

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 187**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**A01H 5/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2008 E 12155893 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2455477**

54 Título: **Plantas resistentes a enfermedades**

30 Prioridad:

**01.02.2007 WO PCT/EP2007/050976**

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

**02.03.2016**

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**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 562 187 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 enfermedades

La presente invención se refiere a plantas de col resistentes a enfermedades, en particular a plantas de col resistentes a *Hyaloperonospora parasitica*. La invención se refiere además a métodos para obtener dichas plantas de col resistentes a enfermedades.

La resistencia de las plantas a agentes patógenos fúngicos y oomicéticos ha sido ampliamente estudiada en cuanto a las resistencias tanto específica como general a agentes patógenos. En muchos casos, la resistencia viene especificada por genes dominantes para la resistencia. Se han identificado muchos de estos genes de resistencia específicos de razas o de "gen por gen" que median en el reconocimiento de agentes patógenos al interaccionar directa o indirectamente con productos de genes de no virulencia u otras moléculas del agente patógeno. Este reconocimiento conduce a la activación de una gran variedad de respuestas de defensa de la planta que detienen el crecimiento del agente patógeno.

En el cultivo de plantas hay una constante lucha para identificar nuevas fuentes de genes de resistencia dominantes sobre todo monogénicos. En variedades cultivadas con genes de resistencia individuales recientemente introducidos, la protección frente a la enfermedad se quiebra a menudo rápidamente porque los agentes patógenos evolucionan y se adaptan con una elevada frecuencia y recuperan la capacidad para infectar exitosamente la planta huésped. Por lo tanto, es muy necesaria la disponibilidad de nuevas fuentes de resistencia a enfermedades.

Por ejemplo, mecanismos de resistencia alternativos actúan a través de la modulación de la respuesta de defensa en las plantas, tal como la resistencia mediada por el gen recesivo *mlo* de la cebada al agente patógeno *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* del oídio. Las plantas que portan alelos mutados del gen *MLO* de tipo silvestre presentan una resistencia casi completa que coincide con el fracaso del intento de penetración fúngica en la pared celular de células epidérmicas atacadas individuales. De este modo, el gen *MLO* de tipo silvestre actúa como un regulador negativo de la respuesta del agente patógeno. Esto se describe en el Documento WO 9804586.

Otros ejemplos son los genes recesivos de resistencia al oídio hallados en una exploración de pérdida de susceptibilidad a *Erysiphe cichoracearum*. Hasta ahora se han clonado tres genes, denominados *PMR6*, que codifica una proteína de tipo pectato liasa, *PMR4*, que codifica una callosa sintasa, y *PMR5*, que codifica una proteína de función desconocida. Parece que tanto el gen *mlo* como el gen *pmr* confieren específicamente resistencia al oídio y no a oomicetos tales como los de los mildiús vellosos.

La resistencia general a agentes patógenos, o formas sistémicas de resistencia tales como SAR, se han obtenido de dos modos principales. El primero es por mutación de reguladores negativos de la defensa de las plantas y la muerte celular, tal como en los mutantes *cpr*, *lsd* y *acd* de *Arabidopsis*. El segundo es por sobreexpresión transgénica de inductores o reguladores de la defensa de las plantas, tal como en plantas que sobreexpresan *NPR1*.

La desventaja de estos mecanismos de resistencia conocidos es que, además de resistencia a agentes patógenos, estas plantas muestran a menudo fenotipos adicionales e indeseables detectables, tales como un crecimiento raquítico o la aparición espontánea de muerte celular.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una forma de resistencia que sea general y duradera y no esté asociada con fenotipos indeseables.

En la investigación que condujo a la presente invención se llevó a cabo una exploración de mutantes de *Arabidopsis thaliana* en cuanto a una susceptibilidad reducida al agente patógeno *Hyaloperonospora parasitica* del mildiú vellosos. Se generaron mutantes por EMS en la muy susceptible línea *Ler eds1-2* de *Arabidopsis*. Se analizaron con detalle ocho mutantes resistentes al mildiú vellosos (*dmr*; del inglés, downy mildew resistant), correspondientes a 6 loci diferentes. Un análisis microscópico mostró que en todos los mutantes estaba acusadamente reducido el crecimiento de *H. parasitica*. La resistencia de *dmr3*, *dmr4* y *dmr5* estaba asociada con la activación constitutiva de la defensa de la planta. Además, los mutantes *dmr3* y *dmr4* pero no *dmr5* eran también resistentes a *Pseudomonas syringae* y *Golovinomyces orontii*.

Por contraste, no se observó activación potenciada de la defensa de la planta en los mutantes *dmr1*, *dmr2* ni *dmr6*. Los resultados de esta investigación han sido descritos por Van Damme et al. (2005), Molecular Plant-Microbe Interactions 18 (6), 583-592. En este artículo no se describen la identificación ni la caracterización de los genes DMR.

El mutante *dmr6* fue identificado en una exploración de "pérdida de susceptibilidad" en el fondo genético *Ler eds1-2* de *Arabidopsis*. El gen *DMR6* ha sido ahora clonado y caracterizado. De este modo, se halló que *DMR6* es el gen At5g24530, que codifica una oxidorreductasa (en la Figura 2 se representan el DNA y la secuencia de aminoácidos). Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de una molécula, el oxidante, a otra, el reductor. De acuerdo con la presente invención, se ha hallado que la falta de una proteína DMR6 funcional da lugar a resistencia al mildiú vellosos.

La presente invención proporciona una planta de col que es resistente a *Hyaloperonospora parasitica*, caracterizada

por que la planta presenta un nivel reducido, una actividad reducida o una ausencia completa de la proteína DMR6 en comparación con una planta que no es resistente al citado agente patógeno.

La resistencia a *Hyaloperonospora parasitica* se basa en un nivel alterado, en particular un nivel reducido, una actividad reducida o una ausencia completa de la proteína DMR6 en una planta.

5 La modulación del gen DMR6 para reducir su actividad o expresión puede ser llevada a cabo en diferentes niveles. En primer lugar, se puede mutar directamente el gen endógeno. Esto puede ser llevado a cabo por medio de un tratamiento mutagénico. Alternativamente, se puede llevar un gen DMR6 modificado a la planta por medio de técnicas transgénicas o por introgresión, o se puede reducir la expresión de DMR6 a nivel regulador, por ejemplo, modificando las secuencias reguladoras o por silenciamiento génico.

10 Un nivel reducido de proteína DMR6 es el resultado de una mutación en el gen *DMR6* que da lugar a una expresión reducida de DMR6 en comparación con el gen DMR6 de tipo silvestre en el que no está presente tal mutación, o que da lugar a una estabilidad reducida del mRNA o la proteína. En una realización particular, esto se lleva a cabo mediante mutaciones en la secuencia de codificación de DMR6 que dan lugar a una proteína DMR6 no funcional, es decir, sin actividad enzimática o con actividad enzimática reducida.

15 En otra realización de la invención, se puede alcanzar la expresión reducida por infrarregulación de la expresión del gen *DMR6* a nivel transcripcional o a nivel traduccional, por ejemplo, mediante silenciamiento génico o mediante mutaciones que afecten a la expresión del gen *DMR6*.

20 Para alcanzar un nivel reducido de proteína DMR6, se puede infrarregular la expresión del gen DMR6 o se puede reducir la actividad enzimática de la proteína DMR6 mediante sustituciones de aminoácidos que den lugar a cambios de nucleótidos en la secuencia de codificación de DMR6.

25 En una realización particular de la invención, la infrarregulación de la expresión del gen DMR6 se lleva a cabo por silenciamiento génico usando RNAi. Para esto, se generan plantas transgénicas que expresan una construcción antisentido de DMR6, una construcción optimizada de micro-RNA, una construcción de repeticiones invertidas o una construcción sentido-antisentido combinados, para generar un dsRNA correspondiente a DMR6 que conduzca a silenciamiento génico.

La infrarregulación del gen DMR6 puede ser llevada también a cabo por mutagénesis de los elementos reguladores en el promotor, la región terminadora, o posibles intrones. En muchos casos, las mutaciones en la secuencia de codificación de *DMR6* conducen a sustituciones de aminoácidos o codones de parada prematuros que afectan negativamente a la expresión o actividad de la proteína DMR6 codificada.

30 Estas mutaciones se inducen en las plantas utilizando productos químicos mutagénicos tales como metanosulfonato de etilo (EMS; del inglés, *ethyl methanesulfonate*), por irradiación de material vegetal con rayos gamma o neutrones rápidos, o por otros medios. Los cambios nucleotídicos resultantes son aleatorios pero, en una gran colección de plantas sometidas a mutagénesis, las mutaciones en el gen DMR6 pueden ser fácilmente identificadas utilizando el método de "focalización de lesiones inducidas locales en genomas" (TILLING; del inglés, *targeting induced local lesions in genomes*) [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 multiplicación, por PCR, del gen de interés a partir de DNA genómico de una gran colección de plantas sometidas a mutagénesis en la generación M2. Secuenciando el DNA o buscando mutaciones puntuales utilizando una nucleasa específica de cadena sencilla, tal como la nucleasa CEL-I [Till et al. 35 40 (2004), *Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases*, Nucleic Acids Res. 32, 2632-2641], se identifican las plantas individuales que tienen una mutación en el gen de interés.

45 Explorando muchas plantas se obtiene una gran colección de alelos mutantes, proporcionando cada uno un efecto diferente sobre la expresión génica o la actividad enzimática. Los niveles de expresión génica o de proteína pueden ser examinados, por ejemplo, mediante el análisis de los niveles de transcritos de DMR6 (por ejemplo, por RT-PCR) o mediante la cuantificación de los niveles de proteína DMR6 con anticuerpos.

Las plantas con el nivel de DMR6 o la expresión de DMR6 reducidos deseados son luego retrocruzadas o cruzadas con otras líneas de cultivo para transferir sólo el nuevo alelo deseado al fondo genético del cultivo deseado.

50 Se describe el uso de un promotor DMR6 para proporcionar resistencia a enfermedades a las plantas. Se ha demostrado la suprarregulación transcripcional de DMR6 en respuesta a una infección por *Hyaloperonospora parasitica*. Tanto el análisis de transcritos como las líneas de promotor DMR6-gen informador apoyan este hallazgo (véase el Ejemplo 1 más adelante). De esta manera, el promotor DMR6 inducible por agentes patógenos es particularmente útil para controlar la expresión de sistemas inducibles que conducen a resistencia a enfermedades en las plantas.

55 En, por ejemplo, el Documento WO 99/45125 se ha descrito un ejemplo de dicho sistema inducible que conduce a resistencia a enfermedades en las plantas y en el que el promotor DMR6 puede ser eficaz, en donde una secuencia de nucleótidos antisentido para un gen implicado en la regulación de la ruta metabólica C5 de las porfirinas está

operativamente unida a un promotor inducible por agentes patógenos y es utilizada para transformar células vegetales. La expresión de la secuencia de nucleótidos antisentido en respuesta al agente patógeno altera eficazmente el metabolismo de las porfirinas de la célula vegetal transformada, lo que conduce al desarrollo de una lesión localizada en donde queda contenida la propagación del agente patógeno. En el Documento WO 96/36697 también se describen sistemas inducibles que conducen a resistencia a enfermedades en plantas, en donde un promotor inducible controla la expresión de una proteína capaz de provocar la respuesta de hipersensibilidad en una planta. En el Documento EP 0474857 se describe además un método para la inducción de resistencia a agentes patógenos en plantas, que comprende transformar las plantas con secuencias polinucleotídicas que codifican una pareja de gen de no virulencia derivado del agente patógeno/gen de resistencia derivado de la planta, en donde la expresión del péptido provocador o del gen de resistencia, o de ambos, es regulada por un promotor inducible por agentes patógenos. En, por ejemplo, el Documento WO 98/32325 se han descrito otros ejemplos de sistemas inducibles que conducen a resistencia a agentes patógenos en plantas.

Se describe un método para proporcionar resistencia a enfermedades a una planta, que comprende transformar una célula de la planta con una construcción de DNA que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está operativamente unido a un promotor inducible por agentes patógenos que es operativo dentro de una célula de la planta, y regenerar plantas transformadas a partir de dichas células de la planta, en donde el promotor inducible por agentes patógenos es un promotor DMR6 y en donde la expresión del ácido nucleico expresable confiere resistencia a enfermedades a la planta transgénica.

Se describen plantas resistentes a enfermedades, obtenibles mediante dicho método, así como tejido vegetal y semillas obtenidos de dichas plantas.

Se describen plantas que son resistentes a un agente patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomicético, en donde la planta comprende en su genoma una construcción de DNA que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está operativamente unido a un promotor inducible por agentes patógenos, en donde el promotor inducible por agentes patógenos es un promotor DMR6.

Se describe la construcción de DNA *per se*, que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está operativamente unido a un promotor inducible por agentes patógenos, en donde el promotor inducible por agentes patógenos es un promotor DMR6. La construcción puede ser empleada para transformar células vegetales que pueden ser regeneradas en plantas transformadas. Además, se pueden obtener tejido y semilla de la planta transformada. Los métodos adecuados para introducir la construcción en células vegetales son conocidos por la persona experta.

Por "operativamente unido" se quiere significar 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, un gen) por el promotor.

Por "ácido nucleico expresable" se quiere significar 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 mRNA y se puede finalmente traducir en una proteína. El ácido nucleico expresable puede ser DNA genómico, cDNA o DNA químicamente sintetizado, o cualquier combinación de los mismos.

Una construcción de DNA comprende todos los elementos de ácido nucleico necesarios que permitan la expresión (es decir, la transcripción) de un ácido nucleico particular en una célula. Típicamente, la construcción incluye un ácido nucleico expresable, es decir, un ácido nucleico que se va a transcribir, y un promotor. La construcción se puede incorporar adecuadamente a, por ejemplo, un plásmido o un vector.

El ácido nucleico expresable puede ser un gen implicado en una respuesta de defensa de la planta, 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 de la planta invadido por el agente patógeno experimenta una muerte celular localizada por la expresión inducida de un mecanismo suicida que desencadena dicha muerte celular localizada en respuesta a agentes patógenos. De este modo, sólo se sacrifican unas pocas células de la planta y se detiene eficazmente la propagación del agente patógeno. Los ejemplos de dichos genes implicados en una respuesta de defensa de la planta son la proteína reguladora NPR1/NIM1 [Friedrich et al., *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14 (9): 1114-1124, 2001] y el factor de transcripción MYB30 [Vailleau et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (5): 10.179-10.184, 2002].

El ácido nucleico expresable puede codificar un polipéptido autólogo o heterólogo capaz de conferir resistencia a enfermedades a una planta. Por "polipéptido autólogo" si quiere significar cualquier polipéptido que se expresa en una célula vegetal transformada a partir de un gen que se encuentra de forma natural en la célula vegetal transformada. Por "polipéptido heterólogo" se quiere significar cualquier polipéptido que se expresa en una célula vegetal transformada a partir de un gen que es parcial o totalmente extraño con respecto a (es decir, que no se encuentra naturalmente en) la célula vegetal transformada. Son ejemplos de dichos polipéptidos la proteína Bax de mamífero, que codifica una proteína pro-apoptótica y da lugar a muerte celular en plantas [Lacomme y Santa Cruz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (14): 7956-61, 1999], y quitinasas fúngicas (María de las Mercedes Dana et al., *Plant*

Physiol. 142 (2): 722-730, 2006].

- 5 El promotor DMR6 puede ser el promotor DMR6 de *Arabidopsis*. El promotor DMR6 comprende una región de 3000 pares de bases que está cadena arriba de la secuencia de codificación de *DMR6* de *Arabidopsis* (codón de inicio: ATG) e incluye la 5'-UTR (región 5' no traducida). El promotor DMR6 puede comprender una secuencia de nucleótidos como la definida en la Figura 11, y/o cualquier fragmento funcional de la misma, es decir, cualquier fragmento (o parte) de dicha secuencia que es aún capaz de iniciar la transcripción del (de los) ácido(s) nucleico(s) expresable(s) al (a los) que está operativamente unido, y/o variantes naturales del mismo, es decir, variantes naturales de este promotor que pueden contener pequeños polimorfismos pero que, en general, tienen una identidad de al menos 90%.
- 10 El promotor DMR6 puede ser un promotor DMR6 ortólogo, es decir, un promotor de un gen DMR6 ortólogo. Más adelante, en el Ejemplo 2, se describen métodos para identificar ortólogos DMR6. Una vez que se han identificado los ortólogos DMR6, la persona experta será capaz de aislar el respectivo promotor de dichos ortólogos usando técnicas de biología molecular estándares.
- 15 Se ha mostrado que el promotor DMR6 es acusadamente inducido por agentes patógenos, y el promotor DMR6 no se expresa mucho en otros tejidos no infectados. Por lo tanto, es un promotor muy adecuado para uso en sistemas inducibles para proporcionar resistencia a agentes patógenos de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomicético a plantas. Anteriormente se han dado ejemplos de agentes patógenos y plantas específicos para los cuales se puede emplear el sistema inducible, utilizando el promotor DMR6.
- 20 La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes. En los ejemplos se hace referencia a las figuras siguientes.
- En la Tabla 1 se muestran los números de acceso de GenBank y los identificadores de GenInfo del mRNA de DMR6 de *Arabidopsis* y de secuencias ortólogas de otras especies vegetales.
- En la Tabla 2 se muestran los cebadores de PCR para los marcadores utilizados para la clonación de DMR6 basada en mapas.
- 25 En la Tabla 3 se muestran pares de cebadores para clonar ortólogos *dmr6* en un vector de expresión vegetal adecuado.
- En la Figura 1 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína DMR6 de *Arabidopsis thaliana* y ortólogos de *Aquilegia sp.*, *Citrus sinensis*, *Coffea canephora*, *Cucumis sativus*, *Gossypium hirsutum*, *Lactuca sativus*, *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 CLUSTAL W (1.83) para alineamiento múltiple de secuencias (EBI). Debajo de las secuencias se indican los aminoácidos conservados mediante los puntos y se indican los aminoácidos idénticos mediante los asteriscos.
- 30 En la Figura 2 se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, del gen DMR6 (At5g24530, gi 42568064, GenBank NM\_122361) y la proteína DMR6 (gi 15238567, GenBank NP\_197841) de *Arabidopsis thaliana*.
- 35 En la Figura 3 se muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada, respectivamente, del ortólogo DMR6 de *Lactuca sativa*.
- En la Figura 4 se muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada, respectivamente, del ortólogo DMR6 de *Spinacia oleracea*.
- 40 En la Figura 5 se muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada del ortólogo DMR6 de *Cucumis sativus* y *Cucumis melo*.
- En la Figura 6 se muestra la resistencia de los mutantes *dmr6* de *Arabidopsis* al mildiú vellosa. (a) Cuantificación de esporangióforos del producto de aislamiento Waco9 de *H. parasitica*, 7 días después de la inoculación, sobre el mutante *dmr6-1* (BC<sub>2</sub>, línea E37) en comparación con su línea parental *Ler eds1-2*, y sobre el mutante *dmr6-2* (línea de T-DNA FLAG\_445D09) en comparación con su línea parental Ws-4. (b) Restablecimiento de la susceptibilidad por complementación con el gen At5g24530 en el mutante *dmr6-1*. Se cuantificaron las esporas de *H. parasitica* por miligramo de peso de plantón sobre *Ler eds1-2*, *dmr6-1* y 5 líneas de complementación (números 121, 122, 211, 231 y 241).
- 45 En la Figura 7 se muestra la estructura del gen *DMR6* de *Arabidopsis* y las mutaciones *dmr6-1* y *dmr6-2*. El gen *DMR6* contiene cuatro exones y una secuencia de codificación de 1026 bases. Se indican los dos alelos: *dmr6-1* con un cambio de base en el exón 2, y *dmr6-2* con una inserción de T-DNA en el intrón 2.
- 50 En la Figura 8 se muestran los niveles relativos de transcritos de *DMR6* en plantas *Ler* tratadas de forma simulada o sometidas a la inoculación de un producto de aislamiento compatible o incompatible de *H. parasitica*. Se determinaron los niveles de transcritos en diferentes días después de la inoculación. La diferencia en los valores del

ciclo umbral ( $\Delta$ CT; del inglés,  $\Delta$  cycle threshold) refleja el número de ciclos de multiplicación adicionales por PCR requeridos para alcanzar una concentración de producto umbral arbitraria en comparación con *ACTIN2*. Un menor valor de  $\Delta$ CT indica un mayor nivel de transcritos.

5 En la Figura 9 se muestra la expresión de la construcción de promotor DMR6-gen informador (*pDMR6::GUS*) en líneas transgénicas de *Arabidopsis*, visualizada sólo con X-gluc como sustrato (Figuras d y e) o Magenta-Xgluc (Figuras a-c) y tinción del crecimiento de *H. parasitica* con azul de tripano. (a) *Ler eds1-2* (*pDMR6::GUS*) 3 días después de la inoculación con *H. parasitica*, producto de aislamiento Cala2. (b) Col-0 (*pDMR6::GUS*) 3 días después de la inoculación con *H. parasitica*, producto de aislamiento Waco9. (c) *Ler eds1-2* (*pDMR6::GUS*) 3 días después de la inoculación con *H. parasitica*, producto de aislamiento Emoy2. (d) Col-0 (*pDMR6::GUS*) 3 días después de la formación de heridas. (e) Col-0 (*pDMR6::GUS*) 3 días después de la aplicación de BTH.

10 En la Figura 10 se muestra el análisis por Q-PCR de los niveles de transcritos de los genes: At4g14365, At1g14880, *ACD6*, *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*, seleccionados como suprarregulados en el análisis con micromatrices de *dmr6-1*. (a) Niveles de transcripción de los seis genes en *dmr6-1* en comparación con *Ler eds1-2* y además el transcrito de *DMR6*. (b) Transcritos génicos elevados de seis genes asociados con la defensa en *dmr6-2* frente a *Ws-4*.  $\Delta$ CT refleja el número de ciclos de multiplicación adicionales por PCR necesarios para alcanzar el nivel de transcritos de *ACTIN2*. Un menor valor de  $\Delta$ CT indica un mayor nivel de transcritos.

15 En la Figura 11 se muestra la secuencia de nucleótidos de la región de 3 kb cadena arriba del codón de inicio del gen *DMR6* (at5g24530) de *Arabidopsis thaliana*, incluyendo el promotor y la 5'-UTR (subrayados).

20 En la Figura 12 se muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada, respectivamente, del ortólogo *DMR6* de *Solanum lycopersicum*.

En la Figura 13 se muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada, respectivamente, del ortólogo *DMR6* de *Nicotiana benthamiana*.

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

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1

El gen *DMR6* (At5g24530) de *Arabidopsis* es necesario para la susceptibilidad al mildiu veloso

#### Procedimientos experimentales

##### Crecimiento e infección de *Hyaloperonospora parasitica*

30 El producto de aislamiento Waco9 de *H. parasitica* fue proporcionado por el Dr. M. Aarts (WUR, Wageningen, Holanda) y el producto de aislamiento Cala2 fue proporcionado por el Dr. E. Holub (Warwick HRI, Wellesbourne, Reino Unido), y fueron mantenidos sobre *Arabidopsis Ws-0* y *Ler*, respectivamente. Se transfirieron semanalmente inóculos (400.000 esporas por mililitro) a plantones sanos de 10 días de edad (E. B. Holub et al., Mol. Plant-Microbe Interact. 7: 223-239, 1994) mediante el uso de una pistola pulverizadora. Los plantones fueron dejados secar al aire durante aproximadamente 45 minutos y fueron incubados bajo una cubierta sellada con una humedad relativa del 100% en una cámara de crecimiento a 16 °C con 9 horas de luz al 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) contando el número de esporangióforos por plantón para al menos 40 plantones por línea examinada (Figura 6a), o aislando esporas en agua 5 dpi y determinando la concentración de esporas para obtener el número por miligramo de tejido foliar (Figura 6b).

#### 40 Generación de líneas *dmr6* retrocruzadas

Los mutantes *dmr6* fueron retrocruzados (BC; del inglés, backcrossed) dos veces (BC<sub>2</sub>) con la línea parental *Ler eds1-2* así como con *Ler*. Las líneas BC<sub>2</sub> generadas con *Ler* fueron seleccionadas en cuanto a la presencia del gen *EDS1* de tipo silvestre mediante análisis por PCR.

#### Clonación de *DMR6*

45 Se realizó un mapeo fino del gen *dmr6* con marcadores de PCR diseñados utilizando la base de datos Cereon para identificar diferencias de inserción y delección (IND) entre Col-0 y *Ler*. Para el mapeo se utilizaron los marcadores (Tabla 2): IND\_MOP9 en el gen At5G24210; IND\_K16H17 en el gen At5G24420; IND\_T4C12 en el gen At5G24820; IND\_T11H3 en medio de los genes At5G24950\_60, e IND\_F21J6 en el gen At5G25270. Se inició una exploración adicional de nuevos recombinantes sobre 300 plantas F<sub>2</sub> que dio lugar a ocho plantas recombinantes F<sub>2</sub> entre los dos marcadores basados en IND: IND\_MOP9 e IND\_T4C12, que flanqueaban una región de 61 genes. Siete marcadores adicionales (M450-M590; Tabla 2) redujeron la región a dieciocho candidatos génicos para el locus *dmr6*, entre At5g24420 y At5g24590. El análisis de la secuencia de At5g24530 indicó una mutación puntual que conducía a un codón de parada en el exón 2 en el mutante *dmr6-1*.

Identificación de una línea de inserción de T-DNA en *dmr6*

Se identificó un segundo alelo de *dmr6*, 445D09, una línea FLAG de inserción de T-DNA generada por INRA Versailles en el fondo genético de acceso Ws-4. La inserción de T-DNA fue confirmada por PCR usando un cebador diseñado en el gen At5g24530, el cebador LP (5'-caggttatggcatatctcacgtc-3'), en combinación con el cebador del borde derecho del T-DNA, Tag3' (5'-tgataccagacggtgcccgcataa-3') o RB4 (5'-tcacgggtgggtttctacaggc-3'). La inserción exacta del T-DNA en el segundo intrón de At5g24530 fue confirmada por secuenciación de amplicones generados con los cebadores de T-DNA de ambos bordes, el izquierdo y el derecho, en combinación con los cebadores génicamente específicos LP o RP (5'-atgtccaagtccaatgccacaag-3').

## Síntesis de cDNA

Se aisló RNA (de aproximadamente 100 mg de tejido foliar de plántones de 10 días de edad) con el kit RNeasy (Qiagen, Venlo, Holanda) y se trató con el sistema RNase-Free DNase (Qiagen). Se cuantificó el RNA total usando un espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japón). Se sintetizó cDNA con la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) y oligo(dT)15 (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 Complementación del mutante *dmr6-1*

Se generaron líneas de complementación transformando plantas *dmr6* por el método de inmersión floral con *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998) que contenía el gen At5g24530 de Col-0 detrás del promotor 35S. La construcción se generó mediante multiplicación por PCR del gen At5g24530 de longitud completa procedente de cDNA de Col-0 con cebadores que incluían sitios de restricción que se emplearon para clonación direccional. Un cebador directo (5'-ttctgggatccaATGGCGCAAAGCTGATATC-3') que contenía un sitio de restricción para BamHI cerca del codón de inicio (ATG) multiplicaba el extremo 5' de *DMR6* y, en el extremo 3' detrás del codón de parada, se generó un sitio EcoRI con un cebador inverso (5'-gatatatgaattcttagttgtagaaaattctcgaggc-3'). El 35S-*DMR6*-Tn fue clonado en el pGreenII0229 [R. P. Heliens, E. A. Edwards, N. R. Leyland, S. Bean y P. M. Mullineaux (2000), "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42, 819-832]. Se aislaron plántones resistentes a DL-fosfinotricina (BASTA) 300  $\mu$ M y se analizaron en cuanto a susceptibilidad a *H. parasitica* y en cuanto a niveles de expresión de *DMR6* por RT-PCR.

Líneas de *DMR6* infraexpresado mediante RNAi

Se generaron líneas de RNAi en los fondos genéticos *Ler eds1-2* y Col-0. Se generó un amplicón de cDNA de 782 pares de bases de longitud de Col-0 At5g24530. La PCR se realizó con la DNA polimerasa Phusion (2U/ $\mu$ l) y dos diferentes combinaciones de cebadores. El amplicón de la primera combinación de cebadores específicos para el gen *DMR6* (RNAiDMR6F: 5'-aaaagcaggtGACCGTCCACGTCTCTCTGAA-3' y RNAiDMR6R: 5'-AGAAAGCTGGGTGAAACGATGCGACCGATAGTC-3') se usó como un molde para la segunda multiplicación por PCR con cebadores generales que permitían la recombinación en el vector pDONR7 del sistema de clonación Gateway. Para la segunda PCR se usaron como molde 10  $\mu$ l de la primera PCR (desnaturalización durante 30 segundos a 98 °C seguida de 10 ciclos de: 10 segundos a 98 °C; 30 segundos a 58 °C; 30 segundos a 72 °C) en un volumen total de 20  $\mu$ l. La segunda PCR (desnaturalización durante 30 segundos a 98 °C seguida de 5 ciclos de: 10 segundos a 98 °C; 30 segundos a 45 °C; 30 segundos a 72 °C y 20 ciclos de 10 segundos a 98 °C; 30 segundos a 55 °C; 30 segundos a 72 °C, acabando con una extensión final de 10 minutos a 72 °C) con el attB1 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') y el attB2 (5'-ggggaccactttgtacagaaagctgggt-3') se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l. Se purificó el producto de PCR en gel y se recombinaron 50 ng de inserto en 150 ng de vector pDONR7 con la enzima Clonase BP. Se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes con el vector y se aislaron plásmidos que contenían el inserto correcto y se emplearon 100 ng del vector pDONR7 con el amplicón de *DMR6* en la reacción LR para recombinar el inserto en dos direcciones opuestas en 150 ng del vector pHellsgate8. Después de la transformación de *E. coli*, se seleccionaron clones resistentes a espectinomicina y se verificaron los plásmidos aislados en cuanto al tamaño de inserto correcto mediante una digestión con NotI y mediante PCR de colonias con un solo cebador interno para At5G24530 (DfragmentF: 5'-gagaagtgggattaaatagaggaa-3'); si los insertos estaban insertados dos veces en direcciones opuestas se podía detectar un amplicón de 1420 pares de bases. Se transformó la cepa electrocompetente C58C1 de *Agrobacterium* con plásmidos pHellsgate8 correctos con el inserto doble en direcciones opuestas. Se aislaron plásmidos de la cepa de *Agrobacterium* y se volvieron a transformar células de *E. coli* para confirmar el tamaño correcto del plásmido y el inserto mediante digestión con NotI. Las cepas de *Agrobacterium* nuevamente confirmadas se utilizaron para la transformación de las plantas Col-0 y *Ler eds1-2* por inmersión floral. Se exploraron las semillas desarrolladas en cuanto a resistencia a kanamicina en placas 1/2x GM, se transfirieron los plántones T<sub>1</sub> y se analizó la siguiente generación de semillas, la T<sub>2</sub>, en cuanto a expresión de *DMR6* y susceptibilidad a *H. parasitica*.

55 Perfil de expresión génica del mutante *dmr6*

Se aisló el RNA total del modo anteriormente descrito. Se multiplicó el mRNA con el kit MessageAmp aRNA (Ambion). Se hibridaron portaobjetos matriciales CATMA (Crowe et al., 2003) que contenían aproximadamente 25.000 etiquetas génicamente específicas de acuerdo con las condiciones normalizadas descritas por de Jong et al.

[M. de Jong, B. van Breukelen, F. R. Wittink, F. L. Menke, P. J. Weisbeek y G. Van den Ackerveken (2006), "Membrane-associated transcripts in Arabidopsis; their isolation and characterization by DNA microarray analysis and bioinformatics", *Plant J.* 46, 708-721]. Para la PCR cuantitativa se generaron moldes de cDNA del modo previamente descrito. Se determinaron los ciclos umbral por transcrito por triplicado usando el sistema ABI PRISM 7700 para detección de secuencias (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) empleando SYBR Green I (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) como colorante informador. Los grupos de cebadores para los transcritos son *DMR6* (QDMR6F: 5'-TGTCATCAACATAGGTGACCAG-3' y QDMR6R: 5'-CGATAGTCACGGATTTTCTGTG-3'), At1g14880 (QAt1g14880F: 5'-CTCAAGGAGAATGGTCCACA-3' y QAt1g14880R: 5'-CGACTTGCCAAATGTGATA-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'-GGTAGGGCAATTGTTCTTAGA-3'), PR-2 (QPR-2F: 5'-AAGGAGCTTAGCCTCACCAC-3' y QPR-2R: 5'-GAGGGAAGCAAGAATGGAAC-3'), PR-1 (QPR-1F: 5'-GAACACGTGCAATGGAGTTT-3' y QPR-1R: 5'-GGTTCACCATTTGTTACACCT-3') y ACT-2 (QACT2F: 5'-AATCACAGCACTGCACCA-3' y QACT2R: 5'-GAGGGAAGCAAGAATGGAAC-3'), generándose fragmentos de 100 pares de bases.

## Resultados

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

Van Damme et al., 2005, *supra*, describen un mutante *dmr6* que es resistente a *H. parasitica*. Se puede examinar el nivel de resistencia contando el número de esporangióforos por plantón siete días después de la inoculación con *H. parasitica* (producto de aislamiento Waco9 o Cala2, obtenibles del Dr. G. Van den Ackerveken, Plant-Microbe Interactions Group, University of Utrecht, Utrecht, Holanda). La línea parental, *Ler eds1-2* (Parker et al., 1996, *Plant Cell* 8: 2033-2046), que es muy susceptible, se emplea como un testigo positivo (y se ajusta a 100%).

En la Figura 6a se muestra la reducción de la formación de esporangióforos sobre los mutantes *dmr6* infectados en comparación con plantones de las líneas parentales, en donde se muestran los resultados de la cuantificación de la esporulación de Waco9 de *Hyaloperonospora parasitica* (esporangióforos/plantón) sobre el mutante *dmr6-1* resistente al mildiú veloso, dos veces retrocruzado con la línea parental *Ler eds1-2*, y sobre el mutante *dmr6-2* (línea de T-DNA FLAG\_445D09) en comparación con las líneas testigo.

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 candidatos génicos. Previamente se mapeó la mutación *dmr6* recesiva cerca del marcador nga139 del cromosoma 5 hasta una región que abarcaba 74 genes. Un mapeo fino vinculó el locus *dmr6* a un intervalo de mapeo que contenía los BACs T13K7 y K18P6 entre los marcadores At5g24420 y At5g24590 situados en los genes correspondientes. Esto permitió confinar el intervalo de *dmr6* a una región de 18 candidatos génicos. Un análisis comparativo de secuencias 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 único cambio de base de G por A, típico de una mutación por EMS, cambia un TGG (codón de *trp*) por un TGA (codón de parada prematuro) en la posición nucleotídica 691 de la secuencia de codificación (Figura 7). El codón de parada precoz trunca la prevista enzima oxidoreductasa de 342 aminoácidos en la posición 141 antes del dominio catalítico conservado, lo que sugiere que *dmr6* es un alelo nulo. Se prevé que la secuencia de codificación de At5g24530 (Figura 2) codifique una proteína con una masa de 39,4 kDa. Hasta la fecha no se ha descrito ningún papel biológico para At5g24530.

At5g24530 es *DMR6*

Se identificó un segundo alelo, *dmr6-2*, en una línea de inserción de T-DNA (FLAG\_445D09) de la colección de mutantes de INRA, Versailles. Se confirmaron la presencia y la posición del inserto de T-DNA en el segundo intrón de At5g24530 (Figura 7) mediante PCR y análisis de secuencias (datos no mostrados). La progenie de la línea FLAG\_445D09 homocigótica para la inserción de T-DNA era resistente al producto de aislamiento Waco9 de *H. parasitica*, mientras que la línea parental (Ws-4) era susceptible (Figura 6a). El transcrito de At5g24530 pudo ser multiplicado por RT-PCR usando cebadores en los exones 2 y 3 en Ws-4, pero no en la línea *dmr6-2* homocigótica (datos no mostrados), lo que indica que *dmr6-2* puede ser considerado un segundo alelo nulo.

Para corroborar la idea de que se requiere At5g24530 para la susceptibilidad a *H. parasitica*, se transformó el mutante *dmr6-1* con el cDNA de At5g24530 clonado bajo el control del promotor 35S. En cinco plantones *dmr6-1* T<sub>2</sub> independientes se confirmó la acusada sobreexpresión de At5g24530 mediante RT-PCR (datos no mostrados). Todas las líneas T<sub>3</sub>, homocigóticas para el transgén, mostraron restablecimiento de la susceptibilidad al producto de aislamiento Cala2 de *H. parasitica* (Figura 6b), lo que confirma que At5g24530 es *DMR6*. La complementación, junto con la identificación de dos mutantes *dmr6* independientes, indican claramente que se requiere un gen *DMR6* funcional para la susceptibilidad a *H. parasitica*.

*DMR6* es transcripcionalmente activado durante la infección por *H. parasitica*

Para estudiar la expresión de *DMR6* durante la infección con *H. parasitica*, se midieron los niveles de transcritos

relativos por PCR cuantitativa en seis diferentes puntos temporales, desde 0 días (2 horas) después de la inoculación hasta 5 días después de la inoculación (dpi) (Figura 8). Se aisló RNA de plántones *Ler* de diez días de edad a los que se inoculó agua (simulación), o producto de aislamiento compatible o incompatible de *H. parasitica* por pulverización. 2 horas después de la inoculación (0 dpi), los niveles de transcritos de *DMR6* eran iguales en los diferentes tratamientos. A partir de 1 dpi, el nivel de transcrito de *DMR6* resultó significativamente aumentado tanto en la interacción compatible como en la incompatible en comparación con los plántones simultáneamente tratados. El nivel de transcritos de *DMR6* 1 dpi era ligera pero significativamente mayor en la interacción incompatible ( $\Delta$ CT de 3,5; factor de inducción de aproximadamente 11) que en la compatible ( $\Delta$ CT de 3,0; factor de inducción de aproximadamente 8). El nivel de expresión aumentaba más con el tiempo hasta alcanzar un elevado nivel estable a los 4-5 dpi. En estos puntos temporales el nivel de transcritos de *DMR6* era mayor en la interacción compatible que en la incompatible. Los elevados niveles de transcritos de *DMR6* durante las interacciones compatibles e incompatibles de *H. parasitica* sugieren un papel de *DMR6* en la defensa de las plantas. La expresión de *DMR6* asociada con la defensa pudo ser confirmada en nuestros tres mutantes de defensa potenciada, *dmr3*, *dmr4* y *dmr5* (Van den Ackerveken et al., no publicado). Además, un análisis bioinformático de los niveles de *DMR6* en el Genevestigator Mutant Surveyor [P. Zimmermann, L. Hennig y W. Gruissem (2005), "Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator", Trends Plant Sci. 10, 407-409] mostró que el gen es intensamente inducido en los mutantes *mpk4* y *cpr5* resistentes a agentes patógenos. En el doble mutante *cpr5/npr1*, el nivel de transcritos de *DMR6* permanecía elevado, lo que indica que la inducción de la expresión de *DMR6* es en su mayor parte independiente de *NPR1*. Parece que el ácido salicílico es una señal importante en la inducción de la expresión de *DMR6* durante la vejez ya que plantas transgénicas *nahG* (que expresan el gen bacteriano salicilato hidrolasa) sólo mostraban bajos niveles de transcrito de *DMR6*.

Para investigar con más detalle cómo se activa la expresión de *DMR6* durante los estreses biótico y abiótico, se generaron líneas informadoras de *DMR6*. Se estudió la localización de la expresión de *DMR6* en plantas transgénicas Col-0 y *Ler eds1-2* que contenían el promotor *DMR6* unido al gen informador *uidA* ( $\beta$ -glucuronidasa, GUS) (*pDMR6::GUS*). Para visualizar tanto el crecimiento de hifas de *H. parasitica*, mediante tinción con azul de tripano, como la actividad GUS, se usó magenta-Xgluc como un sustrato de  $\beta$ -glucuronidasa que produce un precipitado magenta. En las plantas no infectadas no se pudo detectar expresión de GUS en los diferentes orgánulos vegetales: raíz, 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 infectadas con el producto de aislamiento Waco9 (Figura 9b). También se indujo la expresión de GUS en la interacción incompatible: inoculación del producto de aislamiento Emoy2 en *Ler eds1-2* (Figura 9c). Como se muestra en las Figuras 9a y 9b, la expresión de *DMR6* estaba confinada a las células en que *H. parasitica* había formado haustorios. Las células vegetales que contenían los haustorios más recientemente formados no mostraban niveles detectables de actividad GUS (Figura 9a, indicado mediante un asterisco). Durante la interacción incompatible (Figura 9c), sólo se pudo detectar actividad del promotor *DMR6* en las células que habían estado en contacto con las hifas invasoras iniciales. En células muertas, como resultado de la respuesta de hipersensibilidad (HR; del inglés, hypersensitivity response) (visualizada mediante tinción con azul de tripano e indicada en la Figura 9c mediante un asterisco), no se pudo detectar actividad GUS, posiblemente debido a una degradación proteica en estas células. Para probar si la expresión de *DMR6* en células que contienen haustorios es causada por una respuesta de tipo herida, se hicieron heridas en los plántones mediante una incisión con tijeras y se tiñeron los plántones para actividad GUS 3 días más tarde. No se vio ninguna expresión detectable de promotor *DMR6*-GUS, lo que indica que no se induce la expresión de *DMR6* por formación de heridas (Figura 9d). Además, se examinó la inducción local de expresión de *DMR6* en respuesta a un tratamiento con benzotiadiazol (BTH), un compuesto funcional análogo al ácido salicílico (SA). 3 días después del tratamiento con BTH, la actividad GUS se localizaba principalmente en las hojas recién 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 una infección por *H. parasitica*.

El mutante *dmr6-1* expresa constitutivamente transcritos asociados con la defensa

Para elucidar cómo la falta de *DMR6* da lugar a 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 de mRNA de las partes aéreas de plántones *dmr6-1* y *Ler eds1-2* de 14 días de edad sobre micromatrices CATMA de genoma completo. Se halló que un total de 58 genes se expresaban significativa y diferencialmente en *dmr6-1*, de los cuales 51 genes presentaban niveles de transcritos elevados y 7 genes presentaban niveles de transcritos reducidos. Un notable conjunto de los 51 transcritos inducidos han sido identificados como genes asociados con respuestas de defensa activadas de la planta, por ejemplo, ACD6, PR-5, PR-4/HEL y PAD4. Estos datos indican que la pérdida de *DMR6* da lugar a la activación de un conjunto específico de transcritos asociados con la defensa. El hallazgo de que *DMR6* está entre los genes inducidos en *dmr6-1* corrobora la idea de que *DMR6* está asociado con la defensa. Para probar si la expresión inducida de los genes asociados con la defensa se debía a la pérdida de *DMR6* y no se debía a mutaciones adicionales por metanosulfonato de etilo (EMS) que quedaban en el mutante *dmr6-1* retrocruzado, se verificó el nivel de transcritos de una selección de genes (At4g14365, At1g14880, ACD6, PR-1, PR-2 y PR-5) por PCR cuantitativa tanto en el mutante *dmr6-1* como en el mutante *dmr6-2* (Figura 10). Sólo pudimos probar niveles de transcritos de *DMR6* en el mutante *dmr6-1* (Figura 10a) ya que el mutante *dmr6-2* (Figura 10b) tiene una inserción de T-DNA que altera el transcrito de *DMR6*. La inducción de *DMR6* que se observa en el análisis por micromatrices fue confirmada por Q-PCR en *dmr6-1* en comparación con *Ler eds1-2* (Figura 10a). En las Figuras

10a y b se muestra que los seis genes seleccionados presentaban expresión elevada en ambos mutantes *dmr6* en comparación con las líneas parentales. La observada expresión elevada de los genes asociados con la defensa seleccionados en los mutantes *dmr6* indica que la falta de *DMR6* activa una respuesta de defensa de la planta. La activación de este conjunto de transcritos asociados con la defensa podría ser la causa primaria de resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr6*.

## Ejemplo 2

### Identificación de ortólogos DMR6 en cultivos

#### 1. Exploración de bancos sobre la base de homología secuencial

En la Figura 2 se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la secuencia de codificación de DMR6 y la proteína DMR6 de *Arabidopsis thaliana*. Se compararon bancos públicos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las secuencias de la Figura 2. Esta comparación dio lugar a la identificación de las secuencias de codificación de *DMR6* completas y de las previstas secuencias de aminoácidos en *Aquilegia sp.*, *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 secuencial de las proteínas ortólogas así identificadas se proporciona en la Tabla 1 y se visualiza en un alineamiento múltiple en la Figura 1. Para muchas otras especies vegetales, se pudieron identificar fragmentos de DNA ortólogos mediante BlastX como mejores éxitos recíprocos con respecto a las secuencias de la proteína DMR6 de *Arabidopsis* u otras plantas.

#### 2. Identificación de ortólogos por medio de hibridación heteróloga

La secuencia de DNA de DMR6 de *Arabidopsis thaliana*, como se muestra en la Figura 2, se utiliza como una sonda para buscar secuencias homólogas mediante hibridación con DNA de cualquier especie vegetal usando métodos de biología molecular estándares. Usando este método se detectan genes ortólogos mediante hibridación Southern sobre DNA digerido con enzimas de restricción o mediante hibridación con bancos de DNA genómico o cDNA. Estas técnicas son bien conocidas por la persona experta en este campo técnico. Como una sonda alternativa, se puede emplear como sonda la secuencia de DNA de DMR6 de cualquier otra especie vegetal íntimamente relacionada.

#### 3. Identificación de ortólogos por medio de PCR

Para muchas especies de cultivo, se dispone de secuencias parciales de mRNA de DMR6 o de genes DMR6 que se emplean para diseñar cebadores para multiplicar posteriormente por PCR la secuencia completa de cDNA o DNA genómico. Cuando se dispone de secuencias 5' y 3', la secuencia interna que falta es multiplicada por PCR mediante un cebador directo 5' y un cebador inverso 3' específicos para DMR6. En los casos en que sólo se dispone de secuencias 5', internas o 3', se diseñan cebadores tanto directos como inversos. En combinación con cebadores policonectores plasmídicos disponibles, los insertos son multiplicados a partir de bancos de DNA genómico y de cDNA de la especie vegetal de interés. De un modo similar se multiplican secuencias 5' o 3' que faltan mediante técnicas de PCR avanzadas: 5' RACE, 3' RACE, TAIL-PCR, RLM-RACE o PCR Vettorette.

Se proporciona la secuenciación del cDNA de DMR6 de *Lactuca sativa* (lechuga) como un ejemplo. A partir de la base de datos de ESTs de GenBank en el NCBI se identificaron varios ESTs de DMR6 de *Lactuca* utilizando la herramienta tblastn, comenzando con la secuencia de aminoácidos de DMR6 de *Arabidopsis*. El agrupamiento y el alineamiento de los ESTs dieron lugar a una secuencia de consenso para un fragmento de 5' DMR6. Para obtener el cDNA completo de DMR6 de lechuga se utilizó el kit RLM-RACE (Ambion) sobre mRNA de plántones de lechuga. Se obtuvo la secuencia de 3' RNA usando dos cebadores que se diseñaron en la secuencia de consenso de 5' DMR6 derivada de ESTs (Lsat\_dmr6\_fw1: CGATCAAGGTCAACACATGG, y Lsat\_dmr6\_fw2: TCAACCATTACCCAGTGTGC) y los cebadores para 3' RACE del kit. Basándose en la secuencia ensamblada se diseñaron nuevos cebadores para multiplicar la secuencia de codificación completa de DMR6 a partir de cDNA para obtener la secuencia de nucleótidos y la secuencia proteica derivada, como se presentan en la Figura 3.

Se han identificado las secuencias de codificación completas de DMR6 de más de 10 especies vegetales diferentes a partir de bases de datos genómicas y de ESTs. A partir del alineamiento de las secuencias de DNA, se seleccionaron regiones conservadas en la secuencia de codificación para el diseño de cebadores oligonucleotídicos degenerados (para los nucleótidos degenerados, las abreviaturas son de acuerdo con los símbolos de nucleótidos de la IUB que son códigos estándares empleados 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 cDNA de DMR6 de una especie vegetal dada es el siguiente:

1. Se aísla mRNA utilizando métodos estándares;
2. Se sintetiza cDNA usando un cebador de oligo-dT y métodos estándares;

3. Se lleva a cabo una reacción PCR usando oligonucleótidos directos e inversos degenerados;
4. Se separan los fragmentos de la PCR mediante electroforesis estándar en gel de agarosa y se aíslan del gel los fragmentos con el tamaño esperado;
5. Se clonan los fragmentos de PCR aislados en un vector plasmídico usando métodos estándares;
- 5 6. Se analizan los plásmidos con tamaños de inserto correctos, según se determinan por PCR, mediante secuenciación de DNA;
7. Un análisis de secuencias utilizando blastX revela qué fragmentos contienen las secuencias internas de DMR6 correctas;
8. La secuencia de DNA interna puede ser luego utilizada para diseñar cebadores específicos de genes y especies para 5' y 3' RACE, para obtener la secuencia de codificación completa de DMR6 mediante RLM-RACE (como se describió anteriormente).

Se proporciona la secuenciación del cDNA de DMR6 de *Cucumis sativus* (pepino) como un ejemplo. Para el pepino, diversas combinaciones de cebadores entre los cebadores siguientes resultaron exitosas a la hora de multiplicar un tramo de secuencia de codificación interna de cDNA: cebadores directos dmr6\_deg\_fw1B (TTCCAGGTDATTAAYCAYGG), dmr6\_deg\_fw2B CATAAYTGGAGRGAYTAYCT), dmr6\_deg\_fw3B (GARCAAGGRCARCAYATGGC) y dmr6\_deg\_fw4 (AATCCTCCTTCHTTCAAGGA), y cebadores inversos dmr6\_deg\_rv3B (AGTGCATTKGGGTCHGTRTG), dmr6\_deg\_rv4 (AATGTTRATGACAAARGCAT) y dmr6\_deg\_rv5 (GCCATRTGYTGYCCTTG YTC). Después de la clonación y secuenciación de los fragmentos multiplicados, se diseñaron cebadores específicos para DMR6 de pepino para 5' RACE (Cuc\_dmr6\_rv1: TCCGGACATTGAACTTGTG y Cuc\_dmr6\_rv2: TCAAAGAACTGCTTGCCAAC) y 3' RACE (Cuc\_dmr6\_fw1: CGCACTCACCATTCTCCTTC y Cuc\_dmr6\_fw2: GGCCTCCAAGTCCTCAAAG). Finalmente, se multiplicó y secuenció la secuencia completa de cDNA de DMR6 de pepino (Figura 5). Se utilizó un planteamiento similar para espinaca, *Spinacia oleracea* (Figura 4), *Solanum lycopersicum* (Figura 12) y *Nicotiana benthamiana* (Figura 13).

Los ortólogos identificados del modo descrito en este ejemplo pueden ser modificados utilizando técnicas bien conocidas para inducir mutaciones que reduzcan la expresión o actividad de DMR6, para obtener plantas resistentes a hongos u oomicetos no genéticamente modificadas. Alternativamente, se puede emplear la información genética de los ortólogos para diseñar vehículos para silenciamiento génico, y para transformar las correspondientes plantas de cultivo para obtener plantas que sean resistentes a oomicetos.

### Ejemplo 3

#### 30 Mutación de semillas

Se tratan semillas de las especies vegetales de interés con un mutágeno con objeto de introducir mutaciones puntuales aleatorias en el genoma. Se cultivan las plantas mutadas para producir semillas y se explora la siguiente generación en cuanto a la ausencia o reducción de los niveles o actividad de transcritos de DMR6. Esto se lleva a cabo determinando el nivel de expresión del gen *DMR6* o buscando cambios de nucleótidos (mutaciones) mediante el método TILLING, mediante secuenciación de DNA o mediante cualquier otro método para identificar cambios de nucleótidos. Las plantas seleccionadas son homocigóticas o se hacen homocigóticas mediante autofecundación o fecundación cruzada. Las plantas homocigóticas seleccionadas con actividad ausente o reducida de transcritos de DMR6 son examinadas en cuanto a una resistencia aumentada hacia el agente patógeno de interés para confirmar la resistencia aumentada a la enfermedad.

#### 40 Ejemplo 4

Transferencia de un alelo mutado al fondo genético de un cultivo deseado

La introgresión del alelo mutante deseado a un cultivo se lleva a cabo mediante cruce y exploración genotípica del alelo mutante. Éste es un procedimiento estándar en la reproducción actual de cultivos con ayuda de marcadores.

### Ejemplo 5

#### 45 Uso del promotor DMR6 para una expresión génica inducida por agentes patógenos y la generación de plantas resistentes a enfermedades

Un control preciso de la expresión transgénica es esencial para la modificación genética de plantas con resistencia aumentada a enfermedades. En el pasado, la sobreexpresión constitutiva de transgenes ha dado frecuentemente lugar a plantas de mala calidad. Por lo tanto, se ha sugerido utilizar promotores inducibles por agentes patógenos, mediante los cuales sólo se expresan los transgenes cuando y donde son necesarios - en sitios de infección.

La expresión local e inducible de genes genéticamente modificados, por ejemplo, genes conmutadores maestro, genes provocadores o Avr, genes antimicrobianos o genes tóxicos, da lugar a la activación de defensa o muerte

celular que conducirá a resistencia a agentes patógenos, tal como describen Gurr y 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 conseguir una muerte celular inducida que conduzca a resistencia a enfermedades. La especificidad tisular y la capacidad para inducir expresión son de importancia capital para tales planteamientos, como describen Gurr y Rushton (Trends in Biotechnology 23: 283-290, 2005).

De acuerdo con la presente invención, basándose en un análisis de promotor-GUS, se ha demostrado que el promotor DMR6 muestra una expresión intensa, inducible y localizada. De este modo, el promotor DMR6 es muy adecuado para modificar genéticamente la resistencia a enfermedades en plantas transgénicas. El promotor DMR6 consiste en una región de 2,5 kb que está cadena arriba de la secuencia de codificación de DMR6 de *Arabidopsis* (codón de inicio: ATG) e incluye la 5'-UTR (como se representa en la Figura 11). Este promotor inducible por agentes patógenos es luego utilizado para crear construcciones transgénicas adecuadas utilizando técnicas estándares conocidas por la persona experta en este campo técnico.

Utilizando secuencias de DNA ortólogas de una especie vegetal dada, se diseñan cebadores para PCR. Estos son luego utilizados para explorar bancos genómicos de la especie vegetal de interés para identificar los clones genómicos que contienen el ortólogo DMR6 con sus secuencias promotoras y reguladoras. Alternativamente, los clones genómicos son aislados explorando un banco con un fragmento de PCR etiquetado que corresponde al gen ortólogo DMR6. Una secuenciación revela la secuencia de nucleótidos del promotor. La región de 2-5 kb cadena arriba de la secuencia de codificación del ortólogo DMR6 (codón de inicio: ATG), incluyendo así la 5'-UTR, es luego multiplicada por PCR para crear construcciones transgénicas para la transformación de plantas.

#### Ejemplo 6

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

En resumen, se aisló mRNA usando métodos estándares y se sintetizó cDNA utilizando un cebador de oligo-dT y métodos estándares. Posteriormente se generaron fragmentos de PCR usando pares de cebadores para cada cultivo, como se representan más adelante en la Tabla 3. Se clonaron los productos de PCR generados en un vector pENTR/D-TOPO usando el kit de clonación pENTR/D-TOPO de Invitrogen y se analizaron los plásmidos resultantes con tamaños de inserto correctos, según se determinaron por PCR, mediante secuenciación de DNA. Se realizó la recombinación con el vector pB7WG2.0 usando LR Clonase II de Invitrogen y se analizaron los plásmidos resultantes mediante PCR y digestión con enzimas de restricción. Se transformaron bacterias *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 PGV2260 con plásmidos adecuados y se analizaron los plásmidos de *Agrobacterium* mediante PCR y digestión con enzimas de restricción.

Se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana dmr6-1* con las construcciones anteriores por inmersión en disolución de bacterias *Agrobacterium* y se verificó la sobreexpresión de *DMR6* de cultivos en plantas de *Arabidopsis* T1 mediante RT-PCR utilizando los cebadores de clonación para *DMR6* de cultivos (Tabla 3). Finalmente, se infectaron plantas de *Arabidopsis* T2 y T3 con *Hyaloperonospora parasitica* Cala2 para confirmar la complementación. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Como se muestra en la Figura 14, todos los ortólogos *DMR6* examinados eran capaces de complementar el mutante *dmr6-1* de *Arabidopsis thaliana*, lo que indica que los ortólogos *DMR6* identificados codifican proteínas *DMR6* con una funcionalidad similar a la de *DMR6* de *Arabidopsis thaliana*.

#### Tablas

En la Tabla 1 se enumeran los números GI (identificador de GenInfo) y el número de acceso de GenBank para marcadores de secuencia expresada (ESTs; del inglés, *expressed sequence tags*) y secuencias de mRNA o proteína del mRNA de *DMR6* de *Arabidopsis* y secuencias ortólogas de otras especies vegetales. Un número GI (identificador de GenInfo, a veces escrito en minúsculas, "gi") es un número entero único que permite identificar una secuencia concreta. El número GI es una serie de guarismos que se asignan consecutivamente a cada registro secuencial procesado por el NCBI. De este modo, el número GI cambia cada vez que cambia la secuencia. El NCBI asigna números GI a todas las secuencias procesadas en Entrez, incluyendo secuencias de nucleótidos de DDBJ/EMBL/GenBank, secuencias proteicas de SWISS-PROT, PIR y muchas otras. Por lo 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 una secuencia de GenBank resulta modificada, incluso por un solo par de bases, se asigna un nuevo número GI a la secuencia actualizada. El número de acceso sigue siendo el mismo. El número GI es siempre estable y recuperable. De este modo, la referencia a números GI en la tabla proporciona una identificación clara e inequívoca de la secuencia correspondiente.

Tabla 1

<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Detalle</b>	<b>Número GI</b>	<b>Genbank</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	mRNA	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
			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	Genoma borrador		MtrDRAFT_AC119415g1v1
		Proteína	92878635	ABE85154
<i>Oryza sativa 1</i>	Arroz	Genoma		OSJNBb0060I05.4
		Proteína	18057095	AAL58118.1
<i>Oryza sativa 2</i>		mRNA	115450396	NM_001055334
		Proteína	115450397	NP_001048799
<i>Oryza sativa 3</i>		mRNA	115460101	NM_001060186
		Proteína	115460102	NP_001053651
<i>Populus trichocarpa 1</i>	Álamo	Genoma: LG_XII:3095392-3103694		
		Proteína: Poptr1_1:569679, eugene3.00120332		

ES 2 562 187 T3

<i>Populus trichocarpa</i> 2	Álamo	Genoma: LG_XV:201426-209590		
		Proteína: Poptr1_1:732726, estExt_Genewise1_v1.C_LG_XV0083		
<i>Solanum lycopersicum</i> 1	Tomatera	ESTs	62932307	BW689896.1
			58229384	BP885913.1
			117682646	DB678879.1
			5894550	AW035794.1
			117708809	DB703617.1
			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> 2	Tomatera	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
<i>Vitis vinifera</i>	Vid	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 sativus</i>	Pepino	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tabaco	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		

**Tabla 2**

Secuencias cebadoras de marcadores de inserción/delección (diferencia de tamaños entre paréntesis) usados en el mapeo y la clonación del gen DMR6

Nombre del cebador	Gen	INDEL/ enzima	Cebador directo	Cebador inverso
IND_MOP9	At5G24210		ttgggaacagaaaaagtt ggaggt	catattcaaaagggaaaatcc caga
IND_K16H17	At5g24420		tgggggtgtggtttattctgtg ac	tggccaatagtagtgatagcgc aaga
IND_T4C12	At5g24820		tctcgggtaagacacaagt cgagat	tattccaacttgcgacgtagagc at
IND_T11H3	At5g24950-60		ccaattgggttatttactcga tt	cggcttttaacaacatatttcca tt
IND_F21J6	At5g25270		aacacatcaccaagatga atccaga	cctctgcccccaagaaatattga gat
M450	At5G24450	18	agctttgatgtagtgccaa tga	gcggtatacgggggttaaaatc ta
M490	At5g24490	TaqI	atggccaaccactctttgta c	acaagcaagaagaacagcg aag
M525	At5g24520-30	TaqI	gaaatttggttggcattta tc	tcaagatctcatattctcattcca tc
M545	At5G24540/50	41	cagctgaagatgttcatcc cttt	cttgcaattgtgggactaggtg a
M555	At5G24550/60	14	tcactaaccagtgaaaaag gttgc	tatacagcgaatagcaaagcc aag
M470	At5g24470	HphI	ccgcgagtgtaatatatctct cct	cagtttaacgcatgaagtgcta gt
M590	At5g24590	Pdml	gcatcattgtaccgtactga gtc	tagtggatactctgtccctgagg t

**Tabla 3**

Pares de cebadores para clonar 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	TGGGCCAAAAAGTTTATCCA
<i>Spinacia oleracea</i>	spi_fw	CACCATGGCAAACAAGATATTATCCA C
	spiUTR_rv	TTGCTGCCTACAAAAGTACAAA
<i>Lactuca sativa</i>	Lsat_fw	CACCATGGCCGCAAAGTCATCTC
	LsatUTR_rv	CATGGAAACACATATTCCTTCA
<i>Solanum lycopersicum</i>	Slyc1dmr6_fw	CACCATGGAAACCAAAGTTATTTCTA GC
	Slyc1dmr6UTR_rv	GGGACATCCCTATGAACCAA

**Listado de secuencias**

<110> Enza Zaden Beheer B.V. VAN DAMME, Mireille Maria Augusta VAN DEN ACKERVEKEN, Augustinus Franciscus Johannes Maria

5 <120> PLANTAS RESISTENTES A ENFERMEDADES

<130> 4/2MG93/24E

10 <150> PCT/EP2007/050976  
<151> 01-02-2007

<160> 98

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 33  
<212> ADN  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador directo

25 <400> 1

ttctgggatc caatggcggc aaagcttgat atc 33

<210> 2  
30 <211> 39  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
35 <223> cebador inverso

<400> 2

40 gatatatgaa ttcttagtg ttagaaaat tctcgaggc 39

<210> 3  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> RNAiDMR6F

<400> 3

50 aaaaagcagg ctgaccgtcc acgtctctct gaa 33

<210> 4  
<211> 33  
55 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> RNAiDMR6R

60 <400> 4

agaagctgg gtgaaacgat gcgaccgata gtc 33

65 <210> 5  
<211> 29

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> attB1  
  
 <400> 5  
  
 10 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct 29  
 <210> 6  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> attB2  
  
 <400> 6  
 20 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt 29  
 <210> 7  
 <211> 26  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> internal primer for At5G24530  
 30 <400> 7  
  
 gagaagtggg atttaaata gaggaa 26  
 35 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> QDMR6F  
  
 <400> 8  
 45 tgtcatcaac atagtgacc ag 22  
 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> QDMR6R  
 55 <400> 9  
  
 cgatagtcac ggatttctg tg 22  
 60 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 65 <223> QAt1g114880F

ES 2 562 187 T3

<400> 10  
 ctcaaggaga atggtccaca 20  
 5 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> QAt1g14880R  
 <400> 11  
 15 cgacttgcc aaatgtgata 20  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> QAt4g14365F  
 25 <400> 12  
 tggtttctg aggcatgtaa a 21  
 <210> 13  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> QAtfg14365R  
 <400> 13  
 40 agtcaggaa cattggtgt 20  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> QACD6F  
 <400> 14  
 50 tggacagttc tggagcagat 20  
 <210> 15  
 <211> 18  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> QACD6R  
 60 <400> 15  
 caactctcc gctgtgag 18  
 65 <210> 16  
 <211> 23

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> QPR-5F  
  
 <400> 16  
  
 ggcaaatatc tccagtattc aca 23  
 10  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> QPR-5R  
  
 <400> 17  
 20  
 ggtagggcaa ttgttcctta ga 22  
  
 <210> 18  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> QPR-2F  
 30  
 <400> 18  
  
 aaggagctta gcctcaccac 20  
 35  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> QPR-2R  
  
 <400> 19  
 45 gagggaagca agaatggaac 20  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> QPR-1F  
 55  
 <400> 20  
  
 gaacacgtgc aatggagttt 20  
 60  
 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 65 <223> QPR-1R

<400> 21  
 ggtccacca ttgtfacacc t 21  
 5 <210> 22  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> QACT2F  
 <400> 22  
 15 aatcacagca cttgcacca 19  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> QACT2R  
 25 <400> 23  
 gagggaagca agaatggaac 20  
 <210> 24  
 30 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Lsat\_dmr6\_fw1  
 <400> 24  
 gatcaaggtc aacacatgg 19  
 40 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Lsat\_dmr6\_fw2  
 <400> 25  
 50 tcaaccatta cccagtgatgc 20  
 <210> 26  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> dmr6\_deg\_fw1B  
 60 <400> 26  
 ttccaggtta ttaaycaygg 20  
 65 <210> 27  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> dmr6\_deg\_fw2B  
  
 <400> 27  
  
 cataaaytgga grgaytayct 20  
 10  
 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> dmr6\_deg\_fw3b  
  
 <400> 28  
 20  
 garcaaggrc arcayatggc 20  
  
 <210> 29  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> dmr6\_deg\_fw4  
 30  
 <400> 29  
  
 aatcctcctt chtcaagga 20  
 35  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> dmr6\_deg\_rv3B  
  
 <400> 30  
 45 agtgcattkg ggtchgtrtg 20  
  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> dmr6\_deg\_rv4  
 55  
 <400> 31  
  
 aatgttratg acaaargcat 20  
 60  
 <210> 32  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 65  
 <220>  
 <223> dmr6\_deg\_rv5

<400> 32  
 gccatrtgyt gyccttgytc 20  
 5 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Cuc\_dmr6\_rv1  
 <400> 33  
 15 tccggacatt gaaactgtg 20  
 <210> 34  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cuc\_dmr6\_rv2  
 25 <400> 34  
 tcaaagaact gcttgccaac 20  
 <210> 35  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Cuc\_dmr6\_fw1  
 <400> 35  
 40 cgactcacc attctcttc 20  
 <210> 36  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cuc\_dmr6\_fw2  
 <400> 36  
 50 ggcctccaag tctcaaag 19  
 <210> 37  
 <211> 25  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> IND\_MOP9 Fw  
 60 <400> 37  
 tttgggaaca gaaaaagtg gaggt 25  
 65 <210> 38  
 <211> 25

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> IND\_MOP9 Rv  
  
 <400> 38  
  
 catattcaaa agggaaaatc ccaga 25  
 10  
 <210> 39  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> IND\_K16H17 Fw  
  
 <400> 39  
 20  
 tggggtgtg gtttattctg ttgac 25  
  
 <210> 40  
 <211> 26  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> IND\_K16H17 Rv  
 30  
 <400> 40  
  
 tggccaatag tagttgatac gcaaga 26  
 35  
 <210> 41  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> IND\_T4C12 Fw  
  
 <400> 41  
 45 tctcgggtaa gacacaagtc gagat 25  
  
 <210> 42  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> IND\_T4C12 Rv  
 55  
 <400> 42  
  
 tattccaact tgcgacgtag agcat 25  
 60  
 <210> 43  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 65 <223> IND\_T11H3 Fw

ES 2 562 187 T3

<400> 43  
 ccaattgggt tatttacttc gatt 24

5 <210> 44  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> IND\_T11H3 Rv  
 <400> 44

15 cggtctttaa caacatatt tcca 24  
 <210> 45  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> IND\_F21J6 fw primer

25 <400> 45  
 aacacatcac caagatga 18  
 <210> 46  
 30 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> IND\_F21J6 rv primer  
 <400> 46

40 cctctgcccc aagaaatatt gagat 25  
 <210> 47  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> M450 fw  
 <400> 47

50 agctttgtat ggtagtgcca atga 24  
 <210> 48  
 <211> 24  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> M450 Rv

60 <400> 48  
 gcggtatacg ggggttaaaa tcta 24

65 <210> 49  
 <211> 22

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> M490 Fw  
  
 <400> 49  
  
 atggccaacc actctttggt ac 22  
 10  
 <210> 50  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> M490 Rv  
  
 <400> 50  
 20  
 acaagcaaga agaacagcga ag 22  
  
 <210> 51  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> M525 Fw  
 30  
 <400> 51  
  
 gaaatttgggt tgttggcatt tatc 24  
 35  
 <210> 52  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> M525 Rv  
  
 <400> 52  
 45 tcaagatctt catattctca ttcca 25  
  
 <210> 53  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> M545 Fw  
 55  
 <400> 53  
  
 cagctgaagt atgtttcatc ccttt 25  
 60  
 <210> 54  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 65  
 <220>  
 <223> M545 Rv

<400> 54  
 cttgcaattg ttgggactag gtaa 24

5 <210> 55  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> M555 Fw  
 <400> 55

15 tcactaacca gtgaaaaagg ttgc 24  
 <210> 56  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> M555 Rv

25 <400> 56  
 tatacagcga atagcaaagc caag 24  
 <210> 57  
 30 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> M470 Fw  
 <400> 57

40 ccgcgagtgt aatatatctc tcct 24  
 <210> 58  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> M470 Rv  
 <400> 58

50 cagtttaacg catgaagtgc tagt 24  
 <210> 59  
 <211> 24  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> M590 Fw

60 <400> 59  
 gcatcattg taccgtactg agtc 24

65 <210> 60  
 <211> 24



ES 2 562 187 T3

Met Ala Ala Lys Leu Ile Ser Thr Gly Phe Arg His Thr Thr Leu Pro  
 1 5 10 15

Glu Asn Tyr Val Arg Pro Ile Ser Asp Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val  
 20 25 30

Ser Gln Leu Glu Asp Phe Pro Leu Ile Asp Leu Ser Ser Thr Asp Arg  
 35 40 45

Ser Phe Leu Ile Gln Gln Ile His Gln Ala Cys Ala Arg Phe Gly Phe  
 50 55 60

Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Asn Lys Gln Ile Ile Asp Glu Met  
 65 70 75 80

Val Ser Val Ala Arg Glu Phe Phe Ser Met Ser Met Glu Glu Lys Met  
 85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Thr Lys Thr Thr Arg Leu Ser Thr Ser  
 100 105 110

Phe Asn Val Lys Lys Glu Glu Val Asn Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
 115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Ile His Lys Tyr Val Asn Glu Trp Pro Ser Asn  
 130 135 140

Pro Pro Ser Phe Lys Glu Ile Val Ser Lys Tyr Ser Arg Glu Val Arg  
 145 150 155 160

Glu Val Gly Phe Lys Ile Glu Glu Leu Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu  
 165 170 175

Glu Lys Asp Tyr Met Lys Lys Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
 180 185 190

Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly  
 195 200 205

Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
 210 215 220

Thr Thr Val Cys Gly Leu Gln Ile Leu Ile Asp Gly Gln Trp Phe Ala  
 225 230 235 240

ES 2 562 187 T3

Val Asn Pro His Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu  
245 250 255

Gln Ala Leu Ser Asn Gly Val Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Val  
260 265 270

Thr Asn Thr Glu Asn Pro Arg Leu Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
275 280 285

Ala Asp Cys Ala Val Met Ser Pro Ala Lys Pro Leu Trp Glu Ala Glu  
290 295 300

Asp Asp Glu Thr Lys Pro Val Tyr Lys Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr  
305 310 315 320

Tyr Lys Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu  
325 330 335

Asn Phe Leu Asn Asn  
340

<210> 63  
<211> 242  
<212> PRT  
<213> Aquilegia sp.

5

<400> 63

Met Glu Ser Ser Asn Val Leu Leu Thr Gly Thr Arg His Ser Asn Leu  
1 5 10 15

Pro Glu Asn Tyr Val Arg Ser Val Ser Asp Arg Pro Arg Leu Ser Glu  
20 25 30

Val Lys Asp Cys Glu Asn Val Pro Val Ile Asp Leu Ser Val Ala Asp  
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Ala Gln Gln Ile Gly Asn Ala Cys Lys Ser His Gly  
50 55 60

Phe Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Asn Ser Glu Leu Val Glu Lys  
65 70 75 80

Met Met Glu Ile Ser His Glu Phe Phe His Leu Pro Leu Asp Val Lys  
85 90 95

Met Gln Phe Tyr Ser Asp Asp Pro Thr Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr  
100 105 110

10

ES 2 562 187 T3

Ser Phe Asn Leu Lys Lys Glu Ser Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu  
 115 120 125

Arg Leu His Cys His Pro Ile Glu Lys Tyr Val Gln Glu Trp Pro Ser  
 130 135 140

Val Pro Ser Thr Phe Lys Asp Val Val Ala Thr Tyr Cys Lys Glu Val  
 145 150 155 160

Arg Lys Leu Gly Leu Arg Leu Leu Gly Ser Ile Ser Leu Ser Leu Gly  
 165 170 175

Leu Glu Glu Asp Tyr Ile Glu Lys Val Leu Gly Asp Gln Gly Gln His  
 180 185 190

Met Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr  
 195 200 205

Gly Leu Pro Arg His Thr Asp Pro Asn Thr Ile Thr Ile Leu Leu Gln  
 210 215 220

Gly Gln Glu Val Ala Gly Leu Gln Val Leu His Asn Gly Lys Trp Val  
 225 230 235 240

Ala Val

<210> 64

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Citrus sinensis

<400> 64

Met Asp Thr Lys Val Leu Ser Ser Gly Ile Arg Tyr Thr Asn Leu Pro  
 1 5 10 15

Glu Gly Tyr Val Arg Pro Glu Ser Glu Arg Pro Asn Leu Ser Glu Val  
 20 25 30

Ser Glu Cys Lys Asn Val Pro Val Ile Asp Leu Ala Cys Asp Asp Arg  
 35 40 45

Ser Leu Ile Val Gln Gln Val Ala Asp Ala Cys Lys Asn Tyr Gly Phe  
 50 55 60

Phe Gln Ala Ile Asn His Glu Val Pro Leu Glu Thr Val Glu Arg Val  
 65 70 75 80

Leu Glu Val Ala Lys Glu Phe Phe Asn Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu  
 85 90 95

10

ES 2 562 187 T3

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
 100 105 110

Phe Asn Val Asn Lys Glu Lys Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
 115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Tyr Val Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
 130 135 140

Pro Ser Thr Phe Lys Glu Phe Val Ser Thr Tyr Cys Ser Glu Val Arg  
 145 150 155 160

Gly Leu Gly Tyr Arg Val Leu Glu Leu Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu  
 165 170 175

Glu Lys Asp Tyr Ile Lys Lys Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
 180 185 190

Ala Val Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly  
 195 200 205

Leu Pro Gly His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
 210 215 220

Leu Glu Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Asp Lys Trp Val Ala  
 225 230 235 240

Val Asn Pro Leu Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu  
 245 250 255

Gln Ala Leu Ser Asn Gly Arg Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Ile  
 260 265 270

Val Asn Ala Glu Lys Ala Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
 275 280 285

Asn Asn Asp Ala Met Ile Ser Pro Pro Lys Ala Leu Thr Glu Asp Gly  
 290 295 300

Ser Gly Ala Val Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr Ser Lys  
 305 310 315 320

Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Lys  
 325 330 335

Asn

<210> 65

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Coffea canephora

<400> 65

ES 2 562 187 T3

Met Glu Thr Lys Val Ile Ser Ser Gly Ile Lys Tyr Thr Ser Leu Pro  
 1 5 10 15

Glu Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Glu Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val  
 20 25 30

Ser Asp Cys Gln Asn Val Pro Val Val Asp Leu Gly Phe Gly Asp Arg  
 35 40 45

Asn Leu Met Val Arg Gln Ile Gly Asp Ala Cys Arg Asp Tyr Gly Phe  
 50 55 60

Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Ser Lys Asp Ala Val Asp Lys Met  
 65 70 75 80

Leu Glu Thr Ala Thr Glu Phe Phe Ser Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu  
 85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Thr Arg Leu Ser Thr Ser  
 100 105 110

Phe Asn Val Lys Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
 115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Glu Lys Tyr Val Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
 130 135 140

Pro Pro Ser Phe Lys Glu Met Val Ser Asn Tyr Cys Val Gln Ile Arg  
 145 150 155 160

Glu Leu Gly Leu Arg Leu Glu Glu Ala Ile Ala Glu Ser Leu Gly Leu  
 165 170 175

Asp Lys Glu Cys Ile Lys Lys Val Leu Gly Asp Gln Gly Gln His Met  
 180 185 190

Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Asp Leu Thr Tyr Gly  
 195 200 205

Leu Pro Gly His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
 210 215 220

Leu Asn Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Arg Asp Gly Arg Trp Leu Ala



ES 2 562 187 T3

<210> 67  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> Cucumis sativus

5

<400> 67

Met Ser Ser Val Met Glu Ile Gln Leu Leu Cys Ser Gly Gly Arg His  
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Pro Glu Lys Tyr Glu Arg Pro Glu Ser Asp Arg Pro Arg  
 20 25 30

Leu Ser Glu Val Cys Cys Trp Asp Lys Val Pro Ile Ile Asp Leu Gly  
 35 40 45

Cys Glu Glu Arg Glu Met Ile Val Lys Gln Val Glu Glu Ala Cys Lys  
 50 55 60

Ser Tyr Gly Phe Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Arg Lys Glu Leu  
 65 70 75 80

Val Glu Lys Val Ile Glu Val Gly Lys Gln Phe Phe Glu Leu Pro Met  
 85 90 95

Glu Glu Lys Leu Lys Phe Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Val Arg  
 100 105 110

Leu Ser Thr Ser Phe Asn Val Arg Lys Glu Gln Phe Arg Asn Trp Arg  
 115 120 125

Asp Tyr Leu Arg Leu His Cys Tyr Pro Leu Ser Asn Tyr Thr Pro His  
 130 135 140

Trp Pro Ser Asn Pro Pro Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Ser Tyr Cys  
 145 150 155 160

Asn Glu Val Arg Lys Val Gly Tyr Arg Ile Glu Glu Leu Ile Ser Glu  
 165 170 175

Ser Leu Gly Leu Glu Lys Glu Tyr Ile Arg Lys Lys Leu Gly Glu Gln  
 180 185 190

Gly Gln His Met Ala Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Glu

10

ES 2 562 187 T3

195

200

205

Leu Thr Tyr Gly Leu Pro Gly His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile  
210 215 220

Leu Leu Gln Asp Leu His Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly  
225 230 235 240

Lys Trp Leu Ala Val Asn Pro His Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Ile  
245 250 255

Gly Asp Gln Leu Gln Ala Leu Ser Asn Gly Val Tyr Lys Ser Val Trp  
260 265 270

His Arg Ala Val Val Asn Val Asp Lys Pro Arg Leu Ser Val Ala Ser  
275 280 285

Phe Leu Cys Pro Cys Asp Asp Ala Leu Ile Thr Pro Ala Pro Leu Leu  
290 295 300

Ser Gln Pro Ser Pro Ile Tyr Arg Pro Phe Thr Tyr Ala Gln Tyr Tyr  
305 310 315 320

Asn Thr Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Gln His Cys Leu Glu Leu  
325 330 335

Phe Lys Asn His Pro Pro  
340

<210> 68

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Gossypium hirsutum

<400> 68

Met Asp Thr Lys Val Leu Ser Ser Gly Ile His Tyr Ser Ser Leu Pro  
1 5 10 15

Glu Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Glu Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val  
20 25 30

Ser Gln Cys Asp Asn Val Pro Val Ile Asp Leu Gly Cys Glu Asp Arg  
35 40 45

Ser His Ile Val Gln Gln Ile Ala Leu Ala Cys Ile Asn Tyr Gly Phe  
50 55 60

10 Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Ser Lys Glu Ala Val Glu Arg Met  
65 70 75 80

ES 2 562 187 T3

Leu Gln Val Ala His Asp Phe Phe Gly Leu Pro Val Glu Glu Lys Met  
85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
100 105 110

Phe Asn Val Lys Lys Glu Lys Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu His Lys Tyr Val Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
130 135 140

Pro Pro Ser Phe Lys Gln Ile Val Ser Asp Tyr Cys Val Gln Val Arg  
145 150 155 160

Glu Leu Gly Tyr Arg Leu Gln Glu Leu Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu  
165 170 175

Glu Lys Asp Tyr Ile Lys Lys Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
180 185 190

Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly  
195 200 205

Leu Pro Gly His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
210 215 220

Leu Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp Leu Ala  
225 230 235 240

Val Asn Pro Gln Thr Asn Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu  
245 250 255

Gln Ala Leu Ser Asn Gly Thr Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Ile  
260 265 270

Val Asn Thr Asp Lys Pro Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
275 280 285

Tyr Asp His Ala Leu Ile Ser Pro Ala Lys Pro Leu Thr Gln His Gly  
290 295 300

Cys Gly Ala Val Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr Ser Lys  
305 310 315 320

Phe Trp Gly Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Lys  
325 330 335

Asn

<210> 69

5 <211> 1014

<212> ADN

<213> Lactuca sativa

<400> 69

10

ES 2 562 187 T3

atggccgcaa aagtcattct cagtggattc cgtatacta ctctaccgga gagctacgtc 60  
 cgtccgggta acgacagacc taacctatct caagtttccg attgcaacga cgttcctggt 120  
 attgacatcg gttgtgggta tagacaactc ataagccaac aaattggcga tgcttgtaga 180  
 agatacgggt ttttcaggt gattaatcat ggtgtgcctg atgaaatagt ggagaaaatg 240  
 caacaagtag gtagggagtt tttcctggtg cctgtggaag agaagatgaa gctttactca 300  
 gaggatccat cgaagacgat gaggctatcc accagcttta acgtccaaaa agaacaaatt 360  
 cataactggc gagattatct ccgccttcac tgttatctc tggatcaata cagtcctgaa 420  
 tggccttcaa atccttctta tttcaaggaa tatgttggtta attattgtac agcagtgcga 480  
 aatttaggaa tgagaatatt agaatcaata tcagaaagtt tagggttaca aaaagaagaa 540  
 ataaaaacta tattaggcga tcaaggtcaa cacatggcca tcaaccatta cccagtgtgc 600  
 cctgagcccg agctaacctc cgggctaccc gggcacacag accccaatgc tctcaccatc 660  
 cttctacagg acacactggt ctctggtctt caggttctca aagatggcaa atggttagcc 720  
 gttaaaccac accctaatgc gtttgtaatt aacattgggtg atcagttaga ggcggtgagt 780  
 aatggtgaat ataaaagtgt atggcatcga gctgtgggta actcagacaa cccgcgaatg 840  
 tctatagctt cgtttttgtg tccttgtaat gacaccgta ttagggctcc taaagaaata 900  
 ataaaggaag gatcgaaacc tgttttcaaa gaatttactt atgcagaata ctacgcgaag 960  
 ttttgacaaa gaaaccttga tcaagaacat tgcttagaat tcttcaagaa ctag 1014

<210> 70  
 <211> 337  
 <212> PRT  
 <213> Lactuca sativa

5

<400> 70

Met Ala Ala Lys Val Ile Ser Ser Gly Phe Arg Tyr Thr Thr Leu Pro  
 1 5 10 15

Glu Ser Tyr Val Arg Pro Val Asn Asp Arg Pro Asn Leu Ser Gln Val  
 20 25 30

Ser Asp Cys Asn Asp Val Pro Val Ile Asp Ile Gly Cys Gly Asp Arg  
 35 40 45

10

Gln Leu Ile Ser Gln Gln Ile Gly Asp Ala Cys Arg Arg Tyr Gly Phe



ES 2 562 187 T3

<400> 71

Met Asp Thr Lys Val Leu Ser Ser Gly Ile His Tyr Ser Lys Leu Pro  
 1 5 10 15

Glu Ser Tyr Ile Arg Pro Glu Ser Asp Arg Pro Cys Leu Ser Gln Val  
 20 25 30

Ser Glu Phe Glu Asn Val Pro Ile Ile Asp Leu Gly Ser His Asn Arg  
 35 40 45

Thr Gln Ile Val Gln Gln Ile Gly Glu Ala Cys Ser Ser Tyr Gly Phe  
 50 55 60

Phe Gln Val Val Asn His Gly Val Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Thr  
 65 70 75 80

Ala Glu Val Ala Tyr Asp Phe Phe Lys Leu Pro Val Glu Glu Lys Met  
 85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Thr Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
 100 105 110

Phe Asn Val Asn Lys Glu Glu Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
 115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Asp Asn Tyr Val Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
 130 135 140

Pro Pro Ser Phe Lys Glu Thr Val Ala Asn Tyr Cys Lys Glu Val Arg  
 145 150 155 160

Glu Leu Gly Leu Arg Ile Glu Glu Tyr Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu  
 165 170 175

Glu Lys Asp Tyr Leu Arg Asn Ala Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
 180 185 190

5

ES 2 562 187 T3

Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr Tyr Gly  
195 200 205

Leu Pro Gly His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
210 215 220

Leu His Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp Leu Ala  
225 230 235 240

Ile Asn Pro Ile Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu  
245 250 255

Gln Ala Leu Ser Asn Gly Leu Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Ile  
260 265 270

Val Asn Ala Glu Lys Pro Arg Leu Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
275 280 285

Asp Asn Glu Ala Leu Ile Cys Pro Ala Lys Pro Leu Thr Glu Asp Gly  
290 295 300

Ser Gly Ala Val Tyr Arg Gly Phe Thr Tyr Pro Glu Tyr Tyr Ser Lys  
305 310 315 320

Phe Trp Ser Arg Asp Leu Glu Lys Glu His Cys Leu Glu Phe Phe Lys  
325 330 335

Asn Asn

<210> 72

<211> 342

5 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 72

Met Ala Ala Glu Ala Glu Gln Gln His Gln Leu Leu Ser Thr Ala Val  
1 5 10 15

His Asp Thr Met Pro Gly Lys Tyr Val Arg Pro Glu Ser Gln Arg Pro  
20 25 30

Arg Leu Asp Leu Val Val Ser Asp Ala Arg Ile Pro Val Val Asp Leu  
35 40 45

Ala Ser Pro Asp Arg Ala Ala Val Val Ser Ala Val Gly Asp Ala Cys  
50 55 60

10 Arg Thr His Gly Phe Phe Gln Val Val Asn His Gly Ile Asp Ala Ala  
65 70 75 80

ES 2 562 187 T3

Leu Ile Ala Ser Val Met Glu Val Gly Arg Glu Phe Phe Arg Leu Pro  
85 90 95

Ala Glu Glu Lys Ala Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ile  
100 105 110

Arg Leu Ser Thr Ser Phe Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp  
115 120 125

Arg Asp Tyr Leu Arg Leu His Cys Tyr Pro Leu His Gln Phe Val Pro  
130 135 140

Asp Trp Pro Ser Asn Pro Pro Ser Phe Lys Glu Ile Ile Gly Thr Tyr  
145 150 155 160

Cys Thr Glu Val Arg Glu Leu Gly Phe Arg Leu Tyr Glu Ala Ile Ser  
165 170 175

Glu Ser Leu Gly Leu Glu Gly Gly Tyr Met Arg Glu Thr Leu Gly Glu  
180 185 190

Gln Glu Gln His Met Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Gln Cys Pro Glu Pro  
195 200 205

Glu Leu Thr Tyr Gly Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr  
210 215 220

Ile Leu Leu Met Asp Asp Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Asn Asp  
225 230 235 240

Gly Lys Trp Ile Ala Val Asn Pro Gln Pro Gly Ala Leu Val Ile Asn  
245 250 255

Ile Gly Asp Gln Leu Gln Ala Leu Ser Asn Gly Lys Tyr Arg Ser Val  
260 265 270

Trp His Arg Ala Val Val Asn Ser Asp Arg Glu Arg Met Ser Val Ala  
275 280 285

Ser Phe Leu Cys Pro Cys Asn Ser Val Glu Leu Gly Pro Ala Lys Lys  
290 295 300

Leu Ile Thr Asp Asp Ser Pro Ala Val Tyr Arg Asn Tyr Thr Tyr Asp  
305 310 315 320

Glu Tyr Tyr Lys Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys  
325 330 335

Leu Glu Leu Phe Arg Thr  
340

5 <210> 73  
<211> 342  
<212> PRT  
<213> Oryza sativa

10 <400> 73

ES 2 562 187 T3

Met Ala Asp Gln Leu Ile Ser Thr Ala Asp His Asp Thr Leu Pro Gly  
 1 5 10 15

Asn Tyr Val Arg Pro Glu Ala Gln Arg Pro Arg Leu Ala Asp Val Leu  
 20 25 30

Ser Asp Ala Ser Ile Pro Val Val Asp Leu Ala Asn Pro Asp Arg Ala  
 35 40 45

Lys Leu Val Ser Gln Val Gly Ala Ala Cys Arg Ser His Gly Phe Phe  
 50 55 60

Gln Val Leu Asn His Gly Val Pro Val Glu Leu Thr Leu Ser Val Leu  
 65 70 75 80

Ala Val Ala His Asp Phe Phe Arg Leu Pro Ala Glu Glu Lys Ala Lys  
 85 90 95

Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ile Arg Leu Ser Thr Ser Phe  
 100 105 110

Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg Leu  
 115 120 125

His Cys Tyr Pro Leu His Arg Tyr Leu Pro Asp Trp Pro Ser Asn Pro  
 130 135 140

Pro Ser Phe Arg Glu Ile Ile Ser Thr Tyr Cys Lys Glu Val Arg Glu  
 145 150 155 160

Leu Gly Phe Arg Leu Tyr Gly Ala Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu Glu  
 165 170 175

Gln Asp Tyr Ile Lys Lys Val Leu Gly Glu Gln Glu Gln His Met Ala  
 180 185 190

Val Asn Phe Tyr Pro Lys Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Phe Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Met Asp Gln

ES 2 562 187 T3

210

215

220

Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Glu Gly Arg Trp Ile Ala Val  
225 230 235 240

Asn Pro Gln Pro Asn Ala Leu Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Gln  
245 250 255

Ala Leu Ser Asn Gly Arg Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Val Val  
260 265 270

Asn Ser Asp Lys Ala Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro Cys  
275 280 285

Asn Asp Val Leu Ile Gly Pro Ala Gln Lys Leu Ile Thr Asp Gly Ser  
290 295 300

Pro Ala Val Tyr Arg Asn Tyr Thr Tyr Asp Glu Tyr Tyr Lys Lys Phe  
305 310 315 320

Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Arg Thr  
325 330 335

Thr Pro Thr Asp Thr Ser  
340

<210> 74

<211> 340

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 74

Met Ala Thr Thr Gln Leu Leu Ser Thr Val Glu His Arg Glu Thr Leu  
1 5 10 15

Pro Glu Gly Tyr Ala Arg Pro Glu Ser Asp Arg Pro Arg Leu Ala Glu  
20 25 30

Val Ala Thr Asp Ser Asn Ile Pro Leu Ile Asp Leu Ala Ser Pro Asp  
35 40 45

Lys Pro Arg Val Ile Ala Glu Ile Ala Gln Ala Cys Arg Thr Tyr Gly  
50 55 60

Phe Phe Gln Val Thr Asn His Gly Ile Ala Glu Glu Leu Leu Glu Lys  
65 70 75 80

Val Met Ala Val Ala Leu Glu Phe Phe Arg Leu Pro Pro Glu Glu Lys  
85 90 95

5

10

ES 2 562 187 T3

Glu Lys Leu Tyr Ser Asp Glu Pro Ser Lys Lys Ile Arg Leu Ser Thr  
 100 105 110

Ser Phe Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu  
 115 120 125

Arg Leu His Cys His Pro Leu Glu Glu Phe Val Pro Glu Trp Pro Ser  
 130 135 140

Asn Pro Ala Gln Phe Lys Glu Ile Met Ser Thr Tyr Cys Arg Glu Val  
 145 150 155 160

Arg Gln Leu Gly Leu Arg Leu Leu Gly Ala Ile Ser Val Ser Leu Gly  
 165 170 175

Leu Glu Glu Asp Tyr Ile Glu Lys Val Leu Gly Glu Gln Glu Gln His  
 180 185 190

Met Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Arg Cys Pro Glu Pro Asp Leu Thr Tyr  
 195 200 205

Gly Leu Pro Lys His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Pro  
 210 215 220

Asp Pro His Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Arg Asp Gly Asp Gln Trp  
 225 230 235 240

Ile Val Val Asn Pro Arg Pro Asn Ala Leu Val Val Asn Leu Gly Asp  
 245 250 255

Gln Ile Gln Ala Leu Ser Asn Asp Ala Tyr Lys Ser Val Trp His Arg  
 260 265 270

Ala Val Val Asn Pro Val Gln Glu Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Met  
 275 280 285

Cys Pro Cys Asn Ser Ala Val Ile Ser Pro Ala Arg Lys Leu Val Ala  
 290 295 300

Asp Gly Asp Ala Pro Val Tyr Arg Ser Phe Thr Tyr Asp Glu Tyr Tyr  
 305 310 315 320

Lys Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu  
 325 330 335

Phe Lys Gly Gln  
 340

<210> 75

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 75

ES 2 562 187 T3

Met Asp Thr Lys Val Leu Ser Ser Gly Ile Gln Tyr Thr Asn Leu Pro  
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Glu Arg Pro Arg Leu Trp Glu Val  
 20 25 30

Ser Thr Cys Glu Asn Val Pro Val Ile Asp Leu Gly Cys Gln Glu Arg  
 35 40 45

Asp Gln Ile Val Gln Gln Val Gly Asp Ala Cys Lys Asn Tyr Gly Phe  
 50 55 60

Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Ser Leu Glu Ala Val Glu Lys Met  
 65 70 75 80

Leu Gly Val Ala His Asp Phe Phe Ser Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu  
 85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
 100 105 110

Phe Asn Val Asn Lys Glu Lys Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
 115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Tyr Ala Pro Glu Trp Pro Ser Lys  
 130 135 140

Pro Pro Pro Phe Lys Asp Ile Val Ser Ser Tyr Cys Ile Gln Val Arg  
 145 150 155 160

Glu Leu Gly Phe Arg Ile Gln Glu Leu Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu  
 165 170 175

Glu Lys Asp His Val Lys Asn Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
 180 185 190

Ala Val Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Phe Gly  
 195 200 205

Leu Pro Gly His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
 210 215 220

Gln Ser Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp Val Ala  
 225 230 235 240

ES 2 562 187 T3

Val Asp Pro His Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu  
 245 250 255

Gln Ala Leu Ser Asn Gly Arg Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Ile  
 260 265 270

Thr Asn Thr Asp Lys Ala Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
 275 280 285

Tyr Asp Asn Ala Leu Ile Thr Pro Pro Lys Ala Leu Thr Asp Asp Gly  
 290 295 300

Thr Gly Ala Val Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr Lys Lys  
 305 310 315 320

Phe Trp Ser Arg Asp Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Lys  
 325 330 335

Asn Lys

<210> 76

<211> 338

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 76

Met Asp Thr Lys Val Ile Ser Ser Gly Val His Tyr Thr Asn Leu Pro  
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Glu Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val  
 20 25 30

Ser Thr Cys Glu Asp Val Pro Val Ile Asp Leu Gly Cys Gln Asp Arg  
 35 40 45

Asn Gln Ile Val Gln Gln Val Gly Asp Ala Cys Glu His Tyr Gly Phe  
 50 55 60

Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Ser Leu Glu Ala Val Glu Lys Met  
 65 70 75 80

Leu Gly Val Ala His Asp Phe Phe Ser Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu  
 85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
 100 105 110

5

10

ES 2 562 187 T3

Phe Asn Val Asn Lys Glu Lys Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
 115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Tyr Val Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
 130 135 140

Pro Pro Pro Phe Lys Glu Ile Val Arg Ser Tyr Ser Ile Gln Val Arg  
 145 150 155 160

Glu Leu Gly Phe Arg Ile Gln Glu Leu Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu  
 165 170 175

Glu Lys Asp His Ile Lys Asn Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
 180 185 190

Ala Val Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly  
 195 200 205

Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
 210 215 220

Leu Ser Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Leu Lys Asp Gly Lys Trp Val  
 225 230 235 240

Ala Val Asn Pro His Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln  
 245 250 255

Leu Gln Ala Leu Ser Asn Gly Arg Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala  
 260 265 270

Ile Thr Asn Thr Asp Lys Ala Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys  
 275 280 285

Pro Phe Asp Asn Ala Leu Ile Thr Pro Pro Lys Ala Leu Thr Asp Asp  
 290 295 300

Gly Thr Gly Ala Ile Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr Lys  
 305 310 315 320

Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe  
 325 330 335

Lys Asn

<210> 77

<211> 337

<212> PRT

<213> Solanum lycopersicum

<400> 77

5

ES 2 562 187 T3

Met Glu Thr Lys Val Ile Ser Ser Gly Ile Asn His Ser Thr Leu Pro  
1 5 10 15

Gln Ser Tyr Ile Arg Pro Glu Ser Asp Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val  
20 25 30

Val Asp Cys Glu Asn Val Pro Ile Ile Asp Leu Ser Cys Gly Asp Gln  
35 40 45

Ala Gln Ile Ile Arg Gln Ile Gly Glu Ala Cys Gln Thr Tyr Gly Phe  
50 55 60

Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Pro Lys Glu Val Val Glu Lys Met  
65 70 75 80

Leu Gly Val Ala Gly Glu Phe Phe Asn Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu  
85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
100 105 110

Phe Asn Val Lys Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Glu Lys Tyr Ala Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
130 135 140

Pro Ser Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Arg Tyr Cys Arg Glu Ile Arg  
145 150 155 160

Gln Leu Gly Phe Arg Leu Glu Glu Ala Ile Ala Glu Ser Leu Gly Leu  
165 170 175

Asp Lys Glu Cys Ile Lys Asp Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
180 185 190

Ala Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr Tyr Gly  
195 200 205

Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ser Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
210 215 220

Leu Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp Leu Ala  
225 230 235 240

Val Lys Pro Gln Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Leu Gly Asp Gln Leu  
245 250 255

ES 2 562 187 T3

Gln Ala Val Ser Asn Gly Lys Tyr Arg Ser Val Trp His Arg Ala Ile  
 260 265 270

Val Asn Ser Asp Gln Ala Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
 275 280 285

Cys Asp Ser Ala Lys Ile Ser Ala Pro Lys Leu Leu Thr Glu Asp Gly  
 290 295 300

Ser Pro Val Ile Tyr Gln Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr Asn Lys  
 305 310 315 320

Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Gln His Cys Leu Glu Leu Phe Lys  
 325 330 335

Asn

<210> 78

<211> 342

5 <212> PRT

<213> Solanum lycopersicum

<400> 78

Met Thr Thr Thr Ser Val Leu Ser Ser Gly Phe Asn His Ser Thr Leu  
 1 5 10 15

Pro Gln Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Gln Arg Pro Cys Met Ser Glu  
 20 25 30

Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Val Pro Val Ile Asp Met Ser Cys Thr  
 35 40 45

Asn Arg Asn Val Ile Val His Gln Ile Gly Glu Ala Cys Arg Leu Tyr  
 50 55 60

Gly Phe Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Ser Lys Lys Val Ile Asp  
 65 70 75 80

Glu Met Leu Gly Val Ser His Glu Phe Phe Lys Leu Pro Val Glu Glu  
 85 90 95

Lys Met Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser  
 100 105 110

Thr Ser Phe Asn Val Lys Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr  
 115 120 125

10 Leu Arg Leu His Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Tyr Ala Pro Glu Trp Pro

ES 2 562 187 T3

130

135

140

Ser Asn Pro Pro Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Lys Tyr Cys Met Glu  
145 150 155 160

Val Arg Glu Leu Gly Tyr Arg Leu Glu Glu Ala Ile Ser Glu Ser Leu  
165 170 175

Gly Leu Glu Lys Asp Cys Ile Lys Asn Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln  
180 185 190

His Met Ala Ile Asn Phe Tyr Pro Gln Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr  
195 200 205

Tyr Gly Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Ile Thr Ile Leu Leu  
210 215 220

Gln Asp Leu Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp  
225 230 235 240

Leu Ser Ile Lys Pro Gln Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Leu Gly Asp  
245 250 255

Gln Leu Glu Ala Leu Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Ser Ile Trp His Arg  
260 265 270

Ala Ile Val Asn Ser Asp Lys Ala Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu  
275 280 285

Cys Pro Asn Asp Cys Ser Ile Ile Ser Ala Pro Lys Thr Leu Thr Glu  
290 295 300

Asp Gly Ser Ser Ala Ile Tyr Arg His Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr  
305 310 315 320

Glu Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu Tyr Cys Leu Glu Leu  
325 330 335

Phe Lys Asn Asp Gly Thr  
340

<210> 79

<211> 336

5 <212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 79

10 Met Ala Glu Gln Leu Leu Ser Thr Ala Val His Asp Thr Leu Pro Gly  
1 5 10 15

ES 2 562 187 T3

Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ala Glu Val Val  
 20 25 30

Thr Gly Ala Arg Ile Pro Val Val Asp Leu Gly Ser Pro Asp Arg Ala  
 35 40 45

Ala Val Val Ala Ala Ile Gly Asp Ala Cys Arg Ser His Gly Phe Phe  
 50 55 60

Gln Val Leu Asn His Gly Val His Ala Asp Leu Val Ala Ala Val Met  
 65 70 75 80

Ala Val Gly Arg Ala Phe Phe Arg Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Lys  
 85 90 95

Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ala Arg Lys Ile Arg Leu Ser Thr Ser Phe  
 100 105 110

Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg Leu  
 115 120 125

His Cys His Pro Leu Asp Glu Phe Val Pro Asp Trp Pro Ser Asn Pro  
 130 135 140

Pro Asp Phe Lys Asp Thr Met Ser Thr Tyr Cys Lys Glu Val Arg Glu  
 145 150 155 160

Leu Gly Phe Arg Leu Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu Glu  
 165 170 175

Ala Ser Tyr Met Lys Glu Thr Leu Gly Glu Gln Glu Gln His Met Ala  
 180 185 190

Val Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Met Asp Gln  
 210 215 220

Asp Val Ala Gly Leu Gln Val Leu His Gly Gly Lys Trp Val Ala Val  
 225 230 235 240

Asn Pro Gln Pro Gly Ala Leu Ile Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Gln  
 245 250 255

Ala Leu Ser Asn Gly Gln Tyr Arg Ser Val Trp His Arg Ala Val Val  
 260 265 270

ES 2 562 187 T3

Asn Ser Asp Arg Glu Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro Cys  
 275 280 285

Asn His Val Val Leu Gly Pro Ala Lys Lys Leu Val Thr Glu Asp Thr  
 290 295 300

Pro Ala Val Tyr Arg Ser Tyr Thr Tyr Asp Glu Tyr Tyr Lys Lys Phe  
 305 310 315 320

Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Arg Thr  
 325 330 335

<210> 80  
 <211> 1020  
 <212> ADN  
 <213> Spinacia oleracea

5

<400> 80  
 atggcaaac agatattatc caccggaatt ccttacaaaa ccctccccga aagctacatc 60  
 cgacccgaaa atgagaggcc caacttatct caagtctccg attgcgagaa tgtccctggt 120  
 attgacttgg gtgccaaaga ccgtactcaa acaatccacc aagtcttcaa tgcttgtaaa 180  
 aattacgggt ttttccaggt gattaatcat ggggtgtcaa aggaattagc ggagaagatg 240  
 caaaaggtag ctcgagagtt ctctgatatg tcggttgagg aaaaaatgaa attatatagt 300  
 gacgatccaa ctaaaacact aagattgtct acaagtttta acgtaacaa agaggaagtt 360  
 cataattgga gagattatct taggetccat tgttggcctc ttgagcaata tgtccccgaa 420  
 tggccttcta accccccttc cttcaaggaa atagttagca agtacataaa agaagttagg 480  
 gaacttggtt tcagagtcca agaactaata tcagagagtt tagggttgga gaaagattac 540  
 ataaagaatg tcctaggaga tcaaggacaa cacatggctc ttaattatta ccctgagtgc 600  
 ccggagccag agatgacata cgggttgccg ggtcactactg accctaagtc ccttaccatc 660  
 cttctccaag acttgcaagt atctggcctt caaatTTTTA aggatggtaa atggcttgct 720  
 gtcaaacctc aacctgatgc ttttgtcatt aacattggtg atcaattgca ggcattaagt 780  
 aacggtatat acaagagtgt atggcacaga gcagttgtga acacagataa gccaaagatta 840  
 tcagtagctt cattcctctg ccccgccaat gatgcggtga taagcgcgcc aacacctctg 900  
 accgccaacg gatcaccggc tgtatataga gactatacgt atcctgagta ctacaagact 960  
 10 ttctggagta ggaacttggg ccaagagcac tgcttgagc tttttaaaaa ccaaacctag 1020

<210> 81  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> Spinacia oleracea

15

<400> 81

Met Ala Asn Lys Ile Leu Ser Thr Gly Ile Pro Tyr Lys Thr Leu Pro

20



ES 2 562 187 T3

Val Asn Thr Asp Lys Pro Arg Leu Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
 275 280 285

Ala Asn Asp Ala Leu Ile Ser Ala Pro Thr Pro Leu Thr Ala Asn Gly  
 290 295 300

Ser Pro Ala Val Tyr Arg Asp Tyr Thr Tyr Pro Glu Tyr Tyr Lys Thr  
 305 310 315 320

Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Lys  
 325 330 335

Asn Gln Thr

<210> 82

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Vitis sp.

<400> 82

Met Glu Ser Lys Val Leu Ser Thr Gly Ile Arg Tyr Leu Thr Leu Pro  
 1 5 10 15

Gln Ser Tyr Ile Arg Pro Glu Pro Glu Arg Pro Arg Leu Ser Gln Val  
 20 25 30

Ser Glu Cys Lys His Val Pro Ile Ile Asp Leu Gly Lys Asp Val Asn  
 35 40 45

Arg Ala Gln Leu Ile Gln His Ile Ala Asp Ala Cys Arg Leu Tyr Gly  
 50 55 60

Phe Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Ala Ala Glu Met Met Glu Lys  
 65 70 75 80

Met Leu Glu Val Ala Asp Glu Phe Tyr Arg Leu Pro Val Glu Glu Lys  
 85 90 95

Met Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Thr Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr  
 100 105 110

Ser Phe Asn Val Asn Lys Glu Lys Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu  
 115 120 125

10 Arg Leu His Cys Tyr Pro Leu Asp Gln Tyr Thr Pro Glu Trp Pro Ser  
 130 135 140

ES 2 562 187 T3

Asn Pro Pro Ser Phe Lys Glu Ile Val Ser Ser Tyr Cys Lys Glu Val  
145 150 155 160

Arg Glu Leu Gly Phe Arg Leu Gln Glu Met Ile Ser Glu Ser Leu Gly  
165 170 175

Leu Glu Lys Asp His Ile Lys Asn Val Phe Gly Glu Gln Gly Gln His  
180 185 190

Met Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr Tyr  
195 200 205

Gly Leu Pro Gly His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln  
210 215 220

Asp Leu Arg Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Thr Trp Leu  
225 230 235 240

Ala Ile Lys Pro His Pro Gly Ala Phe Val Val Asn Ile Gly Asp Gln  
245 250 255

Leu Gln Ala Val Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala  
260 265 270

Val Val Asn Ala Glu Ser Glu Arg Leu Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys  
275 280 285

Pro Cys Asn Asp Ala Val Ile Gly Pro Ala Lys Pro Leu Thr Glu Asp  
290 295 300

Gly Ser Ala Pro Ile Tyr Lys Asn Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr Lys  
305 310 315 320

Lys Phe Trp Gly Arg Asp Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe  
325 330 335

Lys Asn

<210> 83

<211> 336

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 83

Met Ala Glu His Leu Leu Ser Thr Ala Val His Asp Thr Leu Pro Gly  
1 5 10 15

Ser Tyr Val Arg Pro Glu Pro Glu Arg Pro Arg Leu Ala Glu Val Val  
20 25 30

10

ES 2 562 187 T3

Thr Gly Ala Arg Ile Pro Val Val Asp Leu Gly Ser Pro Asp Arg Gly  
 35 40 45  
 Ala Val Val Ala Ala Val Gly Asp Ala Cys Arg Ser His Gly Phe Phe  
 50 55 60  
 Gln Val Val Asn His Gly Ile His Ala Ala Leu Val Ala Ala Val Met  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Gly Arg Gly Phe Phe Arg Leu Pro Pro Glu Glu Lys Ala Lys  
 85 90 95  
 Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ala Arg Lys Ile Arg Leu Ser Thr Ser Phe  
 100 105 110  
 Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg Leu  
 115 120 125  
 His Cys His Pro Leu Asp Glu Phe Leu Pro Asp Trp Pro Ser Asn Pro  
 130 135 140  
 Pro Asp Phe Lys Glu Thr Met Gly Thr Tyr Cys Lys Glu Val Arg Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Gly Phe Arg Leu Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu Glu  
 165 170 175  
 Ala Ser Tyr Met Lys Glu Ala Leu Gly Glu Gln Glu Gln His Met Ala  
 180 185 190  
 Val Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Met Asp Pro  
 210 215 220  
 Asp Val Ala Gly Leu Gln Val Leu His Ala Gly Gln Trp Val Ala Val  
 225 230 235 240  
 Asn Pro Gln Pro Gly Ala Leu Ile Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Gln  
 245 250 255  
 Ala Leu Ser Asn Gly Gln Tyr Arg Ser Val Trp His Arg Ala Val Val  
 260 265 270  
 Asn Ser Asp Arg Glu Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro Cys  
 275 280 285  
 Asn His Val Val Leu Gly Pro Ala Arg Lys Leu Val Thr Glu Asp Thr  
 290 295 300  
 Pro Ala Val Tyr Arg Asn Tyr Thr Tyr Asp Lys Tyr Tyr Ala Lys Phe  
 305 310 315 320  
 Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Arg Thr  
 325 330 335

<210> 84  
 <211> 346  
 <212> PRT  
 5 <213> Zingiber officinale

<400> 84

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

10

ES 2 562 187 T3

180 185 190

Val Asn Tyr Tyr Pro Lys Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly Leu  
195 200 205

Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp Pro  
210 215 220

His Val Ser Gly Leu Gln Val His Lys Asp Gly Lys Trp Ile Ala Val  
225 230 235 240

Asp Pro Lys Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Gln  
245 250 255

Ala Leu Ser Asn Gly Arg Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Val Val  
260 265 270

Asn Ser Asn Lys Glu Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro Cys  
275 280 285

Asn Ser Val Leu Ile Ser Pro Pro Glu Lys Leu Ile Ala Asp Gly Cys  
290 295 300

Pro Ala Val Tyr Arg Ser Tyr Thr Tyr Asp Glu Tyr Tyr Lys Lys Phe  
305 310 315 320

Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Lys Lys  
325 330 335

Glu Arg Glu Thr Cys Pro Asp Ala Pro Thr  
340 345

- <210> 85
- <211> 22
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> cebador directo AtDMR6\_fw
- <400> 85
- caccatggcg gcaaagctga ta 22
- 15 <210> 86
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 20 <220>
- <223> cebador inverso AtDMR6UTR\_rv
- <400> 86
- 25 gacaaacaca aaggccaag a 21
- <210> 87
- <211> 24
- <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo cuc\_fw  
 5 <400> 87  
 caccatgagc agtggatgg agat 24  
 10 <210> 88  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador inverso cucUTR\_rv  
 <400> 88  
 20 tgggccaaaa agtttatcca 20  
 <210> 89  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo spi\_fw  
 30 <400> 89  
 caccatggca aacaagatat tatccac 27  
 <210> 90  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador inverso spiUTR\_rv  
 <400> 90  
 ttgctgccta caaaagtaca aa 22  
 45 <210> 91  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador directo Lsat\_fw  
 <400> 91  
 55 caccatggcc gcaaaagtca tctc 24  
 <210> 92  
 <211> 22  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso LsatUTR\_rv  
 65 <400> 92

ES 2 562 187 T3

catggaaca catattcctt ca 22

5 <210> 93  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador directo Slycldmr6\_fw

<400> 93

15 caccatggaa accaaagtta ttctagc 28

<210> 94  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador inverso Slycldmr6UTR\_rv

<400> 94

25 gggacatccc tatgaaccaa 20

30 <210> 95  
 <211> 1013  
 <212> ADN

<213> Solanum lycopersicum

35 <400> 95

atggaaacca aagttatttc tagcggaatc aaccactcta ctcttcctca aagttacatc 60

cgaccccaat ccgatagacc acgtctatcg gaagtggctcg attgtgaaa tgttccaata 120

attgacttaa gttgoggaga tcaagctcaa ataattcgtc aaattggaga agcttgtcaa 180

acttatgggt tctttcaggt aattaatcat ggtgtaccaa aggaagttgt agagaaaatg 240

ctaggggtag ctggggaatt tttcaattta ccagtagaag agaaactaaa attatattca 300

gatgatcctt caaagaccat gagattatca acaagtttta atggttaaaaa ggagacagtt 360

cataattgga gagattatct cagacttcat tgttatcctc tagagaagta tgctcctgaa 420

tggccttcta atccatcatc tttcagggaa atcgtgagca gatattgcag ggaaattcgt 480

caactcggat ttagattaga agaagccata gcagaaagcc tggggttaga taaagagtgt 540

ataaaagatg tattgggtga acaaggacaa catatggcta tcaattatta tcctccttgt 600

ccacaaccag aacttactta tgggcttccg gccatactg atccaaattc acttacaatt 660

cttcttcaag acttgcaagt tgcgggtcct caagttctta aagatggcaa atggttagct 720

gtaaaacctc aacctgacgc ctttgtcatt aatcttgggg atcaattgca ggcagtaagt 780

aacgtaagt acagaagtgt atggcatcga gctattgtga attcagatca agctaggatg 840

tcagtggctt cgtttctatg tccgtgtgat agcgcgaaaa tcagtgcacc aaagetgctg 900

acagaagatg gatctccagt gatttatcaa gactttacgt atgctgagta ttacaacaag 960

ttctggagca ggaatttggg ccagcaacat tgtttggaac ttttcaagaa taa 1013

ES 2 562 187 T3

<210> 96

<211> 337

<212> PRT

5 <213> Solanum lycopersicum

<400> 96

Met Glu Thr Lys Val Ile Ser Ser Gly Ile Asn His Ser Thr Leu Pro  
1 5 10 15

Gln Ser Tyr Ile Arg Pro Glu Ser Asp Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val  
20 25 30

Val Asp Cys Glu Asn Val Pro Ile Ile Asp Leu Ser Cys Gly Asp Gln  
35 40 45

Ala Gln Ile Ile Arg Gln Ile Gly Glu Ala Cys Gln Thr Tyr Gly Phe  
50 55 60

Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Pro Lys Glu Val Val Glu Lys Met  
65 70 75 80

Leu Gly Val Ala Gly Glu Phe Phe Asn Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu  
85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
100 105 110

Phe Asn Val Lys Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Glu Lys Tyr Ala Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
130 135 140

Pro Ser Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Arg Tyr Cys Arg Glu Ile Arg  
145 150 155 160

Gln Leu Gly Phe Arg Leu Glu Glu Ala Ile Ala Glu Ser Leu Gly Leu  
165 170 175

Asp Lys Glu Cys Ile Lys Asp Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
180 185 190

Ala Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr Tyr Gly

10



ES 2 562 187 T3

ccacaaccag aactcactta tgggctgcca gcacatactg atccaaatgc ccttacaatt 660  
 cttcttcaag acttagaagt agctggcttt caagttctta aagatggcga atggttggcc 720  
 gtcaagcctc aaccagatgc ctttgtcatt aatcttgggtg atcaactgca ggcagtgagt 780  
 aatgggagat acaaaagcgt atggcatcga gctattgtaa attcagacaa agccaggttg 840  
 tcagtggctt cgttcctttg tccgtgcgat agcgcgaaaa tcagtgtctc aaagctcctc 900  
 actgaagatg gatctcctgt catttatcag gactttacct atgctgagta ttacaaaaag 960  
 ttctggagca ggaatttgga ccaggaacat tgtttggaac ttttcaagaa ctaa 1014

<210> 98

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Nicotiana benthamiana

<400> 98

Met Glu Ala Lys Val Leu Ser Ser Gly Ile Arg His Ser Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

Gln Ser Tyr Ile Arg Pro Gln Ser Asp Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val  
 20 25 30

Ala Asp Cys Glu Asn Val Pro Val Val Asp Ile Gly Cys Gly Asp Arg  
 35 40 45

Asn Leu Ile Val His Gln Ile Gly Glu Ala Cys Arg Leu Tyr Gly Phe  
 50 55 60

Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Pro Lys Asn Leu Ile Asp Glu Met  
 65 70 75 80

Leu Glu Ile Ala Gly Glu Phe Phe Arg Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu  
 85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr Ser  
 100 105 110

Phe Asn Val Lys Lys Glu Lys Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg  
 115 120 125

Leu His Cys Tyr Pro Leu Glu Asn Tyr Ala Pro Glu Trp Pro Ser Asn  
 130 135 140

Pro Ser Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Arg Tyr Cys Met Glu Val Arg  
 145 150 155 160

Gln Leu Gly Phe Arg Leu Gln Glu Ala Ile Ala Glu Ser Leu Gly Leu  
 165 170 175

10

ES 2 562 187 T3

Glu Lys Glu Cys Ile Lys Asp Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met  
 180 185 190

Ala Ile Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr Tyr Gly  
 195 200 205

Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp  
 210 215 220

Leu Glu Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Glu Trp Leu Ala  
 225 230 235 240

Val Lys Pro Gln Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Leu Gly Asp Gln Leu  
 245 250 255

Gln Ala Val Ser Asn Gly Arg Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Ile  
 260 265 270

Val Asn Ser Asp Lys Ala Arg Leu Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro  
 275 280 285

Cys Asp Ser Ala Lys Ile Ser Ala Pro Lys Leu Leu Thr Glu Asp Gly  
 290 295 300

Ser Pro Val Ile Tyr Gln Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr Lys Lys  
 305 310 315 320

Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Lys  
 325 330 335

Asn

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Planta de col que es resistente a *Hyaloperonospora parasitica*, caracterizada por que la planta presenta un nivel reducido, una actividad reducida o una ausencia completa de proteína DMR6 en comparación con la planta que no es resistente al citado agente patógeno, en donde dicha planta presenta una mutación en su gen *DMR6* que da lugar a una proteína DMR6 con actividad enzimática reducida en comparación con la proteína DMR6 codificada por el gen *DMR6* de tipo silvestre en el que no está presente dicha mutación; o dicha planta presenta una mutación en su gen *DMR6* que da lugar a una expresión reducida de *DMR6* en comparación con el gen *DMR6* de tipo silvestre en el que no está presente dicha mutación.
- 10 2. Planta según la Reivindicación 1, en donde dicha planta presenta una mutación en su gen *DMR6* que da lugar a una proteína DMR6 con actividad enzimática reducida en comparación con la proteína DMR6 codificada por el gen *DMR6* de tipo silvestre en el que no está presente dicha mutación, mutación en el gen *DMR6* que conduce a una sustitución de aminoácido en la proteína codificada.
- 15 3. Método para obtener una planta de col que sea resistente a *Hyaloperonospora parasitica*, que comprende reducir el nivel endógeno de proteína DMR6 en la planta por mutación del gen *DMR6* de la planta.
4. Método según la Reivindicación 3, en donde la mutación se efectúa por tratamiento mutagénico de la planta, en particular con mutágenos o radiación.
5. Método según la Reivindicación 3, en donde la reducción del nivel endógeno en la planta se lleva a cabo reduciendo la expresión del gen *DMR6* de la planta mediante silenciamiento génico o RNAi.



Figura 1 (continuación)

Arabidopsis	EEKMKLYSDDPTKTRRLSTSFNVKKEEVNWRDYLRLHCYPIHKYVNEWP	142
Aquilegia_sp	DVKMQFYSDPTKTRMLSTSFNLKKEVHNWRDYLRLHCHPIEKYVQEWP	143
Citrus_sinensis	EKLLKLYSDDPSKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDKYVPEWP	142
Coffea_canephora	EKLLKLYSDDPSKTRMLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCYPLEKYVPEWP	142
Cucumis_sativus	EKLLKFYSDDPSKTRMLSTSFNVRKEQFRNWRDYLRLHCYPLSNYTPHWP	146
Gossypium_hirsutum	EEKMKLYSDDPSKTRMLSTSFNVKKEKVNWRDYLRLHCYPLHKYVPEWP	142
Lactuca_sativa	EEKMKLYSEDPSKTRMLSTSFNVQKEQIHNRDYLRLHCYPLDQYSPPEWP	142
Medicago_truncatula	EEKMKLYSDDPTKTRMLSTSFNVNKEEVNWRDYLRLHCYPLDNYVPEWP	142
Oryza_sativa_1	EKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLHQFVDPWP	147
Oryza_sativa_2	EKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLHRYLPDWP	141
Oryza_sativa_3	EEKEKLYSDEPSKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLEEFVPEWP	143
Populus_trichocarpa_1	EKLLKLYSDDPSKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDKYAPEWP	142
Populus_trichocarpa_2	EKLLKLYSDDPSKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDKYVPEWP	142
Solanum_lycopersicum_1	EKLLKLYSDDPSKTRMLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCYPLEKYAPEWP	142
Solanum_lycopersicum_2	EEKMKLYSDDPSKTRMLSTSFNVKKEVHNWRDYLRLHCYPLDKYAPEWP	144
Sorghum_bicolor	EKAKLYSDDPARKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLHQFVDPWP	141
Spinacia_oleracea	EKMKLYSDDPTKTRMLSTSFNVNKEEVNWRDYLRLHCYPLHQYVPEWP	142
Vitis	EEKMKLYSDDPTKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDQYTPPEWP	143
Zea_mays	EKAKLYSDDPARKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLDEFVDPWP	141
Zingiber_officinale	EKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLEEFI PDWP	141
	: * :*:*:*:*:*. *****:.* ..***** ** :. :. **	
Arabidopsis	SNPPSFKEIVSKYSREVREVFKEI EELISESLGLEKDYMKKVLGEQQHM	192
Aquilegia_sp	SVPSTFKDVVATYCKEVRKGLRLLSI SLGLLEEDYIEKVLGDQGGHM	193
Citrus_sinensis	SNPSTFKFEVSTYCEVRGLGYRLELISESLGLEKDYIKKVLGEQQGHM	192
Coffea_canephora	SNPPSFKEMVSNYCVQIRELGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGDQGGHM	192
Cucumis_sativus	SNPPSFREIVSSYCNVREKVGRIEELISESLGLEKEYIRKVLGEQQGHM	196
Gossypium_hirsutum	SNPPSFQIVSDYCVQVRELGYRLQELISESLGLEKDYIKKVLGEQQGHM	192
Lactuca_sativa	SNPSYFKEYVGNICTAVRNLGMRIESESISLGLQKEEIKTILGDQGGHM	192
Medicago_truncatula	SNPPSFKETVANYCKEVRLEGLRIEYI EESLGLKDYLRNVLGEQQGHM	192
Oryza_sativa_1	SNPPSFKEIIGTYCTEVRELGFRLYEAISESLGLECGYMRTELGEQQGHM	197
Oryza_sativa_2	SNPPSFREIISTYCKEVRLEGLFRLYGAISESLGLEQDYIKKVLGEQQGHM	191
Oryza_sativa_3	SNPAQFKEIMSTYCREVRQLGLRLGAI SVSLGLEEDYIEKVLGEQQGHM	193
Populus_trichocarpa_1	SKPPPFKDIVSSYCIQVRELGFRIQELISESLGLEKDHKKNVLGEQQGHM	192
Populus_trichocarpa_2	SNPPPFKEIVRSYSIQVRELGFRIQELISESLGLEKDHKKNVLGEQQGHM	192
Solanum_lycopersicum_1	SNPPSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEAIAESLGLDKECIKKNVLGEQQGHM	192
Solanum_lycopersicum_2	SNPPSFREIVSKYCEVRLEGLRLEEAIAESLGLKDKIKKNVLGEQQGHM	194
Sorghum_bicolor	SNPPDFKDTMSTYCKEVRLEGLFRLYAAISESLGLEASYMKETLGEQQGHM	191
Spinacia_oleracea	SNPPSFKEIVSKYI KEVRELGFRLQELISESLGLEKDYIKKNVLGDQGGHM	192
Vitis	SNPPSFKEIVSSYCKEVRLEGLFRLQEMISESLGLEKDHKKNVFGQGGHM	193
Zea_mays	SNPPDFKETMGTYCKEVRLEGLFRLYAAISESLGLEASYMKALGEQQGHM	191
Zingiber_officinale	SNPPSFKDVFGSYCQVRLGFRILGIISLGLLEEYLVRVLGEQQGHM	191
	* *. *:*. * :* :* :. *: ***** : : :*: * **	
Arabidopsis	AVNYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDTTVCGLQILI-DGQWFAV	241
Aquilegia_sp	AVNYPPCPEPELTYGLPRHTDPNTITILLQDQEVAGLQVLH-NGKWVAV	242
Citrus_sinensis	AVNFYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLK-DDKWVAV	241
Coffea_canephora	AVNYPPCQPDLTYGLPGHTDPNALTILLQDLNVAGLQVLR-DGRWLAV	241
Cucumis_sativus	AINYPPCQPPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAV	245
Gossypium_hirsutum	AVNYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV	241
Lactuca_sativa	AINHYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDTLVSGLQVLK-DGKWLAV	241
Medicago_truncatula	AVNYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAI	241
Oryza_sativa_1	AVNYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDDQVAGLQVLNDG-KWIAV	246
Oryza_sativa_2	AVNFYPKCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDQVAGLQVLKEG-RWIAV	240
Oryza_sativa_3	AVNYPPCPEPELTYGLPKHTDPNALTILLPDPHVAGLQVLRDGDQWIVV	243
Populus_trichocarpa_1	AVNFYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDQSVAGLQVLK-DGKWVAV	241
Populus_trichocarpa_2	AVNFYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLSVAGLQVLLKDGKWVAV	242
Solanum_lycopersicum_1	AINYPPCQPPELTYGLPAHTDPNSLTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV	241

Figura 1 (continuación)

Solanum_lycopersicum_2	AINFYPCPEPELTYGLPAHTDPNAITILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLSI	243
Sorghum_bicolor	AVNFYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDQDVAGLQVLHGG-KWVAV	240
Spinacia_oleracea	ALNYYPECPEPEMTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVSGLQIFK-DGKWLAV	241
Vitis	AVNYYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLRVAGLQVLK-DGTWLAI	242
Zea_mays	AVNFYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDPDVAGLQVLHAG-QWVAV	240
Zingiber_officinale	AVNYYPKCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDPHVSGLQVHKDG-KWIAV	240
	*.*.** **:::***:****:*****:***** . *.***: . * . :	
Arabidopsis	NPHPDFAVINIGDQLQALSNGVYKSVVHRAVTNTENPRLSVASFCLPADC	291
Aquilegia_sp	NPYPNAFVVNIGDQIQALSNGNYASVWHRAVTNTDREIRISVASFCLPAND	292
Citrus_sinensis	NPLEPNAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAIVNAEKARMSVASFLCPNND	291
Coffea_canephora	KPHPDFAFVVNIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNADQPRLSVASFCLPCDH	291
Cucumis_sativus	NPHPDFAVINIGDQLQALSNGVYKSVVHRAVVNDKPRLSVASFCLPCDD	295
Gossypium_hirsutum	NPQTNAFVINIGDQLQALSNGTYKSVWHRAIVNTDKPRMSVASFLCPYDH	291
Lactuca_sativa	KPHPDFAVINIGDQLEAVSNGEYKSVVHRAVVNSDNPRMSIASFLCPND	291
Medicago_truncatula	NPIPDFAVINIGDQLQALSNGLYKSVWHRAIVNAEKPRLSVASFCLPDNE	291
Oryza_sativa_1	NPQPGALVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVVNSDRERMSVASFLCPCNS	296
Oryza_sativa_2	NPQPNALVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVVNSDKARMSVASFLCPCND	290
Oryza_sativa_3	NPRPNALVVNLGDQIQALSNDAYKSVWHRAVVNPVQERMSVASFMCPCNS	293
Populus_trichocarpa_1	DHPDFAVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFLCPYDN	291
Populus_trichocarpa_2	NPHPDFAVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFLCPCFN	292
Solanum_lycopersicum_1	KPQPDAFVINLGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDS	291
Solanum_lycopersicum_2	KPQPDAFVINLGDQLEALSNGKYKSIWHRAIVNSDKARMSVASFLCPCND	293
Sorghum_bicolor	NPQPGALIINIGDQLQALSNGQYRSVWHRAVVNSDRERMSVASFLCPCNH	290
Spinacia_oleracea	KPQPDAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNTDKPRLSVASFCLPAND	291
Vitis	KPHPGAFVVNIGDQLQAVSNGKYKSVVHRAVVNAESERLSVASFCLPCND	292
Zea_mays	NPQPGALIINIGDQLQALSNGQYRSVWHRAVVNSDRERMSVASFLCPCNH	290
Zingiber_officinale	DPKPNFAVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVVNSNKERMSVASFLCPCNS	290
	. * . . * . : : : * : * : * : * : * : * : * . * * : * * * * . * * : * : * : * : * : * :	
Arabidopsis	AVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYKKFWSRNLQDQEHCLLENFLNN	341
Aquilegia_sp	AIICPA---VKDG---SPSMYKFTYDEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFKE-	335
Citrus_sinensis	AMISPPKALTEDG---SGAVYRDFTYAEYYSKFWSRNLQDQEHCLLELFKN-	337
Coffea_canephora	AVISAPKPLTADG---SPVVYRDFTYAQYKKFWSRNLQDQEHCLLELFKN-	337
Cucumis_sativus	ALITPPAPLLSQ-----PSPIYRFPTYAQYNTFWSRNLQDQEHCLLELFKNH	340
Gossypium_hirsutum	ALISPAKPLTQHG---CGAVYRDFTYAEYYSKFWSRNLQDQEHCLLELFKN-	337
Lactuca_sativa	TVIRAPKEIKKEG---SKPVFKEFTYAEYKAFWTRNLQDQEHCLLEFFKN-	337
Medicago_truncatula	ALICPAKPLTEDG---SGAVYRGFTYPEYYSKFWSRNLQDQEHCLLEFFKNN	338
Oryza_sativa_1	VELGPAKKLITDD---SPAVYRNYTYDEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFRT-	342
Oryza_sativa_2	VLIGPAQKLITDG---SPAVYRNYTYDEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFRTT	337
Oryza_sativa_3	AVISPARKLVADG---DAPVYRSFTYDEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFKGQ	340
Populus_trichocarpa_1	ALITPPKALTDG---TGAVYRDFTYAEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFKNK	338
Populus_trichocarpa_2	ALITPPKALTDG---TGAIYRDFTYAEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFKN-	338
Solanum_lycopersicum_1	AKISAPKLLTEDG---SPVIYQDFTYAEYKFNKFSRNLQDQEHCLLELFKN-	337
Solanum_lycopersicum_2	SIISAPKTLTEDG---SSAIYRHFTYAEYKFNKFSRNLQDQEHCLLELFKN-	340
Sorghum_bicolor	VVLGPAKKLVTED---TPAVYRSYTYDEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFRT-	336
Spinacia_oleracea	ALISAPTPLTANG---SPAVYRDYTYPEYKFTFWSRNLQDQEHCLLELFKNQ	338
Vitis	AVIGPAKPLTEDG---SAPIYKNFTYAEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFKN-	338
Zea_mays	VVLGPAKKLVTED---TPAVYRNYTYDKYKAFWSRNLQDQEHCLLELFRT-	336
Zingiber_officinale	VLISPEPKLIADG---CPAVYRSYTYDEYKKFWSRNLQDQEHCLLELFKKE	337
	: . . : : : : * * : * * . * * : * : : * * * * *	

Figura 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

Figura 2

>CDS de DMR6 de *Arabidopsis thaliana* (gi 42568064, Genbank NM 122361)  
 ATGGCGGCAAAGCTGATATCCACCGGTTTCCGTCATAC TACTTTGCCGGAAAAC TATGTCCGGCCAATCT  
 CCGACCGTCCACGTC TCTCTGAAGTCTCTCAACTCGAAGATTCCCTCATCGATCTCTCTTCCACTGA  
 TCGATCTTTTCTCATCCAACAAATCCACCAAGCTTGTGCCCGATTCCGGATTTTTTCAGGTCATAAATCAC  
 GGAGTTAACAAACAATAATAGATGAGATGGT GAGTGTGCGCGTGAGTCTTTAGCATGTCTATGGAAG  
 AAAAAATGAAGCTATATTCAGACGATCCAACGAAGACAACAAGATTATCGACGAGCTTCAATGTGAAGAA  
 AGAAGAAGTCAACAATTGGAGAGACTATCTAAGACTCCATTGTTATCCTATCCACAAGTATGTCAATGAG  
 TGGCCGTCAAACCCTCCTTCTTTCAAGGAAATAGTAAGTAAATACAGTAGAGAAGTAAGAGAAGTGGGAT  
 TTAAAATAGAGGAATTAATATCAGAGAGCTTAGGTTTAGAAAAAGATTACATGAAGAAAGTGTGGTGA  
 ACAAGGTCAACACATGGCAGTCAACTATTATCCTCCATGTCCTGAACCTGAGCTCACTTACGGTTTACCT  
 GCTCATACCGACCCAAACGCCCTAACCATTCTTCTTCAAGACACTACTGTTGCGGTCTCCAGATCTTGA  
 TCGACGGTCAGTGGTTCGCCGTTAATCCACATCCTGATGCTTTTGTCAACATAGGTGACCAGTTACA  
 GGCATTAAGTAATGGAGTATACAAAAGTGTGGCATCGCGCTGTAACAAACACAGAAAATCCGAGACTA  
 TCGGTGCGATCGTTTCTGTGCCAGCTGACTGTGCTGT CATGAGCCCGCCAAGCCCTTGTGGGAAGCTG  
 AGGACGATGAAACGAAACCAGTCTACAAAGATTTCACTTATGCAGAGTATTACAAGAAGTTTTGGAGTAG  
 GAATCTGGACCAAGAACATTGCCTCGAGAATTTTCTAAACA ACTAA

>Proteína DMR6 de *Arabidopsis thaliana* (gi 15238567, Genbank NP 197841)  
 MAAKLIS TGFRRHTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLEDFPLIDLSTDRSFLIQQIHQACARFGFFQVINH  
 GVNKQIIDEMVSVAREFFSMSMEKMKLYSDDPTKTRRLSTS FNVKKEEVNWRDYLRLHCYPIHKYVNE  
 WPSNPPSFKEIVSKYSREVREVGFKIEELISESLGLEKDYMKKVLGEQQHMAVNYYPPCPEPELTYGLP  
 AHTDPNAL TILLQD TTVCGLQILIDGQWFAVNPHPDFVINIGDQLQALSNGVYKSVVHRAVTNTENPRL  
 SVASFLCPADCAVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYK KFWSRNLDQEHCLNENFLNN\*

Figura 3

>CDS del ortólogo DMR6 de *Lactuca sativa*

ATGGCCGCAAAGTCATCTCCAGTGGATTCCGGTATACTACTCTACCGGAGAGCTACGTCCGTCCGGTTAA  
 CGACAGACCTAACCTATCTCAAGTTTCCGATTGCAACGACGTTCCGTGTTATTGACATCGGTTGTGGTGATA  
 GACAACTCATAAGCCAACAAATTGGCGATGCTTGTAGAAGATACGGTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGT  
 GTGCCTGATGAAATAGTGGAGAAAATGCAACAAGTAGGTAGGGAGTTTTTCCTGTTGCCTGTGGAAGAGAA  
 GATGAAGCTTTACTCAGAGGATCCATCGAAGACGATGAGGCTATCCACCAGCTTTAACGTCCAAAAGAAC  
 AAATTCATAACTGGCGAGATTATCTCCGCCTTCACTGTTATCCTCTGGATCAATACAGTCCCTGAATGGCCT  
 TCAAATCCTTCTTATTTCAAGGAATATGTTGGTAATTATTGTACAGCAGTGCAGAAATTTAGGAATGAGAAT  
 ATTAGAATCAATATCAGAAAGTTTAGGGTTACAAAAGAAGAAATAAAACTATATTAGGCGATCAAGGTC  
 AACACATGGCCATCAACCATTACCCAGTGTGCCCTGAGCCGAGCTAACCTACGGGCTACCCGGGCACACA  
 GACCCCAATGCTCTCACCATCCTTCTACAGGACACACTGGTCTCTGGTCTTCAGGTTCTCAAAGATGGCAA  
 ATGGTTAGCCGTTAAACCACACCCCTAATGCGTTTTGTAATTAACATTGGTGATCAGTTAGAGGCGGTGAGTA  
 ATGGTGAATATAAAAGTGATGGCATCGAGCTGTGGTTAACTCAGACAACCCGCGAATGTCTATAGCTTCG  
 TTTTGTGTCTTGTAAATGACACCGTTATTAGGGCTCCTAAAGAAATAATAAAGGAAGGATCGAAACCTGT  
 TTTCAAAGAATTTACTTATGCAGAATACTACGCGAAGTTTTGGACAAGAAACCTTGATCAAGAACATTGCT  
 TAGAATCTTCAAGAACTAG

>Proteína del ortólogo DMR6 de *Lactuca sativa*

MAAKVISSGFRYTTLPEYVRPVNDRPNLSQVSDCNDVPVIDIGCGDRQLISQIGDACRRYGFQVINHG  
 VPDEIVEKMQQVGREFFLLPVEEKMKLYSEDPSKTMRLSTSFNVQKEQIHNWRDYLRLHCYPLDQYSPEWP  
 SNPSYFKEYVGNYSCTAVRNLGMRILESISESLGLQKEEIKTILGDQGOHMAINHYPCPEPELTYGLPGHT  
 DPNALTILLQDITLVSGLQVLKDGKWLAVKPHPNAFVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRVNSDNPMSIAS  
 FLCPCNDTVIRAPKEIIEGSKPVFKEFTYAEEYAKFWTRNLDQEHCLFFKN\*

Figura 4

>CDS del ortólogo DMR6 de *Spinacia oleracea*

ATGGCAAACAAGATATTATCCACCGGAATTCCTTACAAAACCCTCCCCGAAAGCTACATCCGACCCGAAAA  
 TGAGAGGCCCAACTTATCTCAAGTCTCCGATTGCGAGAATGTCCCTGTTATTGACTTGGGTGCCAAAGACC  
 GTACTCAAACAATCCACCAAGTCTTCAATGCTTGTA AAAAATTACGGGTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGG  
 GTGTCAAAGGAATTAGCGGAGAAGATGCAAAAGGTAGCTCGAGAGTTCCTCGATATGTCGGTTGAGGAAAA  
 AATGAAATTATATAGTGACGATCCAAC TAAAACACTAAGATTGTCTACAAGTTTTAACGTTAACAAAGAGG  
 AAGTTCATAATTGGAGAGATTATCTTAGGCTCCATTGTTGGCCTCTTGAGCAATATGTCCCCGAATGGCCT  
 TCTAACCCCCCTTCCTTCAAGGAAATAGTGAGCAAGTACATAAAAAGAAGTTAGGGAAC TTGGTTTCAGAGT  
 CCAAGAACTAATATCAGAGAGTTTAGGGTTGGAGAAAGATTACATAAAGAATGTCTAGGAGATCAAGGAC  
 AACACATGGCTCTTAATTATTACCCTGAGTGCCCGGAGCCAGAGATGACATACGGGTTGCCGGGTCATACT  
 GACCCTAATGCCCTTACCATCCTTCTCCAAGACTTGCAAGTATCTGGCCTTCAAATTTTTAAGGATGGTAA  
 ATGGCTTGCTGTCAAACCTCAACCTGATGCTTTTGT CATTAAACATTGGTGATCAATTGCAGGCATTAAGTA  
 ACGGTATATACAAGAGTGTATGGCACAGAGCAGTTGTGAACACAGATAAGCCAAGATTATCAGTAGCTTCA  
 TTCCTCTGCCCGCCAATGATGCGTTGATAAGCGCGCCAACACCTCTGACCGCCAACGGATCACCGGCTGT  
 ATATAGAGACTATACGTATCCTGAGTACTACAAGACTTTCTGGAGTAGGAAC TTGGACCAAGAGCACTGCT  
 TGGAGCTTTTTAAAACCAAACCTAG

>Proteína del ortólogo DMR6 de *Spinacia oleracea*

MANKILSTGIPYKTLPEYIRPENERP NLSQVSDCENPVVIDLGAKDRTQTIHQVFNACKNYGFFQVINHG  
 VSKELAEMQKVAREFFDMSVEEKMKLYSDDPTKTLRLS TSFNVNKEEVHNWRDYLR LHCWPLEQYVPEWP  
 SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRVQELISESLGLEKDYIKNVLGDQGHMALNYYPECPEPEMTYGLPGHT  
 DPNALTILLQDLQVSLQIFKDGKWLAVKQPDAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNTDKPRLSVAS  
 FLCPANDALI SAPTPLTANGSPA VYRDYTYPEYYKTFWSRNL DQEHCLLELFKNQT\*

Figura 5

>CDS del ortólogo DMR6 de *Cucumis sativus*

ATGAGCAGTGTGATGGAGATCCAACCTTTTGTGTTTCCAGGGGACGTCACGAGAAGTTGCCAGAGAAGTATGA  
 ACGGCCTGAATCGGATAGGCCGCGGCTGTCCGAGGTGTGTTGTTGGGACAAGGTTCCAATAATCGACTTGG  
 GATGCGAGGAGAGAGAGATGATTGTGAAGCAAGTGGAGGAGGCCTGCAAGTCTTACGGCTTTTCCAGGTT  
 AATAATCATGGTGTGAGGAAGGAATTGGTGGAGAAAAGTGATAGAAGTTGGCAAGCAGTTCCTTGAGCTGCC  
 GATGGAGGAGAAGTTGAAATTTTATTTCAGACGACCCTTCCAAGACCGTCAGACTCTCCACAAGTTTCAATG  
 TCCGGAAAGAGCAATTTTCGCAACTGGAGGGATTATCTCAGACTCCATTGCTATCCTCTCTCCAACCTACACC  
 CCCATTGGCCCTCTAACCCACCATCCTTCAGGGAAATAGTGAGTAGTTATTGCAATGAAGTACGAAAAGT  
 TGGGTACAGAAATAGAGGAGCTAATATCGGAGAGCTTGGGGCTGGAGAAGGAATACATAAGGAAGAAGTTGG  
 GTGAACAAGGTCAGCACATGGCTATAAATTATTATCCGCCATGTCCCAACCAGAACTCACCTACGGGCTC  
 CCTGGCCATACGGATCCCAACGCACTCACCATTTCTCTCAGGATCTCCATGTGCGCCGGCTCCAAGTCTT  
 CAAAGATGAAAAGTGGCTAGCGGTCAACCCCCACCCCAATGCCTTTGTAATCAATATAGGCGACCAATTGC  
 AGGCATTGAGCAATGGGGTGTACAAGAGCGTTTGGCACCGAGCGGTGGTCAATGTTGATAAGCCCAGGCTG  
 TCGGTGCTTCTTTCTCTGCCCTTGTGATGACGCCCTCATTACTCCTGCACCGCTCCTCTCCAGCCTTC  
 CCCATTTACAGACCTTTACCTACGCCAGTACTACAATACTTTTTGGAGCAGAAACTTGGATCAACAAC  
 ATTGCTTGGAACTATTTAAAAACCACCCTCCTTAA

>Proteína del ortólogo DMR6 de *Cucumis sativus*

MSSVMEIQLLCSGGRHEKLPKYEKRPESDRPRLSEVCCWDKVP I I DLGCEEREMIVKQVEEACKSYGFFQV  
 INHGVRKELVEKVIKQFFELPMEKLFYSDPSKTVRLSTSFNVRKEQFRNWRDYLRLHCYPLSNYT  
 PHWPSNPPSFREIVSSYCNEVRKVGRIEELISESLGLEKEYIRKKLGEQGQHMAINYYPPCPQPELTYGL  
 PGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLKDGKWLAVNPHNPAFVINIGDQLQALSNGVYKSVVHRAVVNVDPKRL  
 SVASFCLPCDDALITPAPLLSQPSPIYRPFTYAQYYNTFWSRNLDDQHCLELFLKNHPP\*

Figura 6

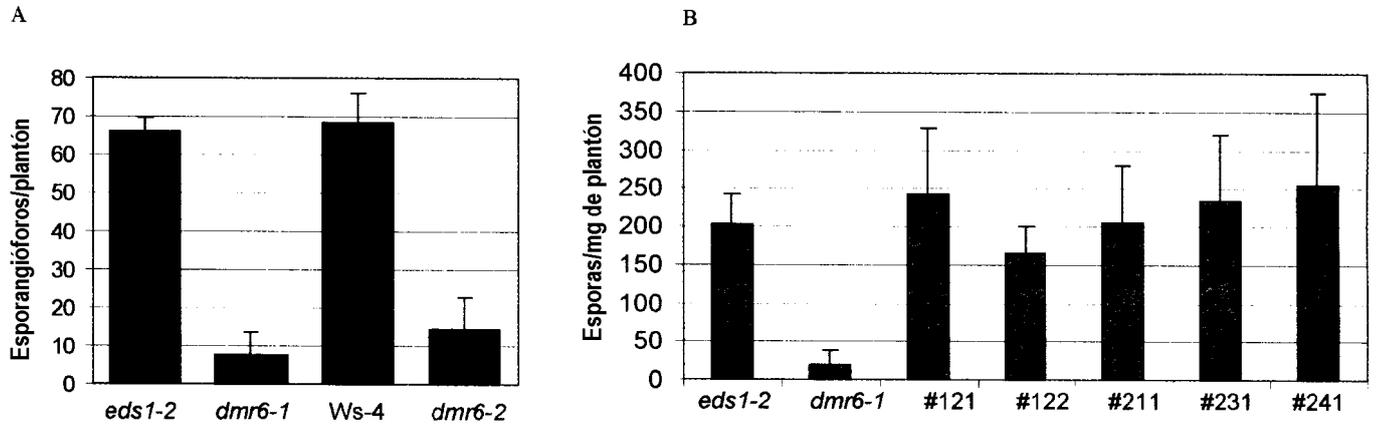


Figura 7

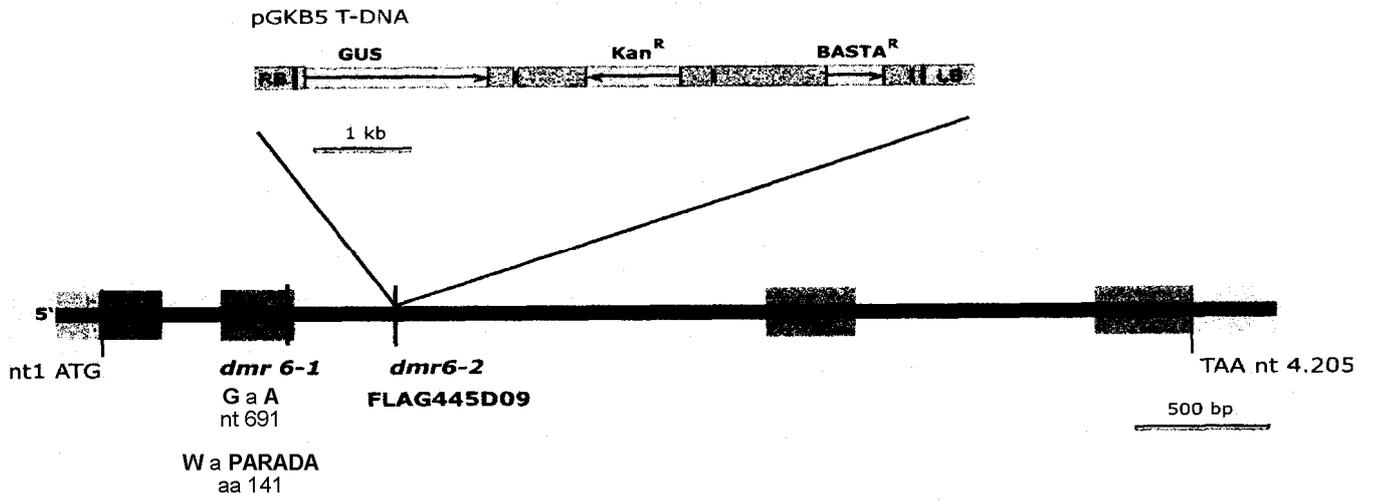


Figura 8

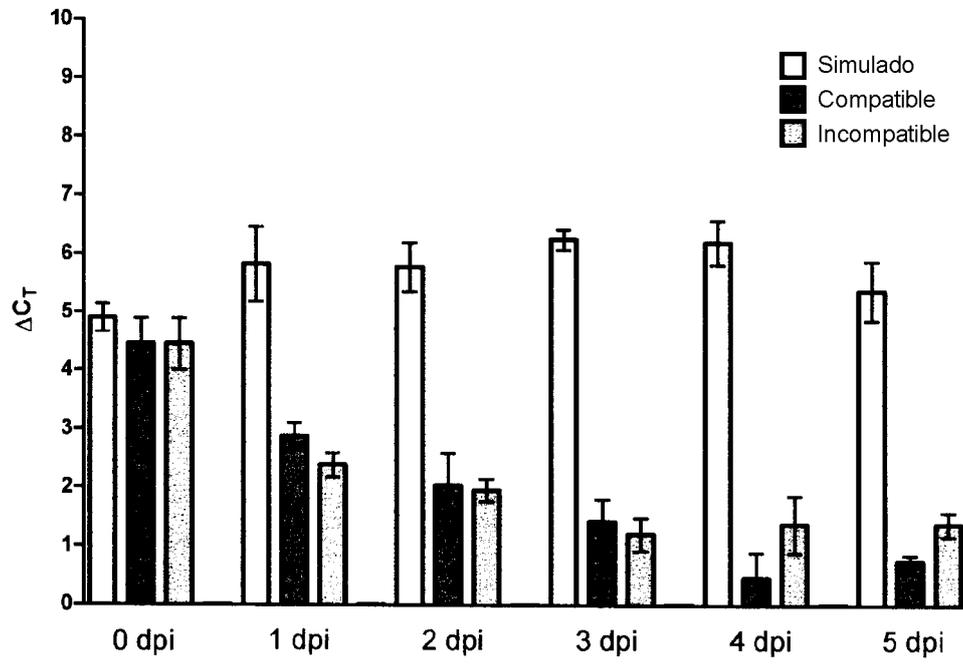


Figura 9

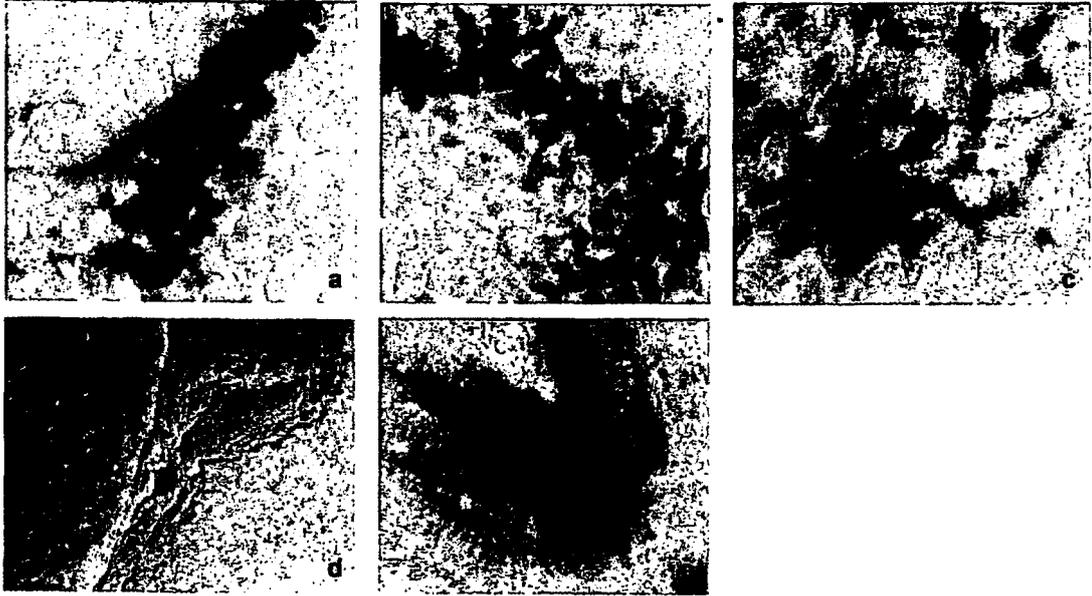


Figura 10

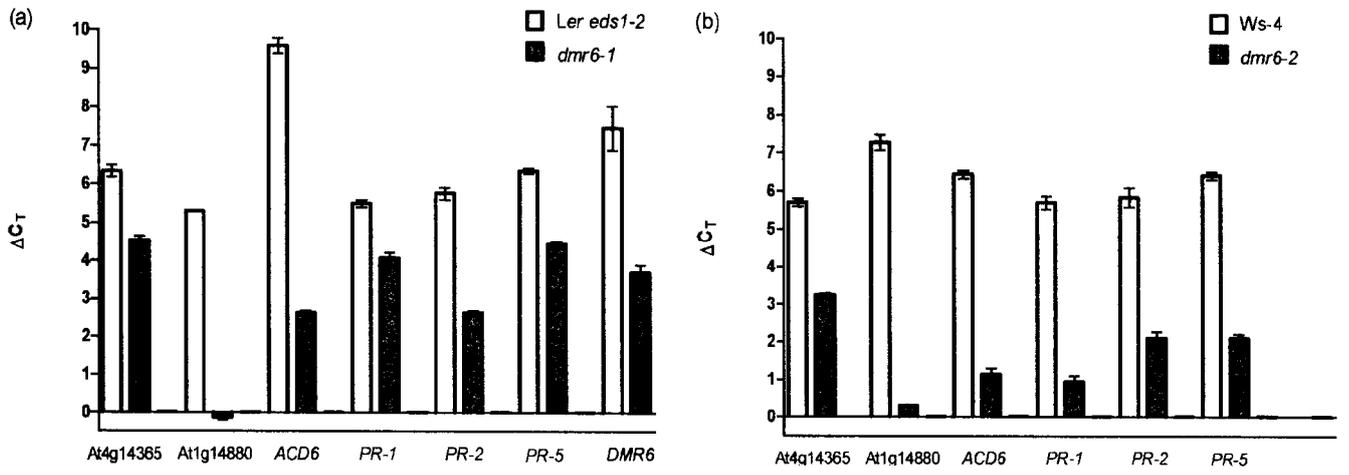


Figura 11

catttttctataaaacccaaactaaacatctacttt  
cttttaaatctataaacctaaacacttttttaaactcaaacccgatataaatttgtttaatttttaacttaaaactctagtgactttatttataaaacccaaa  
cctaaaaaataatttcggttttattgtaaaattaaactctaaatttataattataaactgacttataaatttgttaattgtaaaacttaaaattta  
aatataaataatcttggtttaattaaagatatacagatttggtaatttatttagttattataataatgataataaactagtttaaaattaaagtaagagttt  
attcttagaggtaaatgcaagtattgcccgaaaaaaacaactcaattcaagtgtcgcgaaaaaaaacttaactagtttgatagtttaaaatttggatt  
taaaaaagaaaaaaacaaacagataataatagaagtggagacgccaagagtcacatgagtgactctatcaagattgactctgtctga  
gtctgaagtcctaaacactgagggaccactccacatacgtatggtgcccgtatttggatagatacggacagtggttttcggttggacacgtgtcct  
gctttatctctcgtcgcctcaaaaaataaccacaatgtcttatactcaaccacaggtgtctgpttaccacaactcacaatttgcacaaaaatacacact  
ttgcatggaagattttctaattatacaactcacattattcgaatttaaaattcagatttttttagtttcaagaaaaatcattctttgtagggtaacttgtctta  
tttaacaggtgtatacttgcattgtctgccaatgaaaaataaaatgaaatgatgttctttaaataaagtaactaagaatacaaatcacga  
caaatctctgctagttcaattaaatatacaactcaaacgattttcaacaattttataattcaaaaaataaagttacatactttgtttaacat  
aatataaaaaaaataacatgaataaatttttaacataaaaaattcagttttcaaaaaaagtttagaagttcagttctaaaaaataaggttaaaatag  
aatgctgttttaagacgcaatctagataatttttttaataaaaaaccgagatacatttaaactctataaataaacttaaacctcaattggttacataa  
tctaccaatttaactctatgtaaaataaaactgatttagtaacatttaagcagtaacgagaatgctagcgcctaaataaaacgacttcttaatccactttc  
ttgaatatttggtttaactaaactaaacaaaaatagttataaccacaaaaatataatgaaatttaaaacttataagtaactgaaatacccaaaactaa  
aaaaaaaaaccaaaattataaataaagaagataattagttatgttacaactcgaataatacaataaataaataaataaataaataaataaataa  
atcaagaaaccgaaatggcctttccaaacccaaaccgagatttgaattttatggtcggattcggtttaactggagaatagctatcaacaacaatttaaaata  
gatttagctagatcggtttgggtcgtttgtattctctgcaactcctcacaactcgttataatttataattgtagtttaaaagtaacatcgaaa  
tattgtacgttagtatgcaactatgataatgttattcgtaaacacaatttgaagggtcaaaagagagaaagatagtttaataaagccttgttctg  
aaaaataattatttactgtcactcgtaatgtttatcaatgagttataatctcatttttctctccgaagtcgacgacaataaaaaaacca  
atctcattcgaagtaacttactgataatgatgctgagtgacacagtcgtaagccttggacaacatcattcatgacgtaactgctgacgctagaat  
gatgacattataatcaatgttttttctgctgaatttggtaagtaaaaaataatgaaaatgtagagctttagatatttgcattttcgtttattgtaaaacta  
gctgaatcctgaatcctgagcagtttaattaaatcgtaaatttataatctattcgtacttttaaaataaataataataaactttggtagatgcttaag  
gtaattccttttaataaaaagaatggttagagatcttaaaagttagcttataagaaaaatcggaaaaatcacttttgggggttaattgttctgtttga  
agtaatgtgtagatttttctttagaatttagattaaaaactatttgtttcagatgttttaagaaaaaaaatgtcattcatagcttgcattctta  
cataccttaataagaaaaattataaagtttggattcaggaagtaactaggttagttatttgcacaaaaaataatctaggtttttgttatggaatt  
aegaaagaaaaaaatggataaataagttataaaaaaaattaaactaagattatttagcttaattgataaagattttaggtgaacttaaaaaatg  
ttggttaagagattacaacataaccaaaataaccagaacctctagttataaaaaaaacacttaaaaaatccaaacatttaatttttaataatcat  
aaatcttaaaaaaccacagctgtccttccgaaaaccactataatcgggtgattaaagaaatcaaaatcattcgaataatgcatactataatacaaaa  
aacaattcaactgaaaaacataatcaattgagagtaggacccgagtaaacactgcatgtttttataataataatcatcagatgcacatcgcatataataatactca  
aagtcgagccttccttcttcttataacccttttggattcttcttcaattttctgacatc[aaATC](#)

Figura 12

>CDS del ortólogo DMR6 de *Solanum lycopersicum*

ATGGAAACCAAAGTTATTTCTAGCGGAATCAACCACTCTACTCTTCCTCAAAGTTACATCCG  
 ACCCGAATCCGATAGACCACGTCTATCGGAAGTGGTCGATTGTGAAAATGTTCCAATAATTG  
 ACTTAAGTTGCGGAGATCAAGCTCAAATAATTCGTCAAATTGGAGAAGCTTGTCAAACCTTAT  
 GGTTTCTTTTCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGGAAGTTGTAGAGAAAATGCTAGGGGT  
 AGCTGGGGAATTTTTCAATTTACCAGTAGAAGAGAACTAAAATTATATTCAGATGATCCTT  
 CAAAGACCATGAGATTATCAACAAGTTTTAATGTTAAAAGGAGACAGTTCATAATTGGAGA  
 GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTAGAGAAGTATGCTCCTGAATGGCCTTCTAATCC  
 ATCATCTTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCAGGGAAATTCGTCAACTCGGATTTAGAT  
 TAGAAGAAGCCATAGCAGAAAGCCTGGGGTTAGATAAAGAGTGTATAAAAGATGTATTGGGT  
 GAACAAGGACAACATATGGCTATCAATTATTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTTACTTA  
 TGGGCTTCCGGCCATACTGATCCAAATTCACTTACAATTCCTTCTTCAAGACTTGCAAGTTG  
 CGGGTCTTCAAGTTCTTAAAGATGGCAAATGGTTAGCTGTAAACCTCAACCTGACGCCTTT  
 GTCATTAATCTTGGGGATCAATTGCAGGCAGTAAGTAACGGTAAGTACAGAAGTGTATGGCA  
 TCGAGCTATTGTGAATTCAGATCAAGCTAGGATGTCAGTGGCTTCGTTTCTATGTCCGTGTG  
 ATAGCGCGAAAATCAGTGCACCAAAGCTGCTGACAGAAGATGGATCTCCAGTGATTTATCAA  
 GACTTTACGTATGCTGAGTATTACAACAAG  
 TTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGCAACATTGTTTGGAACTTTTCAAGAATAA

>Proteína del ortólogo DMR6 de *Solanum lycopersicum*

METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVDCENVPIIDLSCGDQAQIIRQIGEACQTY  
 GFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPVEEKLLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKETVHNWR  
 DYLRRLHCYPLEKYAPEWPSNPSSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEIAIESLGLDKECIKDVLG  
 EQGQHMAINYYPPCPQPELTYGLPAHTDPNSLTILLQDLQVAGLQVLKDGKWLAVKQPDAF  
 VINLGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ  
 DFTYAEYYNKFWSRNLDDQHCLLELFKN.

Figura 13

>CDS del ortólogo DMR6 de *Nicotiana benthamiana*

ATGGAAGCAAAGTTCTTTCCAGCGGAATCCGCCACTCTACTATCCCTCAAAGTTACATCCG  
 CCCTCAATCCGATAGGCCGCGCCTTTCTGAAGTTGCTGATTGTGAAAACGTTCCAGTAGTTG  
 ATATAGGTTGCGGTGATAGAAACCTTATTGTTTCATCAAATTGGTGAAGCCTGTCGTCTTTAT  
 GGTTTTTTCCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGAATTTAATAGACGAAATGCTAGAGAT  
 AGCTGGGGAATTTTTTAGGCTTCCAGTTGAAGAGAAGTTGAAATTGTACTCAGATGACCCAT  
 CGAAGACGATGAGATTGTCGACTAGTTTTAATGTGAAAAGGAGAAGGTTTACAATTGGAGA  
 GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTTGAAAATTACGCTCCTGAATGGCCTTCCAATCC  
 TTCCTCTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCATGGAAGTTCGACAACCTCGGGTTCAGAT  
 TGCAGGAAGCCATAGCAGAGAGCCTAGGCTTAGAGAAAGAGTGTATAAAGGATGTATTGGGC  
 GAACAAGGTCAACACATGGCTATCAATTTCTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTCACTTA  
 TGGGCTGCCAGCACATACTGATCCAAATGCCCTTACAATTCTTCTTCAAGACTTAGAAGTAG  
 CTGGTCTTCAAGTTCTTAAAGATGGCGAATGGTTGGCCGTCAAGCCTCAACCAGATGCCTTT  
 GTCATTAATCTTGGTGTCAACTGCAGGCAGTGAGTAATGGGAGATACAAAAGCGTATGGCA  
 TCGAGCTATTGTAAATTCAGACAAAGCCAGGTTGTCAGTGGCTTCGTTCTTTGTCCGTGCG  
 ATAGCGCGAAAATCAGTGCTCCAAAGCTCCTCACTGAAGATGGATCTCCTGTCATTTATCAG  
 GACTTTACCTATGCTGAGTATTACAAAAGTTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGGAACATTG  
 TTTGGAACTTTTCAAGAACTAA

>Proteína del ortólogo DMR6 de *Nicotiana benthamiana*

MEAKVLSSGIRHSTIPQSYIRPQSDRPRLSEVADCENVPVVDIGCGDRNLIVHQIGEACRLY  
 GFFQVINHGVPKNLIDEMLEIAGEFFRLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKEKVHNR  
 DYLRHLHCYPLENYAPEWPSNPSSFREIVSRYCMEVRQLGFRLQEAI AESLGLKEKCIKDVLG  
 EQGQHMAINFYPPCPQPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLKDGEWLAVKQPDAF  
 VINLGDQLQAVSNGRYKSVWHRAIVNSDKARLSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ  
 DFTYA EYK KFW SRNLDQEHCLLEL FKN.

Figura 14

