

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 257**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/53** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2008 E 08707413 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2115147**

54 Título: **Plantas resistentes a enfermedad**

30 Prioridad:

**01.02.2007 WO PCT/EP2007/050976**

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

**10.07.2013**

73 Titular/es:

**ENZA ZADEN BEHEER B.V. (100.0%)**

**HALING 1E**

**1602 DB ENKHUIZEN, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DAMME, MIREILLE, MARIA, AUGUSTA y**

**VAN DEN ACKERVEKEN, AUGUSTINUS,**

**FRANCISCUS, J., M.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 412 257 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes a enfermedad

5 La presente invención se refiere a plantas de lechuga resistentes a enfermedad, en particular a plantas resistentes a organismos del reino Fungi y el filo Oomycota, los oomycetes. La invención además se refiere a métodos de obtención de tales plantas resistentes a enfermedad para proporcionar protección a patógenos Oomycota.

10 La resistencia de las plantas a patógenos fúngicos y oomycetes ha sido exhaustivamente estudiada, para tanto resistencia general como específica a patógeno. En muchos casos la resistencia está especificada mediante genes dominantes. Se ha identificado que muchos de estos genes de resistencia específica a raza o gen-a-gen median el reconocimiento al patógeno al interactuar directamente o indirectamente con productos del gen de avirulencia u otras moléculas del patógeno. Este reconocimiento conduce a la activación de un amplio rango de repuestas de defensa de la planta que detiene el crecimiento del patógeno.

15 En el cultivo de plantas hay una constante lucha por identificar nuevas fuentes de genes de resistencia dominantes mayoritariamente monogénicos. En las variedades cultivadas con genes de resistencia sencillos recién introducidos, con frecuencia se rompe rápidamente la protección a la enfermedad, debido a que los patógenos evolucionan y se adaptan en una alta frecuencia y recuperan la capacidad de infectar con éxito la planta hospedante. Por lo tanto, se necesita mucho la disponibilidad de nuevas fuentes de resistencia a enfermedad.

20 Los mecanismos de resistencia alternativos actúan por ejemplo a través de la modulación de la respuesta de defensa en plantas, tales como la resistencia mediada por el gen recesivo *mlo* en cebada al patógeno mildiu en polvo *Blumeria graminis f. sp. hordei*. Las plantas que llevan alelos mutados del gen *MLO* tipo natural presentan resistencia casi completa que coincide con el aborto de la penetración fúngica tratada de la pared celular de células epidérmicas atacadas sencillas. Por tanto, el gen *MLO* tipo natural actúa como un regulador negativo de la respuesta a patógeno. Esto está descrito en el documento WO9804586.

25 Otros ejemplos son los genes recesivos de resistencia a mildiu en polvo, encontrados en un cribado ("screen") para la pérdida de susceptibilidad a *Erysiphe cichoracearum*. Hasta ahora se han clonado tres genes, denominados *PMR6*, el cual codifica una proteína similar a pectato liasa, *PMR4* el cual codifica una calosa sintasa, y *PMR5* el cual codifica una proteína de función desconocida. Tanto los genes *mlo* como *pmr* parecen conferir específicamente resistencia a mildiu en polvo y no a oomycetes tales como mildius vellosos.

30 La resistencia general a patógeno, o formas sistémicas de resistencia tales como SAR, se ha obtenido mediante dos modos principales. La primera es mediante mutación de reguladores negativos de defensa vegetal y muerte celular, tales como en los mutantes *cpr*, *lsd* y *acd* de *Arabidopsis*. La segunda es mediante sobreexpresión transgénica de inductores o reguladores de defensa vegetal, tales como en las plantas de sobreexpresión de *NPR1*.

La desventaja de estos mecanismos de resistencia conocidos es que, además de la resistencia a patógeno, estas plantas muestran con frecuencia fenotipos adicionales e indeseables detectables, tales como el crecimiento atrofiado o la formación espontánea de muerte celular.

35 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una forma de resistencia que sea general, durable y no asociada a fenotipos indeseables.

40 En la investigación que condujo a la presente invención, se realizó un cribado de mutante de *Arabidopsis thaliana* para susceptibilidad reducida al patógeno de mildiu vellosa *Hyaloperonospora parasitica*. Se generaron mutantes EMS en la línea *Ler eds1-2* de *Arabidopsis* muy susceptible. Se analizaron en detalle ocho mutantes resistentes a mildiu vellosa (*dmr*, del Inglés "downy mildew resistant"), que corresponden a 6 loci diferentes. El análisis microscópico mostró que el crecimiento de todos mutantes de *H. parasitica* se redujo severamente. La resistencia de *dmr3*, *dmr4* y *dmr5* estaba asociada a la activación constitutiva de la defensa vegetal. Además, los mutantes *dmr3* y *dmr4*, pero no *dmr5*, eran también resistentes a *Pseudomonas syringae* y *Golvinomyces orontii*.

45 Por lo contrario, la activación aumentada de la defensa vegetal no se observó en los mutantes *dmr1*, *dmr2* y *dmr6*. Los resultados de esta investigación se ha descrito en Van Damme et al. (2005) Molecular Plant-Microbe Interactions 18(6) 583-592. Este artículo no describe la identificación y la caracterización de los genes DMR.

50 Se identificó el mutante *dmr6* en un cribado de pérdida de susceptibilidad en el ambiente de *Ler eds1-2* de *Arabidopsis*. El gen *DMR6* ahora se ha clonado y caracterizado. Por tanto, se encontró que el gen *DMR6* es el gen At5g24530, que codifica una oxidoreductasa (el ADN y la secuencia de aminoácidos están representados en la Figura 2). Las oxidoreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde una molécula, el oxidante, a otro, el reductor. De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que la pérdida de una proteína DMR6 funcional da como resultado resistencia a mildiu vellosa.

Por tanto, la presente invención proporciona una planta de lechuga, la cual es resistente a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomycete, caracterizada porque la planta tiene un nivel reducido, actividad reducida o

ausencia completa de la proteína DMR6 en comparación con una planta que no es resistente al dicho patógeno, de acuerdo con la reivindicación 1 adjunta.

5 Esta forma de resistencia es en particular eficaz frente a patógenos del filo Oomycota, tales como especies de *Albugo*, *Aphanomyces*, *Basidiophora*, *Bremia*, *Hyaloperonospora*, *Pachymetra*, *Paraperonospora*, *Perofascia*, *Peronophythora*, *Peronospora*, *Peronosclerospora*, *Phytium*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Protobremia*, *Pseudoperonospora*, *Sclerospora*, *Viennotia*, así como a patógenos pertenecientes al Fungi.

10 La resistencia de acuerdo con la invención se basa en una actividad alterada, en particular un nivel reducido, reducida o ausencia completa de la proteína DMR6 en *planta*. El término "proteína DMR6" a este respecto se refiere al producto del gen *DMR6*, tal como la proteína codificada por el gen At5g24530 en *Arabidopsis*. Tales alteraciones se pueden alcanzar de diversos modos.

En una realización de la invención, el nivel reducido de la proteína DMR6 es el resultado de una expresión reducida del gen *DMR6* endógeno. La reducción de la expresión del gen *DMR6* se puede alcanzar, o bien directamente, tal como mediante el silenciamiento del gen, o indirectamente mediante la modificación de sus secuencias reguladoras, o mediante la estimulación de la expresión del gen.

15 La modulación del gen *DMR6* para rebajar su actividad o expresión se puede alcanzar en diversos niveles. Primero, el gen endógeno se puede mutar directamente. Esto se puede alcanzar por medio de un tratamiento mutagénico. Alternativamente, un gen *DMR6* modificado se introduce en la planta por medio de técnicas transgénicas o por introgresión, o la expresión de *DMR6* se puede reducir al nivel regulador, por ejemplo, mediante la modificación de las secuencias reguladoras o mediante el silenciamiento del gen.

20 De acuerdo con la invención, el nivel reducido de proteína DMR6 es el resultado de una mutación en el gen *DMR6* que da como resultado una expresión reducida de *DMR6* en comparación con el gen *DMR6* tipo natural en el que no está presente dicha mutación, o que da como resultado un ARNm reducido o estabilidad de proteína. En una realización particular esto se alcanza mediante mutaciones en la secuencia codificadora de *DMR6* que da como resultado una proteína DMR6 no funcional, es decir, sin o con actividad enzimática reducida.

25 En otra realización de la invención, se puede alcanzar la expresión reducida mediante la regulación a la baja de la expresión del gen *DMR6* o bien al nivel transcripcional o de traducción, por ejemplo, mediante silenciamiento del gen o mediante mutaciones que afectan la expresión del gen *DMR6*.

30 Esta invención se basa en la investigación realizada sobre la resistencia a *Hyaloperonospora parasitica* en *Arabidopsis* pero es un concepto general que se puede aplicar más generalmente en plantas, en particular en plantas de cultivo que son susceptibles a infecciones con patógenos, tales como Oomycota y Fungi.

35 La invención es adecuada para un gran número de enfermedades de planta causadas por oomycetes tales como, pero no se limitan a, *Bremia lactucae* o lechuga. La descripción puede ser adecuada para *Peronospora farinosa* sobre espinaca, *Pseudoperonospora cubensis* sobre miembros de la familia Cucurbitaceae, por ejemplo pepino y melón, *Peronospora destructor* sobre cebolla, *Hyaloperonospora parasitica* sobre miembros de la familia Brassicaceae, por ejemplo repollo, *Plasmopara viticola* sobre uva, *Phytophthora infestans* sobre tomate y patata, y *Phytophthora sojae* sobre soja.

40 Cuando se alcanza la modificación de la expresión del gen *DMR6* en una planta vía modificación genética del gen *DMR6* o vía la identificación de mutaciones en el gen *DMR6*, y el gen no es aún conocido primero debe ser identificado. Para generar plantas resistentes a patógeno, en particular plantas de cultivo, vía modificación genética del gen *DMR6* o vía la identificación de mutaciones en el gen *DMR6*, los genes *DMR6* ortólogos deben ser aislados de estas especies vegetales.

Diversos métodos están disponibles para la identificación de secuencias ortólogas en otras plantas.

45 Un método para la identificación de secuencias ortólogas DMR6 en una especie vegetal, puede por ejemplo comprender la identificación de ESTs de DMR6 de la especie vegetal en una base de datos; diseñando cebadores ("primers") para la amplificación del transcrito de DMR6 completo o ADNc; realizando los experimentos de amplificación con los cebadores para obtener el correspondiente transcrito completo o ADNc; y determinando la secuencia de nucleótidos del transcrito o ADNc. Los métodos adecuados para amplificar el transcrito completo o ADNc en situaciones donde se conoce solamente parte de la secuencia codificadora son las técnicas de PCR avanzadas 5'RACE, 3'RACE, TAIL-PCR, RLM-RACE y PCR vectorette.

50 Alternativamente, si las secuencias de nucleótidos no están disponibles para las especie vegetal de interés, los cebadores se diseñan sobre el gen *DMR6* de una especie vegetal estrechamente relacionada con la planta de interés, basados en los dominios conservados como los determinados por alineamiento de secuencia de nucleótidos múltiple, y usado para amplificar por PCR la secuencia ortóloga. Tales cebadores son cebadores adecuadamente degenerados.

- Otro método fiable para valorar una secuencia dada como un ortólogo DMR6 es mediante la identificación del mejor hit recíproco. Una secuencia ortólogo DMR6 candidata de una especie vegetal dada se identifica con el mejor hit a partir de la bases de datos de ADN cuando se investiga con la proteína DMR6 de *Arabidopsis* o la secuencia de ADN, o la de otra especie vegetal, usando un programa Blast. La secuencia de nucleótidos ortóloga candidata obtenida de la especie vegetal dada se usa para investigar la homología a todas las proteínas de *Arabidopsis* en la base de datos de ADN (por ejemplo, en NCBI o TAIR) usando el método de investigación BlastX. Si el mejor hit y resultado es para la proteína DMR6 de *Arabidopsis*, la secuencia de ADN dada se puede describir como un ortólogo, o secuencia ortóloga.
- DMR6 se codifica mediante un gen sencillo en *Arabidopsis* como deducido a partir de la secuencia del genoma completo que está públicamente disponible. Se han identificado en el genoma de arroz 3 ortólogos, y en álamo 2 ortólogos. En la mayoría de otras especies vegetales ensayadas hasta ahora, DMR6 parece ser codificado mediante un gen sencillo, tal como se ha determinado por el análisis de las secuencias de ARNm y los datos de EST de las bases de datos de ADN públicas. En estas plantas se identifican los genes y proteínas ortólogos mediante comparaciones de nucleótidos y aminoácidos con la información que está presente en las bases de datos públicas.
- Alternativamente, si las secuencias de ADN no están disponibles para la especie vegetal deseada, las secuencias ortólogas se aíslan mediante hibridación heteróloga usando sondas de ADN del gen *DMR6* de *Arabidopsis* u otra planta o mediante métodos PCR, haciendo uso de dominios conservados en la secuencia codificadora de DMR6 para definir los cebadores. Para muchas especies de cultivo, están disponibles secuencias parciales de ARNm de DMR6 que se pueden usar para diseñar cebadores para posteriormente amplificar por PCR el ARNm completo o las secuencias genómicas para el análisis de secuencia de ADN.
- En una realización específica el ortólogo es un gen del cual la proteína codificada muestra al menos 50% de identidad con la proteína DMR6 de *Arabidopsis* (At5g24530) o esa de proteínas DMR6 de otra planta. En una realización más específica la identidad es al menos del 55%, más específicamente del 60%, incluso más específicamente del 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 99%.
- La Figura 1 muestra secuencias ortólogas de DMR6 (descritas en la Tabla 1) que se han identificado en bases de datos públicamente disponibles y se han obtenido por amplificación por PCR sobre ADNc y posterior secuenciación. Después se identifican secuencias ortólogas de DMR6, la secuencia completa de nucleótidos de la secuencia reguladora y codificadora del gen se identifica mediante técnicas biológicas moleculares estándar. Para esto, se sometieron a cribado las bibliotecas genómicas de la especie vegetal mediante hibridación de ADN o PCR con sondas o cebadores derivados de un gen *DMR6* conocido para identificar los clones genómicos que contienen el gen *DMR6*. Alternativamente, se pueden usar métodos PCR avanzados, tales como RACE mediado por ARN ligasa (RLM-RACE, del Inglés "RNA ligase-mediated RACE") para amplificar directamente genes y secuencias de ADNc a partir de ADN genómico o ARNm inversamente transcrito. Posteriormente la secuenciación de ADN da como resultado la caracterización del gen completo o la secuencia codificadora.
- Una vez que se conoce la secuencia de ADN del gen esta información se usa para preparar los medios para modular la expresión del gen *DMR6*.
- Para alcanzar un nivel de proteína DMR6 reducido, se puede regular a la baja la expresión del gen DMR6 o se puede reducir la actividad enzimática de la proteína DMR6 mediante sustituciones de aminoácidos resultantes de los cambios de nucleótidos en la secuencia codificadora de DMR6.
- En una realización particular de la invención, la regulación a la baja de la expresión del gen DMR6 se alcanza mediante el silenciamiento del gen usando ARNi. Para esto, las plantas transgénicas se generan expresando una construcción antisentido DMR6, una micro construcción de ARN optimizada, una construcción repetida invertida, o una construcción sentido-antisentido combinada, para generar ARNds correspondiente a DMR6 que conduce al silenciamiento del gen.
- En una realización alternativa, uno o más reguladores del gen DMR6 se regulan a la baja (en caso de los activadores transcripcionales) por ARNi.
- En otra realización se regularon al alza los reguladores (en caso de las proteínas represoras) mediante sobreexpresión transgénica. La sobreexpresión se alcanza en una realización particular mediante proteínas represoras de la expresión del gen DMR6 de un promotor fuerte, por ejemplo, el promotor 35S que se usa comúnmente en la biotecnología de planta.
- La regulación a la baja del gen DMR6 también se puede alcanzar mediante mutagénesis de los elementos reguladores en el promotor, la región "terminator", o intrones potenciales. Las mutaciones en la secuencia codificadora de *DMR6* en muchos casos conducen a sustituciones de aminoácidos o codones de parada prematuros que afectan negativamente a la expresión o actividad de la proteína DMR6 codificada.
- Estas mutaciones se inducen en plantas mediante el uso de compuestos químicos mutagénicos tales como sulfonato de etil metano (EMS, del Inglés "Ethyl methane sulfonate"), mediante irradiación de material vegetal con rayos gamas o neutrones rápidos, o por otros medios. Los cambios de nucleótidos resultantes son al azar, pero en

una gran colección de plantas sometidas a mutágeno se pueden identificar fácilmente las mutaciones en el gen DMR6 usando el método TILLING (del Inglés "Targeting Induced Local Lesions IN Genomes", Lesiones Locales Inducidas por Etiquetado en Genoma") (McCallum et al., (2000) "Targeted screening for induced mutations". Nat. Biotechnol. 18, 455-457, y Henikoff et al. (2004) "TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics". Plant Physiol. 135, 630-636). El principio de este método se basa en la amplificación por PCR del gen de interés a partir del ADN genómico de una gran colección de plantas sometidas a mutágeno en la generación M2. Mediante la secuenciación de ADN o mediante la búsqueda de las mutaciones puntuales usando una nucleasa específica de cadena sencilla, tal como la CEL-I nucleasa (Till et al. (2004) "Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases". Nucleic Acids Res. 32, 2.632-2.641) se identificaron las plantas individuales que tienen una mutación en el gen de interés.

Al someter a cribado muchas plantas, se obtiene una gran colección de alelos mutantes, dando cada uno un efecto diferente sobre la expresión del gen o actividad de la enzima. La expresión del gen o niveles de proteína se pueden por ejemplo ensayar mediante análisis de niveles de transcrito de DMR6 (por ejemplo, por RT-PCR) o mediante cuantificación de los niveles de proteína DMR6 con anticuerpos.

A continuación las plantas se someten a retrocruzamiento o cruzamiento con el deseado nivel de DMR6 reducido o la expresión de *DMR6* con otras líneas de cultivo para transferir solamente el nuevo alelo deseado en el ambiente del esperado cultivo.

Además se describen genes DMR6 mutados. Se describen alelos *dmr6* con codones de parada prematuros, tales como el alelo *dmr6-1*.

Se describen versiones mutadas de los genes DMR6 de *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* y *Spinacia olearacea* tal como se muestra en las Figuras 3-5.

La presente invención demuestra que las plantas que tienen no nivel o reducido de producto de gen DMR6 funcional muestran resistencia a patógenos, en particular de origen oomycete y fúngico. Con tal conocimiento el experto puede identificar hasta ahora variantes naturales desconocidas de una especie vegetal dada que tiene variantes del gen DMR6 que conducen a un nivel reducido o ausencia de una de la proteína DMR6 funcional, o versiones mutadas de la proteína DMR6, y al uso de estas variantes naturales de acuerdo con la invención.

Se describe el uso de un promotor DMR6 para proporcionar resistencia a enfermedad en plantas, es decir, para proporcionar plantas con una resistencia a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomycete. Se ha demostrado la regulación al alza transcripcional de DMR6 en respuesta a infección de patógeno. Tanto el análisis de transcrito así como las líneas indicadoras del promotor DMR6 soportan este descubrimiento (véase el Ejemplo 1, a continuación). Por tanto, el promotor DMR6 inducible de patógeno es particularmente útil para controlar la expresión de los sistemas inducibles que conducen a resistencia a enfermedad en plantas.

En el documento WO 99/45125, por ejemplo, se ha descrito un ejemplo de sistema inducible que conduce a resistencia a enfermedad en plantas, y en el cual el promotor DMR6 de acuerdo con la presente invención puede ser eficaz, en el que una secuencia de nucleótidos antisentido para un gen implicado en la regulación de la ruta metabólica de porfirina C-5 está unido de manera operable a un promotor inducible de patógeno y se usa para transformar células vegetales. La expresión de la secuencia de nucleótidos antisentido en respuesta al patógeno interrumpe eficazmente el metabolismo de la porfirina de la célula vegetal transformada, y el desarrollo de una lesión localizada en la que está contenida la proliferación del patógeno. El documento WO 96/36697 también describe sistemas inducibles que conducen a resistencia a enfermedad en plantas, en los que un promotor inducible controla la expresión de una proteína capaz de provocar la respuesta de hipersensibilidad en una planta. El documento EP 0474857 además describe un método para la inducción de resistencia a patógeno en plantas, que comprende la transformación de plantas con secuencias de polinucleótidos que codifican un par de gen de avirulencia derivado de patógeno/gen de resistencia derivado de planta, en el que la expresión de uno de o tanto péptidos elicitores como el gen de resistencia está regulado por un promotor inducible de patógeno. En, por ejemplo, el documento WO 98/32325 se han descrito ejemplos adicionales de sistemas inducibles que conducen a resistencia a patógenos en plantas.

Se describe un método para proporcionar resistencia a enfermedad en una planta, que comprende la transformación de una célula vegetal con una construcción de ADN que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está unido de manera operable a un promotor inducible de patógeno que es operable dentro de una célula vegetal, y regeneración de las plantas transformadas a partir de dichas células vegetales, en las que el promotor inducible de patógeno es un promotor DMR6, y en las que la expresión del ácido nucleico expresable confiere resistencia a enfermedad a la planta transgénica.

Se describen plantas de resistencia a enfermedad, obtenibles mediante dicho método, así como tejido vegetal y semillas obtenidas a partir de dichas plantas.

Se describen plantas, las cuales son resistentes a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomycete, donde la planta comprende en su genoma una construcción de ADN, que comprende al menos un ácido nucleico

expresable que está unido de manera operable a un promotor inducible de patógeno, donde el promotor inducible de patógeno es un promotor DMR6.

5 Se describe la construcción de ADN per se, que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está unido de manera operable a un promotor inducible de patógeno, donde el promotor inducible de patógeno es un promotor DMR6. La construcción se puede usar para transformar células vegetales que se pueden regenerar dentro de plantas transformadas. Además, se pueden obtener tejido vegetal y semilla transformados. Los métodos adecuados para la introducción de la construcción dentro de las células vegetales son conocidos por los expertos.

10 De acuerdo con la descripción, por “unido de manera operable” se quiere decir que un promotor y un ácido nucleico expresable, por ejemplo un gen, están conectados de tal modo que permiten la iniciación de la transcripción del ácido nucleico expresable (por ejemplo, gen) por el promotor.

Por “ácido nucleico expresable” se quiere decir un ácido nucleico (por ejemplo un gen, o parte de un gen) que se puede expresar en la célula, es decir que se puede transcribir en el ARNm, y finalmente se puede traducir en una proteína. El ácido nucleico expresable puede ser ADN genómico, ADNc, o ADN químicamente sintetizado o cualquier combinación de los mismos.

15 De acuerdo con la presente descripción, una construcción de ADN comprende todos los elementos de ácido nucleico necesarios que permiten la expresión (es decir, transcripción) de un ácido nucleico particular en una célula. Generalmente, la construcción incluye un ácido nucleico expresable, es decir, un ácido nucleico para ser transcrito, y un promotor. La construcción adecuadamente se puede incorporar dentro de, por ejemplo, un plásmido o vector.

20 El ácido nucleico expresable preferiblemente es un gen implicado en una respuesta de defensa vegetal, por ejemplo un gen asociado con la respuesta de hipersensibilidad de una planta. En la respuesta de hipersensibilidad (HR, del Inglés “Hypersensitivity response”) de una planta, el sitio en la planta donde el patógeno invade sufre muerte celular localizada por la expresión inducida de un mecanismo de suicidio que desencadena dicha muerte celular localizada en respuesta a los patógenos. De este modo, solamente se sacrifican unas pocas células vegetales y se detiene eficazmente la proliferación del patógeno. Ejemplos de dichos genes implicados en una respuesta de defensa vegetal son la proteína reguladora NPR1/NIM1 (Friedrich et al., Mol. Plant Microbe Interact. 14(9): 1.114-1.124, 2001) y el factor de transcripción MYB30 (Vailleau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(15): 10.179-10.184, 2002).

30 En una realización particular, el ácido nucleico expresable codifica un polipéptido autólogo o heterólogo capaz de conferir resistencia a enfermedad a una planta. Por “polipéptido autólogo” se quiere decir cualquier polipéptido que se expresa en una célula vegetal transformada a partir de un gen que se da de manera natural en la célula vegetal transformada. Por “polipéptido heterólogo” se quiere decir cualquier polipéptido que se expresa en una célula vegetal transformada a partir de un gen que es parcialmente o enteramente ajeno (es decir, no se da de manera natural) a la célula vegetal transformada. Ejemplos de tales polipéptidos son la proteína Bax de mamífero, la cual codifica una proteína pro-apoptótica y da como resultado muerte celular en plantas (Lacomme and Santa Cruz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(14): 7.956-61, 1999) y quitinasas fúngicas (de las Mercedes Dana et al., Plant Physiol. 142(2): 722-730, 2006).

40 Preferiblemente, el promotor DMR6 es el promotor DMR6 de *Arabidopsis*. El promotor DMR6 comprende una región de 3.000 pb que están en dirección 5' (“upstream”) de la secuencia codificadora de DMR6 de *Arabidopsis* (codón de inicio ATG) e incluye la 5'UTR. Preferiblemente el promotor DMR6 comprende una secuencia de nucleótidos tal como la definida en la Figura 11, y/o cualquier fragmento de la misma, es decir, cualquier fragmento (o parte) de dicha secuencia que aún sea capaz de iniciar la transcripción de el(los) ácido(s) nucleico(s) expresable(s) a el(los) cual(es) está(n) unido(s) de manera operable, y/o sus variantes naturales, es decir, variantes naturales de este promotor que pueden contener pequeños polimorfismos, pero que son generalmente al menos 90% idénticas.

45 En una realización preferida adicional, el promotor DMR6 es un promotor DMR6 ortólogo, es decir, un promotor de un gen DMR6 ortólogo. En el ejemplo 2 de a continuación se han descrito métodos para identificar ortólogos DMR6. Una vez que se han identificado los ortólogos DMR6, los expertos serán capaces de aislar el respectivo promotor de dichos ortólogos, usando técnicas biológicas moleculares estándar.

50 Se ha demostrado que el promotor DMR6 está fuertemente inducido por patógeno, y el promotor DMR6 no se expresa mucho en otros tejidos no infectados. Por tanto, es un promotor muy adecuado para usar en sistemas inducibles para proporcionar resistencia a patógenos de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomycete en plantas. Anteriormente se han dado ejemplos de patógenos y plantas específicos para los cuales se pueden usar adecuadamente el sistema inducible, usando el promotor DMR6.

La presente invención se ilustra en los siguientes ejemplos que no intentan limitar la invención de ningún modo. En los ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras.

55 La Tabla 1 muestra los números de entrada de Genbank e identificadores de GenInfo del ARNm de DMR6 de *Arabidopsis* y secuencias ortólogas de otras especies vegetales.

La Tabla 2 muestra los cebadores de PCR para los marcadores usados para la clonación basada en mapeo de DMR6.

La Tabla 3 muestra pares de cebador para la clonación de ortólogos *dmr6* en un vector de expresión vegetal adecuado.

5 La Figura 1 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína DMR6 de *Arabidopsis thaliana* y ortólogos a partir de especies de *Aquilegia*, *Citrus sinensis*, *Coffea canephora*, *Cucumis sativus*, *Gossypium hirsutum*, *Lactuca sativa*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* (3), *Populus trichocarpa* (2), *Solanum lycopersicum* (2), *Sorghum bicolor*, *Spinacia oleracea*, *Vitis vinifera*, *Zea mays* y *Zingiber officinale*, usando el programa de alineamiento de secuencia múltiple (EBI) CLUSTAL W (1,83). Por debajo de las secuencias los aminoácidos conservados están indicados por puntos, y los aminoácidos idénticos están indicados por asteriscos.

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen DMR6 (At5g24530, gi 42568064, GenBank NM\_122361) y la proteína (gi 15238567, GenBank NP\_197841) de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente.

15 La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivadas del ortólogo DMR6 de *Lactuca sativa*, respectivamente.

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivadas del ortólogo DMR6 de *Spinacia oleracea*, respectivamente.

20 La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivadas del ortólogo DMR6 de *Cucumis sativus* y *Cucumis melo*.

La Figura 6 muestra la resistencia al mildiu veloso de los mutantes *dmr6* de *Arabidopsis*. (a) Cuantificación de esporangióforos de aislado Waco9 de *H. parasitica*, 7 días después de la inoculación, sobre el mutante *dmr6-1* (BC2, línea E37) en comparación con su línea *Ler eds1-2* parental y sobre el mutante *dmr6-2* (línea de ADN-T FLAG\_445D09) en comparación con su línea parental *Ws-4*. (b) Restauración de la susceptibilidad mediante complementación con el gen At5g24530 en el mutante *dmr6-1*. Se cuantificaron las esporas de *H. parasitica* por mg de peso de plantón sobre *Ler eds1-2*, *dmr6-1* y 5 líneas de complementación (N° 121, 122, 211, 231 y 241).

30 La Figura 7 muestra la estructura del gen DMR6 de *Arabidopsis* y mutaciones *dmr6-1* y *dmr6-2*. El gen *DMR6* contiene cuatro exones y una secuencia codificadora de las 1.026 bases. Los dos alelos están indicados; *dmr6-1* con un cambio de base en el exón 2, y *dmr6-2* con una inserción de ADN-T en el intrón 2.

La Figura 8 muestra los niveles relativos de transcrito de *DMR6* en plantas *Ler* o bien tratadas “mock” o inoculadas con un aislado de *H. parasitica* compatible o incompatible. Se determinaron los niveles de transcrito en diferentes días después de la inoculación. La diferencia en los valores umbrales del ciclo ( $\Delta$ CT, del Inglés “Cycle Threshold”) reflejan el número de ciclos adicionales de amplificación por PCR requeridos para alcanzar una concentración umbral de producto arbitraria en comparación con *ACTIN2*. Un valor de  $\Delta$ CT inferior indica un nivel de transcrito superior.

40 La Figura 9 muestra la expresión de la construcción promotor-indicador de DMR6 (pDMR6::GUS) en líneas transgénicas de *Arabidopsis*, visualizada con solamente X-gluc como sustrato (Figura d y e) o Magenta-Xgluc (Figura a-c) y azul de tripano que tiñen el crecimiento de *H. parasitica* (a) *Ler eds1-2* (pDMR6::GUS) 3 dpi con *H. parasitica*, aislado Cala2. (b) Col-0 (pDMR6::GUS) 3dpi con *H. parasitica*, aislado Waco9. (c) *Ler eds1-2* (pDMR6::GUS) 3 dpi con *H. parasitica*, aislado Emoy2. (d) Col-0 (pDMR6::GUS) 3 dp de realizar la herida. (e) Col-0 (pDMR6::GUS) 3 dp BTH aplicación.

45 La Figura 10 muestra el análisis por Q-PCR de los niveles de transcrito de los genes; Atg4g14365, At1g14880, *ACD6*, *PR-1*, *PR-2* Y *PR-5*, seleccionados como regulados al alza en el análisis de microarray de *dmr6-1*. (a) Los niveles de transcripción de los seis genes en *dmr6-1* en comparación con *Ler eds1-2* y adicionalmente el transcrito de DMR6. (b) Transcritos de gen elevados de seis genes asociados a defensa en *dmr6-2* frente a *Ws-4*. El  $\Delta$ CT refleja el número de ciclos de amplificación por PCR adicionales requeridos para alcanzar el nivel de transcritos de *ACTIN2* adicionales. Un valor de  $\Delta$ CT inferior indica un nivel de transcrito superior.

50 La Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos de la región en dirección 5' de 3 kb del codón de inicio del gen DMR6. (at5g24530) de *Arabidopsis thaliana*, que incluye el promotor y 5'-UTR (subrayado).

La Figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivadas del ortólogo DMR6 de *Solanum lycopersicum*, respectivamente.

La Figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivadas del ortólogo DMR6 de *Nicotiana benthamiana*, respectivamente.

La Figura 14 muestra la complementación de *dmr6-1* de *Arabidopsis thaliana* con DMR6 derivada de *Cucumis sativa* (Cs), *Spinacia oleracea* (So), *Lactuca sativa* (Ls) y *Solanum lycopersicum* (Sl).

## 5 Ejemplo 1

El gen *DMR6* (At5g24530) de *Arabidopsis* es requerido para susceptibilidad a mildiu vellosa.

Procedimientos experimentales

Crecimiento e infección de *Hyaloperonospora parasitica*

10 El aislado Waco9 de *H. parasitica* fue proporcionado por Dr. M. Aarts (WUR, Wageningen, NL) y el aislado Cala2 por Dr. E. Holub (Warwick HRI, Wellesbourne, UK) y se mantuvieron sobre *Arabidopsis Ws-0* y *Ler*, respectivamente. Los inóculos se transfirieron semanalmente (400.000 esporas por ml) a plantones saludables de 10 días de edad (Holub, E.B. et al., Mol. Plant Microbe Interact. 7: 223-239, 1994) mediante el uso de una pistola pulverizadora. Los plantones se secaron al aire durante aproximadamente 45 minutos y se incubaron bajo una tapa sellada a una humedad relativa al 100% en una cámara de crecimiento a 16°C con 9 horas de luz por día (100 mE/m<sup>2</sup>/s). Se cuantificaron los niveles de esporulación 7 días después de la inoculación (dpi, del Inglés “days post inoculation”) mediante el recuento del número de esporangióforos por plantón, durante al menos 40 plantones por línea ensayada (Figura 6a) o mediante el aislamiento de esporas en agua 5 dpi y determinando la concentración de espora para dar el número por mg de tejido de hoja (Figura 6b).

Generación de líneas *dmr6* sometidas a retrocruzamiento

20 Los mutantes *dmr6* se someten dos veces a retrocruzamiento (BC<sub>2</sub>, del Inglés “Back crossed”) con la línea parental *Ler eds1-2* así como *Ler*. Se seleccionaron las líneas BC<sub>2</sub>, generadas con *Ler* para la presencia del gen *EDS1* tipo natural mediante análisis por PCR.

Clonación *DMR6*

25 El buen mapeo del gen *dmr6* se hizo con marcadores de PCR diseñados usando la base de datos Cereon para identificar las diferencias de inserción y deleción (IND) entre Col-0 y *Ler*. Los marcadores: IND\_MOP9 en el gen At5G24210; IND\_K16H17 en el gen At5G24420; IND\_T4C12 en el gen At5G24820; IND\_T11H3 entre los genes At5G24950\_60 y IND\_F21J6 en el gen At5G25270 se usaron para el mapeo (Tabla 2). Se inició un cribado adicional para nuevos recombinantes sobre 300 plantas F<sub>2</sub> dando como resultado ocho plantas recombinantes F<sub>2</sub> entre los dos marcadores basados en IND IND\_MOP9 y IND\_T4C12, los cuales flanquean una región de 61 genes. Siete marcadores adicionales (M450-M590; Tabla 2) redujeron la región a ocho genes candidatos para el locus *dmr6*, entre At5g24420 y At5g24590. El análisis de secuencia de At5g24530 indicó una mutación puntual que conduce a un codón de parada en el exón 2 en el mutante *dmr6-1*.

Identificación de una línea de inserción de ADN-T de *dmr6*.

35 Se identificó un segundo alelo *dmr6*, 445D09 una línea de inserción de ADN-T de FLAG generada por INRA Versailles en el ambiente de accesión de Ws-4. Se confirmó la inserción de ADN-T mediante PCR usando un cebador diseñado en el gen At5g24530, cebador LP (5' -cagggttatggcatatctcacgctc-3'), en combinación con el cebador de borde derecho de ADN-T, Tag3' (5' -ctgataccagacgttgcccgcataa-3') o RB4 (5' -tcacgggttggggttctacaggac-3'). Se confirmó la inserción de ADN-T exacta en el segundo intrón de At5g24530 mediante secuenciación de amplicones generados con los cebadores de ADN-T a partir de tanto el borde izquierdo como el derecho en combinación con los cebadores LP o RP específicos a gen (5' -atgtccaagtccaatagccacaag-3').

Síntesis de ADNc

45 Se aisló el ARN (a partir de aproximadamente 100 mg de tejido de hoja de plantones de 10 días de edad) con el kit RNAesy (Qiagen, Venlo, Los Países Bajos) y se trató con el set de DNasa libre de RNasa (Qiagen). Se cuantificó el ARN total usando un espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japón). El ADNc se sintetizó con transcriptasa inversa de Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y oligo(dT)15 (Promega, Madison, WI, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Complementación del mutante *dmr6-1*

50 Se generaron líneas de complementación mediante la transformación de plantas *dmr6* por el método de depresión floral con *Agrobacterium tumefaciens* (Clough and Bent, 1998) que contienen el gen At5g24530 de Col-0 bajo el promotor 35S. Se generó la construcción mediante amplificación por PCR de la longitud completa de At5g24530 de ADNc de Col-0 con cebadores que incluían sitios de restricción que se usaron para la clonación direccional. Un



cebador directo (5'-ttctggaatccaATGGCGGCAAAGCTGATATC-3') que contenía un sitio de restricción BamHI cerca del codón de inicio (ATG), amplificó el extremo 5' de *DMR6* y en el extremo 3' después del codón de parada se generó un sitio EcoRI con un cebador inverso (5'-gatatatgaattcttagttgtagaaaattctcagaggc-3'). Se clonó el 35S-*DMR6*-Tn en el pGreen II0229 (Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000)). "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." Plant Mol. Biol. 42, 819-832). Se aislaron 300 µM de plantones resistentes a DL-fosfotricina (BASTA) y se analizó la susceptibilidad de *H. parasitica* y los niveles de expresión de *DMR6* por RT-PCR

Líneas "Knock down" de *DMR6* por ARNi

Se generaron líneas ARNi en el ambiente de *Ler eds1-2* y Col-0. Se generó un amplicón de ADNc de 782 pb de longitud del gen At5g24530 de Col-0. La PCR se hizo con la ADN polimerasa de Phusion (2U/µl) y dos combinaciones diferentes de cebador. El amplicón a partir de la primera combinación de cebador específico a gen *DMR6* (ARNiDMR6F: 5' - aaaaagcaggctGACCGTCCACGTCTCTCTGAA -3' y ARNiDMR6R: 5' - AGAAAGCTGGGTGAAACGATGCCACCGATAGTC -3') se usó como plantilla para la segunda amplificación por PCR con cebadores generales que permiten la recombinación dentro del vector pDONR7 del sistema de clonación Gateway. Para la segunda PCR se usó como plantilla 10 µl de la primera PCR (desnaturalización durante 30 seg. a 98°C seguido de 10 ciclos de: 10 seg. a 98°C; 30 seg. a 58°C; 30 seg. a 72°C) en un volumen total de 20 µl. Se realizó la segunda PCR (desnaturalización durante 30 seg. a 98°C seguido por 5 ciclos de: 10 seg. a 98°C; 30 seg. a 45°C; 30 seg. a 72°C y 20 ciclos de 10 seg. a 98°C; 30 seg. a 55°C; 30 seg. a 72°C finalizado por una extensión final de 10 min. a 72°C) con el attB1 (5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') y el attB2 (5' -ggggaccactttgtacaagaaagctgggt -3') en un volumen de reacción de 50 µl. El producto de la PCR se purificó en gel y se recombinó 50 ng de inserto dentro de 150 ng del vector pDONR7 con la enzima clonase BP. El vector se transformó en células de *E. coli* DH5α electrocompetente y los plásmidos que contenían el inserto correcto se aislaron y se usaron 100 ng del pDONR7 con el amplicón *DMR6* en la reacción LR para recombinar el inserto en dos direcciones opuestas dentro de 150 ng de vector pHellsgate8. Después de la transformación dentro de *E. coli*, se seleccionaron clones resistentes a Spectomicina y se verificaron los plásmidos aislados por un digest NotI para el tamaño correcto del inserto y por PCR de colonia con un cebador interno sencillo para At5G4530 (DfragmentF: 5' -gagaagtgggatttaaaatagaggaa-3'), si los insertos se insertan dos veces en dirección opuesta se podría detectar un amplicón de 1.420 pb. Se transformaron los plásmidos pHellsgate8 correctos con el doble inserto en direcciones opuestas dentro de la cepa de *Agrobacterium* electrocompetente, C58C1. Se aislaron los plásmidos a partir de *Agrobacterium* y se transformaron dentro de *E. coli* para confirmar el tamaño correcto del plásmido y el inserto por digestión NotI. Se usaron cepas de *Agrobacterium* reconfirmadas para la transformación de depresión floral de las plantas Col-0 y *Ler eds1-2*. Las semillas desarrolladas se sometieron a cribado para resistencia a Kanamicina sobre placas GM<sup>1/2</sup>x, los plantones T1 se transfirieron y la próxima generación de semillas, la T2, se analizó para la expresión de *DMR6* y susceptibilidad *H. parasitica*.

Perfilación de la expresión del gen del mutante *dmr6*

Se aisló el ARN total tal como se ha descrito describe anteriormente. Se amplificó el ARNm con el kit MessageAmp aRNA (Ambion). Se hibridaron portaobjetos de CATMA array (Crowe et al., 2003) que contenían aproximadamente 25.000 etiquetas específicas a gen de acuerdo con las condiciones estandarizadas descritas por de Jong M., van Breukelen B., Wittink, F.R., Menke, F.L., Weisbeek, P.J. y Van den Ackerveken G. (2006). "Membrane-associated transcripts in Arabidopsis; their isolation and characterization by DNA microarray analysis and bioinformatics." Plant J. 46, 708-721). Para PCR cuantitativo, se generaron plantillas de ADNc tal como se ha descrito previamente. Se determinaron los umbrales de ciclo por transcrito por triplicado usando el sistema de dirección de secuencia ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando SYBR Green I (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) como tinte indicador. Los grupos de cebador para los transcritos son *DMR6* (QDMR6F: 5' -TGTCATCAACATAGGTGACCAG-3' y QDMR6R: 5' -CGATAGTCCAGGATTTTCTGTG-3'), At1g14880 (QAt1g14880F: 5' -CTCAAGGAGAATGGTCCACA-3' y QAt1g14880R: 5' -CGACTTGGCCAAATGTGATA-3'), At4g14365 (QAt4g14365F: 5' -TGGTTTTCTGAGGCATGTAAA-3' y QAt4g14365R: 5' -AGTGCAGGAACATTGGTTGT-3'), ACD6 (QACD6F: 5' -TGGACAGTTCTGGAGCAGAT-3' y QACD6R: 5' -CAACTCCTCCGCTGTGAG-3'), PR-5 (QPR-5F: 5' -GGCAAATATCTCCAGTATTCACA-3' y QPR-5R: 5' -GGTAGGGCAATTGTTTCCTTAGA-3'), PR-2 (QPR-2 F: 5' -AAGGAGCTTAGCCTCACCAC-3' y QPR-2R: 5' -GAGGGAAGCAAGAATGGAAC -3'), PR-1 (QPR-1F: 5' -GAACACGTGCAATGGAGTTT-3' y QPR-1R: 5' -GGTCCACCAATTGTTACACCT-3') y ACT-2 (QACT2F: 5' -AATCACAGCACTTGCACCA-3' y QACT2R: 5' -GAGGGAAGCAAGAATGGAAC-3') generando fragmentos de 100 pares de bases.

Resultados

Caracterización del gen responsable de la resistencia a patógeno en el mutante *dmr6*

Van Damme et al., 2005, supra describe un mutante *dmr6* que es resistente a *H. parasitica*. El nivel de resistencia se puede examinar mediante el recuento del número de esporangióforos por plantón siete días antes de la inoculación

con *H. parasitica* (aislado Waco9 o Cala2, obtenible de Dr. G. Van den Ackerveken, Plant-Microbe Interactions Group, University of Utrecht, Utrecht, NL). La línea parental, *Ler eds1-2* (Parker et al., 1996, Plant Cell 8:2.033-2.046), la cual es muy susceptible, se usa como control positivo (y se ajusta al 100%).

5 En la Fig. 6a se muestra la reducción en la formación de esporangióforo sobre los mutantes *dmr6* infectados en comparación con los plantones de las líneas parentales, donde se muestran los resultados de la cuantificación de *Hyaloperonospora parasitica*, esporulación de Waco9 (esporangióforos/plantón) sobre el mutante *dmr6-1* resistente a mildiu veloso, sometido a retrocruzamiento dos veces con la línea parental *Ler eds1-2*, y sobre mutante *dmr6-2* (línea de ADN-T FLAG\_445D09) en comparación con las líneas control.

10 De acuerdo con la invención, se ha clonado el gen responsable de la resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr6* de van Damme et al., 2005, supra, mediante una combinación de mapeo y secuenciación de los genes candidatos. Previamente, se mapeó la mutación *dmr6* recesiva cerca del marcador nga139 sobre el cromosoma 5 a una región que abarca 74 genes. El buen mapeo unió el locus *dmr6* a un intervalo de mapeo que contenía el BACs T13K7 y K18P6 entre los marcadores At5g24420 y At5g24590 localizados en los correspondientes genes. Esto permitió que el intervalo *dmr6* se confinara a una región de 18 genes candidatos. El análisis de secuencia comparativo de los 18 genes en *dmr6* y la línea parental, *Ler eds1-2* reveló una mutación puntual en el segundo exón del gen At5g24530. Este cambio sencillo de base de G a A, típico para una mutación con EMS, cambia un TGG a (codón trp) por un TGA (codón de parada temprano) en la posición del nucleótido 691 de la secuencia codificadora (Figura 7). El codón de parada temprano trunca la enzima oxidoreductasa pronosticada de 342 aa en la posición 141 antes del dominio catalítico conservado que sugiere que *dmr6* es un alelo nulo. La secuencia codificadora de At5g24530 (Figura 2) se pronostica que codifica una proteína con una masa de 39,4 kDa. Por ahora se ha descrito no papel biológico para At5g24530.

At5g24530 es *DMR6*

25 Se identificó un segundo alelo, *dmr6-2*, en una línea de inserción de ADN-T (FLAG\_445D09) a partir de la colección mutante de INRA, Versailles. La presencia y localización del inserto de ADN-T en el segundo intrón de At5g24530 (Figura 7) se confirmó por PCR y análisis de secuencia (datos no mostrados). La progenie de los homocigotos de la línea FLAG\_445D09 para la inserción de ADN-T era resistente a aislado Waco9 de *H. parasitica*, mientras que la línea parental (Ws-4) era susceptible (Figura 6a). El transcrito de At5g24530 se podría amplificar por RT-PCR usando cebadores en exón 2 y 3 en Ws-4, pero no en la línea *dmr6-2* homocigótica (datos no mostrados), indicando que *dmr6-2* se puede considerar un segundo alelo nulo.

30 Para corroborar la idea de que se requiere At5g24530 para la susceptibilidad a *H. parasitica* el mutante *dmr6-1* se transformó con el ADNc de At5g24530 clonado bajo control del promotor 35S. En cinco plantones *dmr6-1* T<sub>2</sub> independientes se confirmó la fuerte sobreexpresión de At5g24530 mediante RT-PCR (datos no mostrados). Todas las líneas T3, homocigóticas para el transgen, mostraron restauración de susceptibilidad a aislado Cala2 de *H. parasitica* (Figura 6b), confirmando que At5g24530 es *DMR6*. La complementación, junto con la identificación de dos mutantes *dmr6* independientes indica claramente que se requiere un gen *DMR6* funcional para la susceptibilidad a *H. parasitica*.

*DMR6* es activado transcripcionalmente durante infección de *H. parasitica*

40 Para estudiar la sobreexpresión de *DMR6* durante la infección con *H. parasitica* se midieron los niveles relativos de transcrito mediante PCR cuantitativa en seis puntos de tiempo diferentes desde 0 días (2 horas) después de la inoculación a 5 días después de la inoculación (dpi) (Figura 8). Se aisló ARN de plantones *Ler* de 10 días de edad que fueron inoculados mediante pulverización con agua ("mock"), compatible, o aislado incompatible de *H. parasitica*. A 2 horas después de la inoculación (0 dpi) los niveles de transcritos de *DMR6* eran iguales en los diferentes tratamientos. Comenzando desde 1 dpi, el nivel de transcrito de *DMR6* se incrementó significativamente en tanto la interacción compatible como incompatible en comparación con plantones tratados "mock". El nivel de transcrito de *DMR6* era ligeramente pero significativamente mayor en 1 dpi en la interacción incompatible ( $\Delta$ CT de 3,5, aproximadamente 11 veces la inducción) que en la compatible ( $\Delta$ CT de 3,0, aproximadamente 8 veces la inducción). El nivel de expresión aumentó más en el momento de alcanzar un nivel alto estable en 4-5 dpi. En estos puntos de tiempo el nivel de transcrito de *DMR6* era mayor en la interacción compatible que en la incompatible. Los niveles de transcrito de *DMR6* elevados durante las interacciones compatibles e incompatibles de *H. parasitica* sugieren un papel de *DMR6* en la defensa vegetal. La expresión asociada a defensa de *DMR6* se podría confirmar en nuestros tres mutantes de defensa aumentada, *dmr3*, *dmr4* y *dmr5* (Van den Ackerveken et al., no publicado). Además, en análisis in silico de los niveles de *DMR6* en el "Genevestigator Mutant Surveyor" (Zimmermann, P., Henning, L., y Gruissem, W. (2005). "Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator." Trends Plant Sci. 10, 407-409) mostró que el gen está fuertemente inducido en los mutantes resistentes a patógeno *mpk4* y *cpr5*. En el mutante doble *cpr5/npr1* el nivel de transcrito de *DMR6* se mantuvo alto indicando que la inducción de la expresión *DMR6* es en su mayoría independiente a *NPR1*. El ácido salicílico parece ser una señal importante en la inducción de la expresión de *DMR6* durante la senescencia como plantas transgénicas *nahG* (expresando el gen de salicilato hidroxilasa bacteriana) mostró solamente bajos niveles de transcrito de *DMR6*.

Para investigar en más detalle cómo se activa la expresión de *DMR6* durante estrés biótico y abiótico, se generaron las líneas indicadoras de *DMR6*. Se estudió la localización de la expresión de *DMR6* en plantas Col-0 y *Ler eds1-2* transgénicas que contenían el promotor *DMR6* unido al gen indicador (“reporter”) *uidA* ( $\beta$ -glucuronidasa, GUS) (pDMR6::GUS). Para visualizar tanto el crecimiento hifal de *H. parasitica*, mediante tinción con azul de tripano, así como la actividad GUS, se usó magenta-Xgluc como sustrato de  $\beta$ -glucuronidasa que produce un precipitado de magenta. En plantas no infectadas se podría detectar no expresión de GUS en los diferentes orgánulos vegetales; raíces, meristemo, flor, polen y semilla. Se indujo la expresión de *DMR6* en las interacciones compatibles, *Ler eds1-2* infectadas con Cala2 (Figura 9a), y Col-0 infectada con aislado Waco9 (Figura b). La expresión de GUS también se indujo en la interacción incompatible *Ler eds1-2* inoculada con aislado Emoy2 (Figura 9c). Tal como se muestra en la figura 9a y 9b se confinó la expresión de *DMR6* a las células en las cuales *H. parasitica* había formado haustorios. Las células vegetales que contenían los haustorios más recientemente formados no mostraron niveles detectables de actividad de GUS (Figura 9a, indicado por asterisco). Durante la actividad de interacción incompatible (Figura 9c) del promotor *DMR6* solamente se podría detectar en las células que estuvieran en contacto con la hifa invasora inicial. En células muertas, que resultan de la respuesta de hipersensibilidad (HR del Inglés “Hypersensitive response”, visualizada por tinción con azul de tripano indicado en la Figura 9c por asterisco) se podía detectar no actividad GUS, posiblemente debido a degradación de proteína en estas células. Para ensayar si la expresión de *DMR6* en células que contienen haustorios está causada por una respuesta similar a herida, los plantones se hirieron por incisión con tijeras y se tiñeron para actividad GUS 3 días después. Se vio no expresión GUS del promotor *DMR6* detectable, indicando que la expresión de *DMR6* no está inducida por la realización de herida (Figura 9d). Además de la inducción local de la expresión de *DMR6* se ensayó la respuesta a tratamiento con benzotiadiazola (BTH, del Inglés “Benzothiazole”), un análogo funcional de ácido salicílico (SA, del Inglés “Salicylic Acid”). A los 3 días después del tratamiento con BTH la actividad GUS se localizó principalmente en las hojas nuevamente formadas, pero no en las maduras (Figura 9e). El análisis de las líneas pDMR6::GUS confirma los datos de expresión anteriormente descritos y resalta la inducción estrictamente localizada de *DMR6* en respuesta a la infección de *H. parasitica*.

El mutante *dmr6-1* expresa constitutivamente transcritos asociados a defensa

Para elucidar cómo la falta de *DMR6* da como resultado resistencia a *H. parasitica*, se analizó el transcriptoma del mutante *dmr6-1* en comparación con la línea parental *Ler eds1-2*. Se hibridaron sondas derivadas del ARNm de las partes por encima del suelo de plantones *dmr6-1* y *Ler eds1-2* de 14 días de edad con microarrays CATMA del genoma completo. Se encontraron que se expresaron significativamente de manera diferencial un total de 58 genes en *dmr6-1*, de los cuales 51 genes habían elevado y 7 genes habían reducido los niveles de transcrito. Se han identificado un conjunto pronunciado de los 51 transcritos inducidos como genes asociados con respuestas activadas de defensa vegetal, por ejemplo, ACD6, PR-5, PR-4/HEL y PAD4. Estos datos indican que la pérdida de *DMR6* da como resultado la activación de un conjunto específico de transcritos asociados a defensa. El descubrimiento de que *DMR6* está entre los genes inducidos de *dmr6* corrobora la idea de que *DMR6* está asociado a defensa. Para ensayar si la expresión inducida de los genes asociados a defensa era debida a la pérdida de *DMR6* y no debida a las mutaciones por etano metil sulfonato (EMS) adicionales que permanecían en el mutante *dmr6-1* sometido a retrocruzamiento se verificó el nivel de transcrito de una selección de genes (At4g14365, At1g14880, ACD6, PR-1, PR-2 y PR-5) mediante PCR cuantitativa en tanto el mutante *dmr6-1* como *dmr6-2* (Figura 10). Podríamos ensayar solamente los niveles de transcrito de *DMR6* en el mutante *dmr6-1* (Figura 10a) ya que el mutante *dmr6-2* tiene una inserción de ADN-T que interrumpe el transcrito de *DMR6*. La inducción de *DMR6* tal como la observada en el análisis de micro array fue confirmada por Q-PCR en *dmr6-1* en comparación con *Ler eds1-2* (Figura 10a). La Figura 10a y b muestran que todos los seis genes seleccionados se elevaron en ambos mutantes *dmr6* en comparación con las líneas parentales. La expresión elevada observada de los genes asociados a defensa seleccionados en los mutantes *dmr6* indica que la falta de *DMR6* activa una respuesta de defensa vegetal. La activación de este conjunto de transcritos asociados a defensa podría ser la causa principal de la resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr6*.

## Ejemplo 2

Identificación de ortólogos *DMR6* en cultivos

1. Cribado (“screening”) de bibliotecas sobre la base de homología de secuencia

En la Fig. 2 se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la secuencia codificadora *DMR6* y la proteína de *Arabidopsis thaliana*. Se compararon las bibliotecas públicas de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos con las secuencias de la Fig. 2. Esta comparación dio como resultado la identificación de las secuencias codificadoras *DMR6* completas y las secuencias de aminoácidos pronosticadas en especies de *Aquilegia*, *Citrus sinensis*, *Coffea canephora*, *Cucumis sativus*, *Gossypium hirsutum*, *Lactuca sativa*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* (3), *Populus trichocarpa* (2), *Solanum lycopersicum* (2), *Sorghum bicolor*, *Spinacia oleracea*, *Vitis vinifera*, *Zea mays* y *Zingiber officinale*. La información de secuencia de las proteínas ortólogas así identificadas se dan en la Tabla 1 y se visualizan en un alineamiento múltiple en la Fig. 1. Para muchas otras especies vegetales se podrían identificar los fragmentos de ADN ortólogos mediante BlastX como los mejores hits recíprocos a las secuencias de proteína *DMR6* de *Arabidopsis* u otra planta.

2. Identificación de ortólogos por medios de hibridación heteróloga

La secuencia de ADN de DMR6 de la *Arabidopsis thaliana* tal como se muestra en la Fig. 2 se usa como sonda para investigar secuencias homólogas mediante hibridación con ADN de cualquier especie vegetal usando métodos biológicos moleculares estándar. Usando este método se detectaron genes ortólogos mediante hibridación Southern sobre ADN digerido por enzima de restricción o mediante hibridación con bibliotecas genómicas o de ADNc. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Como sonda alternativa la secuencia de ADN de DMR6 de cualquier otra especie vegetal más próxima se puede usar como sonda.

3. Identificación de ortólogos por medios de PCR

Para muchas especies de cultivo, están disponibles el ARNm parcial DMR6 o secuencias de gen de que se usan para diseñar cebadores para posteriormente amplificar por PCR la secuencia completa de ADNc o genómica. Cuando las secuencias 5' y 3' están disponibles la secuencia interna desaparecida se amplifica por PCR mediante un cebador directo ("forward primer") 5' específico a DMR6 y cebador inverso 3' ("reverse primer"). En casos donde solamente las secuencias 5', internas o 3' están disponibles, se diseñan tanto cebadores directos como inversos. En combinación con cebadores "polylinker" de plásmido disponibles, se amplifican los insertos a partir de bibliotecas genómicas y de ADNc de la especie vegetal de interés. De un modo similar, se amplifican las secuencias 5' o 3' desaparecidas mediante técnicas PCR avanzadas; 5'RACE, 3' RACE, TAIL-PCR, RLM-RACE o vectorette PCR.

Como ejemplo de la secuenciación de la *Lactuca sativa* (lechuga) se proporciona ADNc de DMR6. A partir de la base de datos de EST de Genbank en NCBI se identificaron varios ESTs de DMR6 de *Lactuca* usando la herramienta tblastn que comienza con la secuencia de aminoácidos de DMR6 de *Arabidopsis*. El agrupamiento y el alineamiento de las ESTs dieron como resultado una secuencia consenso para un fragmento de DMR6 5'. Para obtener el ADNc de DMR6 de lechuga completo se usó el kit RLM-RACE (Ambion) sobre ARNm a partir de plántones de lechuga. Se obtuvo la secuencia de ARNm 3' mediante el uso de dos cebadores que se diseñaron en la secuencia consenso de DMR6 5' derivada a partir de ESTs (Lsat\_dmr6\_fw1: CGATCAAGGTCAACACATGG, y Lsat\_dmr6\_fw2: TCAACCATTACCCAGTGTGC) y los cebadores RACE 3' del kit. Basado en la secuencia juntada se diseñaron nuevos cebadores para amplificar la secuencia codificadora de DMR6 completa a partir de ADNc para proporcionar la secuencia de nucleótidos y la secuencia de proteína derivada tal como se presenta en la Fig. 3.

Se han identificado las secuencias codificadoras de DMR6 completas de más de 10 especies vegetales diferentes a partir de bases de datos genómicas y de EST. A partir del alineamiento de las secuencias de ADN, se seleccionaron regiones conservadas en la secuencia codificadora para el diseño de los cebadores de oligonucleótido degenerados (para los nucleótidos degenerados las abreviaciones son de acuerdo con los símbolos de nucleótidos de IUB que son códigos estándar usados por todas las compañías que sintetizan oligonucleótidos; G=Guanina, A=Adenina, T=Timina, C=Citosina, R=A o G, Y=C o T, M=A o C, K=G o T, S=C o G, W=A o T, B=C o G o T, D=G o A o T, H=A o C o T, V=A o C o G, N=A o C o G o T).

El procedimiento para obtener secuencias internas de ADNc de DMR6 de una especie vegetal dada es como sigue:

1. El ARNm se aísla usando métodos estándar,
2. El ADNc se sintetiza usando un cebador olig dT y métodos estándar,
3. usando oligonucleótidos directos e inversos degenerados se lleva a cabo una reacción de PCR,
4. los fragmentos de PCR se separan mediante electroforesis de gel de agarosa estándar y fragmentos del tamaño esperado se aíslan a partir del gel,
5. se clonan fragmentos de PCR aislados en un vector de plásmido usando métodos estándar,
6. los plásmido con tamaños de inserto correcto, tal como se determina por PCR, se analizan mediante secuenciación de ADN,
7. el análisis de secuencia que usa blastX revela que los fragmentos contienen las secuencias internas de DMR6 correctas,
8. a continuación, se puede usar la secuencia interna de ADN para diseñar cebadores específicos a género y especie para 5' y 3' RACE para obtener la secuencia codificadora de DMR6 completa mediante RLM-RACE (tal como se ha descrito anteriormente).

Como ejemplo se proporciona la secuenciación del ADNc de DMR6 de *Cucumis sativus* (pepino). Para el pepino diversas combinaciones de cebador entre los siguientes cebadores fueron exitosos en la amplificación de un tramo de secuencia codificadora interna del ADNc; cebadores directos dmr6\_deg\_fw1B (TTCCAGGTDAATTAAYCAYGG), dmr6\_deg\_fw2B (CATAAYTGAGRGAYTAYCT), dmr6\_deg\_fw3B (GARCAAGGRCARCAYATGGC) y dmr6\_deg\_fw4 (AATCCTCCTTCHTTCAAGGA) y cebadores inversos dmr6\_deg\_rv3B (AGTGCATTKGGGTCHGTRTG), dmr6\_deg\_rv4 (AATGTTRATGACAAARGCAT) y dmr6\_deg\_rv5 (GCCATRTGYTGYCCTTGYTC). Después de la

clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados se diseñaron cebadores específicos a DMR6 de pepino para 5'RACE (Cuc\_dmr6\_rv1: TCCGGACATTGAAACTTGTG y Cuc\_dmr6\_rv2: TCAAAGAACTGCTTGCCAAC) y 3'RACE (Cuc\_dmr6\_fw1: CGCACTCACCATTCTCCTTC y Cuc\_dmr6\_fw2: GGCTCCAAGTCCTCAAAG). Finalmente se amplificó y se secuenció la secuencia completa de ADNc de DMR6 de pepino (Figura 5). Un planteamiento similar se usó para espinaca, *Spinacia oleracea* (Figura 4), *Solanum lycopersicum* (Figura 12) y *Nicotiana benthamiana* (Figura 13).

Los ortólogos identificados tal como se han descrito en este ejemplo se pueden modificar usando técnicas bien conocidas para inducir mutaciones que reducen la expresión de DMR6 o la actividad, para obtener plantas no genéticamente modificadas resistentes a Fungi u Oomycota. Alternativamente, la información genética de los ortólogos se puede usar para diseñar vehículos para el silenciamiento del gen, y para transformar las correspondientes plantas de cultivo para obtener plantas que sean resistentes a Oomycota.

### Ejemplo 3

#### Mutación de semillas

Las semillas de la especie vegetal de interés se tratan con un mutágeno para introducir al azar las mutaciones puntuales en el genoma. Se hacen crecer las plantas mutadas para producir semillas y la siguiente generación se sometió a cribado para la ausencia de reducción de los niveles de transcrito de DMR6 o actividad. Esto se alcanza mediante el seguimiento del nivel de la expresión del gen *DMR6*, o mediante la investigación de los cambios de nucleótido (mutaciones) mediante el método TILLING, mediante secuenciación de ADN, o mediante cualquier otro método para identificar los cambios de nucleótido. Las plantas seleccionadas son homocigóticas o se hacen homocigóticas por autocruzamiento o entrecruzamiento. Se ensayó la resistencia aumentada al patógeno de interés para confirmar la resistencia a enfermedad deseada en las plantas homocigóticas seleccionadas con ausencia o actividad de transcrito de DMR6 reducida.

### Ejemplo 4

#### Transferencia de un alelo mutado dentro del ambiente de un cultivo deseado

La introgresión del alelo mutante deseado en un cultivo se alcanza mediante cruzamiento y cribado genotípico del alelo mutante. Esto es un procedimiento estándar en actual reproducción por asistente de marcadores de cultivos.

### Ejemplo 5

#### Uso del promotor *DMR6* para la expresión del gen inducido por patógeno y la generación de plantas resistentes a enfermedad

El control preciso de la expresión del transgen es crucial a la producción por ingeniería de plantas con resistencia a enfermedad aumentada. En el pasado, la sobreexpresión constitutiva de los transgenes frecuentemente ha dado como resultado plantas de escasa calidad. Por lo tanto, se ha sugerido usar promotores inducibles a patógeno, por los cuales se expresan los transgenes solamente cuando y donde se necesite, en sitios de infección.

La expresión local e inducible de los genes modificados por ingeniería, por ejemplo genes de cambio maestros, elicitador o genes Avr, genes antimicrobianos, o genes tóxicos, da como resultado la activación de defensa o muerte celular que conducirá a resistencia a patógeno, tal como se describe por Gurr and Rushton (Trends in Biotechnology 23: 275-282, 2005). Un buen ejemplo es proporcionado por De wit (Annu. Rev. Phytopathol. 30: 391-418, 1992) quien propone el uso de la combinación Avr9-cf9 para alcanzar muerte celular inducida que conduce a resistencia a enfermedad. La especificidad a tejido y la inducibilidad de la expresión es de importancia principal para tales planteamientos, tal como se describe por Gurr and Rushton (Trends in Biotechnology 23: 283-290, 2005).

De acuerdo con la presente invención, se ha demostrado que el promotor *DMR6* demuestra una fuerte expresión inducible y localizada basada en el análisis promotor-GUS. Por tanto, el promotor *DMR6* es muy adecuado para la modificación por ingeniería de la resistencia a enfermedad en plantas transgénicas. El promotor *DMR6* consiste en una región de 2,5 kb que está en dirección 5' de la secuencia codificadora de *DMR6* de *Arabidopsis* (ATG codón de inicio) e incluye el 5'UTR (tal como se representa en la Figura 11). A continuación, se usa este promotor inducible a patógeno para modificar por ingeniería construcciones de transgen adecuados, usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

Usando secuencias de ADN ortólogas de una especie vegetal dada se diseñaron cebadores para PCR. A continuación, estos se usan para el cribado de bibliotecas genómicas de la especie vegetal de interés para identificar los clones genómicos que contienen el ortólogo *DMR6* con su promotor y secuencias reguladoras. Alternativamente, se aíslan los clones genómicos mediante cribado de una biblioteca con un fragmento de PCR marcado que corresponde al gen ortólogo *DMR6*. La secuenciación revela la secuencia de nucleótidos del promotor. A continuación la región de 2-5 kb en dirección 5' la secuencia codificadora ortóloga *DMR6* (ATG codón de inicio), incluyendo por tanto la 5'UTR, se amplifica por PCR para modificar por ingeniería construcciones de transgen para la transformación de la planta.

### Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra la complementación de *dmr6-1* mutante en *Arabidopsis thaliana* mediante ortólogos *DMR6* de 4 especies de cultivo diferentes. Para esto, los ortólogos *DMR6* de *Cucumis sativa* (Cs), *Spinacia oleracea* (So), *Lactuca sativa* (Ls) y *Solanum lycopersicum* (Sl) se clonaron dentro de un vector de expresión vegetal bajo el control del promotor 35S y, posteriormente, este vector se transformó en un mutante *dmr6-1* de *Arabidopsis thaliana*.

En resumen, se aisló ARNm usando métodos estándar y se sintetizó ADNc usando un cebador oligo dT y métodos estándar. Posteriormente, se generaron fragmentos de PCR usando pares de cebador para cada cultivo tal como se representa en la tabla 3 de a continuación. Los productos de PCR generados se clonaron en un vector pENTR/D-TOPO usando el kit de clonación pENTR/D-TOPO de Invitrogen y los plásmidos resultantes con tamaños correctos de inserto, tal como los determinados por PCR, se analizaron por secuenciación de ADN. La recombinación al vector pB7WG2,0 se hizo usando LR clonase II de Invitrogen y se analizaron los plásmidos resultantes por PCR y la digestión con enzimas de restricción. Se transformaron los plásmidos adecuados en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 PGV2260 y se analizaron los plásmidos de *Agrobacterium* por PCR y la digestión con enzimas de restricción.

Las plantas *dmr6-1* de *Arabidopsis thaliana* se transformaron con las anteriores construcciones sumergiendo en disolución de *Agrobacterium* y se verificó la sobreexpresión de cultivos *DMR6* en plantas T1 de *Arabidopsis* mediante RT-PCR usando los cebadores de clonación de cultivos *DMR6* (tabla 3). Finalmente, las plantas T2 y T3 de *Arabidopsis* fueron infectadas con *Hyaloperonospora parasitica* Cala2 para confirmar la complementación. Los resultados se muestran en la figura 4.

Tal como se muestra en la figura 14, todos los ortólogos *DMR6* ensayados eran capaces de la complementación del *dmr6-1* de *Arabidopsis thaliana* indicando que los ortólogos *DMR6* identificados codifican proteínas *DMR6* con una funcionalidad similar al *DMR6* de *Arabidopsis thaliana*.

### Tablas

La Tabla 1 enumera los números GI (del Inglés “GenInfo Identifier”) y el número de entrada de Genbank para las Etiquetas de Secuencia Expresada (ESTs, del Inglés “Expressed Sequence Tags”) y las secuencias de ARNm o proteína del ARNm de *DMR6* de *Arabidopsis* y secuencias ortólogas de otras especies vegetales. Un número GI (“genInfo identifier”, algunas veces escrito en minúscula, “gi”) es un número entero único que identifica una secuencia particular. El número GI es una serie de dígitos que se asignan consecutivamente a cada registro de secuencia procesados por NCBI. Por tanto, el número GI cambiará todas las veces que cambie la secuencia. El NCBI asigna los números GI a todas las secuencias procesadas en Entrez, incluyendo secuencias de nucleótidos de DDBJ/EMBL/GenBank, secuencias de proteína de SWISS-PROT, PIR y muchos otros. Por tanto, el número GI proporciona un identificador de secuencia único que es independiente de la fuente de la base de datos que especifica una secuencia exacta. Si se modifica una secuencia en GenBank, incluso por un par de base sencillo, se asigna un nuevo número GI a la secuencia actualizada. El número de entrada sigue el mismo. El número GI es siempre estable y recuperable. Por tanto, la referencia a los números GI en la tabla proporciona una identificación clara e inequívoca de la secuencia correspondiente.

Tabla 1

| Especie                     | Nombre común   | Detalle | Número GI | Genbank    |
|-----------------------------|----------------|---------|-----------|------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Berro de Thale | ARNm    | 42568064  | NM_122361  |
| <i>Aquilegia sp</i>         | Aquilegia      | ESTs    | 75461114  | DT768847.1 |
|                             |                |         | 74538666  | DT745001.1 |
|                             |                |         | 74562677  | DT760187.1 |
|                             |                |         | 75461112  | DT768846.1 |
|                             |                |         | 74562675  | DT760186.1 |
| <i>Citrus sinensis</i>      | Naranja dulce  | ESTs    | 5793134   | CX672037.1 |
|                             |                |         | 57933368  | CX673829.1 |
|                             |                |         | 63078039  | CX309185.1 |
| <i>Coffea canephora</i>     | Café           | ESTs    | 82485203  | DV705375.1 |
|                             |                |         | 82458236  | DV684837.1 |

ES 2 412 257 T3

| Espece                        | Nombre común     | Detalle   | Número GI | Genbank                |
|-------------------------------|------------------|---|-----------|------------------------|
|                               |                  |   | 82461999  | DV688600.1             |
|                               |                  |   | 82487627  | DV707799.1             |
| <i>Gossypium hirsutum</i>     | Algodón          | ESTs  | 109842586 | DW241146.1             |
|                               |                  |   | 48751103  | CO081622.1             |
| <i>Sorghum bicolor</i>        | Sorgo            | ESTs  | 45992638  | CN150358.1             |
|                               |                  |   | 57813436  | CX614669.1             |
|                               |                  |   | 45985339  | CN145819.1             |
|                               |                  |   | 57821006  | CX622219.1             |
|                               |                  |   | 45989371  | CN148311.1             |
|                               |                  |   | 57821495  | CX622708.1             |
|                               |                  |   | 45959033  | CN130459.1             |
|                               |                  |   | 45985193  | CN145752.1             |
|                               |                  |   | 18058986  | BM322209.1             |
|                               |                  |   | 45958822  | CN130381.1             |
|                               |                  |   | 30164583  | CB928312.1             |
| <i>Medicago truncatula</i>    | Carretón trucado | Boceto de Genoma  |           | MtrDRAFT_AC119415 g1v1 |
|                               |                  | proteína  | 92878635  | ABE85154               |
| <i>Oryza sativa 1</i>         | Arroz            | Genoma  |           | OSJNBb0060I05.4        |
|                               |                  | proteína  | 18057095  | AAL58118.1             |
| <i>Oryza sativa 2</i>         |                  | ARNm  | 115450396 | NM_001055334           |
|                               |                  | proteína  | 115450397 | NP_001048799           |
| <i>Oryza sativa 3</i>         |                  | ARNm  | 115460101 | NM_001060186           |
|                               |                  | proteína  | 115460102 | NP_001053651           |
| <i>Populus trichocarpa 1</i>  | Chopo            | Genoma: LG_XII: 3095392-3103694                           |           |                        |
|                               |                  | proteína: Popr1_1:569679, eugene3.00120332                |           |                        |
| <i>Populus trichocarpa 2</i>  | Chopo            | Genoma: LG_XV: 201426-209590                              |           |                        |
|                               |                  | proteína: Poptr_1:732726, estExt_Genewisel_v1.C_LG_XV0083 |           |                        |
| <i>Solanum lycopersicum 1</i> | Tomate           | ESTs  | 62932307  | BW689896.1             |
|                               |                  |   | 58229384  | BP885913.1             |
|                               |                  |   | 117682646 | DB678879.1             |
|                               |                  |   | 5894550   | AW035794.1             |
|                               |                  |   | 117708809 | DB703617.1             |

ES 2 412 257 T3

| Espece                           | Nombre común | Detalle | Número GI | Genbank    |
|----------------------------------|--------------|---------|-----------|------------|
|                                  |              |         | 62934028  | BW691617.1 |
|                                  |              |         | 15197716  | BI422913.1 |
|                                  |              |         | 4381742   | AI486371.1 |
|                                  |              |         | 5601946   | AI896044.1 |
|                                  |              |         | 4387964   | AI484040.1 |
|                                  |              |         | 4383017   | AI487646.  |
|                                  |              |         | 5278230   | AI780189.1 |
|                                  |              |         | 12633558  | BG133370.1 |
|                                  |              |         | 76572794  | DV105461.1 |
|                                  |              |         | 117692514 | DB718569.1 |
|                                  |              |         | 4385331   | AI489960.1 |
|                                  |              |         | 4383253   | AI487882.1 |
|                                  |              |         | 4384827   | AI489456.1 |
| <i>Solanum lycopersicum</i><br>2 | Tomate       | ESTs    | 47104686  | BT013271.1 |
|                                  |              |         | 14685038  | BI207314.1 |
|                                  |              |         | 14684816  | BI207092.1 |
| <i>Zea mays</i>                  | Maíz         | ESTs    | 110215403 | EC897301.1 |
|                                  |              |         | 76291496  | DV031064.1 |
|                                  |              |         | 91050479  | EB160897.1 |
|                                  |              |         | 91874282  | EB404239.1 |
|                                  |              |         | 110540753 | EE044673.1 |
|                                  |              |         | 78111856  | DV530253.1 |
|                                  |              |         | 94477588  | EB706546.1 |
|                                  |              |         | 71441483  | DR822533.1 |
|                                  |              |         | 78111699  | DV530096.1 |
|                                  |              |         | 78107139  | DV525557.1 |
|                                  |              |         | 76017449  | DT944619.1 |
|                                  |              |         | 91048249  | EB158667.1 |
|                                  |              |         | 78104908  | DV523326.1 |
|                                  |              |         | 78088214  | DV516607.1 |
|                                  |              |         | 76291495  | DV031063.1 |
|                                  |              |         | 71441482  | DR822532.1 |
|                                  |              |         | 78088213  | DV516606.1 |



| Especie                      | Nombre común | Detalle   | Número GI | Genbank    |
|------------------------------|--------------|---|-----------|------------|
| <i>Vitis vinifera</i>        | Uvas         | ESTs  | 33396402  | CF202029.1 |
|                              |              |   | 33399765  | CF205392.1 |
|                              |              |   | 45770972  | CN006824.1 |
|                              |              |   | 45770784  | CN006636.1 |
|                              |              |   | 45770528  | CN006380.1 |
|                              |              |   | 45770631  | CN006483.1 |
|                              |              |   | 33400623  | CF206250.1 |
|                              |              |   | 33396335  | CF201962.1 |
|                              |              |   | 30134763  | CB920101.1 |
|                              |              |   | 30305300  | CB982094.1 |
|                              |              |   | 71857419  | DT006474.1 |
|                              |              |   | 30305235  | CB982029.1 |
| <i>Zingiber officinale</i>   | Jengibre     | ESTs  | 87108948  | DY375732.1 |
|                              |              |   | 87095447  | DY362231.1 |
|                              |              |   | 87095448  | DY362232.1 |
|                              |              |   | 87094804  | DY361588.1 |
|                              |              |   | 87095449  | DY362233.1 |
|                              |              |   | 87094803  | DY361587.1 |
| <i>Lactuca sativa</i>        | Lechuga      | Secuencia descrita en esta solicitud de patente |           |            |
| <i>Spinacia oleracea</i>     | Espinaca     | Secuencia descrita en esta solicitud de patente |           |            |
| <i>Cucumis sativa</i>        | Pepino       | Secuencia descrita en esta solicitud de patente |           |            |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | Tabaco       | Secuencia descrita en esta solicitud de patente |           |            |

Tabla 2

Secuencias cebador de los marcadores de inserción/delección (diferencia de tamaño entre paréntesis) usados en el mapeo y clonación del gen *DMR6*.

| Nombre cebador | Gen          | INDEL/enzima | Cebador directo               | Cebador inverso                |
|----------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------------------------|
| IND_MOP9       | At5G24210    |              | tttgggaacagaaaaagt<br>tggaggt | catattcaaaagggaaaa<br>tcccaga  |
| IND_K16H17     | At5g24420    |              | tgggggttggtttattc<br>tggtgac  | tggccaatagtagttgat<br>acgcaaga |
| IND_T4C12      | At5g24820    |              | tctcgggtaagacacaag<br>tcgagat | tattccaacttgcgacgt<br>agagcat  |
| IND_T11H3      | At5g24950-60 |              | ccaattgggttatttact<br>tcgatt  | cggcttttaacaacatat<br>tttcca   |
| IND_F21J6      | At5g25270    |              | aacacatcaccaagatga<br>atccaga | cctctgccccagaata<br>ttgagat    |

| Nombre cebador | Gen          | INDEL/enzima | Cebador directo               | Cebador inverso               |
|----------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|
| M450           | At5G24450    | 18           | agctttgtatggtagtgc<br>caatga  | gcggtatacgggggtaa<br>aatcta   |
| M490           | At5g24490    | TaqI         | atggccaaccactctttg<br>ttac    | acaagcaagaagaacagc<br>gaag    |
| M525           | At5g24520-30 | TaqI         | gaaatttggttgttgga<br>tttatac  | tcaagatcttcatattct<br>cattcca |
| M545           | At5G24540/50 | 41           | cagctgaagtatgtttca<br>tcccttt | cttgcaattggtgggact<br>aggtaa  |
| M555           | At5G24550/60 | 14           | tcactaaccagtgaaaaa<br>ggttgc  | tatacagcgaatagcaaa<br>gccaag  |
| M470           | At5g24470    | HphI         | ccgcgagtgtaatatatc<br>tctcct  | cagtttaacgcatgaagt<br>gctagt  |
| M590           | At5g24590    | Pdml         | gcatcatttgtaccgtac<br>tgagtc  | tagtggatactctgtccc<br>tgaggt  |

Tabla 3

Pares de cebador para clonación de ortólogos *dmr6* en un vector de expresión vegetal adecuado.

|                             |                 |                             |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtDMR6_fw       | CACCATGGCGGCAAAGCTGATA      |
|                             | AtDMR6UTR_rv    | GACAAACACAAAGGCCAAAGA       |
| <i>Cucumis sativa</i>       | cuc_fw          | CACCATGAGCAGTGTGATGGAGAT    |
|                             | cucUTR_rv       | TGGGCCAAAAGTTTATCCA         |
| <i>Spinacia oleracea</i>    | spi_fw          | CACCATGGCAAACAAGATATTATCCAC |
|                             | spiUTR_rv       | TTGCTGCCTACAAAAGTACAAA      |
| <i>Lactuca sativa</i>       | Lsat_fw         | CACCATGGCCGCAAAGTCATCTC     |
|                             | LsatUTR_rv      | CATGGAAACACATATTCCITCA      |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | Slyc1dmr6_fw    | CACCATGGAAACCAAAGTATTCTAGC  |
|                             | Slyc1dmr6UTR_rv | GGGACATCCCTATGAACCAA        |

**REIVINDICACIONES**

1. Planta de lechuga que es resistente a *Bremia lactucae*, caracterizado porque la planta tiene un nivel reducido, actividad reducida o ausencia completa de proteína DMR6 en comparación con la planta que no es resistente a dicho patógeno donde
- 5 dicha planta tiene una mutación en su gen *DMR6* que da como resultado una proteína DMR6 con actividad enzimática reducida en comparación con la proteína DMR6 codificada por el gen *DMR6* tipo natural en el que no está presente tal mutación; o
- dicha planta tiene una mutación en su gen *DMR6* que da como resultado una expresión DMR6 reducida en comparación con el gen *DMR6* tipo natural donde no está presente tal mutación.
- 10 2. Planta como la reivindicada en la reivindicación 1, en la que dicha planta tiene una mutación en su gen *DMR6* que da como resultado una proteína DMR6 con actividad enzimática reducida en comparación con la proteína DMR6 codificada por el gen *DMR6* tipo natural en el que tal mutación no está presente dicha mutación en el gen *DMR6* conduce a una sustitución de aminoácidos en la proteína codificada.
- 15 3. Planta como la reivindicada en la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el gen tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos como las mostradas en la Figura 3.
4. Método para obtener una planta de lechuga que es resistente a *Bremia lactucae* que comprende la reducción del nivel endógeno de proteína DMR6 en la planta por mutación del gen *DMR6* de la planta.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la mutación se efectúa por tratamiento mutagénico de la planta, en particular con mutágenos o radiación.
- 20 6. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la reducción del nivel endógeno en la planta se alcanza al reducir la expresión del gen *DMR6* de la planta mediante silenciamiento o ARNi.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el gen *DMR6* a mutar tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos como las mostradas en la Figura 3.

Fig. 1

|                        |  |       |
|------------------------|--|-------|
| Arabidopsis            | -----MAAKLISTGFRHTTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLED-FPLIDL      | 43    |
| Aquilegia_sp           | -----MESSNVLLTGTRHSNLPENYVRSVSDRPRLSEVKDCEN-VPVIDL     | 44    |
| Citrus_sinensis        | -----MDTKVLSSGIRYTNLPEGYVRPESERPNLSEVSECKN-VPVIDL      | 43    |
| Coffea_canephora       | -----METKVISSGIKYTSLPESYVRPESERPRLESEVSDCQN-VPVVDL     | 43    |
| Cucumis_sativus        | -----MSSVMIEIQLLCSGGRHEKLPKYEKRPESDRPRLSEVCCWDK-VPIIDL | 47    |
| Gossypium_hirsutum     | -----MDTKVLSSGIHYSSLPESYVRPESERPRLESEVSDCQN-VPVIDL     | 43    |
| Lactuca_sativa         | -----MAAKVISSGFRYTTLPESYVRPVDNRPNLSQVSDCND-VPVIDI      | 43    |
| Medicago_truncatula    | -----MDTKVLSSGIHYSKLPESYIRPESDRPCLSQVSEFEN-VPIIDL      | 43    |
| Oryza_sativa_1         | MAAEAEQQHQLLSTAVH-DTTPGKYVRPESQRPRLDLVSDAR-IPVVDL      | 48    |
| Oryza_sativa_2         | -----MADQLISTADH-DTLPNGYVRPEAQRPRLDVLSAS-IPVVOL        | 42    |
| Oryza_sativa_3         | -----MATTQLLSTVEHRETLPEGYARPESDRPRLAEVATDSN-IPVVDL     | 44    |
| Populus_trichocarpa_1  | -----MDTKVLSSGIQYTNLPASYVRPESERPRLESEVSTCEN-VPVIDL     | 43    |
| Populus_trichocarpa_2  | -----MDTKVISSGVHYTNLPASYVRPESERPRLESEVSTCED-VPVIDL     | 43    |
| Solanum_lycopersicum_1 | -----METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVVDCCEN-VPIIDL     | 43    |
| Solanum_lycopersicum_2 | -----MTTTSVLSGGFNHSTLPQSYVRPESQRPCMSVVDSDLLVPVIDM      | 45    |
| Sorghum_bicolor        | -----MAEQLLSTAVH-DTLPQSYVRPESQRPRLAEVVTGAR-IPVVDL      | 42    |
| Spinacia_oleracea      | -----MANKILSTGIPYKTLPESYIRPENERPNLSQVSDCEN-VPVIDL      | 43    |
| Vitis                  | -----MESKVLSTGIRYTLTPQSYIRPEPERPRLSQVSECKH-VPIIDL      | 43    |
| Zea_mays               | -----MAEHLSTAVH-DTLPQSYVRPEPERPRLAEVVTGAR-IPVVDL       | 42    |
| Zingiber_officinale    | -----MADMLLSIGEH-DTMAPRNYVRPENERPHLDNVIADAN-IPVVDL     | 42    |
|                        | ..* * * ..** : *                                       | ..**: |
| Arabidopsis            | S-STDRSFLIQIHOACARFGFFQVINHGVNKQIIDEMVSVAREFFSMSM      | 92    |
| Aquilegia_sp           | S-VADESLLAQQIGNACKSHGFFQVINHGVNSELVEKMMEISHEFFHLPL     | 93    |
| Citrus_sinensis        | A-CDDRSLIVQQVADACKNYGFFQAINHEVPLETVERVLEVAKEFFNLPV     | 92    |
| Coffea_canephora       | G-FGDRNLMVRQIGDACRDYGFQVINHGVSKDAVDKMLTATEFFSLPV       | 92    |
| Cucumis_sativus        | G-CEEREMIVKQVEEACKSYGFFQVINHGVKELVEKVIIEVGKQFFELPM     | 96    |
| Gossypium_hirsutum     | G-CEDRSHIVQIALACINYGFFQVINHGVSKAEVERMLQVAHDFGLPV       | 92    |
| Lactuca_sativa         | G-CGDRQLISQQIGDACRRYGFQVINHGVPEIIEKMQQVGREFFLLPV       | 92    |
| Medicago_truncatula    | G-SHNRTQIVQQIGEACSSYGFFQVNVHGVPLEELKKTAEVAYDFFKLPV     | 97    |
| Oryza_sativa_1         | A-SPDRAAVVSAVGDACTRTHGFFQVNVHGI DAALIASVMEVGREFFRLPA   | 92    |
| Oryza_sativa_2         | A-NPDRAKLVSQVGAACRSHGFFQVNLHGVPELTLVLAHADFFRLPA        | 91    |
| Oryza_sativa_3         | A-SPDKPRVIAETAQACRTYGFQVTVNHGIAEELLEKVMVALEFFRLPP      | 93    |
| Populus_trichocarpa_1  | G-CQERDQIVQQVGDACKNYGFFQVINHGVSLAEVEKMLGVHADFFSLPV     | 92    |
| Populus_trichocarpa_2  | G-CQDRNQIVQQVGDACEHYGFQVINHGVSLAEVEKMLGVHADFFSLPV      | 92    |
| Solanum_lycopersicum_1 | S-CGDAQIIRQIGEACQTYGFFQVINHGVKPEVVEKMLGVAGEFFNLPV      | 92    |
| Solanum_lycopersicum_2 | S-CTNRNVIVHQIGEACRLYGFFQVINHGVSKKVIDEMLGVSHFFKLPV      | 94    |
| Sorghum_bicolor        | G-SPDRAAVVAIGDACRSHGFFQVNLHGVHADLVAAMVAVGRAFFRLSP      | 91    |
| Spinacia_oleracea      | G-AKDRQTIVHQVFNACKNYGFFQVINHGVSKELAEKMKVAREFFDMSV      | 92    |
| Vitis                  | G-KDVNRAQLIQIADACRLYGFFQVINHGVAAEMMEKMLEVADEFYRLPV     | 93    |
| Zea_mays               | G-SPDRGAVVAVGDACRSHGFFQVNVHGIHAALVAAMVAVGRAFFRLPP      | 91    |
| Zingiber_officinale    | G-APDKSQIISQIEKACRLYGFFQVNVHGIHAELIKKVLAIADLEFFRLPQ    | 91    |
|                        | .. : ** .****. ** : ..* : .:                           |       |

Fig. 1 (continuación)

|                        |   |     |
|------------------------|---|-----|
| Arabidopsis            | EEKMKLYSDDPTKTRRLSTSFNVKKEEVNWRDYLRLHCYPIHKYVNEWP   | 142 |
| Aquilegia_sp           | DVKMQFYSDPTKTRRLSTSFNLKKEVHNWRDYLRLHCHPIEKYVQEW     | 143 |
| Citrus_sinensis        | EEKLKLYSDDPSKTRRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDKYVPEW   | 142 |
| Coffea_canephora       | EEKLKLYSDDPSKTRRLSTSFNVKKEQVHNWRDYLRLHCYPLEKYVPEW   | 142 |
| Cucumis_sativus        | EEKLKLYSDDPSKTRRLSTSFNVKKEQFRNWRDYLRLHCYPLSNYTPHWP  | 146 |
| Gossypium_hirsutum     | EEKMKLYSDDPSKTRRLSTSFNVKKEQVHNWRDYLRLHCYPLDQYVPEW   | 142 |
| Lactuca_sativa         | EEKMKLYSDDPTKTRRLSTSFNVNKEEVNWRDYLRLHCYPLDNYVPEW    | 142 |
| Medicago_truncatula    | EEKMKLYSDDPAKKIRLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCYPLHQVFPDW    | 147 |
| Oryza_sativa_1         | EEKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCYPLHRYLPDWP   | 141 |
| Oryza_sativa_2         | EEKELKLYSDEPSKTRRLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCHPLEEFVPEW   | 143 |
| Oryza_sativa_3         | EEKLKLYSDDPSKTRRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDKYVPEW   | 142 |
| Populus_trichocarpa_1  | EEKLKLYSDDPSKTRRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDKYVPEW   | 142 |
| Populus_trichocarpa_2  | EEKLKLYSDDPSKTRRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDKYVPEW   | 142 |
| Solanum_lycopersicum_1 | EEKMKLYSDDPSKTRRLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCYPLDKYVPEW    | 144 |
| Solanum_lycopersicum_2 | EEKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCHPLEEFVPEW    | 141 |
| Sorghum_bicolor        | EEKMKLYSDDPTKTRRLSTSFNVNKEEVNWRDYLRLHCYPLDQYVPEW    | 142 |
| Spinacia_oleracea      | EEKMKLYSDDPTKTRRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDQYVPEW   | 143 |
| Vitis                  | EEKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCHPLEEFVPEW    | 141 |
| Zea_mays               | EEKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCYPLEEFVPEW    | 141 |
| Zingiber_officinale    | : * : ** : * : : . ***** : ** . ***** * : : . **    |     |
| Arabidopsis            | SNPPSFKEIVSKYSREVEVGFKEELISESLGLEKDYMKKVLGEQGHM     | 192 |
| Aquilegia_sp           | SVPSTFKDVFVATYCKEVRKGLRLLGSI SLSLGLLEEDYIEKVLGDQGHM | 193 |
| Citrus_sinensis        | SNPSTFKDFVSTYCEVREGLGYRVELISESLGLEKDYIKKVLGEQGHM    | 192 |
| Coffea_canephora       | SNPPSFKEIVSVCYQVRELGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGDQGHM    | 192 |
| Cucumis_sativus        | SNPPSFREIVSSYCNVREKVGRIEELISESLGLEKEYIRKKLGEQGHM    | 196 |
| Gossypium_hirsutum     | SNPPSFQIVSDYCVRELGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM      | 192 |
| Lactuca_sativa         | SNPSYFKEYVGNCTAVRNLGRIEELISESLGLEKDYLRNALGEQGHM     | 192 |
| Medicago_truncatula    | SNPPSFKEIVANVCKEVRLEGLRIEYISESLGLEKDYLRNALGEQGHM    | 192 |
| Oryza_sativa_1         | SNPPSFKEIIGTYCTEVRLEGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM   | 197 |
| Oryza_sativa_2         | SNPPSFREIISTYCKEVRLEGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM   | 191 |
| Oryza_sativa_3         | SNPAQFKEIMSTYCREVRLGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM    | 193 |
| Populus_trichocarpa_1  | SKPPPFKDIVSSYCIQVRELGFRIQELISESLGLEKDYLRNALGEQGHM   | 192 |
| Populus_trichocarpa_2  | SNPPPFKEIVRSYSIQVRELGFRIQELISESLGLEKDYLRNALGEQGHM   | 192 |
| Solanum_lycopersicum_1 | SNPPSFREIVSRVYCREIRQLGFRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM  | 192 |
| Solanum_lycopersicum_2 | SNPPSFREIVSKYCMVRELGYRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM    | 194 |
| Sorghum_bicolor        | SNPPDFKDMSTYCKEVRLEGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM    | 191 |
| Spinacia_oleracea      | SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRIQELISESLGLEKDYLRNALGEQGHM   | 192 |
| Vitis                  | SNPPSFKEIVSSYCKEVRLEGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM   | 193 |
| Zea_mays               | SNPPDFKDMSTYCKEVRLEGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGEQGHM    | 191 |
| Zingiber_officinale    | SNPPSFKDVFGSYCQVRKLGFRILGII SLSLGLLEEEYLVRVLEGEQGHM | 191 |
|                        | * * . * : . . * : * : : * : * * : : : * : * * *     |     |
| Arabidopsis            | AVNYYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDQTVCGQLIIL-DGQWFAV  | 241 |
| Aquilegia_sp           | AVNYYPPCPEPELTYGLPRHTDPNTITILLQDQEVAGLQVLH-NGKVVAV  | 242 |
| Citrus_sinensis        | AVNYYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLK-DDKVVAV  | 241 |
| Coffea_canephora       | AVNYYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLNVAGLQVLR-DGRWLVAV | 241 |
| Cucumis_sativus        | AIVNYYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAV | 245 |
| Gossypium_hirsutum     | AVNYYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV  | 241 |
| Lactuca_sativa         | AINHYVPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLVSGIQLVK-DGKWLAV   | 241 |
| Medicago_truncatula    | AVNYYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAI  | 241 |
| Oryza_sativa_1         | AVNYYPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDDQVAGLQVLNDG-KWIAV   | 246 |
| Oryza_sativa_2         | AVNYYPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDDQVAGLQVLNDG-KWIAV   | 240 |
| Oryza_sativa_3         | AVNYYPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDDQVAGLQVLNDG-KWIAV   | 243 |
| Populus_trichocarpa_1  | AVNYYPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDQSVAGLQVLK-DGKVVAV   | 242 |
| Populus_trichocarpa_2  | AVNYYPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV   | 241 |
| Solanum_lycopersicum_1 | AIVNYYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV | 241 |

Fig. 1 (continuación)

|                        |  |     |
|------------------------|--|-----|
| Solanum_lycopersicum_2 | AINFYPCPQPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLSI    | 243 |
| Sorghum_bicolor        | AVNFYPCPPELTYGLPAHTDPNALTILLMDQDVAGLQVLHGG-KWVAV     | 240 |
| Spinacia_oleracea      | ALNYYPECPEFEMTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVSGLQIFK-DGKWLAV   | 241 |
| Vitis                  | AVNYYPCPQPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLRVAGLQVLK-DGTWLAI    | 242 |
| Zea_mays               | AVNFYPCPPELTYGLPAHTDPNALTILLMDPDVAGLQVLHAG-QWVAV     | 240 |
| Zingiber_officinale    | AVNYYPKCPELTYGLPAHTDPNALTILLQDPHVSGLQVHKDG-KWIAV     | 240 |
|                        | *:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:           |     |
| Arabidopsis            | NPHFDAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVTNTENPRLSVASFLCPADC   | 291 |
| Aquilegia_sp           | NPYNFAFVFNIGDQIQALSNGNYASVWHRAVTNTDRERISVASFLCPAND   | 292 |
| Citrus_sinensis        | NPLNFAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAIVNAEKARMSVASFLCPND    | 291 |
| Coffea_canephora       | KPHFDAFVFNIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVDQPRLSVASFLCPCDH     | 291 |
| Cucumis_sativus        | NPHFAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVVDKPRLSVASFLCPCDD      | 295 |
| Gossypium_hirsutum     | NPQTNAFVINIGDQLQALSNGTYKSVWHRAIVNTDKPRMSVASFLCPYDH   | 291 |
| Lactuca_sativa         | KPHFAFVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRAVVDNPRMSIASFLCPCND      | 291 |
| Medicago_truncatula    | NPIFDAFVINIGDQLQALSNGLYKSVWHRAIVNAEKPRLSVASFLCPDNE   | 291 |
| Oryza_sativa_1         | NPQPGALVINIGDQLQALSNGKYSVWHRAVVDSDRERMSVASFLCPCNS    | 296 |
| Oryza_sativa_2         | NPQPNALVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVVDSDKARMSVASFLCPCND   | 290 |
| Oryza_sativa_3         | NPRPNALVFNIGDQIQALSNDAYKSVWHRAVVDNPQERMSVASFMCPCNS   | 293 |
| Populus_trichocarpa_1  | DPHFDAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFLCPYDN   | 291 |
| Populus_trichocarpa_2  | NPHFDAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFLCPCFN   | 292 |
| Solanum_lycopersicum_1 | KPQPDFAFVINIGDQLQAVSNGKYSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDS   | 291 |
| Solanum_lycopersicum_2 | KPQPNFAFVINIGDQLEALSNGKYKSIWHRAIVNSDQARMSVASFLCPNDC  | 293 |
| Sorghum_bicolor        | NPQPGALVINIGDQLQALSNGQYKSVWHRAVVDSDRERMSVASFLCPCNH   | 290 |
| Spinacia_oleracea      | KPQPDFAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVDKPRLSVASFLCPCAND   | 291 |
| Vitis                  | KPHGFAFVFNIGDQLQAVSNGKYSVWHRAVVDNAESERLSVASFLCPCND   | 292 |
| Zea_mays               | NPQPGALVINIGDQLQALSNGQYKSVWHRAVVDSDRERMSVASFLCPCNH   | 290 |
| Zingiber_officinale    | DPKPNFAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVVDNSKERMSVASFLCPCNS  | 290 |
|                        | * ..*:::*:*:*:*:*:*:* * *:*:* * * *:*:*:*:*:         |     |
| Arabidopsis            | AVMSPAKFLWEAEDOETKPVYKDFTYAEYYKFFWRSRNLQEHCLFNFLNN   | 341 |
| Aquilegia_sp           | AIIICPA---VKDG---SPSMYKKFTYDEYYKFFWRSRNLQDQHCLFLFKE- | 335 |
| Citrus_sinensis        | AMISPPKALTEDG---SGAVYRDFTYAEYYSKFFWRSRNLQEHCLFLFKN-  | 337 |
| Coffea_canephora       | AVISAPKPLTADG---SPVVYRDFTYAQYYKFFWRSRNLQEHCLFLFKN-   | 337 |
| Cucumis_sativus        | ALITPAPLLSQ----PSPIYRPFYQYYNTFWRSRNLQDQHCLFLFKNH     | 340 |
| Gossypium_hirsutum     | ALISPAKFLTQHG---CGAVYRDFTYAEYYSKFWRNLQDQHCLFLFKN-    | 337 |
| Lactuca_sativa         | TVIRAPKEIIEG---SKPVYKFTYAEYYAKFWRNLQEHCLFCKN-        | 337 |
| Medicago_truncatula    | ALICPAKFLTEDG---SGAVYRGTPEYYKFFWRSRNLQEHCLFCKN       | 338 |
| Oryza_sativa_1         | VELGPAKLLITDD---SPAVYRNNTYDEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFRT-   | 342 |
| Oryza_sativa_2         | VLIIPAQKLITDG---SPAVYRNNTYDEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFRT    | 337 |
| Oryza_sativa_3         | AVISPAKFLVADG---DAPVYRSFTYDEYYKFFWRSRNLQEHCLFCKGQ    | 340 |
| Populus_trichocarpa_1  | ALITPPKALTDDG---TGAVYRDFTYAEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFKNK   | 338 |
| Populus_trichocarpa_2  | ALITPPKALTDDG---TGAVYRDFTYAEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFKN-   | 338 |
| Solanum_lycopersicum_1 | AKISAPKLLTEDG---SPVIYQDFTYAEYYNKFWRNLQDQHCLFLFKN-    | 337 |
| Solanum_lycopersicum_2 | SIIISAPKLLTEDG---SSAIYRHFTYAEYYKFFWRSRNLQDQHCLFLFKN  | 340 |
| Sorghum_bicolor        | VVLGPAKLLVTD---TPAVYRSYTYDEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFRT-    | 336 |
| Spinacia_oleracea      | ALISAPTLTANG---SPAVYRDYTYEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFKNQ     | 338 |
| Vitis                  | AVIGPAKPLTEDG---SAPIYKNFTYAEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFKN-   | 338 |
| Zea_mays               | VVLGPAKLLVTD---TPAVYRNNTYDKYYAKFFWRSRNLQEHCLFLFRT-   | 336 |
| Zingiber_officinale    | VLISEPEKLIADG---CPAVYRSYTYDEYYKFFWRSRNLQEHCLFLFKE    | 337 |
|                        | : .. : :: : * * : * * : * * : * * : * * : * * :      |     |

Fig. 1 (continuación)

|                        |           |     |
|------------------------|-----------|-----|
| Arabidopsis            | -----     |     |
| Aquilegia_sp           | -----     |     |
| Citrus_sinensis        | -----     |     |
| Coffea_canephora       | -----     |     |
| Cucumis_sativus        | PP-----   | 342 |
| Gossypium_hirsutum     | -----     |     |
| Lactuca_sativa         | -----     |     |
| Medicago_truncatula    | -----     |     |
| Oryza_sativa_1         | -----     |     |
| Oryza_sativa_2         | PTDTS---- | 342 |
| Oryza_sativa_3         | -----     |     |
| Populus_trichocarpa_1  | -----     |     |
| Populus_trichocarpa_2  | -----     |     |
| Solanum_lycopersicum_1 | -----     |     |
| Solanum_lycopersicum_2 | GT-----   | 342 |
| Sorghum_bicolor        | -----     |     |
| Spinacia_oleracea      | T-----    | 339 |
| Vitis                  | -----     |     |
| Zea_mays               | -----     |     |
| Zingiber_officinale    | RETCPDAPT | 346 |

Fig. 2

```

> CDS DMR6 Arabidopsis thaliana (gi 42568064, Genbank NM_122361)
ATGGCGGCAAAGCTGATATCCACCGGTTCCGTCATACTACTTTGCCGGAAAACATATGTCGGCCAATCT
CCGACCGTCCACGTCTCTCTGAAGTCTCTCAACTCGAAGATTTCCCTCATCGATCTCTCTCCACTGA
TCGATCTTTTCTCATCCAACAAATCCACCAAGCTTGTGCCGGATTCCGGATTTTTTCAGGTCATAAATCAC
GGAGTTAACAAACAAATAATAGATGAGATGGTGAGTGTGCGCGTGAGTTCTTTAGCATGTCTATGGAAG
AAAAATGAAGCTATATTCAGACGATCCAACGAAGACAACAAGATTATCGACGAGCTTCAATGTGAAGAA
AGAAGAAGTCAACAATTGGAGAGACTATCTAAGACTCCATTGTTATCCTATCCACAAGTATGTCAATGAG
TGGCCGTCAAACCCCTCCTTCTTTCAAGGAAATAGTAAATAACAGTAGAGAAGTAAGAGAAGTGGGAT
TTAAATAGAGGAATTAATATCAGAGAGCTTAGGTTTAGAAAAAGATTACATGAAGAAAGTGCTTGGTGA
ACAAGGTCAACACATGGCAGTCAACTATTATCCTCCATGTCTGAACTGAGCTCACTTACGGTTTACCT
GCTCATACCGACCCAAACGCCCTAACCATTCTTCTTCAAGACACTACTGTTTGGGGTCTCCAGATCTTGA
TCGACGGTCAAGTGGTTCGCCGTTAATCCACATCCTGATGCTTTTGTCAACAACATAGGTGACCAGTTACA
GGCATTAAAGTAATGGAGTATACAAAAGTGTTTGGCATCGCGCTGTAAACAAACACAGAAAATCCGAGACTA
TCGGTGCATCGTTTTCTGTGCCAGCTGACTGTGCTGTGATGAGCCCGCCAGCCCTTGTGGGAAGCTG
AGGACGATGAAACGAACCAAGTCTACAAGATTTCACTTATGCAGAGTATTACAAGAAGTTTTGGAGTAG
GAATCTGGACCAAGAACATTGCCTCGAGAATTTCTAAACAATAA

```

```

> proteína DMR6 Arabidopsis thaliana (gi 15238567, Genbank NP_197841)
MAAKLISTGFRHTTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLEDFPLIDLSSDRSFLIQQIHQACARFGFFQVINH
GVNKQIIDEMVSVAREFFSMSMEEKMKLYSDDPTKTTRLSTSFNVKKEEVNNWRDYLRLHCYPIHKYVNE
WPSNPPSFKEIVSKYSREVREVGFKIEELISESLGLEKDYMKKVLGEQQHMAVNYYPPEPELTYGLP
AHTDPNALFILLQDFTVCGLQILIDGQWFAVNPFPDAFVINIGDQLQALSNGVYKSVVHRAVTNTENPRL
SVASFLCPADCAVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYKFKFWSRNLQEHCLNPLNN*

```



Fig. 3

```

> CDS ortólogo DMR6 Lactuca sativa
ATGGCCGCAAAAGTCATCTCCAGTGGATTCCGGTATACTACTCTACCGGAGAGCTACGTCGGTCCGGTTAA
CGACAGACCTAACCTATCTCAAGTTCCGATTGCAACGACGTTCTGTTATTGACATCGGTTGTGGTGATA
GACAACTCATAAGCCAACAAATGGCGATGCTTGTAGAAGATACGGTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGT
GTGCCTGATGAAATAGTGGAGAAAATGCAACAAGTAGGTAGGGAGTTTTTCTGTTGCTGTGGAGAGAA
GATGAAGCTTTACTCAGAGGATCCATCGAAGACGATGAGGCTATCCACCAGCTTTAACGTCCAAAAAGAAC
AAATTCATAACTGGCGAGATTATCTCCGCCTTCACTGTATCCTCTGGATCAATACAGTCCTGAATGGCCT
TCAAATCCTTCTTATTTCAAGGAATATGTTGGTAATTATTGTACAGCAGTGCAGAAATTTAGGAATGAGAAT
ATTAGAATCAATATCAGAAAGTTTAGGGTTACAAAAAGAGAAATAAAACTATATTAGGCGATCAAGGTC
AACACATGGCCATCAACCATACCCAGTGTGCCCTGAGCCCGAGCTAACCTACGGGCTACCCGGGCACACA
GACCCCAATGCTCTCACCATCCTTCTACAGGACACACTGGTCTCTGGTCTTCAGGTTCTCAAAGATGGCAA
ATGGTTAGCCGTTAAACCACCCCTAATGCCTTGTAAATTAACATTGGTGTACAGTTAGAGGCGGTGAGTA
ATGGTGAATATAAAAGTGTATGGCATCGAGCTGTGGTTAACTCAGACAACCCGCGAATGTCTATAGCTTCG
TTTTTGTGCTTGTAAATGACACCGTTATTAGGGCTCCTAAAGAAATAATAAGGAAGGATCGAAACCTGT
TTTCAAAGAATTTACTTATGCAGAATACTACGCGAAGTTTTGGACAAGAACCTTGATCAAGAACATTGCT
TAGAATTCTTCAAGAACTAG

> proteína ortólogo DMR6 Lactuca sativa
MAAKVISSGFRYTTLPESYVRPVNDRPNLSQVSDCNDVPVIDIGCGDRQLISQQIGDACRRYGFQVINHG
VPDEIVEKMQQVGREFFLLPVEEKMKLYSEDPKTMRLSTS FNVQKEQIHNRDYLRLHCYPLDQYSPEWF
SNPSYFKEYVGNVYCTAVRNLMRILESISESLGLQKEIKTILGDQGHMAINHYVPCPEPELTYGLPGHT
DPNALTILLQDTLVSLQVLKDGKWLAVKPHNAFVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRAVVNSDNPRMSIAS
FLCPCNDTVIRAPKEIIKEGSKPVFKEFTYAEYYAKFWTRNLQEHCLFFPKN*
    
```

Fig. 4

```
> CDS ortólogo DMR6 Spinacia oleracea
ATGGCAAACAAGATATTATCCACCGGAATTCCTTACAAAACCCCTCCCGAAAGCTACATCCGACCCGAAAA
TGAGAGGCCCAACTTATCTCAAGTCTCCGATTGCGAGAAATGCCCTGTTATTGACTTGGGTGCCAAAGACC
GTA CTCAAACAATCCACCAAGTCTTCAATGCTTGTAAAAATTACGGGTTTTCCAGGTGATTAATCATGGG
GTGTCAAAGGAATTAGCGGAGAAGATGCAAAAGGTAGCTCGAGAGTTCCTCGATATGTCGGTTGAGGAAAA
AATGAAATATATAGTGACGATCCAACTAAAACACTAAGATTGTCTACAAGTTTTAACGTTAACAAAGAGG
AAGTTCATAATTGGAGAGATTATCTTAGGCTCCATTGTTGGCCTCTTGAGCAATATGTCGCCGAATGGCCT
TCTAACCCCTTCTTCAAGGAAATAGTGAGCAAGTACATAAAAGAAGTTAGGGAAGTTGGTTTCAGAGT
CCAAGAATAATATCAGAGAGTTTAGGGTTGGAGAAAGATTACATAAAGAATGTCTTAGGAGATCAAGGAC
AACACATGGCTCTTAATTATTACCCTGAGTCCCGGAGCCAGAGATGACATACGGGTTGCCGGGTCATACT
GACCCTAATGCCCTTACCATCCTTCTCCAAGACTTGCAAGTATCTGGCCTTCAAATTTTTAAGGATGGTAA
ATGGCTTGCTGTCAAACCTCAACCTGATGCTTTTGTCAATTAACATTGGTGATCAATTGCAGGCATTAAGTA
ACGGTATATACAAGAGTGTATGGCACAGAGCAGTTGTGAACACAGATAAGCCAAGATTATCAGTAGCTTCA
TTCCTCTGCCCGCCAATGATGCGTTGATAAGCGCGCCAACACCTCTGACCGCCAACGGATCACCGGCTGT
ATATAGAGACTATACGTATCCTGAGTACTACAAGACTTCTGGAGTAGGAACTTGGACCAAGAGCACTGCT
TGGAGCTTTTTAAAARCCAAACCTAG
```

```
> proteina ortólogo DMR6 Spinacia oleracea
MANKILSTGIPYKTLPEYIRPENERPNLSQVSDCENVPVIDLGAKDRQTIIHQVFNACKNYGFFQVINHG
VSKELAEKMQKVARFFDMSVEEKMKLYSDDPTKTLRLSTSFNVNKEEVHNWRDYLRLHCWPLEQYVPEWP
SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRVQEFJ.I.SESLGLKQYIKNVLGQQQHMLNYYECPPEPEMTYGLPGHT
DPNALTILLQDLQVSLQIFKDGKWLAVKPPDAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRVVNTDKPRLSVAS
FLCPANDALISAPTPLTANGSPA VYRDYTYPEYYKTFWSRNLQEHCLLEFKNQ+
```

Fig. 5

```

> CDS ortólogo DMR6 Cucumis sativus
ATGAGCAGTGTGATGGAGATCCAAC TTTTGTGTTCAGGGGGACGTCACGAGAAGTTGCCAGAGAAGTATGA
ACGGCCTGAATCGGATAGGCCGCGGCTGTCGGAGGTGTGTGTTGGGACAAGGTTCCAATAATCGACTTGG
GATGCGAGGAGAGAGAGATGATTGTGAAGCAAGTGGAGGAGGCCTGCAAGTCTTACGGCTTTTCCAGGTT
ATAAATCATGGTGTGAGGAAGGAATGGTGGAGAAAGTGATAGAAGTTGGCAAGCAGTTCCTTGAGCTGCC
GATGGAGGAGAAGTTGAAATTTTATTTCAGACGACCCTTCCAAGACCGTCAGACTCTCCACAAGTTTCAATG
TCCGGAAGAGCAATTCGCAACTGGAGGGATTATCTCAGACTCCATTGCTATCCTCTCTCCAAC TACACC
CCCCATTGGCCCTCTAACCCACCATCCTTCAGGGAAATAGTGAGTAGTTATGCAATGAAGTACGAAAAGT
TGGGTACAGAATAGAGGACCTAATATCGGAGAGCTTGGGGCTGGAGAAGGAATACATAAGGAAGAAGTTGG
GTGAACAAGGTCAGCACATGGCTATAAAT TATTATCCGCCATGTCCCCAACAGAACTCACC TACGGGCTC
CCTGGCCATACGGATCCCCAACGCACTCACCATTCTCCTTCAGGATCTCCATGTCGCCGGCCTCCAAGTCTC
CAAAGATGGAAAGTGGCTAGCGGTCAACCCCCACCCCAATGCCTTTGTAATCAATATAGGCGACCAATTGC
AGGCATTGAGCAATGGGGTGTACAAGAGCGTTTGGCACCAGCGGTGGTCAATGTTGATAAGCCAGGCTG
TCGGTCGCTTCTTTTCTCTGCCCTTGTGATGACGCCCTCATTACTCCTGCACCGCTCCTCTCCAGCCTTC
CCCCATTACAGACCTTTCACCTACGCCCAGTACTACAATACTTTTGGAGCAGAAAAC TGGATCAACAAC
ATTGCTTGGAACTATTTAAAAACCACCTCCTTAA

> proteína ortólogo DMR6 Cucumis sativus
MSSVMEIQLLCSGGRHEKLPEKYERPESDRPRLSEVCCWDKVP IIDLGCEEREMIVKQVEEACKSYGFFQV
INHGVRKELVEKVI EVGKQFFELPMEEKLKFYSDDP SKTVRLSTSFNVRKEQFRNWRDYLR LHCYPLSNYT
PHWPSNPPSFR EIVSSYCNEVRKVGYRIEELISESLGLEKEYIRKKLGEQQQHMAINYYPPCQPELTYGL
PGHTDPNAL TILLODLHVAGLQVLKDGKWLAVNPHPNAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVVNVDPRL
SVASFLCPCDDALITPAPLLSQSPPIYRPFYTAQYYNTFWSRNLDOQHCL ELFKNHPP*
    
```

Fig. 6

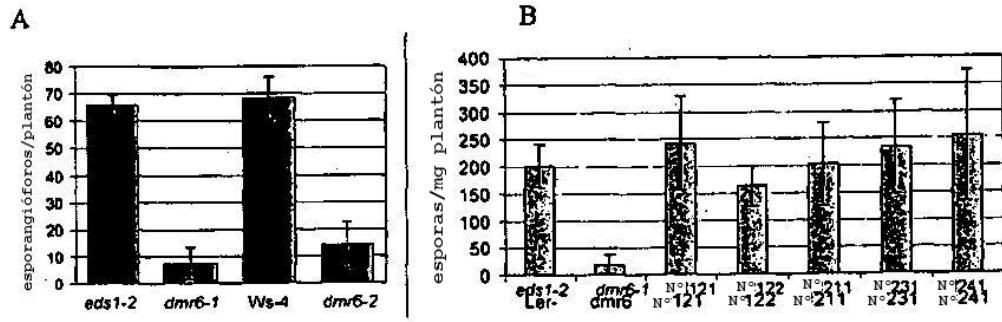


Fig. 7

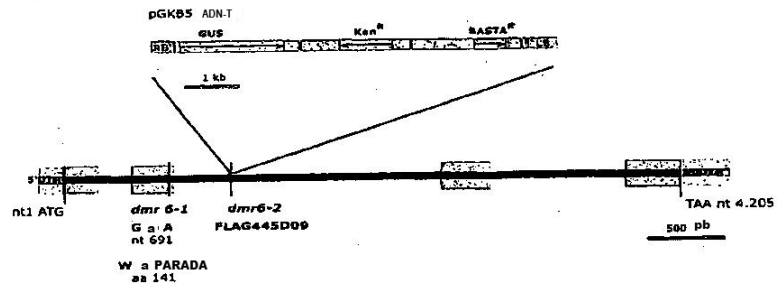


Fig. 8

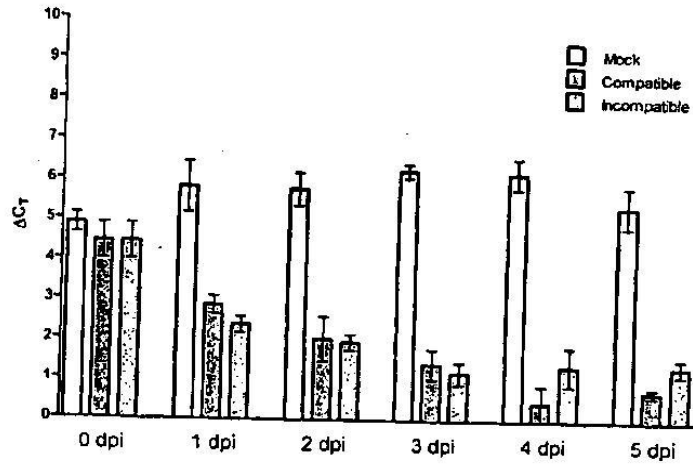


Fig. 9

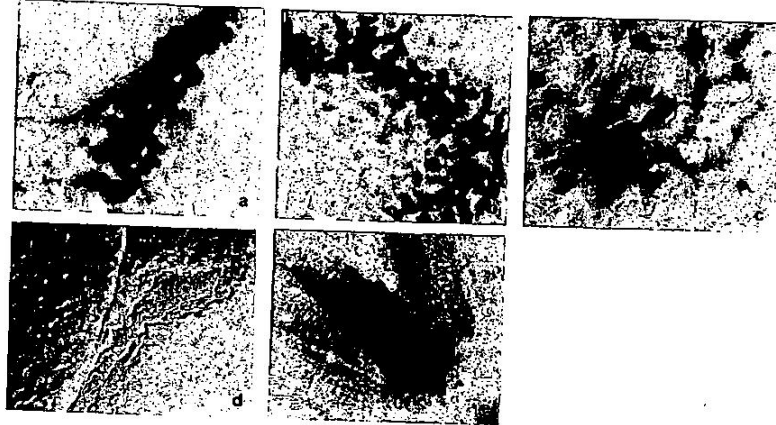


Fig. 10

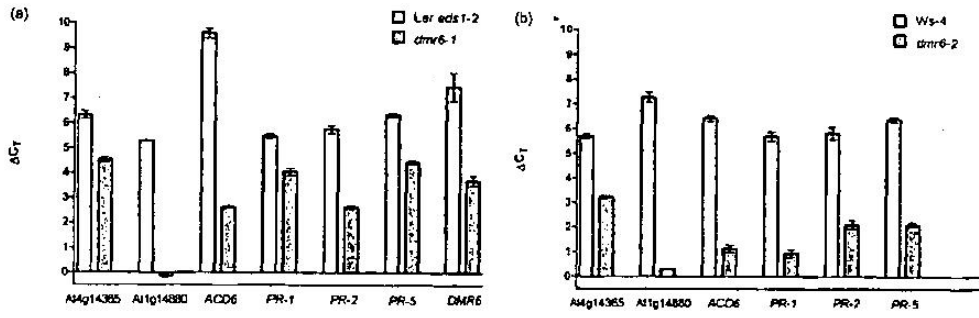




Fig. 11

catttttctataaatacacaactacaactctacttt  
ctttaaactataaaccataaacacttttttaaacctcaaacccgatatataaatttggtttaatttaaaactctagtgacttattttataaaccceaaa  
cctaaaaaataaattcgtttttattgtaaaatttaaaccttaaaatttaaaacttaaaactgactataaatttggtttaattgtaaaactaaattttta  
aatataatatacttggtttaattaaagatacagatttggtttttagttattataataataatgataataaactagtttaaaactaaagtaagattt  
attcttagaggttaaatgcaagtaattgtccgaaaaaacaactcaaatcaagtagtccgaaaaaatactaaactagttgataagtttaaaatttggatt  
taaaaaaggaaaaaaaatacaacaagataataatagaagtgtgacacacggcacaagagtcacagtagtactatcaagattgactctgtctga  
gtctgaagtcocaaaccatgatggaccactccacatacagatcgtgcccgtatttggatagatacagacagtggtttcgtttggacacgtgtcct  
gctttatctctcgtcgcaccaaaaalaccacaatgctttatctcaaccacaggttctcgtctatcccaacctcaaatgttaccaaaaatacacact  
ttgcatggaagattttctaaattacaactcacattatcogaatttaaatcogattttttagtttcaagaaaactcattctttgatgggtacttgtctta  
tttaacaggttgcatacctgtattcattgttctgccaatgaaaaaaaatgaaaatgaaaatgattcattgtttaaataaaagtaaaactaaacatcacga  
caaatctctgtctagcttaaatatttaatacaactcaaaogatttcaacaacttttataattcaaaaaataagttacatactttgttttaacat  
aaataataaaaaataaacatgaataaattatttaacataaaaaaactcagttttcaaaaaatagtttagaagtttaagttctaaataaagtaaaatg  
aatgctgttttaagacgaactagataaatttttttaataaaaaccgagatacatttaaatctctaaataaactataaactaaattggttacatata  
tctaccaatttaactcattgtaaatataaaactgatttttagtaacaattaaagcagtaagagatgctagcgcctaaataaacgacttctaaatcccacttc  
ttgaaatattgttttaactaaatcaaaaaataatagttataataaccacaataataatgaaatttaaaacttaagtaactgaaatacccacaactaa  
aaaaaaaaccacaataataatataaataaagaatattgattttacactcgaataatacaataaattgatttcaacttaagtaactgaaatacccacaactaa  
atcaagaaccgaatgggttttccaaaccaaaaccgagatttgaattttagtgcactcctcaacttaagcagtaagagatgctagcgcctaaataaacgacttctaaatcccacttc  
gatttagctagatcggtttggttcgttttggattctctcgtcactcctcaactcgtttattgtttacactcgaataatacaataaattgatttcaacttaagtaactgaa  
tattgtacggtagatgacacttatgataatgtttatcgtaaacacaattgaaaaggtcaagaagaagagaaagattgatttcaacttaagtaactgaaatacccacaactaa  
aaaaataatttttactgicacatcgttaattatcaatgcaagtttaatactcatttttctctccgaaagtcgacgacaataaaaaaaccg  
atctcatcgaagtaactatacigatagatgctgagctgacacagtcgtaagccttggacaacaactcattcatgacgtcactgctgtgacgctagaat  
gatgacattatcaatgttttttctgctgaatttggtaaaataatgaaaatgtaaggttagataatttggattttcgttttattgtaaaacta  
gctgaactcgaacttggagcagtaataatcgttaatttataatctcgaacttttaaaataaataataataataaactttgggtggaatgcttaag  
gtaattcttttttaataaataaagttggttagagatcttaaaagttagcttaagaatacggaaaaaataacttttgggtgggttaattgtttcgttttga  
agtaatgtgtagattttcttatgaatttagattaaaaaactatttggtttccagatgttttaagaaaaaaatgtcattcagcttgcattctctta  
cataccttaataaagaaaaatataaagtttgggttaacgggaagctaatcctagttatgtatttggcccaaaaaataactaggttttggttatggaat  
aagaagaaaaaaaatagatataaatacaaatataaactaagatatttagcttaattgtaaaagattttagtgaacttaaaaaatag  
ttggttaagagattacaacattaaacaaattaaacgaaccccttagtatttaaaaaaacaacttaaaatatacccacaacttaatttttaacat  
aaattttataaaaccacagctgtcctttcgaataatcactataatcggtagtaagaataaaaaatcaaacatctcgaataatagcatacttataaaca  
aaccaattcactgaaaaacataatbaattgagagtagggccgagtaaacactgatttttatataatcctcagatgacatcgcatacataataactca  
aagtcgagcctccttctcttcttatacccttttctcttcaatttctgacatacaATc

Fig. 12

```

> CDS ortólogo DMR6 Solanum lycopersicum
ATGGAAACCAAAGTTATTTCTAGCGGAATCAACCACCTCTACTCTTCCTCAAAGTTACATCCG
ACCCGAATCCGATAGACCACGTCTATCGGAAGTGGTCGATTGTGAAAATGTTCCAATAATTG
ACTTAAGTTGCGGAGATCAAGCTCAAATAATTCGTCAAATTGGAGAAGCTTGTCAAACCTTAT
GGTTCTTTTCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGGAAGTTGTAGAGAAAATGCTAGGGGT
AGCTGGGGAATTTTCAATTTACCAGTAGAAGAGAACTAAAATTATATTCAGATGATCCTT
CAAAGACCATGAGATTATCAACAAGTTTTAATGTTAAAAAGGAGACAGTTCATAATTGGAGA
GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTAGAGAAGTATGCTCCTGAATGGCCTTCTAATCC
ATCATCTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCAGGGAAATTCGTCAACTCGGATTTAGAT
TAGAAGAAGCCATAGCAGAAAGCCTGGGGTTAGATAAAGAGTGTATAAAAGATGTATTGGGT
GAACAAGGACAACATATGGCTATCAATTATTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTTACTTA
TGGGCTTCCGGCCATACTGATCCAAATTCACCTTACAATTCTTCTTCAAGACTTGCAAGTTG
CGGCTTCAAGTCTTAAAGATGGCAATGGTTAGCTGTAAAACCTCAACCTGACGCCTTT
GTCATTAATCTTGGGGATCAATTGCAGGCAGTAAGTAACGGTAAGTACAGAAGTGTATGGCA
TCGAGCTATTGTGAATTCAGATCAAGCTAGGATGTCAGTGGCTTCGTTTCTATGTCCGTGTG
ATAGCGGAAAATCAGTGCACCAAAGCTGCTGACAGAAGATGGATCTCCAGTGATTTATCAA
GACTTTACGTATGCTGAGTATTACAACAAG
TTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGCAACATTGTTTGGAACTTTCAAGAATAA

> proteína ortólogo DMR6 Solanum lycopersicum
METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVVDCENVPIIDLSCGDQAQIIRQIGEACQTY
GFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKEIVHNWR
DYLRLHCYPLEKYAPEWPSNPSSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEIAESLGLDKECIKQVLG
EQGQHMAINYYPPCPQPELTYGLPAHTDPNSLTILLQDLQVAGLQVLKDGKWLAVKPPQDAF
VINLGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
DFTYAEYYNKFWSRNLDDQHCLLELFKN.
    
```

Fig. 13

```
>CDS ortólogo DMR6 Nicotina benthamiana
ATGGAAGCAAAAGTTCTTTCCAGCGGAATCCGCCACTCTACTATCCCTCAAAGTTACATCCG
CCCTCAATCCGATAGGCCGCGCCTTTCTGAAGTTGCTGATTGTGAAAACGTTCCAGTAGTTG
ATATAGGTTGCGGTGATAGAAACCTTATTGTTTCATCAAATTGGTGAAGCCTGTCCGCTTTAT
GGTTTTTCCAGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGATTTAATAGACGAAATGCTAGAGAT
AGCTGGGGAATTTTTAGGCTTCCAGTTGAAGAGAAGTTGAAATTGACTCAGATGACCCAT
CGAAGACGATGAGATTGTCGACTAGTTTTAATGTGAAAAGGAGAAGGTTACAAATTGGAGA
GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTTGAAAATTACGCTCCTGAATGGCCTTCCAATCC
TTCCCTTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCATGGAAGTTCGACAACCTCGGGTTCAGAT
TGCAGGAAGCCATAGCAGAGAGCCTAGGCTTAGAGAAAGAGTGTATAAAGGATGTATTGGGC
GAACAAGGTCAACACATGGCTATCAATTTCTATCCTCCTTGTCACAACCAGAACTCACTTA
TGGGCTGCCAGCACATACTGATCCAAATGCCCTTACAATCCTTCTTCAAGACTTAGAAGTAG
CTGGTCTTCAAGTCTTAAAGATGGCGAATGGTTGGCCGTCAGCCTCAACCAGATGCCTTT
GTCATTAATCTGGTGATCAACTGCAGGCAGTGAGTAATGGGAGATACAAAAGCGTATGGCA
TCGAGCTATTGTAATTCAGACAAAGCCAGGTTGTGAGTGGCTTCGTTCCCTTTGTCCGTGCG
ATAGCGCGAAAATCAGTGCTCCAAAGCTCCTCACTGAAGATGGATCTCCTGTCAATTTATCAG
GACTTTACCTATGCTGAGTATTACAAAAGTTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGGAACATTG
TTTGGAACTTTTCAAGAATAA
```

```
>proteína ortólogo DMR6 Nicotiana benthamiana
MEAKVLSSGIRHSTIPQSYIRPQSDRPLSEVADCENVPVVDIGCGDRNLIVHQIGEACRLY
GFFQVINHGVPKNLIDEMLEIAGEFFRLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKEKVNWR
DYLRRLHCYPLENYAPEWPSNPSSFREIVSRYCMEVRQLGFRLQEAIAESLGLEKECIKDVLG
EQGQHMAINFYPPCPOPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLKDGEWLAVKPPQDAF
VINLGDQLQAVSNGRYKSVVHRAIVNSDKARLSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
DFTYAEYKWFWSRNLQEHCLLELFKN.
```

Fig. 14

