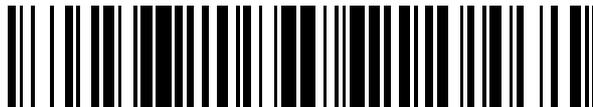


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 886**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2006 PCT/EP2006/010535**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2007 WO07051626**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2006 E 06828912 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 1957655**

54 Título: **Plantas resistentes a enfermedades**

30 Prioridad:
01.11.2005 WO PCT/EP2005/011718

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2016

73 Titular/es:
**ENZA ZADEN BEHEER B.V. (100.0%)
HALING 1E
1602 DB ENKHUIZEN, NL**

72 Inventor/es:
**VAN DEN ACKERVEKEN, AUGUSTINUS F. J. M. y
VAN DAMME, MIREILLE, MARIA, AUGUSTA**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 594 886 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

Antecedentes de la invención

5 La presente invención está relacionada con las plantas resistentes a enfermedades, en particular con plantas resistentes a organismos del filo *Oomycota*, los oomicetos.

10 La resistencia de las plantas a los patógenos ha sido estudiada extensivamente, tanto la resistencia específica de patógeno como la de amplio espectro. En muchos casos la resistencia está especificada por genes de resistencia dominantes. Se ha identificado que muchos de estos genes específicos de raza o genes de resistencia gen-por-gen median el reconocimiento del patógeno interaccionando de forma directa o indirecta con productos de genes de avirulencia u otras moléculas del patógeno. Este reconocimiento conduce a la activación de un amplio espectro de repuestas de defensa de la planta que detienen el crecimiento del patógeno.

15 En la mejora vegetal se realiza un esfuerzo constante para identificar nuevas fuentes de genes de resistencia, sobre todo monogénica y dominante. En variedades obtenidas por selección con genes de resistencia individuales recientemente introducidos, la protección frente a enfermedades a menudo se rompe rápidamente, porque los patógenos evolucionan y se adaptan a una alta frecuencia y recuperan la habilidad de infectar con éxito la planta huésped. Por tanto, la disponibilidad de nuevas fuentes de resistencia a enfermedades es muy necesaria.

20 Los mecanismos de resistencia alternativos actúan, por ejemplo, a través de la modulación de la respuesta de defensa de las plantas, como la resistencia mediada por el gen recesivo *mlo* al patógeno del oídio *Blumeria graminis f.sp. hordei* en cebada. Las plantas con alelos mutados del gen silvestre *MLO* muestran una resistencia casi completa que coincide con el aborto del intento de penetración del hongo en la pared celular de células individuales de la epidermis atacadas. El gen silvestre *MLO* actúa, por tanto, como regulador negativo de la resistencia al patógeno. Esto está descrito en WO9804586.

25 Otros ejemplos son los genes de resistencia recesivos al oídio, encontrados en un cribado para detectar la pérdida de susceptibilidad a *Erysiphe cichoracearum*. Hasta el momento se han clonado tres genes, denominados *PMR6*, que codifica una proteína similar a la pectato liasa, *PMR4*, que codifica una calosa sintasa, y *PMR5*, que codifica una proteína de función desconocida. Ambos genes *mlo* y *pmr* parecen conferir resistencia específica al oídio y no a oomicetos como los mildiús.

30 Se ha obtenido resistencia amplia a patógenos, o formas sistémicas de resistencia como RSA, mediante dos vías principales. La primera es mutando reguladores negativos de la defensa de las plantas y de la muerte celular, como en los mutantes de *Arabidopsis cpr*, *lsd* y *acd*. La segunda es sobreexpresando transgénicamente inductores o reguladores de la defensa de las plantas, como en las plantas que sobreexpresan *NPR1*.

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

35 Es objeto de la presente invención procurar una forma de resistencia que es amplia, duradera y que no está asociada con fenotipos indeseables.

40 En la investigación que condujo a la presente invención, se realizó un cribado de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para detectar una susceptibilidad reducida al patógeno de mildiú *Hyaloperonospora parasitica*. Se generaron mutantes EMS en la línea de *Arabidopsis* altamente susceptible *Ler eds1-2*. Se analizaron en detalle ocho mutantes resistentes al mildiú (*dmr*), correspondientes a 6 *loci* distintos. Un análisis microscópico mostró que el crecimiento de *H. parasitica* estaba severamente reducido en todos los mutantes. Se asoció la resistencia de *dmr3*, *dmr4* y *dmr5* con la activación constitutiva de las defensas de la planta. Además, *dmr3* y *dmr4*, pero no *dmr5*, también eran resistentes a *Pseudomonas syringae* y *Golovinomyces orontii*.

45 En contraste, no se observó un aumento de la activación de las defensas de las plantas en los mutantes *dmr1*, *dmr2* y *dmr6*. Los resultados de esta investigación han sido descritos en Van Damme *et al.* (2005) Molecular Plant-Microbe Interactions 18(6) 583-582. Sin embargo, este artículo no describe la identificación y caracterización de los genes *DMR*.

50 De acuerdo con la presente invención ahora ha sido encontrado que *DMR1* es un gen que codifica una homoserina kinasa (HSK). Los cinco alelos mutados *dmr1* de *Arabidopsis* han sido secuenciados y cada uno de ellos da lugar a un cambio de aminoácido diferente en la proteína HSK. HSK es una enzima clave en la biosíntesis de los aminoácidos metionina, treonina e isoleucina y es por tanto considerada como esencial. Los distintos mutantes *dmr1* muestran defectos en HSK que causan que la planta acumule homoserina. Los cinco alelos diferentes muestran diferentes niveles de resistencia que se correlacionan con los diferentes niveles de acumulación de homoserina en los mutantes.

La presente invención proporciona, por tanto, una planta, que es resistente a un patógeno de origen oomiceto, caracterizada por que la planta tiene niveles alterados de homoserina comparada con una planta que no es resistente a dicho patógeno.

5 Esta forma de resistencia es particularmente efectiva contra patógenos del filo *Oomycota*, como las especies *Albugo*, *Aphanomyces*, *Basidiospora*, *Bremia*, *Hyaloperonospora*, *Pachymetra*, *Paraperonospora*, *Perofascia*, *Peronophythora*, *Peronospora*, *Peronosclerospora*, *Phytium*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Protobremia*, *Pseudoperonospora*, *Sclerospora*, *Vienotia*.

La resistencia está basada en un nivel alterado de homoserina *in planta*. Más en particular, la resistencia está basada en un nivel incrementado de homoserina *in planta*.

10 El nivel endógeno de homoserina ha sido incrementado. Esto puede conseguirse disminuyendo la actividad enzimática del gen homoserina kinasa que da lugar a una menor conversión de homoserina y por tanto una acumulación de la misma. Alternativamente, se puede reducir la expresión de la enzima homoserina kinasa. Esto también conduce a una menor conversión de homoserina y por tanto una acumulación de la misma. Otra manera de incrementar el nivel endógeno de homoserina es incrementando su biosíntesis a través de la ruta del aspartato. La
15 reducción de la expresión del gen homoserina kinasa en sí mismo puede conseguirse de varias maneras, tanto directamente, tal como mediante silenciamiento génico, como indirectamente modificando sus mismas secuencias reguladoras o mediante la estimulación de la represión del gen.

La modulación del gen HSK para reducir su actividad o expresión se puede conseguir a varios niveles. Primero, el gen endógeno puede ser mutado directamente. Esto se puede conseguir por medio de un tratamiento mutagénico.
20 Alternativamente, un gen HSK modificado puede ser introducido en la planta con por medio de técnicas transgénicas o mediante introgresión, o la expresión de HSK puede ser reducida a nivel regulatorio, por ejemplo modificando las secuencias reguladoras o mediante silenciamiento génico.

En una realización, el aumento de la producción endógena es el resultado de una reducción endógena de la expresión del gen HSK que de este modo conduce a una conversión menos eficiente de homoserina en homoserina
25 fosfato y la biosíntesis subsecuente de metionina y treonina. Esta expresión reducida de HSK es el resultado de una mutación en el gen HSK que conduce a una reducción de la estabilidad del ARNm o de la proteína.

En otra realización la expresión reducida puede conseguirse regulando a la baja la expresión del gen HSK a nivel de transcripción o de traducción, p. ej. mediante mutaciones en las secuencias reguladoras que afecten la expresión del gen HSK.

30 En una realización más se puede obtener el incremento en el nivel endógeno de homoserina induciendo cambios en la biosíntesis o el metabolismo de homoserina. En una realización particular esto se consigue mediante mutaciones en la secuencia codificante de HSK que resultan en una proteína HSK con una actividad enzimática reducida conduciendo por tanto a una menor conversión de homoserina en homoserina fosfato.

Esta invención se basa en una investigación realizada sobre la resistencia a *Hyaloperonospora parasitica* en la
35 planta *Arabidopsis* pero es un concepto general que puede ser aplicado de forma generalizada en plantas, en particular en plantas cultivadas que son susceptibles a infecciones con patógenos, tales como *Oomycota*.

La invención es apropiada para un gran número de enfermedades de plantas causadas por oomicetos tales como, *Bremia lactucae* en lechuga, *Peronospora farinosa* en espinaca, *Pseudoperonospora cubensis* en miembros de la familia de las cucurbitáceas, p. ej. pepino, *Peronospora destructor* en cebolla, *Hyaloperonospora parasitica* en col,
40 *Plasmopara viticola* en vid, *Phytophthora infestans* en tomate y patata, y *Phytophthora sojae* en soja.

El nivel de homoserina de estas otras plantas puede ser incrementado con todas las técnicas descritas anteriormente. Sin embargo, cuando la modificación de la expresión del gen HSK en una planta se ha de conseguir a través de la modificación genética del gen HSK o a través la identificación de mutaciones en el gen HSK y todavía no se conoce el gen, éste ha de ser identificado primero. Para generar plantas resistentes al patógeno, en particular
45 plantas cultivadas, a través de la modificación genética del gen HSK o mediante la identificación de mutaciones en el gen HSK, se deben aislar los genes HSK ortólogos de esas especies vegetales. Los ortólogos se definen como los genes o proteínas de otros organismos que tienen la misma función.

Hay disponibles varios métodos para la identificación de secuencias ortólogas en otras plantas.

50 Un método para la identificación de secuencias de HSK ortólogas en una especie vegetal, puede por ejemplo comprender identificar ESTs de homoserina kinasa en una base de datos de la especie vegetal; diseñar cebadores para la amplificación del transcrito o ADNc completos de homoserina kinasa; realizar experimentos de amplificación con los cebadores para obtener el transcrito o ADNc completos correspondientes; y determinar la secuencia de nucleótidos del transcrito o ADNc.

55 Unos métodos adecuados para amplificar el transcrito o ADNc completos en situaciones en las que solo se conoce una parte de la secuencia codificante son las técnicas avanzadas de PCR 5'-RACE, 3'-RACE, TAIL-PCR, RLM-PCR

y PCR vectorette.

Alternativamente, si no hay secuencias nucleotídicas disponibles para la especie vegetal de interés, los cebadores se diseñan sobre el gen HSK de una especie vegetal estrechamente relacionada con la planta de interés, se basan en dominios conservados tal como lo determine el alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas, y se usan para amplificar mediante PCR la secuencia ortóloga. Dichos cebadores son cebadores adecuadamente degenerados.

Otro método fiable para evaluar si una secuencia es una ortóloga de HSK es mediante la identificación del mejor resultado recíproco. Se identifica una secuencia candidata a ortóloga de HSK de una determinada especie vegetal como el mejor resultado obtenido de una búsqueda con la proteína o secuencia de ADN de *Arabidopsis*, o de otra especie vegetal, en una base de datos de ADN usando el programa Blast. La secuencia candidata a ortóloga de HSK de la especie vegetal determinada obtenida se utiliza buscar homologías con todas las proteínas de *Arabidopsis* presentes en la base de datos de ADN (p. ej. en NCBI o TAIR) usando el método de búsqueda BlastX. Si el mejor resultado y puntuación es para la proteína HSK de *Arabidopsis*, puede decirse que la secuencia de ADN es un ortólogo, o secuencia ortóloga

Tal y como se deduce de las secuencias del genoma completo disponibles públicamente para *Arabidopsis* y arroz, HSK está codificada por un único gen en estas dos especies. En la mayoría de las otras especies estudiadas hasta el momento, parece que HSK está codificada por un único gen, tal y como se determina analizando las secuencias de ARNm y datos de EST de bases de datos de ADN públicas, excepto para la patata, el tabaco y el álamo para los que se han identificado dos homólogos de HSK. Los genes y proteínas ortólogos han sido identificados en estas plantas mediante comparaciones de nucleótidos y aminoácidos con la información presente en bases de datos públicas.

Alternativamente, si no hay secuencias de ADN disponibles para la especie vegetal deseada, se pueden aislar secuencias ortólogas mediante hibridación heteróloga utilizando sondas de ADN del gen HSK de *Arabidopsis* u otra planta o mediante métodos de PCR, haciendo uso de dominios conservados en la secuencia codificante de HSK para definir los cebadores. Para muchas especies cultivadas, están disponibles secuencias parciales de ARNm de HSK que se pueden utilizar para diseñar cebadores para amplificar subsecuentemente mediante PCR las secuencias de ARNm o genómicas completas para el análisis de secuencias de ADN.

La Fig. 1 muestra secuencias de HSK ortólogas que han sido identificadas en bases de datos disponibles públicamente y que han sido obtenidas a través de la amplificación de ADNc mediante PCR y su secuenciación subsecuente.

Tras la identificación de secuencias ortólogas de HSK, se identifica la secuencia nucleotídica completa de la secuencia reguladora y codificante del gen mediante técnicas estándar de biología molecular. Para esto, se criban genotecas genómicas de la especie vegetal mediante hibridación de ADN o PCR con sondas o cebadores derivados de un gen homoserina kinasa conocido, tales como las sondas y cebadores descritos anteriormente, para identificar los clones genómicos que contienen el gen HSK. Alternativamente, se pueden utilizar métodos avanzados de PCR, como RACE mediada por ARN Ligasa (RLM-RACE), para amplificar directamente secuencias génicas y de ADNc desde ADN genómico o ARNm inversamente transcrito. La secuenciación subsecuente de ADN resulta en la caracterización de la secuencia génica o codificante completa.

Una vez se conoce la secuencia de ADN del gen se utiliza esta información para preparar los medios para modular la expresión del gen homoserina kinasa en una de las formas descritas anteriormente.

Más en particular, para conseguir una actividad HSK reducida la expresión del gen HSK puede ser regulada a la baja o la actividad enzimática de la proteína HSK puede ser reducida mediante sustituciones aminoacídicas que resultan de cambios nucleotídicos en la secuencia codificante de HSK.

La regulación a la baja del gen puede conseguirse por mutagénesis de los elementos reguladores en el promotor, la región terminadora, o intrones potenciales. Las mutaciones en la secuencia codificante de HSK conducen en muchos casos a sustituciones aminoacídicas o codones de terminación prematuros que afectan negativamente a la expresión o la actividad de la enzima HSK codificada.

Estas y otras mutaciones que afectan la expresión de HSK son inducidas en plantas usando químicos mutagénicos tales como el metanosulfonato de etilo (EMS), irradiando 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 planta mutagenizadas las mutaciones en el gen HSK pueden ser fácilmente identificadas utilizando el método TILLING (Targeting Local Lesions IN Genomes) (McCallum *et al.* (2000) Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* 18, 455-457, y Heinkoff *et al.* (2004) TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol.* 135, 630-636). El principio de este método se basa en la amplificación mediante PCR del gen de interés a partir de ADN genómico de una gran colección de plantas mutagenizadas en la generación M2. Mediante la secuenciación de ADN o buscando mutaciones puntuales utilizando una nucleasa específica de cadena sencilla, tal como la nucleasa *CEL-I* (Till *et al.* (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.

Cribando muchas plantas se obtiene una gran colección de alelos mutantes, en la que cada uno aporta un efecto diferente en la expresión génica o en la actividad enzimática. La expresión génica o la actividad enzimática puede ensayarse analizando los niveles del transcrito de HSK (p. ej. mediante RT-PCR), cuantificando los niveles de proteína HSK con anticuerpos o analizando los aminoácidos, midiendo la acumulación de homoserina como resultado de una actividad HSK reducida. Estos métodos son conocidos para expertos en la técnica.

El experto en la técnica puede utilizar los ensayos de patógenos habituales para ver si la acumulación de homoserina es suficiente como para inducir una resistencia al patógeno.

Las plantas con la reducción deseada de la actividad o expresión de HSK son entonces retrocruzadas o cruzadas con otras líneas de mejora vegetal para transferir solamente el nuevo alelo deseado en el fondo genético del cultivo deseado.

La presente invención demuestra que las plantas que contienen un incremento en los niveles de homoserina muestran resistencia a patógenos, en particular a aquellos de origen oomiceto. Con este conocimiento, un experto en la técnica puede modificar activamente el gen HSK por medio de aproximaciones mutagénicas o transgénicas, pero también identificar variantes naturales hasta el momento desconocidas en una especie vegetal dada que acumule homoserina y que tenga variantes del gen HSK que conduzcan a un incremento de homoserina, y usar estas variantes naturales de acuerdo con la invención.

En la presente solicitud los términos “homoserina kinasa” y “HSK” se usan de forma intercambiable.

La presente invención está ilustrada con los siguientes ejemplos. En los ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras.

La Figura 1 muestra el alineamiento de secuencias aminoacídicas de las proteínas HSK de *Arabidopsis thaliana* y ortólogas de *Citrus sinensis*, *Populus trichocarpa* (1), *Populus trichocarpa* (2), *Solanum tuberosum* (2), *Vitis vinifera*, *Lactuca sativa*, *Solanum tuberosum* (1), *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, *Ipomoea nil*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Spinacia oleracea*, *Pinus taeda*, *Zea mays*, y *Oryza sativa* utilizando el programa de alineamiento múltiple de secuencias Clustal W (1.82) (EBI). Bajo las secuencias se indican los aminoácidos conservados mediante puntos, y los aminoácidos idénticos mediante asteriscos. Los triángulos negros y su texto correspondiente indican los aminoácidos que han sido sustituidos en los cinco mutantes *dmr* de *Arabidopsis*.

La Tabla 2 muestra los números de orden Genbank y los identificadores GenInfo del ARNm de HSK de *Arabidopsis* y las secuencias ortólogas de las otras especies vegetales.

La Figura 2 muestra el porcentaje de formación de conidióforo de dos aislados de *Hyaloperonospora parasitica*, Cala2 y Waco9, en los mutantes *dmr1-1*, *dmr1-2*, *dmr1-3* y *dmr1-4* y la línea parental, *Ler eds1-2*, 7 días tras la inoculación. Los conidióforos formados en la línea parental se fijaron como 100%.

La Figura 3 es un resumen gráfico de los tres pasos principales en la clonación de *DMR1*: a) El mapeado inicial de *dmr1* resultó en el posicionamiento del *locus* en el brazo corto del cromosoma 2 entre las posiciones 7,42 y 7,56 Mpb. Tres marcadores tipo inserción/delección (INDEL) fueron diseñados (la posición de los marcadores F6P23, T23A1 y F5J6 se indica mediante las líneas negras). Estos marcadores se utilizaron para identificar recombinantes de entre varios cientos de plantas segregantes F2 y F3. Las secuencias de los cebadores de los marcadores tipo INDEL y otros marcadores adicionales utilizados para identificar los puntos recombinación en los recombinantes seleccionados se presentan en la Tabla 3. b) Un marcador, At2g17270 (indicado por una línea gris), mostró el mayor ligamiento con la resistencia. El *locus dmr1* puede ser delimitado aún más a una región que contiene 8 genes, at2g17250-at2g17290. Los ocho genes fueron amplificados y secuenciados para la búsqueda de mutaciones en las secuencias codificantes utilizando los cebadores descritos en la Tabla 4. El análisis de las secuencias de ADN de todos los ocho genes candidatos condujo al descubrimiento de mutaciones puntuales en el gen At2g17265 de todos los 5 mutantes *dmr1*. c) Cada mutante *dmr1* tiene una mutación puntual en una localización diferente del gen At2g17265, que codifica para una homoserina kinasa.

La Figura 4 muestra un dibujo esquemático de la secuencia codificante de HSK y las posiciones y sustituciones nucleotídicas de 5 mutaciones *dmr1* diferentes en la secuencia codificante de HSK (las posiciones nucleotídicas, indicadas mediante los triángulos negros, son relativas al codón de inicio ATG que comienza en la posición 1). Se muestran las regiones 5'-UTR y 3'-UTR mediante cajas gris claro. Bajo la secuencia nucleotídica se muestra la secuencia proteica. La proteína HSK contiene una secuencia putativa de tránsito de cloroplasto (parte gris oscuro). Los cambios de aminoácido resultantes de las 5 mutaciones *dmr1* se indican en el número de su posición de aminoácido (aa) (triángulos negros) en la proteína HSK.

La Figura 5 muestra la posición de la enzima homoserina kinasa en la ruta del aspartato para la biosíntesis de los aminoácidos treonina, metionina e isoleucina.

La Figura 6 muestra el número de conidióforos por plántula de *Ler eds1-2* a 5 días tras la inoculación con dos aislados diferentes de *H. parasitica*, Waco9 y Cala2. Las plántulas inoculadas fueron infiltradas con dH₂O, D-

homoserina (5 mM) o L-homoserina (5 mM) 3 días tras la inoculación con el patógeno. Las plántulas tratadas con L-homoserina muestran una ausencia completa de formación de conidióforo y son por tanto resistentes.

La Figura 7 muestra el análisis microscópico del crecimiento y desarrollo de *H. parasitica* en plántulas tratadas con agua, D-homoserina (5 mM), o L-homoserina (5 mM) y teñidas con azul de tripano.

5 a: Formación de conidióforos tras el tratamiento con HS en plántulas *Ler eds1-2* (aumento 10x). No se detectó formación de conidióforos tras la infiltración con L-homoserina, mientras que las plantas control muestran esporulación abundante.

b: El desarrollo del haustorio está afectado por la infiltración de L-homoserina (5 mM) (aumento 40x), pero no en plantas tratadas con agua o D-homoserina.

10 Las Figuras 8 y 9 muestran las secuencias nucleotídicas y aminoácidas del gen (At2g17265, NM_127281, GI:18398362) y proteína (At2g17265, NP_179318, GI:15227800) homoserina kinasa, respectivamente.

La Figura 10 muestra las secuencias nucleotídica y aminoácida predicha de la secuencia codificante (CDS) y la proteína, respectivamente, de la homoserina kinasa de *Lactuca sativa*.

15 La Figura 11 muestra las secuencias nucleotídica y aminoácida predicha de la secuencia codificante (CDS) y la proteína, respectivamente, de la homoserina kinasa de *Vitis vinifera*.

La Figura 12 muestra las secuencias nucleotídica y aminoácida predicha de la secuencia codificante (CDS) y la proteína, respectivamente, de la homoserina kinasa de *Cucumis sativus*.

La Figura 13 muestra las secuencias nucleotídica y aminoácida predicha de la secuencia codificante (CDS) y la proteína, respectivamente, de la homoserina kinasa de *Spinacia oleracea*.

20 La Figura 14 muestra las secuencias nucleotídica y aminoácida predicha de la secuencia codificante (CDS) y la proteína, respectivamente, de la homoserina kinasa de *Solanum lycopersicum*.

Ejemplos

Ejemplo 1

Caracterización del gen responsable de la resistencia a patógenos en los mutantes *dmr*.

25 Van Damme *et al.*, 2005, *supra* describe cuatro mutantes, *dmr1-1*, *dmr1-2*, *dmr1-3* y *dmr1-4* que son resistentes a *H. parasitica*. El nivel de resistencia puede ser examinado contando los conidióforos por hoja de plántula siete días tras la inoculación con el aislado de *H. parasitica* Cala2 (obtenible del Dr. E. Holub, Warwick RHI, Wellesbourne, UK o del Dr. G. Van der Ackerveken, Departamento de Biología, Universidad de Utrecht, Utrecht, NL). Para la línea parental, *Ler eds1-2* (Parker *et al.*, 1996, Plant Cell 8:2033-2046), la cual es altamente susceptible, el número de conidióforos se fija en 100%. La reducción en la formación de conidióforos en los mutantes *dmr1* infectados comparados con las plántulas de la línea parental se muestran en la Fig. 2.

30 De acuerdo con la invención, el gen responsable de la resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr1* de van Damme *et al.*, 2005, *supra* ha sido clonado mediante una combinación de mapeado y secuenciación de genes candidatos.

35 *DMR1* fue aislado mediante clonación basada en mapas. Los mutantes *dmr1* fueron cruzados con el mutante *FN2* Col-0 para generar una población de mapeado. El mutante *FN2* es susceptible al aislado de *H. parasitica* Cala2, debido a una mutación por neutrones rápidos en el gen *RPP2A* (Sinapidou *et al.*, 2004, Plant J. 38:898-909). Como las plantas F1 fueron susceptibles, y aproximadamente una cuarta parte de las plantas F2 mostraron resistencia a *H. parasitica*, todos los 5 mutantes *dmr1* portan una sola mutación recesiva.

40 El proceso de clonaje de *DMR1* se ilustra en la Fig. 3 y está descrito con mayor detalle más adelante. La localización en el mapa del *locus dmr1*, situado en el brazo corto del cromosoma 2, fue determinada primero genotipando 48 plantas F2 resistentes. A partir de un cribado adicional para detectar nuevos recombinantes en 650 plantas F2 se identificaron unos 90 recombinantes F2 entre dos marcadores tipo INDEL (inserción/delección) en el BAC T24112 en la posición 7,2 Mpb y en el BAC F5J6 en la posición 7,56 Mpb (de acuerdo con la versión 5.0 de enero de 2004 del genoma de *Arabidopsis* publicada en TIGR), lo que permitió mapear el gen en una región que contiene un contig de 5 BACs.

45 Se genotiparon las plantas F2 y se fenotipo la generación F3 para hacer un mapeado fino del *locus dmr1*. La mutación *dmr1* puede ser mapeada a una región de unos 130 Kpb (abarcando 3 clones BAC solapantes: F6P23, T23A1, y F5J6) entre dos marcadores tipo INDEL localizados en el BAC F6P23, en la posición 7,42 Mpb y en el F5J6 en la posición 7,56 Mpb (de acuerdo con la versión 5.0 de enero de 2004 del genoma de *Arabidopsis* publicada en TIGR). Esto resultó en un área con 30 genes putativos candidatos para el *locus dmr1*, entre los genes de *Arabidopsis* con los códigos TAIR AT2g17060 y AT2g17380. Se diseñaron marcadores tipo secuencia polimórfica

amplificada y cortada (CAPS) basados en SNPs ligados a los genes AT2g17190, AT2g17200, AT2g17270, At2g17300, At2g17310 y At2g17360.

Los datos del análisis de los 5 recombinantes restantes en esta región con esos marcadores tipo CAPS redujo a 8 los genes candidatos: At2g17230 (NM_127277, GI:30679913), At2g17240 (NM_127278, GI:30679916), At2g17250 (NM_127279, GI:22325730), At2g17260 (NM_127280, GI:30679922), At2g17265 (NM_127281, GI:18398362), At2g17270 (NM_127282, GI:30679927), At2g17280 (NM_127283, GI:42569096), At2g17290 (NM_127284, GI:30679934). La secuenciación de todos estos 8 genes resultó en el hallazgo de mutaciones puntuales en el gen codificante AT2g17265 en los cinco alelos *dmr1*: *dmr1-1*, *dmr1-2*, *dmr1-3*, *dmr1-4* y *dmr1-5*, demostrando claramente que AT2g17265 es *DMR1*. La Fig. 3 muestra un esquema de *dmr1* con las mutaciones puntuales de los diferentes alelos.

At2g17265 codifica para la enzima homoserina kinasa (HSK), hasta el momento el único gen de *Arabidopsis* que muestra esta función.

En *Arabidopsis*, la HSK está codificada por un solo gen, At2g17265 (Lee y Leustek, 1999, Arch. Biochem. Biophys. 372:135-142). La HSK es la cuarta enzima en la ruta del aspartato y es requerida para la biosíntesis de los aminoácidos metionina, treonina e isoleucina. La HSK cataliza la fosforilación de homoserina en homoserina fosfato (Fig. 5).

Ejemplo 2

Análisis de aminoácidos

La homoserina fosfato es un intermediario en la producción de metionina, isoleucina y treonina en *Arabidopsis*. Como la homoserina kinasa tiene un papel clave en la producción de aminoácidos, se determinaron los niveles de aminoácidos libres en la línea parental *Ler eds1-2* y en los cuatro mutantes *dmr1* diferentes. Se extrajeron estos aminoácidos a partir de hojas enteras con metanol 80%, seguido de una segunda extracción con etanol 20%. Los extractos combinados fueron secados y disueltos en agua. Tras añadir un estándar interno, se detectaron aminoácidos S-aminoetil-cisteína (SAEC) mediante cromatografía de intercambio de iones automatizada con postcolumna de derivatización con ninhidrina en un equipo JOEL AminoTac JLC-500/V (Tokio, Japón).

Los análisis de aminoácidos de cuatro mutantes *dmr1* diferentes y la línea parental *Ler eds1-2* mostraron una acumulación de homoserina en los mutantes *dmr1*, mientras este aminoácido intermediario no fue detectable en la línea parental *Ler eds1-2*. No hubo reducción en el nivel de metionina, isoleucina ni treonina en los mutantes *dmr1* (Tabla 1).

Tabla 1

Concentración (en pmol/mg de peso fresco) de homoserina, metionina, treonina e isoleucina en las partes aéreas de plántulas de dos semanas de la línea parental *Ler eds1-2* y los mutantes *dmr1-1*, *dmr1-2*, *dmr1-3* y *dmr1-4*.

	Homoserina	Metionina	Isoleucina	Treonina
<i>dmr1-1</i>	964	29	12	264
<i>dmr1-2</i>	7.128	14	29	368
<i>dmr1-3</i>	466	11	16	212
<i>dmr1-4</i>	6.597	11	32	597
<i>Ler eds1-2</i>	0	7	10	185

Debido a la reducción en la actividad de la HSK en los mutantes *dmr1*, la homoserina se acumula. Este efecto puede ser aumentado aún más mediante un influjo más fuerte de aspartato en la ruta conduciendo a un nivel de homoserina todavía más alto. La alta concentración de homoserina sustrato permitiría todavía una suficiente fosforilación por parte de la HSK mutada como para que los niveles de metionina, isoleucina y treonina no se redujeran en los mutantes *dmr1* y en la línea parental, *Ler eds1-2* (Tabla 1).

Ejemplo 3

La resistencia a patógenos se consigue mediante la aplicación de L-homoserina

Para analizar si el efecto es específico de la homoserina se analizó el estereoisómero D-homoserina. Se infiltraron plántulas completas con agua, 5 mM de D-homoserina y 5 mM de L-homoserina. Solamente el tratamiento con el aminoácido natural L-homoserina resultó en resistencia a *H. parasitica*. Las plántulas tratadas con agua o D-

homoserina no mostraron una gran reducción en el crecimiento del patógeno y fueron susceptibles a *H. parasitica*. Se aplicó la infiltración a dos accesiones de *Arabidopsis*, *Ler eds1-2* y *Ws eds1-1*, susceptibles a *Cala2* y *Waco9*, respectivamente. Se determinó la formación de conidióforos como un indicador de la susceptibilidad a *H. parasitica*. Los conidióforos fueron contados 5 días tras la inoculación con *H. parasitica* y 2 días tras la infiltración con agua, D-homoserina o L-homoserina. (Fig. 6). La infiltración con L-homoserina resulta claramente en una reducción de la formación de conidióforos y en una resistencia a *H. parasitica*. Esto fue confirmado más extensamente estudiando el crecimiento del patógeno *in planta* en plántulas de *Arabidopsis* mediante la tinción con azul de tripano. Las plantas fueron inoculadas con el aislado *Cala2*. Los síntomas fueron evaluados a 5 días tras la inoculación y mostraron claramente que solo las plántulas infiltradas con L-homoserina mostraban una fuerte reducción del crecimiento del patógeno y ausencia de crecimiento de conidióforos (Fig. 7).

El análisis microscópico mostró que el haustorio, la estructuras de alimentación hechas por *H. parasitica* durante el proceso de infección, solamente está perturbado en las hojas tratadas con L-homoserina.

De nuevo se muestra que los niveles incrementados de homoserina *in planta* conducen a la resistencia a patógenos.

Ejemplo 4

15 Identificación de ortólogos de HSK en cultivos

1. Cribado de bibliotecas en base a la homología de secuencias

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen y proteína homoserina kinasa de *Arabidopsis thaliana* se muestran en Fig. 8 y Fig. 9.

Se compararon bibliotecas de secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las secuencias de Fig. 8 y Fig. 9.

20 Esta comparación resultó en la identificación de secuencias codificantes y secuencias aminoacídicas predichas completas de HSK en *Citrus sinensis*, *Populus trichocarpa* (1), *Populus trichocarpa* (2), *Solanum tuberosum* (2), *Solanum tuberosum* (1), *Nicotiana benthamiana*, *Ipomoea nil*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Pinus tadea*, *Zea mays*, y *Oryza sativa*. La información de las secuencias de las proteínas ortólogas identificadas de este modo se proporciona en la Fig. 1. Se podrían identificar otros muchos fragmentos de ADN ortólogos de otras especies vegetales utilizando los mejores resultados recíprocos de BlastX de las secuencias proteicas de HSK de *Arabidopsis* u otras plantas.

2. Identificación de ortólogos por medio de hibridación heteróloga

La secuencia de ADN de HSK de *Arabidopsis* mostrada en la Fig. 8 se utiliza como sonda para buscar secuencias homólogas por hibridación con ADN en cualquier especie vegetal utilizando métodos estándar de biología molecular. Utilizando este método se detectan genes ortólogos mediante hibridación tipo southern con ADN digerido por enzimas o mediante hibridación con genotecas genómicas o de ADNc. Estas técnicas son bien conocidas para un experto en la técnica. Se puede utilizar la secuencia de ADN de HSK de cualquier especie vegetal más estrechamente relacionada como sonda alternativa.

3. Identificación de ortólogos por medio de PCR

35 Para muchas especies cultivadas, hay secuencias parciales de ARNm o del gen HSK disponibles que se pueden utilizar para diseñar cebadores para amplificar subsecuentemente mediante PCR la secuencia de ADNc o genómica completa. Cuando están disponibles las secuencias 5' y 3' la secuencia que falta en el intervalo es amplificada mediante PCR con un cebador directo 5' y un cebador inverso 3' específicos de HSK. En los casos en los que solamente están disponibles las secuencias 5', interna o 3', se diseñan tanto los cebadores directos como los inversos. En combinación con cebadores de sitios de multiclonación plasmídicos disponibles, los insertos se amplifican a partir de genotecas genómicas o de ADNc de la especie vegetal de interés. De manera similar, las secuencias 5' o 3' que faltan son amplificadas mediante técnicas de PCR avanzadas; 5'-RACE, 3'-RACE, TAIL-PCR, RLM-PCR y PCR vectorette.

45 A modo de ejemplo se proporciona la secuenciación del ADNc de HSK de *Lactuca sativa* (lechuga). Se identificaron varios ESTs de HSK de *Lactuca* en la base de datos Genbank EST de NCBI utilizando la herramienta tblastn comenzando con la secuencia de aminoácidos de HSK de *Arabidopsis*. El agrupamiento y alineamiento de los ESTs resultó en una secuencia consenso para un fragmento 5' de HSK y una para un fragmento 3' de HSK. Para obtener el ADNc completo de HSK de lechuga se utilizó el kit RLM-RACE (Ambion) con ARNm de plántulas de lechuga. La secuencia 5' de ARNm se obtuvo utilizando un cebador que fue diseñado en la secuencia consenso 3' de HSK derivada de ESTs (R1Sl: GCCTTCTTCACAGCATCCATTCC) y los cebadores 5' RACE del kit. La secuencia de ADNc 3' se obtuvo utilizando dos cebadores diseñados en el fragmento 5' RACE (Let3RACEOut: CCGTTGCGGTTAATGAGATT, y Let3RACEInn: TCGTGTTGGTGAATCCTGAA) y los cebadores 3' RACE del kit. Se diseñaron nuevos cebadores basados en la secuencia ensamblada para amplificar la secuencia codificante completa de HSK a partir de ADNc para proporcionar la secuencia nucleotídica y la secuencia proteica derivada tal y como se presentan en la Figura 10. Se utilizaron aproximaciones similares para *Solanum lycopersicum* (Figura 14) y

Vitis vinifera (Figura 11).

Se han identificado las secuencias codificantes completas de HSK de más de 10 especies vegetales diferentes a partir de bases de datos genómicas y de ESTs. A partir del alineamiento de secuencias de ADN, se seleccionaron regiones conservadas en las secuencias codificantes para el diseño de cebadores degenerados de nucleótidos (las abreviaturas de los nucleótidos degenerados se corresponden con los símbolos de nucleótidos IUB que son los códigos estándar utilizados 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 las secuencias internas de ADNc de HSK de una especie vegetal dada es el siguiente:

1. se aísla el ARNm utilizando métodos estándar,
2. se sintetiza el ADNc utilizando un cebador oligo dT y métodos estándar,
3. se realiza una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos degenerados directos e inversos,
4. se separan los fragmentos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa estándar y se aíslan del gel los fragmentos del tamaño esperado,
5. se clonan los fragmentos de PCR aislados en un vector plasmídico utilizando métodos estándar,
6. se analizan mediante secuenciación de ADN los plásmidos con los tamaños de inserto correctos, determinados mediante PCR,
7. se revela que fragmentos contienen las secuencias internas de HSK correctas mediante el análisis de secuencias utilizando blastx,
8. las secuencias internas de ADN pueden entonces ser utilizadas para diseñar cebadores específicos de gen o de especie para 5'- y 3'-RACE para obtener la secuencia codificante completa de HSK mediante RLM-RACE (tal y como se ha descrito anteriormente).

Se provee la secuenciación del ADNc de HSK de *Cucumis sativus* (pepino) a modo de ejemplo. Para pepino se amplificó con éxito un fragmento de la secuencia codificante interna a partir de ADNc utilizando dos combinaciones de cebadores; combinación 1: cebador F1Kom (GAYTTCYTHGGMTGYGCCGT) y M1RC (GCRGCGATKCCRCRCAGTT), y combinación 2: cebador M1Kom (AACTGYGICYGGMATCGCYGC), y R1Kom (CCATDCCVGAATCAANGGVGC). Tras la clonación y la secuenciación de los fragmentos amplificados se diseñaron cebadores específicos de HSK de pepino para 5'-RACE (Cuc5RACEOut: AGAGGATTTTTACTAAGTTTATTCGTG y Cuc5RACEInn: AGACATAATCTCCCAAGCCATGA) y 3'-RACE (Cuc3RACEOut: TGATGGCTTGGGAGATTATGTCT y Cuc3RACEInn: CACGAATAAACTTAGTAAAAATCCTCT). Finalmente se amplificó y secuenció la secuencia completa de ADNc de HSK de pepino (Figura 12). Se utilizó una aproximación similar para espinaca, *Spinacia oleracea* (Figura 13).

Se pueden modificar los ortólogos identificados tal y como se describe en este ejemplo utilizando técnicas conocidas para inducir mutaciones que reduzcan la expresión o actividad de HSK. Alternativamente, la información genética de los ortólogos se puede utilizar para diseñar vehículos para el silenciamiento génico. Todas esas secuencias son utilizadas entonces para transformar el cultivo vegetal correspondiente para obtener plantas que sean resistentes a *Oomycota*.

Ejemplo 5

Reducción de la expresión de homoserina kinasa en *Arabidopsis* por medio de ARNi.

Se han conseguido producir líneas con HSK silenciada en *Arabidopsis* mediante ARNi. Se transformó con éxito la accesión de *Arabidopsis* Col-0 con un constructo que contiene dos fragmentos de unas 750 pb del exón de HSK en direcciones opuestas. Se analizaron los transformantes para la resistencia a *H. parasitica*, aislado Waco9. Se obtuvieron bastantes líneas transgénicas que confirieron resistencia a *H. parasitica*. El análisis de la expresión de HSK y la acumulación de homoserina confirmó que en las líneas transformadas el gen HSK está silenciado, resultando en la resistencia a *H. parasitica*.

Ejemplo 6

Mutación de semillas

Las semillas de las especies vegetales de interés fueron tratadas con un mutágeno para introducir mutaciones puntuales aleatorias en el genoma. Las plantas mutadas se cultivan para producir semillas y la siguiente generación se criba para detectar un incremento en la acumulación de homoserina. Esto se consigue midiendo los niveles del

aminoácido homoserina, monitorizando el nivel de expresión del gen HSK, o buscando mutaciones sin sentido en el gen HSK mediante el método TILLING, mediante secuenciación de ADN, o mediante cualquier otro método para identificar cambios de nucleótido.

- 5 Las plantas seleccionadas son homocigotas o se convierten en homocigotas mediante autofecundación o cruzamiento con otras plantas. Las plantas homocigotas seleccionadas con niveles incrementados de homoserina se ensayan para un incremento en la resistencia al patógeno de interés para confirmar el incremento de resistencia.

Ejemplo 7

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

- 10 La introgresión del alelo mutante deseado en un cultivo se consigue mediante cruzamientos y cribado genotípico del alelo mutante. Éste es un procedimiento estándar en la mejora vegetal de cultivos asistida por marcadores actual.

Tablas

Tabla 2

Números GI (identificador GenInfo) y número de orden Genbank de los marcadores de secuencia expresada (ESTs) y secuencias de ARNm del ARNm de HSK de *Arabidopsis* y secuencias ortólogas de otras especies vegetales.

- 15 Un número GI (identificador GenInfo, escrito a veces en minúscula, "gi") es un número entero único que identifica una secuencia particular. El número GI es una serie de dígitos que se asignan consecutivamente a cada archivo de secuencia procesado por NCBI. El número GI cambiará por tanto cada vez que cambie 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 muchos otros. El número GI provee por tanto un identificador único de la secuencia que es independiente de la base de datos de origen y que especifica una secuencia exacta. Si una secuencia en GenBank se modifica, incluso un solo par de bases, se le asigna a la secuencia actualizada un nuevo número GI. El número de orden permanece el mismo. El número GI es siempre estable y recuperable. Por tanto, la referencia a números GI en la tabla proporciona una identificación clara e inequívoca de la secuencia correspondiente.
- 20

Especie	Nombre común	Detalle	Número GI	Genbank
Arabidopsis thaliana	Arabidopsis	ARNm	39104571	AK117871
			55935768	CV886642
			28618675	CB293218
			55935770	CV886643
			28619455	CB293998
Citrus sinensis	Naranja	ESTs	10846810	BF069552
			17401269	BM178051
			8283472	BE021031
			16348965	BI974560
			7285286	AW597773
			58024665	CX711406
			58017647	CX704389
			20449357	BQ253481
			16105339	BI893079
			37996979	CF808568
			37996460	CF808049
			6072786	AW102173
			26057235	CA800149
			6455775	AW186458
			6072724	AW102111
9203587	BE329811			
Ipomoea nil	Gloria de la mañana	ESTs	74407098	CJ761918
			74402449	CJ757269
			74402115	CJ756935
			74388670	CJ743490
Nicotiana benthamiana	Tabaco	ESTs	39880685	CK295868
			39859026	CK284950
			39864851	CK287885
			39864855	CK287887
			39859024	CK284949
			39864853	CK287886
			39880683	CK295867
			39864849	CK287884
Oryza sativa	Arroz	ARNm	50916171	XM_468550

25

ES 2 594 886 T3

Phaseolus vulgaris	Judía	ESTs	32970537	AK060519			
			62708660	CV535256			
			62710636	CV537232			
			62708052	CV534648			
			62709395	CV535991			
			62710761	CV537357			
			62708535	CV535131			
			62708534	CV535130			
			62711318	CV537914			
			62707924	CV534520			
			62710733	CV537329			
			62709601	CV536197			
			62709064	CV535660			
			62708834	CV535430			
			70780626	DR690274			
			67490638	DR092267			
			Pinus taeda	Pino taeda	ESTs	48933532	CO162991
34354980	CF396563						
67706241	DR117931						
17243465	BM158115						
34349136	CF390719						
66981484	DR057917						
48932595	CO162054						
66689208	DR011702						
48933450	CO162909						
34350236	CF391819						
67706323	DR118013						
48932678	CO162137						
66981399	DR057832						
34354850	CF396433						
Populus trichocarpa 1	Álamo					Genoma v1.0, LG_IX, 149339-148242	
						Expresión confirmada por ESTs	
Populus trichocarpa 2	Álamo					Genoma v1.0, scaffold_66, 1415935-1417032	
			Expresión confirmada por ESTs				
Solanum tuberosum 1	Patata	ESTs	66838966	DR037071			
			61238361	DN588007			
			39804315	CK251362			
			39801776	CK250065			
			9250052	BE340521			
			39832341	CK275363			
			21917848	BQ116921			
			9249876	BE340345			
			39815050	CK258070			
			39804985	CK251702			
			39804987	CK251703			
			39825384	CK268406			
			39832342	CK275364			
			66838967	DR037072			
			9250394	BE340863			
			39804317	CK251363			
			39825385	CK268407			
21375072	BQ516203						
Solanum tuberosum 2	Patata	ESTs	39813353	CK256373			
			39793361	CK246131			
			39793359	CK246130			
			39813352	CK256372			
Zea Mays	Maíz	ESTs	76021237	DT948407			
			76913306	DV165065			
			71446162	DR827212			
			71449720	DR830770			
			78117576	DV535963			
			91048486	EB158904			
			71439095	DR820145			
			76936546	DV174774			
			76012246	DT939416			
			78085419	DV513812			
			71766843	DR964780			
			76924795	DV170131			
			71449067	DR830117			
			91875652	EB405609			
			71450175	DR831225			
			78103551	DV521979			
			78090555	DV518929			
78104654	DV523072						

		76926251	DV170768
		78111568	DV529965
		71773353	DR971257
		71425952	DR807002
		93282458	EB674722
		78074199	DV502633
		76293328	DV032896
		78075462	DV503896
		91054750	EB165168
		86469295	DY235665
		74243218	DT651132
		74242899	DT650813
		101384764	EB814428
		91054750	EB165168
		71440426	DR821476
		78121780	DV540164
		78103550	DV521978
		86469294	DY235664
		91877777	EB407734
		67014441	CO443190
		76924794	DV170130
		76021236	DT948406
		71446161	DR827211
		78110960	DV529358
		78074736	DV503170
		71428043	DR809093
		86469052	DY235422
		71440425	DR821475
		78121779	DV540163
		78104653	DV523071
		37400920	CF637820
		78074198	DV502632
		71449719	DR830769
		58213736	BP877213
		7333245	AW621598
		4386685	AI482761
Solanum lycopersicum	Tomate	Unigen SGN-U223239 de la Sol Genomics Network	
Lactuca sativa	Lechuga	Secuencia descrita en esta solicitud de patente	
Vitis vinifera	Vid	Secuencia descrita en esta solicitud de patente	
Spinacia oleracea	Espinaca	Secuencia descrita en esta solicitud de patente	
Cucumis sativus	Pepino	Secuencia descrita en esta solicitud de patente	

Tabla 3

Secuencias de los cebadores de los marcadores tipo inserción/delección (INDEL, diferencia de tamaño indicada entre corchetes) y tipo secuencia polimórfica amplificada y cortada (CAP, sitio de restricción indicado entre corchetes) utilizados en el mapeado del *locus DMR1*.

5

Nombre del cebador Código del BAC y/o código At de TAIR	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador inverso	TIPO (tamaño/enzima)	Número GI del código At de TAIR
T24I12 (At2g16670)	AATCCAAATTTCTT GCGAGAACACA	AAACGAAGAGTGAC AATGGTTGGAG	INDEL (33)	18398180
F5J6 (AT2g17370-80)	CCGTCAGATCAGTC CTCATCTTGTT	CAGAAGCTGATGAT CGTGGAAAGTA	INDEL (30)	23506018, 30679966
F6P23 (AT2g17060)	CGGTTTCATGTCGA GGAAGATCATA	AAGAAGAGAAGTGC GTCAACCTTCC	INDEL (37)	22325728
T23A1	TCCTTCCATGTCCG	AACAAATTTGCTTC	INDEL	42570808,

ES 2 594 886 T3

(AT2g17220-30)	AAACCA	CAGCCTTT	(26)	30679913
AT2g17190	GAATAGAGGTTGAT	CTCTTGATGTTTT	CAP	30679898
	GGAAATCAAGA	ACTGGGCTGAT	(MseI)	
AT2g17200	CCTCTCCACCCATT	CGATCCATTTCGTC	CAP	30679902
	TCTAATTTTCG	AAGCAATCTAC	(MboII)	
AT2g17270	GATGCAGCTAAATT	ACGAAAATATCAAA	CAP	30679927
	ATCAGTGTGAA	AAGCTCCTTC	(NlaIII)	
AT2g17300-05	AGGTAGGATGGTAT	GCATGTTTTCTCTA	CAP	30679937,
	TATGTTTGAAC	AGCGATAGAAG	(EcoRI)	22325732
AT2g17310	ATGGGTAAACGAAAG	CACATGTATAAGGT	CAP	42569097
	AGAGGATTAGT	CTCCCATAGA	(MseI)	
AT2g17360	CCAACAAGTATCCT	CCACATCAAACCTTA	CAP	30679959
	CTTTTGTGTT	ATGAACTCCAC	(MaeIII)	

Tabla 4

Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los ocho genes *DMR1* candidatos para los que se indican los código TAIR y GI.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Códigos TAIR	Códigos GI
MvD17230_F	TTCCCGAAGTGTACATTTAAAAGCTC	At2g17230	30679913
MvD17230_R	TATGTCATCCCCAAGAGAAGAAGAC	At2g17230	30679913
MvD17240-F	CAATAAAAGCCTTTAAAAGCCCACT	At2g17240	30679916
MvD17240_R	TAGCTTCTGAAACTGTGGCATTACA	At2g17240	30679916
MvD17250_1F	CATGATTTGAGGGTATATCCAAAA	At2g17250	22325730
MvD17250_1R	GGAGGTGGGATTTGAGATAAAACTT	At2g17250	22325730
MvD17250_2F	TAGCCTAGAACTCTCTGTTTCGCAAG	At2g17250	22325730
MvD17250_2R	CATTATTTTGCCTAGTTGTGAGTGG	At2g17250	22325730
MvD17250_3F	CGAAGAAATCCTACAATCAACCATC	At2g17250	22325730
MvD17250_3R	TCTCACAATTCCCCTCTCTTACTCC	At2g17250	22325730
MvD17260_1F	TTACTCATTTGGGTGAACAGAACAA	At2g17260	30679922
MvD17260_1R	ATCATCCCTAATCTCTCTGCTTCCT	At2g17260	30679922
MvD17260_2F	GATTAAGATACGGGAATGGAGTCT	At2g17260	30679922
MvD17260_2R	ATGCAGACAAATAAGATGGCTCTTG	At2g17260	30679922
MvD17260_3F	GTTGTTGCTCCTGTCACAAGACTTA	At2g17260	30679922
MvD17260_3R	GAACAAAGACGAAGCCTTTAAACAA	At2g17260	30679922
MvD17265_F	GAGGACTGCATCTAGAAGACCCATA	At2g17265	18398362
MvD17265_R	TGGGCTCTCAACTATAAAGTTTGCT	At2g17265	18398362
MvD17270_F1	TAACGGTAAAGCAACGAATCTATCC	At2g17270	30679927
MvD17270_R1	TCAAACCTGATAACGAGAGACGTTGA	At2g17270	30679927
MvD17270_F2	TTGCGTTCGTTTTTGGAGTCTTTTAT	At2g17270	30679927
MvD17270_R2	AAACCAGACTCATTCTTTTGACATC	At2g17270	30679927
MvD17280_F1	TTTAGGATCTCTGCCTTTTCTCAAC	At2g17280	42569096
MvD17280_R1	GAGAAATCAATAGCGGGAAAGAGAG	At2g17280	42569096
MvD17280_F2	GCTTAAATAGTCCCTTTTCTTGC	At2g17280	42569096
MvD17280_R2	TCTGCTGGTTCTCATGTTGATAGAG	At2g17280	42569096
MvD17290_F1	CTCTCCTTCATCATTTCCACAAATCC	At2g17290	30679934
MvD17290_R1	TTCTCTCGCTGTAATGACCTCTAT	At2g17290	30679934

ES 2 594 886 T3

MvD17290_F2	TGCCACAGGTGTTGACTATGC	At2g17290	30679934
MvD17290_R2	TGCTCTTAAACCCGCAATCTC	At2g17290	30679934
MvD17290_F3	GAAGATGGCTTTAAAGGTCAGTTTGT	At2g17290	30679934
MvD17290_R3	AGCAACAACAACATAAAAGGTGGAAG	At2g17290	30679934

REIVINDICACIONES

1. Una planta, que es resistente a un patógeno, en donde la planta y el patógeno se seleccionan de *Bremia lactucae* en lechuga, *Peronospora farinosa* en espinaca, *Pseudoperonospora cubensis* en miembros de la familia de las cucurbitáceas, *Pseudoperonospora cubensis* en pepino, *Peronospora destructor* en cebolla, *Hyaloperonospora parasitica* en col, *Plasmopara viticola* en vid, *Phytophthora infestans* en tomate y patata, y *Phytophthora sojae* en soja; dicha planta tiene un nivel incrementado de homoserina *in planta* comparada con dicha planta que no es resistente a dicho patógeno; y dicha planta tiene una mutación en su gen homoserina kinasa que disminuye la actividad homoserina kinasa de la enzima codificada.
- 5 2. Una planta según se reivindica en la reivindicación 1, en la que la mutación en el gen homoserina kinasa conduce a una sustitución aminoacídica en la proteína codificada.
- 10 3. Una planta según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el gen es un gen de homoserina kinasa tal y como se identifica en la lista de Tabla 2.
- 15 4. Una planta según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el gen es el gen de la homoserina kinasa de *Lactuca sativa* que tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos tal y como se muestran en la Fig. 10.
5. Una planta según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el gen es el gen de la homoserina kinasa de *Vitis vinifera* que tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos tal y como se muestran en la Fig. 11.
- 20 6. Una planta según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el gen es el gen de la homoserina kinasa de *Cucumis sativus* que tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos tal y como se muestran en la Fig. 12.
7. Una planta según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el gen es el gen de la homoserina kinasa de *Spinacia oleracea* que tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos tal y como se muestran en la Fig. 13.
- 25 8. Una planta según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el gen es el gen de la homoserina kinasa de *Solanum lycopersicum* que tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos tal y como se muestran en la Fig. 14.

Fig. 1

```

Arabidopsis_thaliana      ---MASLCFQSPS---KPISYFQPKS-----NPSPLFAKVSVFRCRASVQTLVA----- 44
Citrus_sinensis          ----MAICFSSAV---KPNHFTVFF-----NPAP----KKPIFKCSCSLPTVTT----- 39
Populus_trichocarpa_1    ---MAICCFPSPL---KMPMPATPLT-----NLKPK---RPDILRCNFSPLTITTT----- 41
Populus_trichocarpa_2    ---MAIC-FLSPL---KPITPTTSLT-----NLNPK---KPNILRCNFSPLIITTT----- 41
Solanum_tuberosum_2     ----MAVLCQSP---LNLKLTSSSSS-----SRNRANP----SFRNLNSAHSR----- 39
Vitis_vinifera          ----MAICFHSP---SKPTCISPSSNH-----YRPNLHAR----SFRCNFSKTLT----- 39
Lactuca_sativa          ----MAIRHYQPPFASTSSSISSTDLF-----KPPKLYLSS---SVRCNISVASK----- 43
Solanum_tuberosum_1     ----MAITYQSP---MKLNFTSNGFS-----NPPSLYPINTHFSFGNLSVSSSSTQT- 47
Solanum_lycopersicum     ----MAITFQSP---MKLSFITSNGFS-----NPPSLYPINTHFSFGNLSVSSSSTQT- 47
Nicotiana_benthamiana    ---MAICYQSP---VKLNFTTSNAFSNPINPPPLYPIKTRFSSGGNLSAVPSKTQTT 54
Ipomoea_nil              ----ASISSTRHP-----NPPCLPALNISRCGPLFSAVTSSTLA- 36
Glycine_max              ----MATSTCFLC---PSTASLKGRRF-----RIR---IRCSSS-----VSVNIR----- 36
Phaseolus_vulgaris       ---MATAMSFLC---PSPATFKGTEMP-----IAR---FRCCSNTNSVSLNTR----- 40
Cucumis_sativus          ---MAMLSYQPP---KLSLTIIPVLS-----NPKPVLFRCSLSLPSRTAVTS----- 42
Spinacia_oleracea        ---MAICAQSP---FKPVNLSPHSPS-----PTHKSPFICKLSLSSHSTPLTT----- 44
Pinus_taeda              MESVFAQTKNHCFYLEPDLGLNSCFGLSRFRFKFSRGLPHVFNVRCAQVSLKP--- 57
Zea_mays                 ---MAPAATSTAS---APSSFHSTGRHR---ARVGARPSLVSLRVRAANPNVT----- 46
Oryza_sativa             ---MAAAAAAAPP---SPAPCFPSTRH-----TLPGLVSVRVSRRVKA--VAI----- 44
    
```

K (*dmr1-2*)



```

Arabidopsis_thaliana      ----VEPEPVFVSVKTFAPATVANLPGGFDFLGCVDG----LGDHVTLRVDFSVRAGEV 96
Citrus_sinensis          ----TEPEPVFTSVKTFAPATVANLPGGFDFLGCVDG----LGDVYSLKVDPSVHPGEV 91
Populus_trichocarpa_1    ----TEPEPVFTSVRSFAPATVANLPGGFDFLGCVDG----LGDVSLRVDFSVHPGEL 93
Populus_trichocarpa_2    ----TEPEPVFTSVRSFAPATVANLPGGFDFLGCVDG----LGDVSLRVDFSVHPGEL 93
Solanum_tuberosum_2     ----SEPSVFTSVKSFAPATVANLPGGFDFLGCVDG----IGDFVTLRLDPNVHPGEV 91
Vitis_vinifera          ----ADPQPVFTSVKSFAPATVANLPGGFDFLGAADV----IGDFVTLRVDPNVKAGEV 91
Lactuca_sativa          --LEPEPHPVFTSVKSFAPATVANLPGGFDFLGCADV----IGDYVTLTVDPQVQPGRL 97
Solanum_tuberosum_1     HITIPEPEPVFTSVKSFAPATVANLPGGFDFLGCADV----IGDFVTLRVDPNVKAGEV 103
Solanum_lycopersicum     HITIPEPEPVFTSVKSFAPATVANLPGGFDFLGCADV----VGDVFTLRVDPNVKAGEV 103
Nicotiana_benthamiana    HITIPEPEPVFASVKSAPATVANLPGGFDFLGCADV----IGDFITLRVDSKVKPGEV 110
Ipomoea_nil              ---VSDPEPVYASVKSAPATVANLPGGFDFLGCADV----IGDFVTVRVDPDVPQGV 89
Glycine_max              ----REPEPVTTLVKAFAPATVANLPGGFDFLGCADV----LGDIVSVKVDQVHPGEI 88
Phaseolus_vulgaris       ----TEPQPVTTFVKAFAPATVANLPGGFDFLGCADV----IGDIVSVRVDPVPRPGEI 92
Cucumis_sativus          ----VEPQPVFSSVKAAPATVANLPGGFDFLGCADV----LGDVYSLSDVSNVHPGEV 94
Spinacia_oleracea        ----EPTPLLTSTVTFAPATVANLPGGFDFLGCADV----LGDVYSLSDVSVHPGQL 95
Pinus_taeda              -VIQFEATPILQSVKAFAPATVANLPGGFDFLGCADV----LGDHVTVEVNDVEPGKI 112
Zea_mays                 ----ADPAPAFQSVTTFAPATVANLPGGFDFLGCADVADASLSLGDVTATLDPSPPPATV 100
Oryza_sativa             ----ADPAPAFNSVTFAPATVANLPGGFDFLGCADVADASLSLGDVTATLDPSPPPGTV 98
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
    
```

```

Arabidopsis_thaliana      SISEITGTTT----KLSTNPLRNCAGIAAIAATMKMLGIRSVGLSLDLHKGLPLGSGGLS 151
Citrus_sinensis          SISEVIGPS-----KLSKNPLWNCAGIAAISAMKMLGVRVSVGLSLSLEKGLPLGSGGLS 145
Populus_trichocarpa_1    SIDSISGPK-----KLSKNPLYNCAGIAAIAATMKMLNIRSVGLSLSLEKGLPLGSGGLS 147
Populus_trichocarpa_2    SIDSISGTK-----NLSKNPLWNCAGIAAIAATMKMLNIRSVGLSLSLEKGLPLGSGGLS 147
Solanum_tuberosum_2     SIDSISGAG-----KLRNRPRWNCAGIAAISVMKMLNIRSVGLTSLHKGKPLGSGGLS 146
Vitis_vinifera          SIVDIGVGN--AKKLSKNPLWNCAGIAAISVMKMLGVRVSVGLSLSLEKGLPLGSGGLS 149
Lactuca_sativa          SIAEINGVDKS--SKLRSRNLWNCAGIAAISVMKMLKIRSVGLSLSINTCLPLRGGGLS 155
Solanum_tuberosum_1     SIDSISGAG-----NRLSKDPLSNCAGIAAISVMKMLNIQSVGLSISLEKGLPLGSGGLS 158
Solanum_lycopersicum     SIDSISGAG-----GKLSKDPNSCAGIAAISVMKMLNIQSVGLSISLEKGLPLGSGGLS 165
Nicotiana_benthamiana    SISEISGAG-----NKLKSNPLWNCAGIAAIAVMKMLRIQSVGLSISLEKGLPLGSGGLS 144
Ipomoea_nil              CISDISGHAP----NKLKSNPLWNCAGIAAIEVMKMLNIRSVGLSLSLEKGLPLGSGGLS 144
Phaseolus_vulgaris       RISDITGHAP----NKLSTNPLWNCAGIAAIEVMKMLAIRSVGLSLSLQKGLPLGSGGLS 148
Cucumis_sativus          AISDITGNNT----NKLKSNPLYNCAGIAAIEVMKMLGIRSVGLSLSLEKGLPLGSGGLS 150
Spinacia_oleracea        SISSISGDAS----SKLSKDPLLNCAGIASALAAMKMLNIRSVGLSLSLQKGLPLGSGGLS 151
Pinus_taeda              VISFIDGDN----NRLSLNPMKNCAGIAAKATMELLGVRVSVGLSGLHKGKPLGSGGLS 167
Zea_mays                 SIASVTSPSRPNLAERLSRDLRNCAGVAAIAALRALGVRSHAVSIHITKGLPLGSGGLS 160
Oryza_sativa             AIASVTSPSRPTLADRLSRDLRNCAGVAAIAALRALDVKSHAVSIHITKGLPLGSGGLS 158
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
    
```

D (*dmr1-5*)

R (*dmr1-4*)



```

Arabidopsis_thaliana      SAASAAAAAVVNEIFGRKLGSDQLVLVAGLESEAKVSGYHADNIAPAIMGGFVLIIRNYEP 211
Citrus_sinensis          SAASAAAAAVVNEIFGRKLEVKDLVLVAGLESEAKVSGYHADNIAPAIMGGFVLIIRSYEP 205
Populus_trichocarpa_1    SAASAAAAAVVNEIFGRKLEVKDLVLVAGLESEAKVSGYHADNIAPAIMGGFVLIIRSYDP 207
Populus_trichocarpa_2    SAASAAAAAVVNEIFGRKLEVKDLVLVAGLESEAKVSGYHADNIAPAIMGGFVLIIRSYDP 207
Solanum_tuberosum_2     SAASAAAAAVVNEIFGRPLTLDLVLVAGLDESSEKVSQYHADNVAPAIMGGFVLIIRSYHP 209
Vitis_vinifera          SAASAAAAAVVNEIFGRKLVDDLVLAGLSEAKVSGYHADNVAPPALMGGFVLIIRSYDP 206
Lactuca_sativa          SAASAAAAAVVNEIFCGKLDHSDLLIAGLEAEAKLSQYHADNIAPAIMGGFVLIIRSYDP 215
Solanum_tuberosum_1     SAASAAAAAVVNEIFGRKLVDDLVLAGLESEKVSQYHADNIAPAIMGGFVLIIRSYDP 218
Solanum_lycopersicum     SAASAAAAAVVNEIFGRKLVDDLVLAGLESEKVSQYHADNIAPAIMGGFVLIIRSYDP 218
Nicotiana_benthamiana    SAASAAAAAVVNEIFGGKLSVSDLVLAGLESEKVSQYHADNIAPAIMGGFVLIIRSYDP 225
Ipomoea_nil              SAASAAAAAVVNEIFGSRLSVSDLVFAGLESEKVSQYHADNVAPAIMGGFVLIIRSYDP 204
Glycine_max              SAASAAAAAVVNEIFGKLSVEELVLVAGLSEKVSQYHADNVAPAIMGGFVLIIRSYDP 204
Phaseolus_vulgaris       SAASAAAAAVVNEIFGRKLSVEDLVVSLKSEKVSQYHADNVAPAIMGGFVLIIRSYEP 208
Cucumis_sativus          SAASAAAAAVVNEIFGGKLVGVEELVLVAGLSEKVSQYHADNVAPAIMGGFVLIIRNYEP 210
    
```


Fig. 2

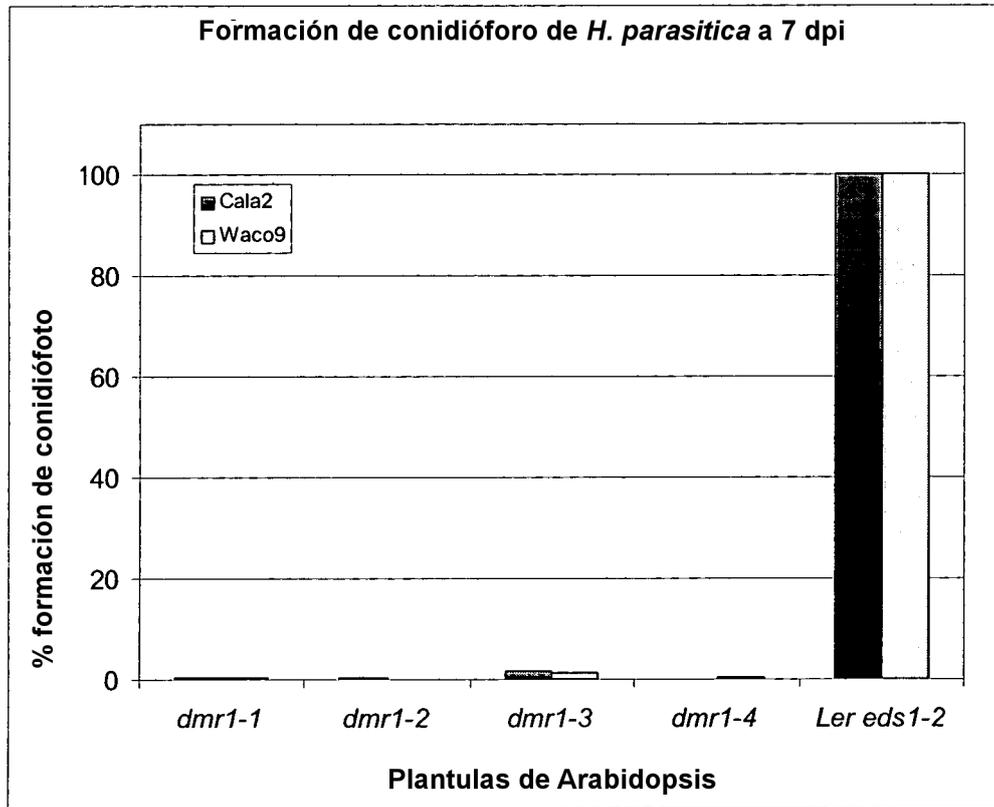


Fig. 3

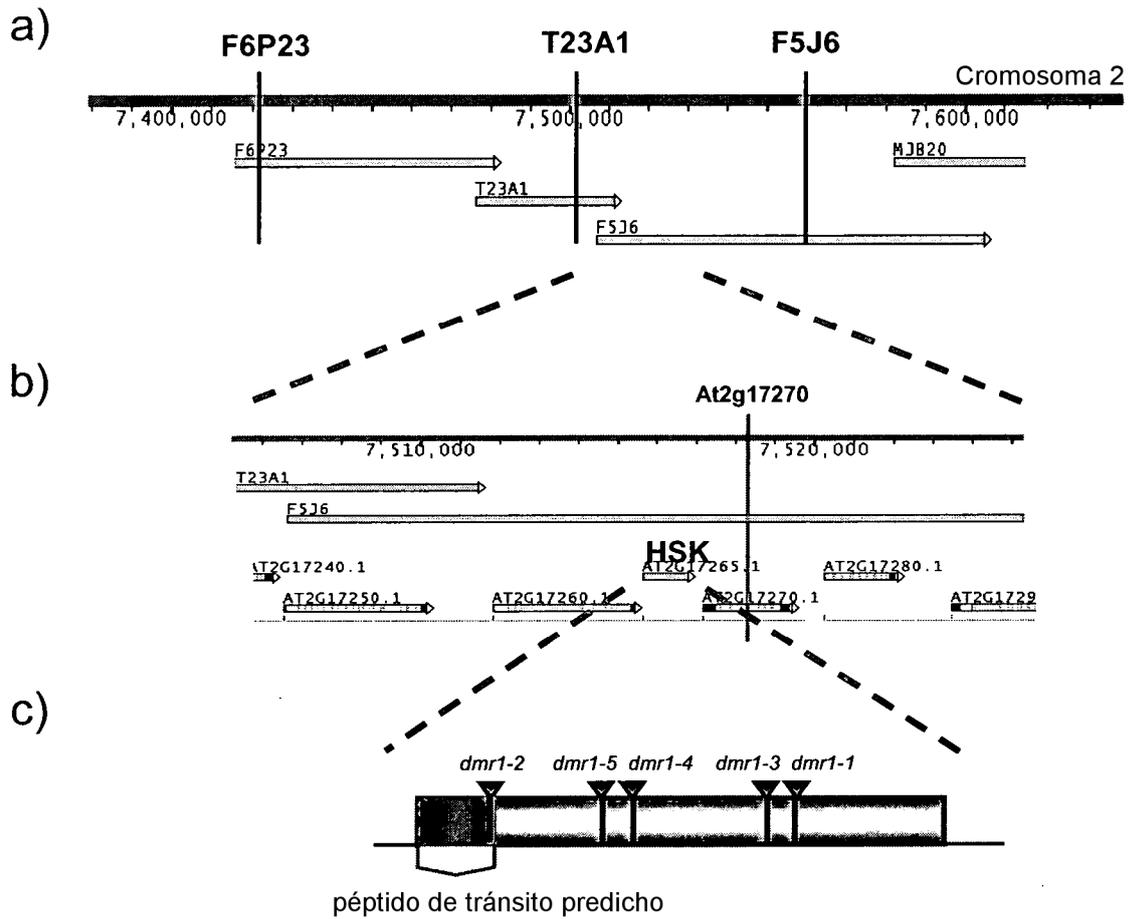


Fig. 4

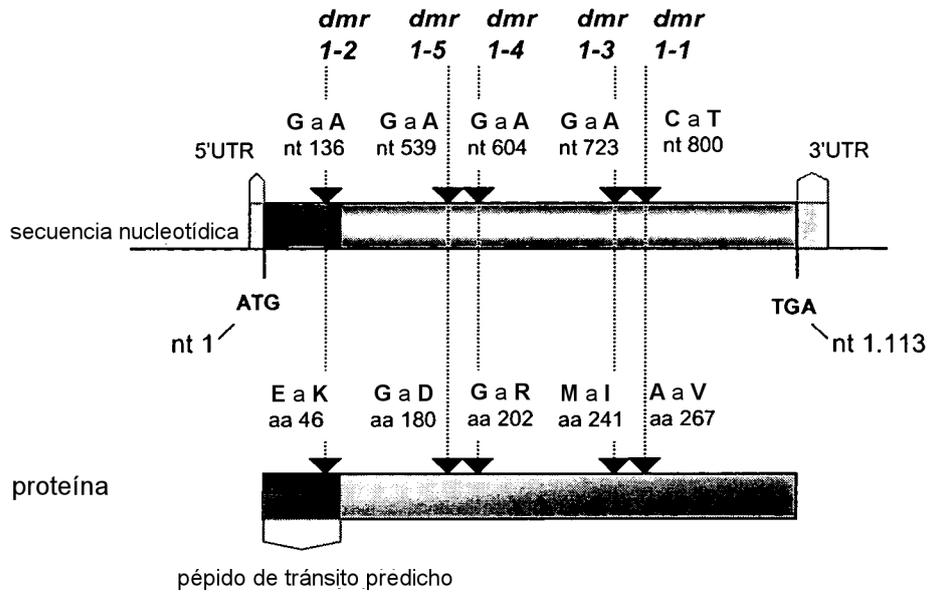


Fig. 5

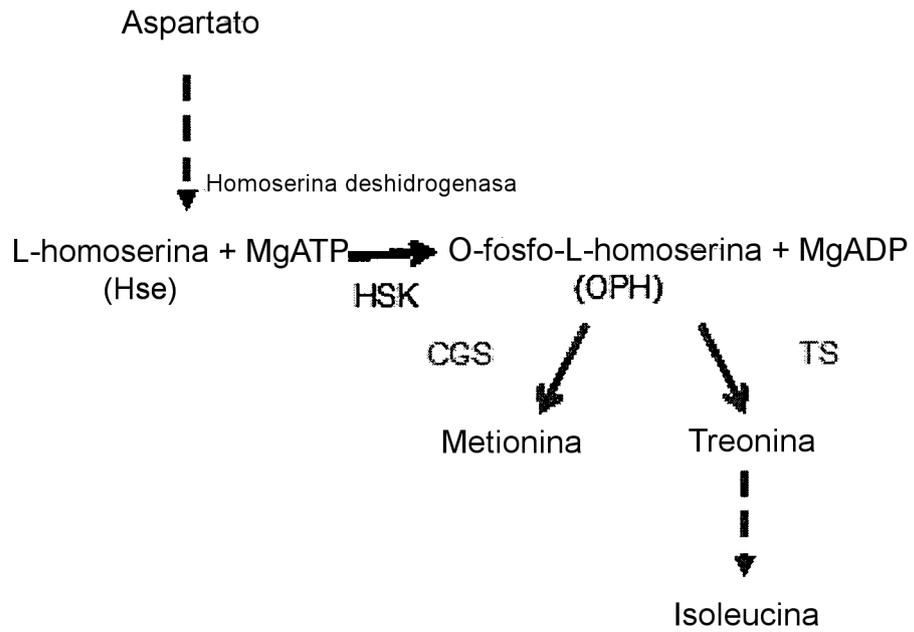


Fig. 6

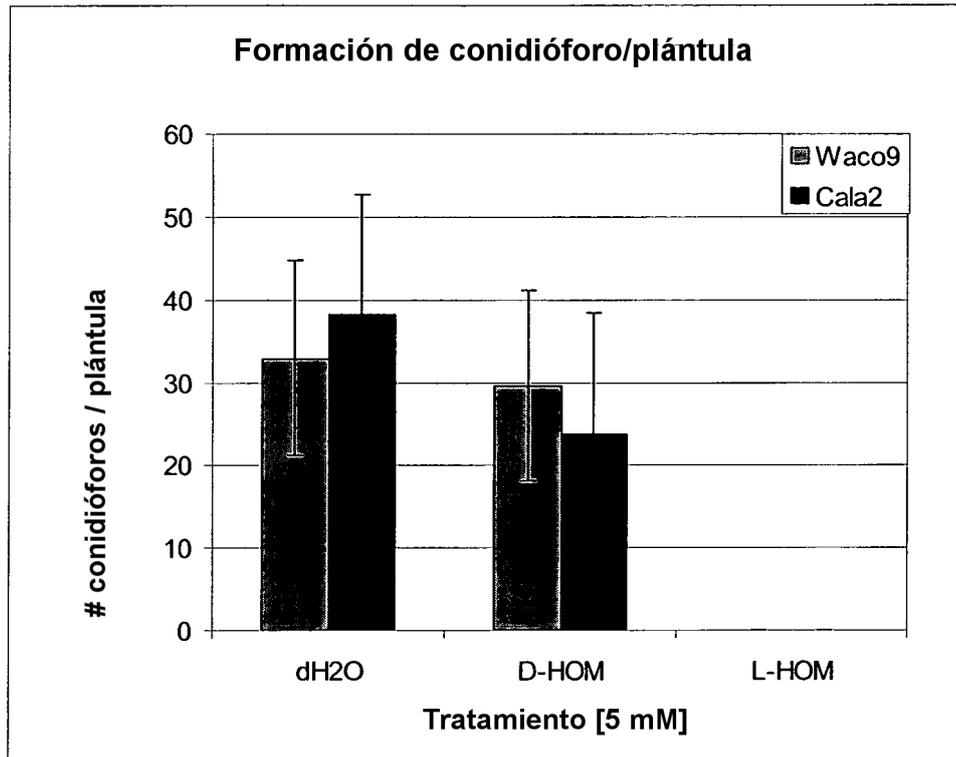


Fig. 7

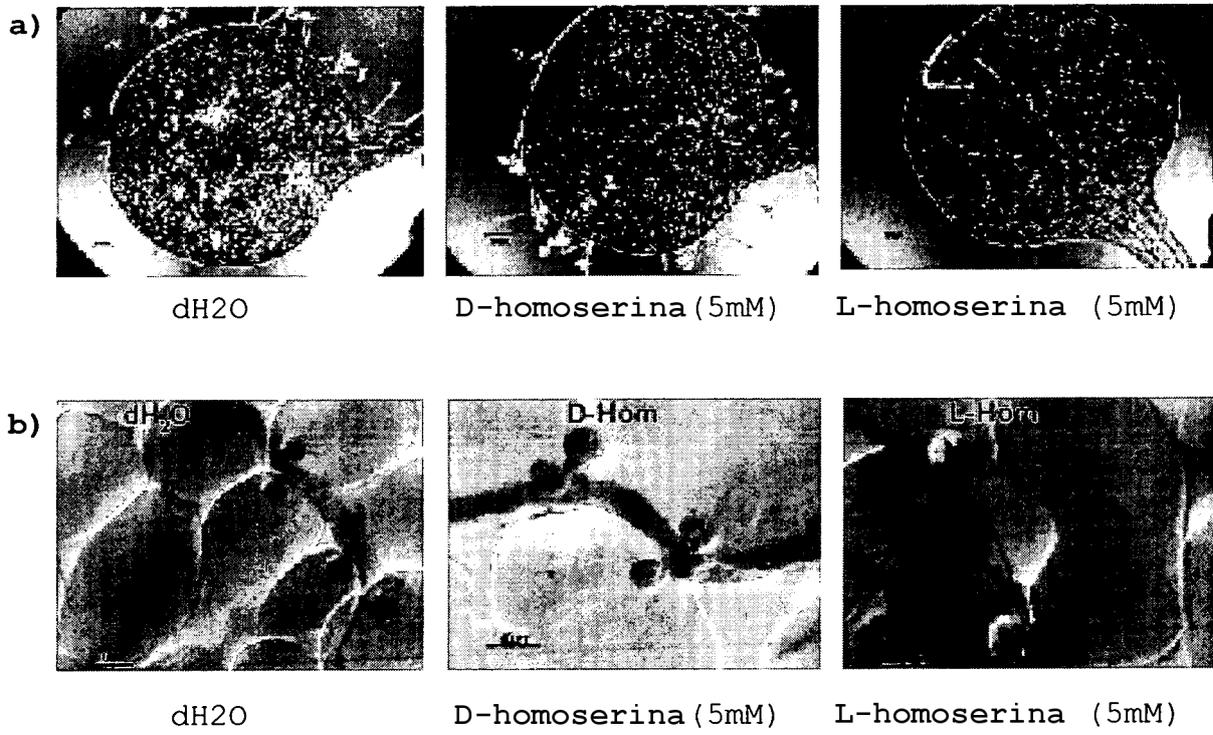


Fig. 8

```

1 CTCATTACTT GTTCATCAAT GGCAAGTCTT TGTTTCCAAT CTCCTTCCAA
51 ACCCATTTCC TATTTCCAAC CCAAATCCAA TCCATCGCCG CCGTTATTCG
101 CCAAAGTCTC CGTCTTTCGA TGCAGAGCTT CCGTACAAAC CCTCGTCGCC
151 GTTGAGCCGG AGCCAGTTTT CGTCTCCGTC AAGACTTTTG CGCCAGCCAC
201 CGTCGCTAAT TTAGGACCAG GGTTTGATTT CTTAGGATGC GCCGTCGATG
251 GTCTCGGAGA CCATGTGACT CTCCGTGTAG ATCCCTCTGT ACGAGCCGGT
301 GAGGTCTCAA TCTCGGAGAT CACCGGAACG ACAACAAAAC TCAGCACAAA
351 TCCTCTCCGG AACTGCGCCG GAATCGCTGC TATTGCTACA ATGAAGATGT
401 TAGGGATCAG ATCGGTTGGT TTATCATTAG ATTTGCATAA AGGTCTTCCT
451 TTAGGTAGCG GTTTAGGTTT TAGTGCAGCT AGCGCCGCCG CAGCTGCTGT
501 GGCGGTTAAT GAGATCTTTG GTCGGAAATT AGGGAGTGAT CAATTGGTAT
551 TAGCCGGTTT AGAATCGGAA GCGAAAGTCT CCGGTTATCA CGCTGATAAT
601 ATCGCACCAG CGATCATGGG TGGATTTCGTT TTGATTTCGAA ACTACGAACC
651 ACTTGATTTG AAACCATTGA AGTTCCCATC TGATAAAGAT CTCTTCTTTG
701 TTCTAGTAAG CCCTGAGTTT GAAGCTCCAA CTAAGAAAAT GAGAGCTGCA
751 TTGCCTACAG AGATTCCAAT GGTTTCATCAT GTTTGGAACA GTAGCCAAGC
801 AGCTGCTTTA GTCGCTGCTG TGTTAGAAGG TGACGCAGTG ATGCTTGGGA
851 AGGCATTGTC GTCGGATAAG ATTGTGGAGC CAACTAGAGC GCCTTTGATT
901 CCGGGGATGG AAGCTGTGAA GAAGGCAGCT TTGGAAGCTG GAGCGTTTGG
951 ATGTACAATT AGCGGAGCTG GACCAACAGC AGTTGCGGTG ATTGATTCCG
1001 AGGAGAAGGG TCAAGTGATT GGAGAGAAGA TGGTGGAAGC GTTTTGGAAA
1051 GTTGGTCATT TGAAATCTGT TGCTTCTGTG AAGAAGCTTG ATAAGGTTGG
1101 TGCTAGGCTT GTCAACAGCG TCTCCAGATG ATCTTTTAAT GATGTTTGAT
1151 TATGCTAAGA TTGGAACAAA TCTTCCTTTG TACTGTAATT TCTAGATGAT
1201 AATAAAGTTG TTTGTTTTCT AACT

```

Fig. 9

```

1 MASLCFQSPS KPISYFQPKS NPSPLFAKV SVFRCRASVQ TLVAVEPEPV
51 FVSVKTFAPA TVANLGPFGD FLGCAVDGLG DHVTLRVDPS VRAGEVSISE
101 ITGTTTKLST NPLRNCAGIA AIATMKMLGI RSVGLSLDLH KGLPLGSLG
151 SSAASAAAAA VAVNEIFGRK LGSDQLVLAG LESEAKVSGY HADNIAPAIM
201 GGFVLIRNYE PLDLKPLRFP SDKDLFFVLV SPDFEAPTKK MRAALPTEIP
251 MVHHVWNSSQ AAALVAAVLE GDAVMLGKAL SSDKIVEPTR APLIPGMEAV
301 KKAALEAGAF GCTISGAGPT AVAVIDSEEK QVIGIEKMVE AFWKVGHLKS
351 VASVKKLDNV GARLVNSVSR

```

Fig. 10

>CDS de HSK de *Lactuca sativa*

ATGGCAATTCGCCATTATCAACCTCCATTCGCCTCCACTTCTTCTTCTATCTCTAGTACA
 GATTTATTCAAACCCCTAAACTTTATCTTTCATCGTCTGTCCGGTGCAACATCTCCGTC
 GCTTCCAAACTGGAACCCGAACCTCATCCAGTTTTTCACCTCCGTTAAGTCATTCGCCCCC
 GCCACCGTAGCCAACCTCGGGCCTGGTTTCGACTTCCTCGGCTGCGCAATCGACGGC
 ATC
 GGAGATTACGTTACCCTCACAGTCGACCCCCAAGTCCAACCCGGCAGATTATCAATTGCA
 GAAATCAACGGCGTTGACAAGTCTTCCAAGAGGCTCAGCAGAAACCCCTCTATGGAATTGC
 GCCGGAATTGCTGCAATCTCCGTCATGAAGATGCTCAAGATCCGATCCGTTGGTCTCTCT
 TTATCCATCAATACATGTCTCCCCCTTCGAGGCGGGCTAGGCTCCAGCGCCGCTAGCGCT
 GCCGCCCGCCGTTGCGGTTAATGAGATTTTCGGAGGGAAGTTACATGATTCCGATTTG
 ATACTCGCGGGGCTCGAAGCTGAAGCGAAGTTATCCGGTTATCACGCCGATAACATTGCT
 CCGGCGATCATGGGCGGGTTGTGTTGATCAGAAGCTACGATCCATTAGAGTTGATCTCC
 TTGAAGTTTCCACCGGAAAAGAATCTGTTTTTCGTGTTGGTGAATCCTGAATTCGAAGCA
 CAAACGAAGAAGATGAGGGCGGTTCTACCGACGGAGATAACAATGTCGGATCATGTATGG
 AATTGTAGTCAGGCGGGCGGCGTTGGTGGCAGGCGTATTGCAGGGGGATTTGGTGGGGTTT
 GGGAAAGCATTGTTCATCGGATAGAATAGTGGAGCCACGGCGGGCGCCATTGCTTCCGGGA
 ATGGAAGATGTGAAGAAGGCAGCAATGGAAGCAGGGGCATATGGGTGTACGATAAGTGGG
 TCAGGGCCGACGGTGGTGGCGGTGACGGATGATGAAGATAGAGGGAGGGAGATCGGGGAG
 AAGATGGTGAAGCTTTTGTAGAGAAGGGAAAGTTGAAAGCTTTGGCTATGGTGAAGAAA
 CTGGACAGAGTTGGTGTAGAGTTATCAGTCGTATCTCCAGCCAATGA

>proteína HSK de *Lactuca sativa*

MAIRHYQPPFASTSSSISSTDLFKPPKLYLSSSVRCNISVASKLEPEPHPV
 FTSVKSFAPATVANLPGFDFLGCAIDGIGDYVTLTVDPQVQPGRLSIAEINGVDKSSKR
 LSRNPLWNCAGIAAISVMKMLKIRSVGLSLSINTCLPLRGGLGSSAASAAAAAVVNEIF
 GGKLDSDLILAGLEAEAKLSGYHADNIAPAIMGGFVLIRSYDPLELISLKFPPEKNLFF
 VLVNPEFQAQTKMRAVLPTEITMSDHVWNCQAAALVAGVLQGDLVGFGKALSSDRIVE
 PRRAPLLPGMEDVKKAAMEAGAYGCTISGSGPTVVAVTDEDRGREIGEKMVEAFVEK GK
 LKALAMVKKLDRVGARVISRISSQ*

Fig. 11

>CDS de HSK de *Vitis vinifera*

ATGGCGATTTGCTTCCACTCCCCCTCAAACCCACTTGCATTTCTCCCTCATCAAACCATTACAGACCCAATCTT
 CATGCTCGGTCCCTCAGATGCAACTTCTCTAAAACATTAACCTGCTGATCCTCAACCAGTTTTTCACCTCTGTGAAG
 TCCTTCGCACCCGCAACCGTTGCTAACCTCGGTCCCGGTTTCGATTTCCCTCGGTGCTGCTGTTGATGGTATAGGC
 GATTTTCGCTCCCTTCGCGTGGATCCTGATGTTCCGGCCCGGGAGATTCGATTGTCGATATCGATGGTGTGGG
 AATAGCGCCAAGAAGCTCAGTAAAAATCCCTCTGGAACGCGCCGGCATTGCCGCTATCTCCGTCATGAAAATG
 CTCGGAGTCCGATCGGTGGGGCTGTCCCTTCCCTCGAGAAGGGGTTGCCATTGGGAAGTGGACTTGGGTCGAGC
 GCTGCCAGTGCCGCCCGGGCTGCTGTGGCGGTGAATGAGATTTTTGGGCGGAAATTTGGGAGTTGATGACCTTGTC
 CTTGCTGGGCTTGACTCGGAAGCTAAAGTTTCGGGTTATCACGCGAACAATGTGGCGCCGGCTCTTATGGGAGGA
 TTCGTGTTGATTCGGAGTTATGATCCTTTGGAGTTGATTCCTTTGACGTTCCGAGCGACAAGGAGTTGTTTTTT
 GTGTTGGTGAATCCGGAATTTGAAGCTCCCACCAAGAAAATGCGGGCGGCATTGCCGTCGGAGATCGGGATGTCT
 GATCACGTGTGGAATTGTAGCCAGGCCGCTGCATTGGTAGCCTCGATTTTGCAAGGAGATTTGAGGGGGTTGGGC
 AAGGCATTGTCCTCCGACAGAATTGTGGAGCCAAGGAGGGCACCCTTGATCCCTGGGATGGAAGGAGTAAAAAG
 GCTGCTCTTGAGGCTGGTGCATTTGGCTGTACAATTAGTGGAGCAGGGCCGACTGCAGTTGCAATTACAGATGAC
 GAAGAGAAGGGAAGGGAGATTGGAGAACGGATGGTAGAAGCTTCTTGGAGGAAGGGAAGTTGAAGGCTGTAGCA
 ATGGTGAAGCAACTCGATAGGGTTGGTGTAGGCTTATGAGTAGCATCCTCAGATGA

>proteína HSK de *Vitis vinifera*

MAICFHSPSKPTCISPSSNHYPNLHARSFRCNFS
 KTLTADPQPVFTSVKSFAPATVANLGPFGDFLGAAVDGI GDFVSLRVPDVRPGEISIVD
 IDGVGNSAKKLSKNPLWNCAGIAAISVMKMLGVRVSVGLSLSLEKGLPLGSLGSSAASAA
 AAHAVVNEIFGRKLGVDLVLVLAGLDSEAKVSGYHANNVAPALMGGFVLIRSYPLELIPL
 TFPDKELFFVLVNPEFEAPTCKMRAALPSEIGMSDHVWNCQAAALVASILQGDRLRLG
 KALSSDRIVEPRRAPLIPMEGVKKAALAEAGAFGCTISGAGPTAVAITDDEEKGREIGER
 MVEAFLEEGKLVKAVAMVKQLDRVGARLMSSILR*

Fig. 12

>CDS de HSK de *Cucumis sativus*

ATGGCTATGCTCTCCTATCAACCGCCATTGAAGTCGTTGACCATTCCCTCCAGTTTCTTTATCTAACCCCTAAACCT
 GTTCTCTTCAGGTGCAGTTTGTCTCTTCCATCTAGAACCGCCGTCACCTCCGTGGAACCTCAACCCGTTTCTCT
 TCCGTCAAGGCGTTTGTCTCCTGCAACCGTCGCTAATTTAGGTCCTGGGTTTGATTTCCCTGGCTGCGCTGTTGAT
 GGCTTGGGAGATTATGTCTCTCTTAGTGTGATTCCAATGTTTCATCCAGGTGAAGTTGCGATTCTGATATTACA
 GGAATAACACGAATAAACTTAGTAAAAATCCTCTCTATAATTGTGCTGGTATTGCTGCTATTGAAGTTATGAAA
 ATGCTAGGGATCCGATCTGTTGGTCTTTCTCTTTTCGCTTGAGAAAGGTTTGCCGTTAGGGAGTGGATTGGGATCT
 AGTGCTGCGAGTGCAGCTGCTGCGGCGATTGCTGTTAATGGATTGTTTCGGTGGGAAATTAGGAGTAGAGGAATTG
 GTTCTCGCGGGTTGAAATCGGAAGAGAAGGTTTCTGGGTACCATGCGGATAATGTGCGACCCGGCTATCATGGGG
 GGTTTCATTCTGATTGCGAAATTACGAACCCCTTGAATTGATTTCGTTTGAATTTCCCGTCGAGAAGGAGCTGTTC
 TTCGTGTTGGTCAGCCCGGAATTCGAAGCACCGACGAAGAAAATGCGGGCTGCGTTACCTGCTGAAGTTGGGATG
 CCACACCATGTGTGGAATTCAGCCAAGCCGGGGCGTTGGTGGCTGCGGTGCTGCAGGGTGACACGATGGGATTG
 GGGAAAGCATTGTCATCAGACAAAATTGTGGAACCAAGGCGTTTCGCCGTTGATTCCAGGTATGGATGGTGTAAAG
 AAGGCAGCCATTGCTGCTGGGGCATTGGGTGCACGATAAGCGGAGCAGGGCCAACAGCGGTGGCGGTGATCGAT
 AACGAAGAGAAGGGGAAGGAGATTGGTGAGAGGATGGTTATGGCATTCTGAAGGAAGGAAATTTGAAAGCTACG
 GCATCTGTAAAGAGACTAGATCGAGTTGGTGCAAGGCTTATTGGATCAACTCCTTTAGATAGAGTTTATGA

>proteína HSK de *Cucumis sativus*

MAMLSYQPPLKSLTI PPVLSLNPVLFRCSLSLPSRTAVTSVEPQPVFSSVKAFAPA
 TVANLGPFDLGLCAVDGLGDYVLSVDSNVHPGEVAISDI TGNNTNKL SKNPLYNCAGI
 AAIEVMKMLGIRSVGLSLSLEKGLPLGSLGSSAASAAAAIAVNGLFGGKLGVEELVLA
 GLKSEKVSQYHADNVAPAIMGGFILIRNYEPELELIRLKFVPEKELFFVLVSPEFEAPTK
 KMRAALPAEVMPPHHVWNSQAGALVAAVLQGD TMGLGKALSSDKIVEPRRSPLIPGMDG
 VKKAAIAAGAFGCTISGAGPTAVAVIDNEEKGKEIGERMVMAFLKEGNLKATASVKRLDR
 VGARLIGSTPLDRVL*

Fig. 13

>CDS de HSK de *Spinacia oleracea*

ATGGCAATCTGCGCACAATCTCCATTCAAACCCGTCAATCTATCACCTCACTCCCCTTCTCCCACCCACAAATCC
 CCATTCATCTGTAAACTTTCTCTCTCTCCCACTCAACCCACTCACCTCTCACCCTGAACCAACACCCTCCTC
 ACCTCCGTCACCACCTTCGCCCCGCTACCGTCGCCAACCTCGGCCAGGGTTCGACTTCCTCGGTTGCGCTGTC
 GATGGCCTCGGTGACTTCGTTTCTCTTTCCGTTGACCCCTCCGTTTCATCCCGGTCAACTCTCCATCTCCTCCATT
 TCCGGCGACGCTTCTTCCAAACTCTCAAAGATCCCCTTCTTAACTGCGCCGGTATCTCTGCCCTAGCCGCCATG
 AAGCTCCTTAACATTTCGCTCCGTCGGCCTTTCTCTATCTCTCCAAAAGGGCTCCCCTTGGCTCCGGTCTCGGA
 TCTTCAGCAGCTTCCGCTGCTGCTGCCGCTGTTGCTGTGAACTCCCTATTTGGCTCCCCTCTCTCTCCACTCGAC
 CTCGTACACGCTGGACTTGAGTCAGAATCTAAAGTTTCCGGTTACCACGCTGACAACATTGCACCGGCGATAATG
 GGTGGTTTTATCTTAATCAGGAGTTATGAGCCATTGGATTTGATGAAATTTGGAGTTCCTGAGACTAATGATTTG
 TATTTTCGTATTGGTTAGTCCGGAATTTGAAGCCCCAACGAAGAAGATGAGGGCGGCATTGCCGAAGGAGATCGGG
 ATGCCGCACCACATATGGAATTTAGCCAAGCGGCAGCATTGGTGGCGGCAGTTTTGATGGGTGACGTAGAAGGG
 ATAGGAAAGGCAATGTCTTCCGATAAAAGTGGTGGAGCCAAGGCGGCACCATTGATTCCTGGGATGATGGCGGTG
 AAGAAGGCGGCTATTGAAGGGGGAGCGTTCGGGTGTACAATTAGCGGGGCAGGGCCTACGGCTGTGGCAGTAACG
 GATAGGGAGGAGAAGGGAAGAGAGATCGGAGAGAGAATGGTGGAAAGCGTTTTTGAAGGAAGGAGGGTTAAAGGCT
 GCCGCTGTGATTCAAAGCTAGATAGAGTTGGTGTAGAGTTGTTAGCAGTGTCCCAGATGA

>proteína HSK de *Spinacia oleracea*

MAICAQSPFKPVNLSPHSPSPHKSFPICKLSLSSHSTH
 SPLTTEPTPLLSVTTTFAPATVANLGPGFDFLGCAVDGLGDFVLSVDPSPVHPGQLSIS
 ISGDASSKLSKDPLLNCAGISALAAMKLLNIRSVGLSLSLQKGLPLGSLGSSAASAAAA
 AVAVNSLFGSPLSPLDLVHAGLESESKVSGYHADNIAPAIMGGFILLIRSYEPLDLMKLEF
 PETNDLYFVLVSPEFEAPTCKMRAALPKEIGMPHHIWNSSQAAALVAAVLMGDVEGIGKA
 MSSDKVVEPRRAPLIPGMMAVKKAIEGGAFGCTISGAGPTAVAVTDREKGREIGERMV
 EAFWKEGGLKAAAVIQKLDVGRVSSVPR*

Fig. 14

>CDS de HSK de *Solanum lycopersicum*

ATGGCTATAACCTTTCAATCTCCCATGAAACTCAGCTTCATCACTTCTAATGGCTTCTCAAATCCTCC
 TTCTCTTTATCCCATCAATACCCATTTCTCATTTGGATTCAATCTCTCATCTGTCTCCTCCAAAACCC
 AAACCCATATCACCATAACCCGAACCCGAACCCGATTCACCTCCGTCAAGTCGTTTGCTCCGGCCACT
 GTTGCTAATCTAGGTCGGGTTTTGATTTCCCTCGGATGCGCCGTTGATGGAGTCGGAGATTTTGTAC
 TCTTCGGGTTGACCCAAATGTTAAAGCTGGGGAGGTTTCGATTTCTGATATCTCCGGTGCTGGAAATA
 GGCTTAGTAAAGACCCTTTATCGAACTGTGCTGGAATAGCTGCTATTTCTGTTATGAAGATGTTGAAT
 ATACAGTCTGTTGGTTTATCGATTTCCGCTTGAAAAGGGTTGCCGTTGGGTAGTGGACTTGGGTCTAG
 TGCTGCTAGTGTGCGGCGGCGGCGGTGGCTGTGAATGAGATTTTTGGACGGAAGTTGAGTGTGATG
 ATCTTGTGCTTGCTGGGTTGGAATCGGAAACGAAGGTTTCGGGTTATCATGCTGATAATATAGCACCT
 TCGATTATGGGTGGTTTTGTGTTGATAAGAAGTTATGATCCGTTGGAATTGATCCCATGAAGTTTCC
 ATTTGAAAAGATTTGTTTTTTGTGCTTGTGAATCCCGAATTCGAAGCTCCAACGAAGAAGATGAGGG
 CGGTATTGCCATCGGAGGTGACAATGTCGCATCATATATGGAATTGTAGTCAGGCTGGGGCGTTGGTG
 GCTGCGATATTGCAGGGGGATTCGAGGGGTTTAGGGAAGGCGTTGTCGTCTGATAAGATTGTGGAGCC
 GAGGAGAGGGCCGTTGATTCCTGGGATGGAGGGAGTGAAGAAGGCGGCGTTGAAGGCTGGGGCATTG
 GTTGCACGATAAGCGGAGCTGGACCTACTTTGGTCGCGGTGACGGATGATGAAGAGAGAGGGAGGGAG
 ATTGGGGAGAGAATGGTGGAGGCGTTTATGAAGGAAGGGAACCTGAAGGCTTTGGCTATGGTGAAGAA
 GCTTGATCGAGTTGGTGCCCGCCTTGTAGTAGCAATTCATGA

>proteína HSK de *Solanum lycopersicum*

MAITFQSPMKLSFITSNGFSNPPSLYPINTHFSFGFNLSSVSSKTQTHITIPPEPEPVFTS
 VKSFAPATVANLPGFDLGCVDGVDVFTLRVDPNVKAGEVSI SDISGAGNRLSKDPL
 SNCAGIAAISVMKMLNIQSVGLSISLEKGLPLGSLGSSAASAAAAAVAVNEIFGRKLSV
 DDLVLAGLESETKVSGYHADNIAPSIMGGFVLIRSYDPLELIPLKFPFEKDLFFVLVNPE
 FEAPTKMRAVLPSEVTMSHHIWNC SQAGALVAAILQGDSRGLGKALSSDKIVEPRRGPL
 IPMEGVKKAALKAGAFGCTISGAGPTLVAVTDDEERGREIGERMVEAFMKEGNLKALAM
 VKKLDRVGARLVSSNS*