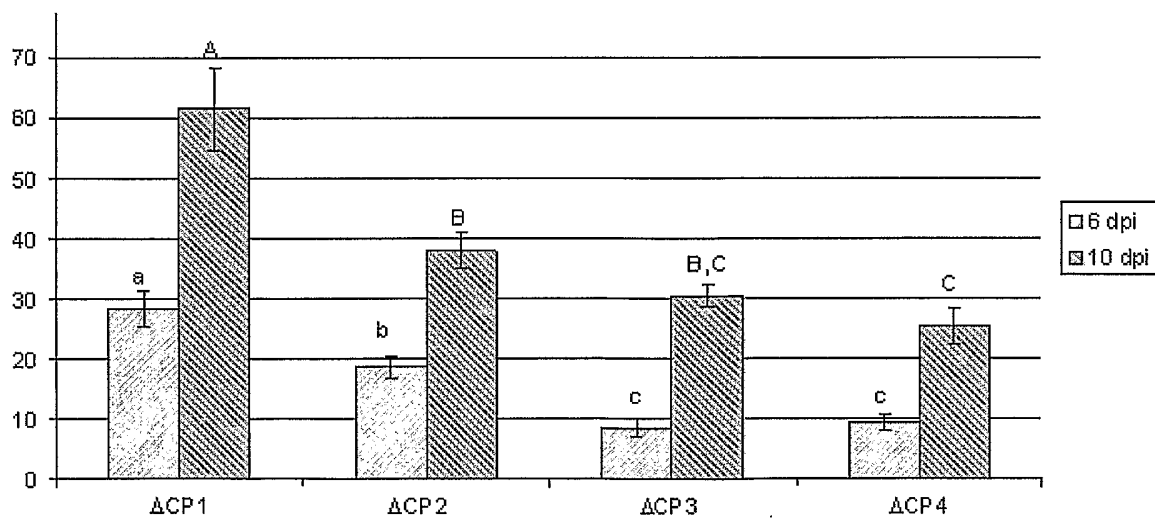


FIG. 13

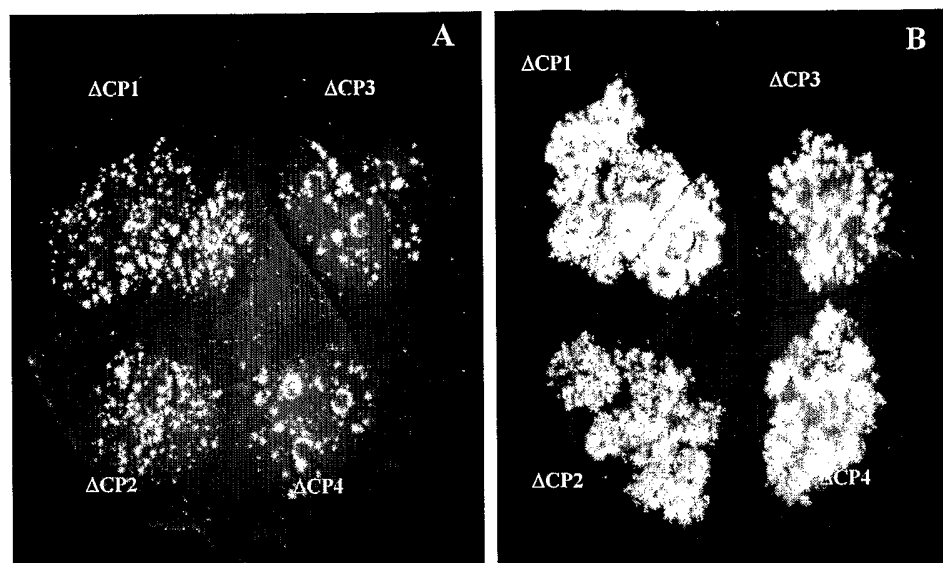


FIG. 14

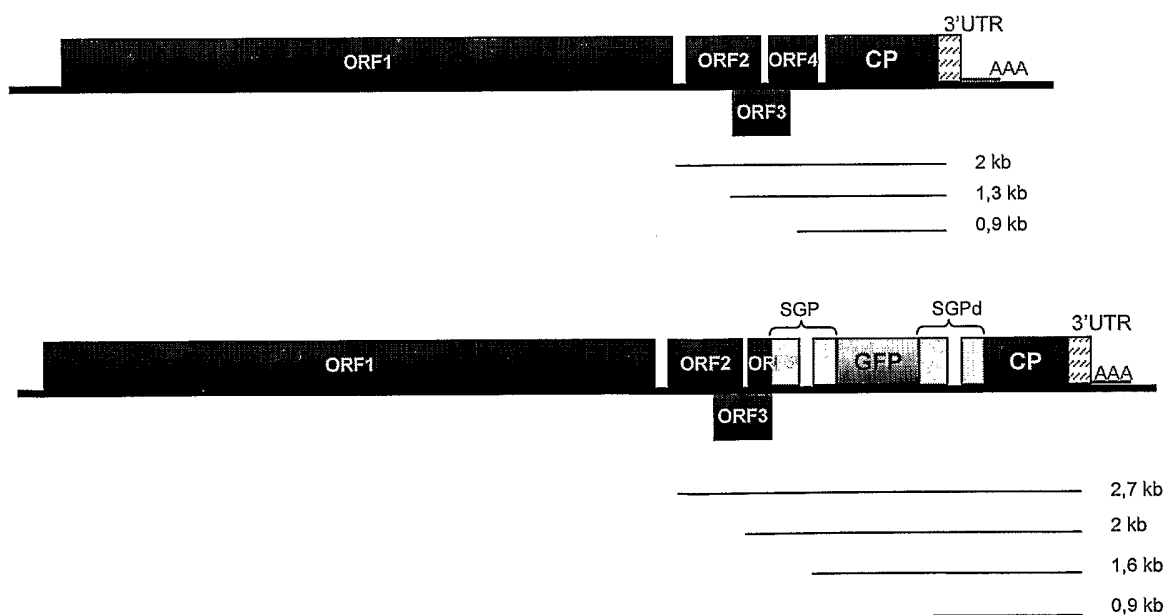


FIG. 15

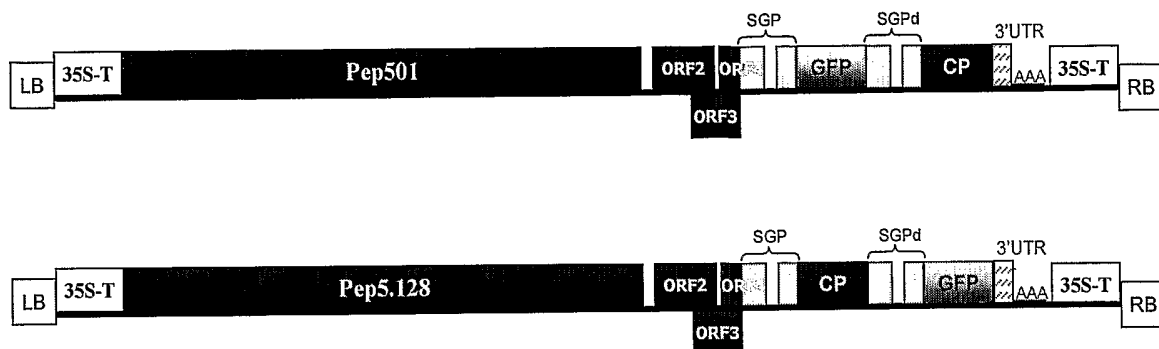


FIG. 16

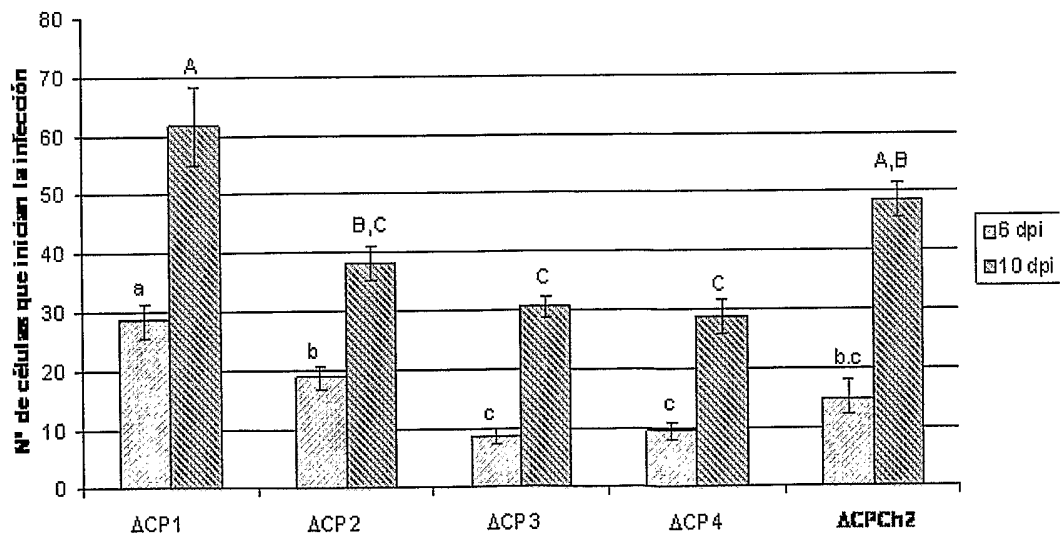


FIG. 17

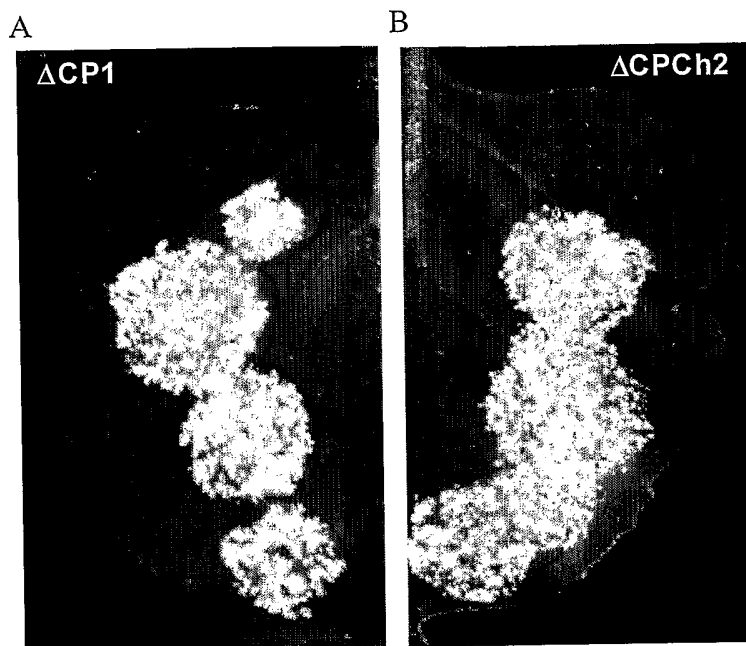


FIG. 18

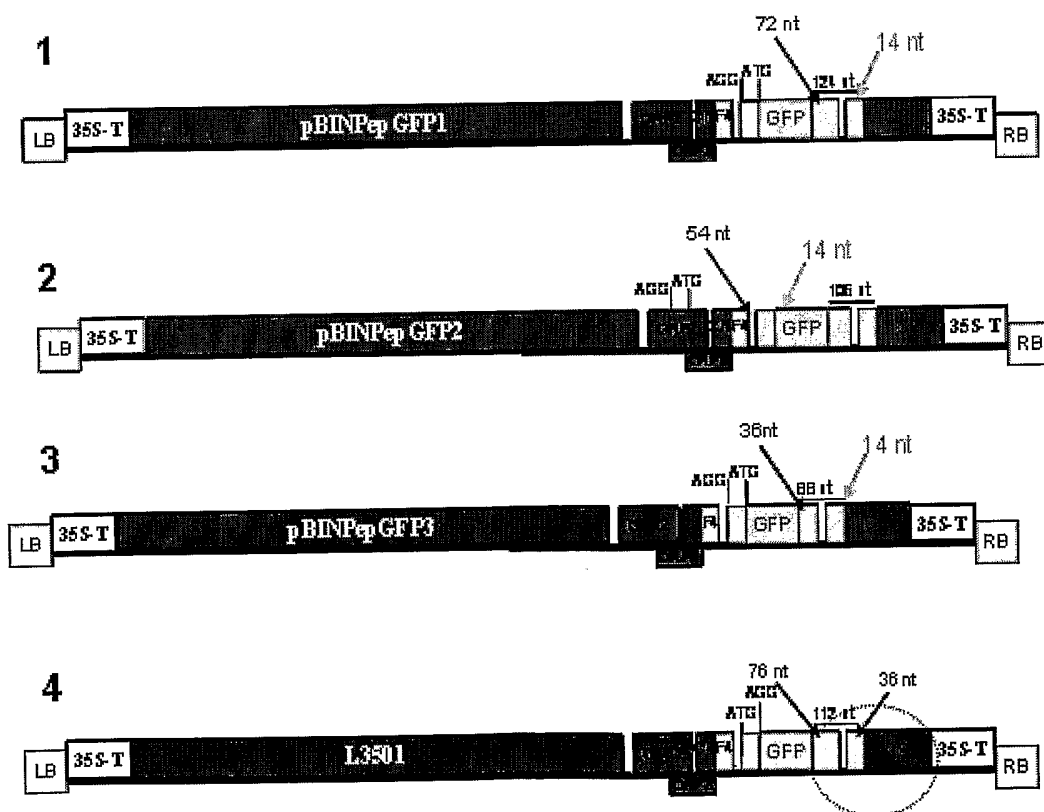


FIG. 19