(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 651 329**

(51) Int. CI.:

C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
A01H 5/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2008 E 12155891 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2455476**

(54) Título: **Plantas resistentes a enfermedad**

(30) Prioridad:

01.02.2007 WO PCT/EP2007/050976

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2018

(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:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes a enfermedad

La presente invención se refiere a plantas de cebolla resistentes a enfermedad, en particular a plantas de cebolla resistentes a *Peronospora destructor*.

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

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

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

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

La resistencia general a patógeno, o formas sistémicas de resistencia tales como SAR, se ha obtenido mediante dos modos principales. La primera es mediante mutación de reguladores negativos de defensa vegetal y muerte celular, tales como en los mutantes *cpr, lsd* y *acd* de *Arabidopsis*. La segunda es mediante sobreexpresión transgénica de inductores o reguladores de defensa vegetal, tales como en las plantas de sobreexpresión de *NPR*1.

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

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

En la investigación que condujo a la presente invención, se realizó un cribado de mutante de *Arabidopsis thaliana* para susceptibilidad reducida al patógeno de mildiu velloso *Hyaloperonospora parasitica.* Se generaron mutantes EMS en la línea *Ler eds*1-2 de *Arabidopsis* muy susceptible. Se analizaron en detalle ocho mutantes resistentes a mildiu velloso (*dmr,* del Inglés "downy mildew resistant"), que corresponden a 6 loci diferentes. El análisis microscópico mostró que el crecimiento de todos mutantes de *H. parasitica* se redujo severamente. La resistencia de *dmr3, dmr4* y *dmr5* estaba asociada a la activación constitutiva de la defensa vegetal. Además, los mutantes *dmr3* y *dmr4*, pero no *dmr5*, eran también resistentes a *Pseudomonas syringae* y *Golovinomyces orontii.*

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

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

Por tanto, la presente invención proporciona una planta de cebolla, la cual es resistente a *Peronospora destructor* como se define en las reivindicaciones anejas.

La resistencia de acuerdo con la invención se basa en una actividad alterada, en particular un nivel reducido,

reducida o ausencia completa de la proteína DMR6 en *planta*. El término “proteína DMR6” a este respecto se refiere al producto del gen *DMR6*. Tales alteraciones se pueden alcanzar de diversos modos.

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

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

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

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

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

La invención es adecuada para un gran número de enfermedades de planta causadas por oomycetes tales como *Peronospora destructor* en la cebolla.

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

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

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

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

Otro método fiable para valorar una secuencia dada como un ortólogo DMR6 es mediante la identificación del mejor hit recíproco. Una secuencia ortólogo DMR6 candidata de una especie vegetal dada se identifica con el mejor hit a partir de la bases de datos de ADN cuando se investiga con la proteína DMR6 de *Arabidopsis* o la secuencia de ADN, o la de otra especie vegetal, usando un programa Blast. La secuencia de nucleótidos ortóloga candidata obtenida de la especie vegetal dada se usa para investigar la homología a todas las proteínas de *Arabidopsis* en la base de datos de ADN (por ejemplo, en NCBI o TAIR) usando el método de investigación BlastX. Si el mejor hit y resultado es para la proteína DMR6 de *Arabidopsis*, la secuencia de ADN dada se puede describir como un ortólogo, o secuencia ortóloga.

DMR6 se codifica mediante un gen sencillo en *Arabidopsis* como deducido a partir de la secuencia del genoma completo que está públicamente disponible. Se han identificado en el genoma de arroz 3 ortólogos, y en álamo 2 ortólogos. En la mayoría de otras especies vegetales ensayadas hasta ahora, DMR6 parece ser codificado mediante un gen sencillo, tal como se ha determinado por el análisis de las secuencias de ARNm y los datos de EST de las bases de datos de ADN públicas. En estas plantas se identifican los genes y proteínas ortólogos mediante comparaciones de nucleótidos y aminoácidos con la información que está presente en las bases de datos públicas.

Alternativamente, si las secuencias de ADN no están disponibles para la especie vegetal deseada, las secuencias ortólogas se aíslan mediante hibridación heteróloga usando sondas de ADN del gen *DMR6* de *Arabidopsis* u otra planta o mediante métodos PCR, haciendo uso de dominios conservados en la secuencia codificadora de DMR6 para definir los cebadores. Para muchas especies de cultivo, están disponibles secuencias parciales de ARNm de DMR6 que se pueden usar para diseñar cebadores para posteriormente amplificar por PCR el ARNm completo o las secuencias genómicas para el análisis de secuencia de ADN.

La Figura 1 muestra secuencias ortólogas de DMR6 (descritas en la Tabla 1) que se han identificado en bases de datos públicamente disponibles y se han obtenido por amplificación por PCR sobre ADNc y posterior secuenciación. Después se identifican secuencias ortólogas de DMR6, la secuencia completa de nucleótidos de la secuencia reguladora y codificadora del gen se identifica mediante técnicas biológicas moleculares estándar. Para esto, se sometieron a cribado las bibliotecas genómicas de la especie vegetal mediante hibridación de ADN o PCR con sondas o cebadores derivados de un gen *DMR6* conocido para identificar los clones genómicos que contienen el gen *DMR6*. Alternativamente, se pueden usar métodos PCR avanzados, tales como RACE mediado por ARN ligasa (RLM-RACE, del Inglés “RNA ligase-mediated RACE”) para amplificar directamente genes y secuencias de ADNc a partir de ADN genómico o ARNm inversamente transcrito. Posteriormente la secuenciación de ADN da como resultado la caracterización del gen completo o la secuencia codificadora.

Una vez que se conoce la secuencia de ADN del gen esta información se usa para preparar los medios para modular la expresión del gen *DMR6*.

Para alcanzar un nivel de proteína DMR6 reducido, se puede regular a la baja la expresión del gen DMR6 o se puede reducir la actividad enzimática de la proteína DMR6 mediante sustituciones de aminoácidos resultantes de los cambios de nucleótidos en la secuencia codificadora de DMR6.

La regulación a la baja de la expresión del gen DMR6 se alcanza mediante el silenciamiento del gen usando ARNi. Para esto, las plantas transgénicas se generan expresando una construcción antisentido DMR6, una micro construcción de ARN optimizada, una construcción repetida invertida, o una construcción sentido-antisentido combinada, para generar ARNds correspondiente a DMR6 que conduce al silenciamiento del gen.

Uno o más reguladores del gen DMR6 pueden regularse a la baja (en caso de los activadores transcripcionales) por ARNi.

Los reguladores pueden regularse al alza (en caso de las proteínas represoras) mediante sobreexpresión transgénica. La sobreexpresión se alcanza en una realización particular mediante proteínas represoras de la expresión del gen DMR6 de un promotor fuerte, por ejemplo, el promotor 35S que se usa comúnmente en la biotecnología de planta.

La regulación a la baja del gen DMR6 también se puede alcanzar mediante mutagénesis de los elementos reguladores en el promotor, la región “terminator”, o intrones potenciales. Las mutaciones en la secuencia codificadora de *DMR6* en muchos casos conducen a sustituciones de aminoácidos o codones de parada prematuros que afectan negativamente a la expresión o actividad de la proteína DMR6 codificada.

Estas mutaciones se inducen en plantas mediante el uso de compuestos químicos mutagénicos tales como sulfonato de etil metano (EMS, del Inglés “Ethyl methane sulfonate”), mediante irradiación de material vegetal con rayos gamas o neutrones rápidos, o por otros medios. Los cambios de nucleótidos resultantes son al azar, pero en una gran colección de plantas sometidas a mutágeno se pueden identificar fácilmente las mutaciones en el gen DMR6 usando el método TILLING (del Inglés “Targeting Induced Local Lesions IN Genomes”, Lesiones Locales Inducidas por Etiquetado en Genoma”) (McCallum et al., (2000) “Targeted screening for induced mutations”. Nat. Biotechnol. 18, 455-457, y Henikoff et al. (2004) “TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics”. Plant Physiol. 135, 630-636). El principio de este método se basa en la amplificación por PCR del gen de interés a partir del ADN genómico de una gran colección de plantas sometidas a mutágeno en la generación M2. Mediante la secuenciación de ADN o mediante la búsqueda de las mutaciones puntuales usando una nucleasa específica de cadena sencilla, tal como la CEL-I nucleasa (Till et al. (2004) “Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases”. Nucleic Acids Res. 32, 2.632-2.641) se identificaron las plantas individuales que tienen una mutación en el gen de interés.

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

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

La presente invención demuestra que las plantas que tienen no nivel o reducido de producto de gen DMR6 funcional muestran resistencia a patógenos, en particular de origen oomycete y fúngico. Con tal conocimiento el experto

puede identificar hasta ahora variantes naturales desconocidas de una especie vegetal dada que tiene variantes del gen DMR6 que conducen a un nivel reducido o ausencia de una de la proteína DMR6 funcional, o versiones mutadas de la proteína DMR6.

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

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

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

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

Se divulgan plantas, las cuales son resistentes a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomycete, donde la planta comprende en su genoma una construcción de ADN, que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está unido de manera operable a un promotor inducible de patógeno, donde el promotor inducible de patógeno es un promotor DMR6.

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

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

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

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

El ácido nucleico expresable preferiblemente es un gen implicado en una respuesta de defensa vegetal, por ejemplo un gen asociado con la respuesta de hipersensibilidad de una planta. En la respuesta de hipersensibilidad (HR, del Inglés “Hypersensitivity response”) de una planta, el sitio en la planta donde el patógeno invade sufre muerte celular localizada por la expresión inducida de un mecanismo de suicidio que desencadena dicha muerte celular localizada en respuesta a los patógenos. De este modo, solamente se sacrifican unas pocas células vegetales y se detiene eficazmente la proliferación del patógeno. Ejemplos de dichos genes implicados en una respuesta de defensa

vegetal son la proteína reguladora NPR1/NIM1 (Friedrich et al., Mol. Plant Microbe Interact. 14(9): 1.114-1.124, 2001) y el factor de transcripción MYB30 (Vailleau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(15): 10.179-10.184, 2002).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen DMR6 (At5g24530, gi 42568064, GenBank NM_122361) y la proteína (gi 15238567, GenBank NP_197841) de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente.

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

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

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

La Figura 6 muestra la resistencia al mildiu velloso de los mutantes *dmr6* de *Arabidopsis*. (a) Cuantificación de esporangióforos de aislado Waco9 de *H. parasitica*, 7 días después de la inoculación, sobre el mutante *dmr6-1* (BC2, línea E37) en comparación con su línea *Ler eds1-2* parental y sobre el mutante *dmr6-2* (línea de ADN-T FLAG_445D09) en comparación con su línea parental Ws-4. (b) Restauración de la susceptibilidad mediante complementación con el gen At5g24530 en el mutante *dmr6-1*. Se cuantificaron las esporas de *H. parasitica* por mg de peso de plantón sobre *Ler eds1-2, dmr6-1* y 5 líneas de complementación (Nº 121, 122, 211, 231 y 241).

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 1

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

Procedimientos experimentales

Crecimiento e infección de *Hyaloperonospora parasitica*

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

Generación de líneas *dmr6* sometidas a retrocruzamiento

Los mutantes *dmr6* se someten dos veces a retrocruzamiento (BC_2, del Inglés "Back crossed") con la línea parental *Ler eds1-2* así como *Ler*. Se seleccionaron las líneas BC_2, generadas con *Ler* para la presencia del gen *EDS1* tipo natural mediante análisis por PCR.

Clonación *DMR6*

El buen mapeo del gen *dmr6* se hizo con marcadores de PCR diseñados usando la base de datos Cereon para identificar las diferencias de inserción y deleción (IND) entre Col-0 y *Ler*. Los marcadores: IND_MOP9 en el gen At5G24210; IND_K16H17 en el gen At5G24420; IND_T4C12 en el gen At5G24820; IND_T11H3 entre los genes At5G24950_60 y IND_F21J6 en el gen At5G25270 se usaron para el mapeo (Tabla 2). Se inició un cribado adicional para nuevos recombinantes sobre 300 plantas F_2 dando como resultado ocho plantas recombinantes F_2 entre los

dos marcadores basados en IND IND_MOP9 y IND_T4C12, los cuales flanquean una región de 61 genes. Siete marcadores adicionales (M450-M590; Tabla 2) redujeron la región a ocho genes candidatos para el locus *dmr6*, entre At5g24420 y At5g24590. El análisis de secuencia de At5g24530 indicó una mutación puntual que conduce a un codón de parada en el exón 2 en el mutante *dmr6-1*.

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

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

Síntesis de ADNc

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

Complementación del mutante *dmr6-1*

Se generaron líneas de complementación mediante la transformación de plantas *dmr6* por el método de depresión floral con *Agrobacterium tumefaciens* (Clough and Bent, 1998) que contienen el gen At5g24530 de Col-0 bajo el promotor 35S. Se generó la construcción mediante amplificación por PCR de la longitud completa de At5g24530 de ADNc de Col-0 con cebadores que incluían sitios de restricción que se usaron para la clonación direccional. Un cebador directo (5'-ttctgggpatccaATGGCGGCAAAGCTGATATC-3') que contenía un sitio de restricción BamHI cerca del codón de inicio (ATG), amplificó el extremo 5' de *DMR6* y en el extremo 3' después del codón de parada se generó un sitio EcoRI con un cebador inverso (5'-gatatatgaattcttagttgtttagaaaattctcgaggc-3'). Se clonó el 35S-*DMR6*-Tn en el pGreen II0229 (Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000)). "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." Plant Mol. Biol. 42, 819-832). Se aislaron 300 µM de plantones resistentes a DL-fosfinotricina (BASTA) y se analizó la susceptibilidad de *H. parasitica* y los niveles de expresión de DMR6 por RT-PCR

Líneas "Knock down" de *DMR6* por ARNi

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

Perfilación de la expresión del gen del mutante *dmr6*

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

Resultados

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

Van Damme et al., 2005, supra describe un mutante *dmr6* que es resistente a *H. parasitica*. El nivel de resistencia se puede examinar mediante el recuento del número de esporangióforos por plantón siete días antes de la inoculación con *H. parasitica* (aislado Waco9 o Cala2, obtenible de Dr. G. Van den Ackerveken, Plant-Microbe Interactions Group, University of Utrecht, Utrecht, NL). La línea parental, *Ler eds1-2* (Parker et al., 1996, Plant Cell 8:2.033-2.046), la cual es muy susceptible, se usa como control positivo (y se ajusta al 100%).

En la Fig. 6a se muestra la reducción en la formación de esporangióforo sobre los mutantes *dmr6* infectados en comparación con los plantones de las líneas parentales, donde se muestran los resultados de la cuantificación de *Hyaloperonospora parasitica*, esporulación de Waco9 (esporangióforos/plantón) sobre el mutante *dmr6-1* resistente a mildiu velloso, sometido a retrocruzamiento dos veces con la línea parental *Ler eds1-2*, y sobre mutante *dmr6-2* (línea de ADN-T FLAG_445009) en comparación con las líneas control.

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

At5g24530 es *DMR6*

Se identificó un segundo alelo, *dmr6-2*, en una línea de inserción de ADN-T (FLAG_445009) a partir de la colección mutante de INRA, Versailles. La presencia y localización del inserto de ADN-T en el segundo intrón de At5g24530 (Figura 7) se confirmó por PCR y análisis de secuencia (datos no mostrados). La progenie de los homocigotos de la línea FLAG_445009 para la inserción de ADN-T era resistente a aislado Waco9 de *H. parasitica*, mientras que la línea parental (Ws-4) era susceptible (Figura 6a). El transcrito de At5g24530 se podría amplificar por RT-PCR usando cebadores en exón 2 y 3 en Ws-4, pero no en la línea *dmr6-2* homocigótica (datos no mostrados), indicando que *dmr6-2* se puede considerar un segundo alelo nulo.

Para corroborar la idea de que se requiere At5g24530 para la susceptibilidad a *H. parasitica* el mutante *dmr6-1* se transformó con el ADNc de At5g24530 clonado bajo control del promotor 35S. En cinco plantones *dmr6-1* T_2 independientes se confirmó la fuerte sobreexpresión de At5g24530 mediante RT-PCR (datos no mostrados). Todas las líneas T3, homocigóticas para el transgen, mostraron restauración de susceptibilidad a aislado Cala2 de *H. parasitica* (Figura 6b), confirmando que At5g24530 es *DMR6*. La complementación, junto con la identificación de dos

mutantes *dmr6* independientes indica claramente que se requiere un gen *DMR6* funcional para la susceptibilidad a *H. parasitica*.

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

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

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

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

Para elucidar cómo la falta de *DMR6* da como resultado resistencia a *H. parasitica*, se analizó el transcriptoma del mutante *dmr6-1* en comparación con la línea parental *Ler eds1-2.* Se hibridaron sondas derivadas del ARNm de las partes por encima del suelo de plantones *dmr6-1* y *Ler eds1-2* de 14 días de edad con microarrays CATMA del genoma completo. Se encontraron que se expresaron significativamente de manera diferencial un total de 58 genes en *dmr6-1*, de los cuales 51 genes habían elevado y 7 genes habían reducido los niveles de transcrito. Se han identificado un conjunto pronunciado de los 51 transcritos inducidos como genes asociados con respuestas activadas de defensa vegetal, por ejemplo, ACD6, PR-5, PR-4/HEL y PAD4. Estos datos indican que la pérdida de *DMR6* da como resultado la activación de un conjunto específico de transcritos asociados a defensa. El descubrimiento de que *DMR6* está entre los genes inducidos de *dmr6* corrobora la idea de que *DMR6* está asociado a defensa. Para ensayar si la expresión inducida de los genes asociados a defensa era debida a la pérdida de *DMR6* y no debida a las mutaciones por etano metil sulfonato (EMS) adicionales que permanecían en el mutante *dmr6-1* sometido a retrocruzamiento se verificó el nivel de transcrito de una selección de genes (At4g14365,

At1g14880, *ACD6, PR-1, PR-2 y PR-5*) mediante PCR cuantitativa en tanto el mutante *dmr6-1* como *dmr6-2* (Figura 10). Podríamos ensayar solamente los niveles de transcrito de DMR6 en el mutante *dmr6-1* (Figura 10a) ya que el mutante *dmr6-2* tiene una inserción de ADN-T que interrumpe el transcrito de DMR6. La inducción de DMR6 tal como la observada en el análisis de micro array fue confirmada por Q-PCR en *dmr6-1* en comparación con *Ler eds1-2* (Figura 10a). La Figura 10a y b muestran que todos los seis genes seleccionados se elevaron en ambos mutantes *dmr6* en comparación con las líneas parentales. La expresión elevada observada de los genes asociados a defensa seleccionados en los mutantes *dmr6* indica que la falta de *DMR6* activa una respuesta de defensa vegetal. La activación de este conjunto de transcritos asociados a defensa podría ser la causa principal de la resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr6*.

Ejemplo 2

Identificación de ortólogos DMR6 en cultivos

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

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

2. Identificación de ortólogos por medios de hibridación heteróloga

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

3. Identificación de ortólogos por medios de PCR

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

Como ejemplo de la secuenciación de la *Lactuca sativa* (lechuga) se proporciona ADNc de DMR6. A partir de la base de datos de EST de Genbank en NCBI se identificaron varios ESTs de DMR6 de *Lactuca* usando la herramienta tblastn que comienza con la secuencia de aminoácidos de DMR6 de *Arabidopsis*. El agrupamiento y el alineamiento de las ESTs dieron como resultado una secuencia consenso para un fragmento de DMR6 5'. Para obtener el ADNc de DMR6 de lechuga completo se usó el kit RLM-RACE (Ambion) sobre ARNm a partir de plantones de lechuga. Se obtuvo la secuencia de ARNm 3' mediante el uso de dos cebadores que se diseñaron en la secuencia consenso de DMR6 5' derivada a partir de ESTs (Lsat_dmr6_fw1: CGATCAAGGTCAACACATGG, y Lsat_dmr6_fw2: TCAACCATTACCCAGTGTGC) y los cebadores RACE 3' del kit. Basado en la secuencia juntada se diseñaron nuevos cebadores para amplificar la secuencia codificadora de DMR6 completa a partir de ADNc para proporcionar la secuencia de nucleótidos y la secuencia de proteína derivada tal como se presenta en la Fig. 3.

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

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

1. El ARNm se aísla usando métodos estándar,

2. El ADNc se sintetiza usando un cebador olig dT y métodos estándar,

3. usando oligonucleótidos directos e inversos degenerados se lleva a cabo una reacción de PCR,

4. los fragmentos de PCR se separan mediante electroforesis de gel de agarosa estándar y fragmentos del tamaño esperado se aíslan a partir del gel,

5. se clonan fragmentos de PCR aislados en un vector de plásmido usando métodos estándar,

6. los plásmido con tamaños de inserto correcto, tal como se determina por PCR, se analizan mediante secuenciación de ADN,

7. el análisis de secuencia que usa blastX revela que los fragmentos contienen las secuencias internas de DMR6 correctas,

8. a continuación, se puede usar la secuencia interna de ADN para diseñar cebadores específicos a género y especie para 5' y 3' RACE para obtener la secuencia codificadora de DMR6 completa mediante RLM-RACE (tal como se ha descrito anteriormente).

Como ejemplo se proporciona la secuenciación del ADNc de DMR6 de *Cucumis sativus* (pepino). Para el pepino diversas combinaciones de cebador entre los siguientes cebadores fueron exitosos en la amplificación de un tramo de secuencia codificadora interna del ADNc; cebadores directos dmr6_deg_fw1B (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 (GCCATRTGYTGYCCTTGYTC). Después de la clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados se diseñaron cebadores específicos a DMR6 de pepino para 5'RACE (Cuc_dmr6_rv1: TCCGGACATTGAAACTTGTG y Cuc_dmr6_rv2: TCAAAGAACTGCTTGCCAAC) y 3'RACE (Cuc_dmr6_fw1: CGCACTCACCATTCTCCTTC y Cuc_dmr6_fw2: GGCCTCCAAGTCCTCAAAG). Finalmente se amplificó y se secuenció la secuencia completa de ADNc de DMR6 de pepino (Figura 5). Un planteamiento similar se usó para espinaca, *Spinacia oleracea* (Figura 4), *Solanum lycopersicum* (Figura 12) y *Nicotiana benthamiana* (Figura 13).

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

Ejemplo 3

Mutación de semillas

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

Ejemplo 4

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

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

Ejemplo 5

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

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

los cuales se expresan los transgenes solamente cuando y donde se necesite, en sitios de infección.

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

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

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

Ejemplo 6

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

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

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

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

Tablas

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

Tabla 1

Especie	**Nombre común**	**Detalle**	**Número GI**	**Genbank**
Arabidopsis thaliana	Berro de Thale	ARNm	42568064	NM_122361
Aquilegia sp	Aquilegia	ESTs	75461114	DT768847.1
			74538666	DT745001.1
			74562677	DT760187.1
			75461112	DT768846.1
			74562675	DT760186.1
Citrus sinensis	Naranja dulce	ESTs	5793134	CX672037.1
			57933368	CX673829.1
			63078039	CX309185.1
Coffea canephora	Café	ESTs	82485203	DV705375.1
			82458236	DV684837.1
			82461999	DV688600.1
			82487627	DV707799.1
Gossypium hirsutum	Algodón	ESTs	109842586	DW241146.1
			48751103	CO081622.1
Sorghum bicolor	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
Medicago truncatula	Carretón trucado	Boceto de Genoma		MtrDRAFT_AC119415 g1v1
		proteína	92878635	ABE85154
Oryza sativa 1	Arroz	Genoma		OSJNBb0060105.4
		proteína	18057095	AAL58118.1
Oryza sativa 2		ARNm	115450396	NM_001055334
		proteína	115450397	NP_001048799
Oryza sativa 3		ARNm	115460101	NM_001060186

Especie	Nombre común	Detalle	Número GI	Genbank
		proteína	115460102	NP_001053651
Populus trichocarpa 1	Chopo	Genoma: LG_XII: 3095392-3103694		
		proteína: Popr1_1:569679, eugene3.00120332		
Populus trichocarpa 2	Chopo	Genoma: LG_XV: 201426-209590		
		proteína: Poptr_1:732726, estExt_Genewisel_v1.C_LG_XV0083		
Solanum lycopersicum 1	Tomate	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
Solanum lycopersicum 2	Tomate	ESTs	47104686	BT013271.1
			14685038	BI207314.1
			14684816	BI207092.1
Zea mays	Maíz	ESTs	110215403	EC897301.1
			76291496	DV031064.1
			91050479	EB160897.1
			91874282	EB404239.1
			110540753	EE044673.1
			78111856	DV530253.1
			94477588	EB706546.1

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

Tabla 2

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

Nombre cebador	**Gen**	**INDEL/enzima**	**Cebador directo**	**Cebador inverso**
IND_MOP9	At5G24210		tttgggaacagaaaaagttggaggt	catattcaaaagggaaaatccccaga
IND_K16H17	At5g24420		tggggttgtggtttattctgttgac	tggccaatagtagttgatacgcaaaga
IND_T4C12	At5g24820		tctcgggtaagacacaagtcgagat	tattccaacttgcgacgtagagcat
IND_T11H3	At5g24950-60		ccaattgggttatttacttcgatt	cggcttttaacaacatattttcca
IND_F21J6	At5g25270		aacacatcaccaagatgaatccaga	cctctgccccaagaaatattgagat
M450	At5G24450	18	agctttgtatggtagtgccaatga	gcggtatacgggggttaaaatcta
M490	At5g24490	TaqI	atggccaaccactctttgttac	acaagcaagaagaacagcgaag
M525	At5g24520-30	TaqI	gaaatttggttgttggcatttatc	tcaagatcttcatattctcattcca
M545	At5G24540/50	41	cagctgaagtatgtttcatccctttt	cttgcaattgttgggactaggtaa
M555	At5G24550/60	14	tcactaaccagtgaaaaaggttgc	tatacagcgaatagcaaagccaag
M470	At5g24470	HphI	ccgcgagtgtaatatatctctcct	cagtttaacgcatgaagtgctagt
M590	At5g24590	PdmI	gcatcatttgtaccgtactgagtc	tagtggatactctgtccctgaggt

Tabla 3

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

Arabidopsis thaliana	AtDMR6_fw	CACCATGGCGGCAAAGCTGATA
	AtDMR6UTR_rv	GACAAACACAAAGGCCAAAGA
Cucumis sativa	cuc_fw	CACCATGAGCAGTGTGATGGAGAT
	cucUTR_rv	TGGGCCAAAAAGTTTATCCA
Spinacia oleracea	spi_fw	CACCATGGCAAACAAGATATTATCCAC
	spiUTR_rv	TTGCTGCCTACAAAAGTACAAA
Lactuca sativa	Leat_few	CACCATGGCCGCAAAAGTCATCTC
	LsatUTR_rv	CATGGAAACACATATTCCTTCA
Solanum lycopersicum	Slyc1dmr6_fw	CACCATGGAAACCAAAGTTATTTCTAGC
	Slyc1dmr6UTR_rv	GGGACATCCCTATGAACCAA

Listado de secuencias

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

<120> PLANTAS RESISTENTES A ENFERMEDAD

<130> 4/2MG92/24D

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

<160> 98

<170> PatentIn versión 3.3

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

<220>
<223> cebador directo

<400> 1

ttctgggatc caatggcggc aaagcttgat atc 33

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

<220>
<223> cebador inverso

<400> 2

gatatatgaa ttcttagttg tttagaaaat tctcgaggc 39

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

<220>
<223> ARNiDMR6F

<400> 3

aaaaagcagg ctgaccgtcc acgtctctct gaa 33

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

<220>
<223> ARNiDMR6R

<400> 4

agaaagctgg gtgaaacgat gcgaccgata gtc 33

<210> 5

<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> attB1

<400> 5

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct 29

<210> 6
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> attB2

<400> 6

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt 29

<210> 7
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223>cebador interno para At5G24530

<400> 7

gagaagtggg atttaaaata gaggaa 26

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QDMR6F

<400> 8

tgtcatcaac ataggtgacc ag 22

<210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QDMR6R

<400> 9

cgatagtcac ggattttctg tg 22

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QAt1g114880F

<400> 10

ctcaaggaga atggtccaca 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QAt1g14880R

<400> 11

cgacttggcc aaatgtgata 20

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QAt4g14365F

<400> 12

tggttttctg aggcatgtaa a 21

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QAtfg14365R

<400> 13

agtgcaggaa cattggttgt 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QACD6F

<400> 14

tggacagttc tggagcagat 20

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QACD6R

<400> 15

caactcctcc gctgtgag 18

<210> 16

<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QPR-5F

<400> 16

ggcaaatatc tccagtattc aca 23

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QPR-5R

<400> 17

ggtagggcaa ttgttcctta ga 22

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QPR-2F

<400> 18

aaggagctta gcctcaccac 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QPR-2R

<400> 19

gagggaagca agaatggaac 20

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

<220>
<223> QPR-1F

<400> 20

gaacacgtgc aatggagttt 20

<210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QPR-1R

<400> 21

ggttccacca ttgttacacc t 21

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QACT2F

<400> 22

aatcacagca cttgcacca 19

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> QACT2R

<400> 23

gagggaagca agaatggaac 20

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Lsat_dmr6_fw1

<400> 24

gatcaaggtc aacacatgg 19

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Lsat_dmr6_fw2

<400> 25

tcaaccatta cccagtgtgc 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> dmr6 deg_fw1B

<400> 26

ttccaggtda ttaaycaygg 20

<210> 27

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

<220>
<223> dmr6_deg_fw2B

<400> 27

cataaytgga grgaytayct 20

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> dmr6_deg_fw3b

<400> 28

garcaaggrc arcayatggc 20

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> dmr6_deg_fw4

<400> 29

aatcctcctt chttcaagga 20

<210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> dmr6_deg_rv3B

<400> 30

agtgcattkg ggtchgtrtg 20

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> dmr6_deg_rv4

<400> 31

aatgttratg acaaargcat 20

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> dmr6_deg_rv5

<400> 32

gccatrtgyt gyccttgytc 20

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

<220>
<223> Cuc_dmr6_rv1

<400> 33

tccggacatt gaaacttgtg 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cuc_dmr6_rv2

<400> 34

tcaaagaact gcttgccaac 20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cuc_dmr6_fw1

<400> 35

cgcactcacc attctccttc 20

<210> 36
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cuc_dmr6_fw2

<400> 36

ggcctccaag tcctcaaag 19

<210> 37
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IND_MOP9 Fw

<400> 37

tttgggaaca gaaaaagttg gaggt 25

<210> 38

<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IND_MOP9 Rv

<400> 38

catattcaaa agggaaaatc ccaga 25

<210> 39
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IND_K16H17 Fw

<400> 39

tggggttgtg gtttattctg ttgac 25

<210> 40
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IND_K16H17 Rv

<400> 40

tggccaatag tagttgatac gcaaga 26

<210> 41
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IND_T4C12 Fw

<400> 41

tctcgggtaa gacacaagtc gagat 25

<210> 42
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IND_T4C12 Rv

<400> 42

tattccaact tgcgacgtag agcat 25

<210> 43
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IND_T11H3 Fw

<400> 43

ccaattgggt tatttacttc gatt 24

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

<220>
<223> IND_T11H3 Rv

<400> 44

cggcttttaa caacatattt tcca 24

<210> 45
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo IND_F21J6

<400> 45

aacacatcac caagatga 18

<210> 46
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso IND_F21J6

<400> 46

cctctgcccc aagaaatatt gagat 25

<210> 47
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M450 fw

<400> 47

agctttgtat ggtagtgcca atga 24

<210> 48
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M450 Rv

<400> 48

gcggtatacg ggggttaaaa tcta 24

<210> 49

<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M490 Fw

<400> 49

atggccaacc actctttgtt ac 22

<210> 50
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M490 Rv

<400> 50

acaagcaaga agaacagcga ag 22

<210> 51
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M525 Fw

<400> 51

gaaatttggt tgttggcatt tatc 24

<210> 52
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M525 Rv

<400> 52

tcaagatctt catattctca ttcca 25

<210> 53
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M545 Fw

<400> 53

cagctgaagt atgtttcatc ccttt 25

<210> 54
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M545 Rv

<400> 54

cttgcaattg ttgggactag gtaa 24

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

<220>
<223> M555 Fw

<400> 55

tcactaacca gtgaaaaagg ttgc 24

<210> 56
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M555 Rv

<400> 56

tatacagcga atagcaaagc caag 24

<210> 57
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M470 Fw

<400> 57

ccgcgagtgt aatatatctc tcct 24

<210> 58
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M470 Rv

<400> 58

cagtttaacg catgaagtgc tagt 24

<210> 59
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M590 Fw

<400> 59

gcatcatttg taccgtactg agtc 24

<210> 60

<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M590 Rv

<400> 60

tagtggatac tctgtccctg aggt 24

<210> 61
<211> 1026
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 61

atggcggcaa agctgatatc caccggtttc cgtcatacta ctttgccgga aaactatgtc 60

cggccaatct ccgaccgtcc acgtctctct gaagtctctc aactcgaaga tttccctctc 120

atcgatctct cttccactga tcgatctttt ctcatccaac aaatccacca agcttgtgcc 180

cgattcggat tttttcaggt cataaatcac ggagttaaca aacaaataat agatgagatg 240

gtgagtgttg cgcgtgagtt ctttagcatg tctatggaag aaaaaatgaa gctatattca 300

gacgatccaa cgaagacaac aagattatcg acgagcttca atgtgaagaa agaagaagtc 360

aacaattgga gagactatct aagactccat tgttatccta tccacaagta tgtcaatgag 420

tggccgtcaa accctccttc tttcaaggaa atagtaagta aatacagtag agaagtaaga 480

gaagtgggat ttaaaataga ggaattaata tcagagagct taggtttaga aaaagattac 540

atgaagaaag tgcttggtga acaaggtcaa cacatggcag tcaactatta tcctccatgt 600

cctgaacctg agctcactta cggtttacct gctcataccg acccaaacgc cctaaccatt 660

cttcttcaag acactactgt ttgcggtctc cagatcttga tcgacggtca gtggttcgcc 720

gttaatccac atcctgatgc ttttgtcatc aacataggtg accagttaca ggcattaagt 780

aatggagtat acaaaagtgt ttggcatcgc gctgtaacaa acacagaaaa tccgagacta 840

tcggtcgcat cgtttctgtg cccagctgac tgtgctgtca tgagcccggc caagcccttg 900

tgggaagctg aggacgatga aacgaaacca gtctacaaag atttcactta tgcagagtat 960

tacaagaagt tttggagtag gaatctggac caagaacatt gcctcgagaa ttttctaaac 1020

aactaa 1026

<210> 62
<211> 341
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 62

```
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
```

```
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.

<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
```

```
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
<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
```

```
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
<212> PRT
<213> Coffea canephora

<400> 65

```
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
```

```
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

Ser Pro Val Val Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Ala Gln 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
```

<210> 66
<211> 1029
<212> ADN
<213> Cucumis sativus

<400> 66

```
atgagcagtg tgatggagat ccaacttttg tgttcagggg gacgtcacga gaagttgcca     60
gagaagtatg aacggcctga atcggatagg ccgcggctgt cggaggtgtg ttgttgggac    120
aaggttccaa taatcgactt gggatgcgag gagagagaga tgattgtgaa gcaagtggag    180
gaggcctgca agtcttacgg ctttttccag gttataaatc atggtgtgag gaaggaattg    240
gtggagaaag tgatagaagt tggcaagcag ttctttgagc tgccgatgga ggagaagttg    300
aaatttttatt cagacgaccc ttccaagacc gtcagactct ccacaagttt caatgtccgg    360
aaagagcaat ttcgcaactg gagggattat ctcagactcc attgctatcc tctctccaac    420
tacacccccc attggccctc taacccacca tccttcaggg aaatagtgag tagttattgc    480
aatgaagtac gaaaagttgg gtacagaata gaggagctaa tatcggagag cttggggctg    540
gagaaggaat acataaggaa gaagttgggt gaacaaggtc agcacatggc tataaattat    600
tatccgccat gtccccaacc agaactcacc tacgggctcc ctggccatac ggatcccaac    660
gcactcacca ttctccttca ggatctccat gtcgccggcc tccaagtcct caaagatgga    720
aagtggctag cggtcaaccc ccaccccaat gcctttgtaa tcaatatagg cgaccaattg    780
caggcattga gcaatggggt gtacaagagc gtttggcacc gagcggtggt caatgttgat    840
aagcccaggc tgtcggtcgc ttcttttctc tgcccttgtg atgacgccct cattactcct    900
gcaccgctcc tctcccagcc ttcccccatt tacagacctt tcacctacgc ccagtactac    960
aatacttttt ggagcagaaa cttggatcaa caacattgct tggaactatt taaaaaccac   1020
cctccttaa                                                           1029
```

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

<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
```

```
        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
<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

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

```
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
<211> 1014
<212> ADN
<213> Lactuca sativa

<400> 69

```
atggccgcaa aagtcatctc cagtggattc cggtatacta ctctaccgga gagctacgtc     60
cgtccggtta acgacagacc taacctatct caagtttccg attgcaacga cgttcctgtt    120
attgacatcg gttgtggtga tagacaactc ataagccaac aaattggcga tgcttgtaga    180
agatacggtt ttttccaggt gattaatcat ggtgtgcctg atgaaatagt ggagaaaatg    240
caacaagtag gtagggagtt tttcctgttg cctgtggaag agaagatgaa gctttactca    300
gaggatccat cgaagacgat gaggctatcc accagcttta acgtccaaaa agaacaaatt    360
cataactggc gagattatct ccgccttcac tgttatcctc tggatcaata cagtcctgaa    420
tggccttcaa atccttctta tttcaaggaa tatgttggta attattgtac agcagtgcga    480
aatttaggaa tgagaatatt agaatcaata tcagaaagtt tagggttaca aaaagaagaa    540
ataaaaacta tattaggcga tcaaggtcaa cacatggcca tcaaccatta cccagtgtgc    600
cctgagcccg agctaaccta cgggctaccc gggcacacag accccaatgc tctcaccatc    660
cttctacagg acacactggt ctctggtctt caggttctca aagatggcaa atggttagcc    720
gttaaaccac accctaatgc gtttgtaatt aacattggtg atcagttaga ggcggtgagt    780
aatggtgaat ataaaagtgt atggcatcga gctgtggtta actcagacaa cccgcgaatg    840
tctatagctt cgtttttgtg tccttgtaat gacaccgtta ttagggctcc taaagaaata    900
ataaaggaag gatcgaaacc tgttttcaaa gaatttactt atgcagaata ctacgcgaag    960
ttttggacaa gaaaccttga tcaagaacat tgcttagaat tcttcaagaa ctag         1014
```

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

<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

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

```
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Gly Met Arg Ile Leu Glu Ser Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu
                165                 170                 175

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

Ala Ile Asn His Tyr Pro Val 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

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

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

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

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

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

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

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

Asn
```

<210> 71
<211> 338
<212> PRT
<213> Medicago truncatula

<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
```

```
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
<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

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

```
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
```

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

<400> 73

```
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
```

```
    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
```

```
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
<212> PRT
<213> Populus trichocarpa

<400> 75

```
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
```

```
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
```

```
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

```
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
```

```
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
<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

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

```
    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
<212> PRT
<213> Sorghum bicolor

<400> 79

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

```
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
```

```
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

<400> 80

```
atggcaaaca agatattatc caccggaatt ccttacaaaa ccctccccga aagctacatc     60

cgacccgaaa atgagaggcc caacttatct caagtctccg attgcgagaa tgtccctgtt    120

attgacttgg gtgccaaaga ccgtactcaa acaatccacc aagtcttcaa tgcttgtaaa    180

aattacgggt ttttccaggt gattaatcat ggggtgtcaa aggaattagc ggagaagatg    240

caaaaggtag ctcgagagtt cttcgatatg tcggttgagg aaaaaatgaa attatatagt    300

gacgatccaa ctaaaacact aagattgtct acaagtttta acgttaacaa agaggaagtt    360

cataattgga gagattatct taggctccat tgttggcctc ttgagcaata tgtccccgaa    420

tggccttcta acccccccttc cttcaaggaa atagtgagca agtacataaa agaagttagg    480

gaacttggtt tcagagtcca agaactaata tcagagagtt tagggttgga gaaagattac    540

ataaagaatg tcctaggaga tcaaggacaa cacatggctc ttaattatta ccctgagtgc    600

ccggagccag agatgacata cgggttgccg ggtcatactg accctaatgc ccttaccatc    660

cttctccaag acttgcaagt atctggcctt caaattttta aggatggtaa atggcttgct    720

gtcaaacctc aacctgatgc ttttgtcatt aacattggtg atcaattgca ggcattaagt    780

aacggtatat acaagagtgt atggcacaga gcagttgtga acacagataa gccaagatta    840

tcagtagctt cattcctctg ccccgccaat gatgcgttga taagcgcgcc aacacctctg    900

accgccaacg gatcaccggc tgtatataga gactatacgt atcctgagta ctacaagact    960

ttctggagta ggaacttgga ccaagagcac tgcttggagc tttttaaaaa ccaaacctag   1020
```

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

<400> 81

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

```
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Thr Lys Thr Leu 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 Trp Pro Leu Glu Gln Tyr Val Pro Glu Trp Pro Ser Asn
    130                 135                 140

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

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

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

Ala Leu Asn Tyr Tyr Pro Glu Cys Pro Glu Pro Glu Met 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 Ser Gly Leu Gln Ile Phe Lys Asp Gly Lys Trp Leu Ala
225                 230                 235                 240

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

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

```
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
<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

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

```
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
<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
```

```
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
<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
```

```
            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
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo AtDMR6_fw

<400> 85

caccatggcg gcaaagctga ta 22

<210> 86
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso AtDMR6UTR_rv

<400> 86

gacaaacaca aaggccaaag a 21

<210> 87
<211> 24
<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo cuc_fw

<400> 87

caccatgagc agtgtgatgg agat 24

<210> 88
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso cucUTR_rv

<400> 88

tgggccaaaa agtttatcca 20

<210> 89
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo spi_fw

<400> 89

caccatggca aacaagatat tatccac 27

<210> 90
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso spiUTR_rv

<400> 90

ttgctgccta caaaagtaca aa 22

<210> 91
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo Lsat_fw

<400> 91

caccatggcc gcaaaagtca tctc 24

<210> 92
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso LsatUTR_rv

<400> 92

catggaaaca catattcctt ca 22

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

<220>
<223> cebador directo Slyc1dmr6_fw

<400> 93

caccatggaa accaaagtta tttctagc 28

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

<220>
<223> cebador inverso Slyc1dmr6UTR_rv

<400> 94

gggacatccc tatgaaccaa 20

<210> 95
<211> 1013
<212> ADN
<213> Solanum lycopersicum

<400> 95

atggaaacca aagttatttc tagcggaatc aaccactcta ctcttcctca aagttacatc 60

cgacccgaat ccgatagacc acgtctatcg gaagtggtcg attgtgaaaa tgttccaata 120

attgacttaa gttgcggaga tcaagctcaa ataattcgtc aaattggaga agcttgtcaa 180

acttatggtt tctttcaggt aattaatcat ggtgtaccaa aggaagttgt agagaaaatg 240

ctaggggtag ctggggaatt tttcaattta ccagtagaag agaaactaaa attatattca 300

gatgatcctt caaagaccat gagattatca acaagtttta atgttaaaaa 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 gcccatactg atccaaattc acttacaatt 660

cttcttcaag acttgcaagt tgcgggtctt caagttctta aagatggcaa atggttagct 720

gtaaaacctc aacctgacgc ctttgtcatt aatcttgggg atcaattgca ggcagtaagt 780

aacggtaagt acagaagtgt atggcatcga gctattgtga attcagatca agctaggatg 840

tcagtggctt cgtttctatg tccgtgtgat agcgcgaaaa tcagtgcacc aaagctgctg 900

acagaagatg gatctccagt gatttatcaa gactttacgt atgctgagta ttacaacaag 960

ttctggagca ggaatttgga ccagcaacat tgtttggaac ttttcaagaa taa 1013

<210> 96
<211> 337
<212> PRT
<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
```

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

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> 97
<211> 1014
<212> ADN
<213> Nicotiana benthamiana

<400> 97

atggaagcaa aagttctttc cagcggaatc cgccactcta ctatccctca aagttacatc 60

cgccctcaat ccgataggcc gcgcctttct gaagttgctg attgtgaaaa cgttccagta 120

gttgatatag gttgcggtga tagaaacctt attgttcatc aaattggtga agcctgtcgt 180

ctttatggtt ttttccaggt aattaatcat ggtgtaccaa agaatttaat agacgaaatg 240

ctagagatag ctggggaatt ttttaggctt ccagttgaag agaagttgaa attgtactca 300

gatgacccat cgaagacgat gagattgtcg actagtttta atgtgaaaaa ggagaaggtt 360

cacaattgga gagattatct cagacttcat tgttatcctc ttgaaaatta cgctcctgaa 420

tggccttcca atccttcctc tttcagggaa atcgtgagca gatattgcat ggaagttcga 480

caactcgggt tcagattgca ggaagccata gcagagagcc taggcttaga gaaagagtgt 540

ataaaggatg tattgggcga acaaggtcaa cacatggcta tcaatttcta tcctccttgt 600

ccacaaccag aactcactta tgggctgcca gcacatactg atccaaatgc ccttacaatt 660

cttcttcaag acttagaagt agctggtctt caagttctta aagatggcga atggttggcc 720

gtcaagcctc aaccagatgc ctttgtcatt aatcttggtg atcaactgca ggcagtgagt 780

aatgggagat acaaaagcgt atggcatcga gctattgtaa attcagacaa agccaggttg 840

tcagtggctt cgttcctttg tccgtgcgat agcgcgaaaa tcagtgctcc aaagctcctc 900

actgaagatg gatctcctgt catttatcag gactttacct atgctgagta ttacaaaaag 960

ttctggagca ggaatttgga ccaggaacat tgtttggaac ttttcaagaa ctaa 1014

<210> 98
<211> 337
<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

```
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

1. Planta de cebolla que es resistente a *Peronospora destructor* caracterizada porque la planta tiene un nivel reducido, actividad reducida o ausencia completa de proteína DMR6 en comparación con la planta que no es resistente a dicho patógeno en donde dicha planta tiene una mutación en su gen *DMR6* que da como resultado una expresión DMR6 reducida en comparación con el gen *DMR6* de tipo salvaje en donde no está presente tal mutación.

2. Método para obtener una planta de cebolla que es resistente a *Peronospora destructor* que comprende la reducción del nivel endógeno de proteína DMR6 en la planta por mutación del gen *DMR6* de la planta.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la mutación se efectúa por tratamiento mutagénico de la planta, en particular con mutágenos o radiación.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la reducción del nivel endógeno en la planta se alcanza al reducir la expresión del gen *DMR6* de la planta mediante silenciamiento del gen o ARNi.

Fig. 1

```
Arabidopsis                 ------MAAKLISTGFRHTTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLED-FPLIDL 43
Aquilegia_sp                -----MESSNVLLTGTRHSNLPENYVRSVSDRPRLSEVKDCEN-VPVIDL 44
Citrus_sinensis             ------MDTKVLSSGIRYTNLPEGYVRPESERPNLSEVSECKN-VPVIDL 43
Coffea_canephora            ------METKVISSGIKYTSLPESYVRPESERPRLSEVSDCQN-VPVVDL 43
Cucumis_sativus             --MSSVMEIQLLCSGGRHEKLPEKYERPESDRPRLSEVCCWDK-VPIIDL 47
Gossypium_hirsutum          ------MDTKVLSSGIHYSSLPESYVRPESERPRLSEVSQCDN-VPVIDL 43
Lactuca_sativa              ------MAAKVISSGFRYTTLPESYVRPVNDRPNLSQVSDCND-VPVIDI 43
Medicago_truncatula         ------MDTKVLSSGIHYSKLPESYIRPESDRPCLSQVSEFEN-VPIIDL 43
Oryza_sativa_1              MAAEAEQQHQLLSTAVH-DTMPGKYVRPESQRPRLDLVVSDAR-IPVVDL 48
Oryza_sativa_2              ------MADQLISTADH-DTLPGNYVRPEAQRPRLADVLSDAS-IPVVDL 42
Oryza_sativa_3              -----MATTQLLSTVEHRETLPEGYARPESDRPRLAEVATDSN-IPLIDL 44
Populus_trichocarpa_1       ------MDTKVLSSGIQYTNLPASYVRPESERPRLWEVSTCEN-VPVIDL 43
Populus_trichocarpa_2       ------MDTKVISSGVHYTNLPASYVRPESERPRLSEVSTCED-VPVIDL 43
Solanum_lycopersicum_1      ------METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVVDCEN-VPIIDL 43
Solanum_lycopersicum_2      -----MTTTSVLSSGFNHSTLPQSYVRPESQRPCMSEVVDSDDLVPVIDM 45
Sorghum_bicolor             ------MAEQLLSTAVH-DTLPGSYVRPESQRPRLAEVVTGAR-IPVVDL 42
Spinacia_oleracea           ------MANKILSTGIPYKTLPESYIRPENERPNLSQVSDCEN-VPVIDL 43
Vitis                       ------MESKVLSTGIRYLTLPQSYIRPEPERPRLSQVSECKH-VPIIDL 43
Zea_mays                    ------MAEHLLSTAVH-DTLPGSYVRPEPERPRLAEVVTGAR-IPVVDL 42
Zingiber_officinale         ------MADMLLSIGEH-DTMPRNYVRPENERPHLDNVIADAN-IPVVDF 42
                                      ::       .:*  * *.  :** :  *      .*::*:

Arabidopsis                 S-STDRSFLIQQIHQACARFGFFQVINHGVNKQIIDEMVSVAREFFSMSM 92
Aquilegia_sp                S-VADESLLAQQIGNACKSHGFFQVINHGVNSELVEKMMEISHEFFHLPL 93
Citrus_sinensis             A-CDDRSLIVQQVADACKNYGFFQAINHEVPLETVERVLEVAKEFFNLPV 92
Coffea_canephora            G-FGDRNLMVRQIGDACRDYGFFQVINHGVSKDAVDKMLETATEFFSLPV 92
Cucumis_sativus             G-CEEREMIVKQVEEACKSYGFFQVINHGVRKELVEKVIEVGKQFFELPM 96
Gossypium_hirsutum          G-CEDRSHIVQQIALACINYGFFQVINHGVSKEAVERMLQVAHDFFGLPV 92
Lactuca_sativa              G-CGDRQLISQQIGDACRRYGFFQVINHGVPDEIVEKMQQVGREFFLLPV 92
Medicago_truncatula         G-SHNRTQIVQQIGEACSSYGFFQVVNHGVPLEELKKTAEVAYDFFKLPV 92
Oryza_sativa_1              A-SPDRAAVVSAVGDACRTHGFFQVVNHGIDAALIASVMEVGREFFRLPA 97
Oryza_sativa_2              A-NPDRAKLVSQVGAACRSHGFFQVLNHGVPVELTLSVLAVAHDFFRLPA 91
Oryza_sativa_3              A-SPDKPRVIAEIAQACRTYGFFQVTNHGIAEELLEKVMAVALEFFRLPP 93
Populus_trichocarpa_1       G-CQERDQIVQQVGDACKNYGFFQVINHGVSLEAVEKMLGVAHDFFSLPV 92
Populus_trichocarpa_2       G-CQDRNQIVQQVGDACEHYGFFQVINHGVSLEAVEKMLGVAHDFFSLPV 92
Solanum_lycopersicum_1      S-CGDQAQIIRQIGEACQTYGFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPV 92
Solanum_lycopersicum_2      S-CTNRNVIVHQIGEACRLYGFFQVINHGVSKKVIDEMLGVSHEFFKLPV 94
Sorghum_bicolor             G-SPDRAAVVAAIGDACRSHGFFQVLNHGVHADLVAAVMAVGRAFFRLSP 91
Spinacia_oleracea           G-AKDRTQTIHQVFNACKNYGFFQVINHGVSKELAEKMQKVAREFFDMSV 92
Vitis                       GKDVNRAQLIQHIADACRLYGFFQVINHGVAAEMMEKMLEVADEFYRLPV 93
Zea_mays                    G-SPDRGAVVAAVGDACRSHGFFQVVNHGIHAALVAAVMAAGRGFFRLPP 91
Zingiber_officinale         G-APDKSQIISQIEKACRLYGFFQVVNHGIAAELIKKVLAIALEFFRLPQ 91
                            .   :.      :  **  .****. ** :           .  *: :.
```

Fig. 1 (continuación)

```
Arabidopsis                EEKMKLYSDDPTKTTRLSTSFNVKKEEVNNWRDYLRLHCYPIHKYVNEWP 142
Aquilegia_sp               DVKMQFYSDDPTKTMRLSTSFNLKKESVHNWRDYLRLHCHPIEKYVQEWP 143
Citrus_sinensis            EEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDKYVPEWP 142
Coffea_canephora           EEKLKLYSDDPSKTTRLSTSFNVKKETVHNWRDYLRLHCYPLEKYVPEWP 142
Cucumis_sativus            EEKLKFYSDDPSKTVRLSTSFNVRKEQFRNWRDYLRLHCYPLSNYTPHWP 146
Gossypium_hirsutum         EEKMKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKEKVHNWRDYLRLHCYPLHKYVPEWP 142
Lactuca_sativa             EEKMKLYSEDPSKTMRLSTSFNVQKEQIHNWRDYLRLHCYPLDQYSPEWP 142
Medicago_truncatula        EEKMKLYSDDPTKTMRLSTSFNVNKEEVHNWRDYLRLHCYPLDNYVPEWP 142
Oryza_sativa_1             EEKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLHQFVPDWP 147
Oryza_sativa_2             EEKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLHRYLPDWP 141
Oryza_sativa_3             EEKEKLYSDEPSKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLEEFVPEWP 143
Populus_trichocarpa_1      EEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDKYAPEWP 142
Populus_trichocarpa_2      EEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDKYVPEWP 142
Solanum_lycopersicum_1     EEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKETVHNWRDYLRLHCYPLEKYAPEWP 142
Solanum_lycopersicum_2     EEKMKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKETVHNWRDYLRLHCYPLDKYAPEWP 144
Sorghum_bicolor            EEKAKLYSDDPARKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLDEFVPDWP 141
Spinacia_oleracea          EEKMKLYSDDPTKTLRLSTSFNVNKEEVHNWRDYLRLHCWPLEQYVPEWP 142
Vitis                      EEKMKLYSDDPTKTMRLSTSFNVNKEKVHNWRDYLRLHCYPLDQYTPEWP 143
Zea_mays                   EEKAKLYSDDPARKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLDEFLPDWP 141
Zingiber_officinale        EEKAKLYSDDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLEEFIPDWP 141
                           : * ::**::*::. *******:.** ..********** *: .:  .**

Arabidopsis                SNPPSFKEIVSKYSREVREVGFKIEELISESLGLEKDYMKKVLGEQGQHM 192
Aquilegia_sp               SVPSTFKDVVATYCKEVRKLGLRLLGSISLSLGLEEDYIEKVLGDQGQHM 193
Citrus_sinensis            SNPSTFKEFVSTYCSEVRGLGYRVLELISESLGLEKDYIKKVLGEQGQHM 192
Coffea_canephora           SNPPSFKEMVSNYCVQIRELGLRLEEAIAESLGLDKECIKKVLGDQGQHM 192
Cucumis_sativus            SNPPSFREIVSSYCNEVRKVGYRIEELISESLGLEKEYIRKKLGEQGQHM 196
Gossypium_hirsutum         SNPPSFKQIVSDYCVQVRELGYRLQELISESLGLEKDYIKKVLGEQGQHM 192
Lactuca_sativa             SNPSYFKEYVGNYCTAVRNLGMRILESISESLGLQKEEIKTILGDQGQHM 192
Medicago_truncatula        SNPPSFKETVANYCKEVRELGLRIEEYISESLGLEKDYLRNALGEQGQHM 192
Oryza_sativa_1             SNPPSFKEIIGTYCTEVRELGFRLYEAISESLGLEGGYMRETLGEQEQHM 197
Oryza_sativa_2             SNPPSFREIISTYCKEVRELGFRLYGAISESLGLEQDYIKKVLGEQEQHM 191
Oryza_sativa_3             SNPAQFKEIMSTYCREVRQLGLRLLGAISVSLGLEEDYIEKVLGEQEQHM 193
Populus_trichocarpa_1      SKPPPFKDIVSSYCIQVRELGFRIQELISESLGLEKDHVKNVLGEQGQHM 192
Populus_trichocarpa_2      SNPPPFKEIVRSYSIQVRELGFRIQELISESLGLEKDHIKNVLGEQGQHM 192
Solanum_lycopersicum_1     SNPSSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEAIAESLGLDKECIKDVLGEQGQHM 192
Solanum_lycopersicum_2     SNPPSFREIVSKYCMEVRELGYRLEEAISESLGLEKDCIKNVLGEQGQHM 194
Sorghum_bicolor            SNPPDFKDTMSTYCKEVRELGFRLYAAISESLGLEASYMKETLGEQEQHM 191
Spinacia_oleracea          SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRVQELISESLGLEKDYIKNVLGDQGQHM 192
Vitis                      SNPPSFKEIVSSYCKEVRELGFRLQEMISESLGLEKDHIKNVFGEQGQHM 193
Zea_mays                   SNPPDFKETMGTYCKEVRELGFRLYAAISESLGLEASYMKEALGEQEQHM 191
Zingiber_officinale        SNPSSFKDVFGSYCQQVRKLGFRILGIISLSLGLEEEYLVRVLGEQEQHM 191
                           * *. *:: .  *   :* :* ::   *: ****:   :   :*:* ***

Arabidopsis                AVNYYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDTTVCGLQILI-DGQWFAV 241
Aquilegia_sp               AVNYYPPCPEPELTYGLPRHTDPNTITILLQGQEVAGLQVLH-NGKWVAV 242
Citrus_sinensis            AVNFYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLK-DDKWVAV 241
Coffea_canephora           AVNYYPPCPQPDLTYGLPGHTDPNALTILLQDLNVAGLQVLR-DGRWLAV 241
Cucumis_sativus            AINYYPPCPQPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAV 245
Gossypium_hirsutum         AVNYYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV 241
Lactuca_sativa             AINHYPVCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDTLVSGLQVLK-DGKWLAV 241
Medicago_truncatula        AVNYYPPCPQPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAI 241
Oryza_sativa_1             AVNYYPQCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDDQVAGLQVLNDG-KWIAV 246
Oryza_sativa_2             AVNFYPKCPEPELTFGLPAHTDPNALTILLMDQQVAGLQVLKEG-RWIAV 240
Oryza_sativa_3             AVNYYPRCPEPDLTYGLPKHTDPNALTILLPDPHVAGLQVLRDGDQWIVV 243
Populus_trichocarpa_1      AVNFYPPCPEPELTFGLPGHTDPNALTILLQDQSVAGLQVLK-DGKWVAV 241
Populus_trichocarpa_2      AVNFYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLSVAGLQVLLKDGKWVAV 242
Solanum_lycopersicum_1     AINYYPPCPQPELTYGLPAHTDPNSLTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV 241
```

Fig. 1 (continuación)

```
Solanum_lycopersicum_2      AINFYPQCPQPELTYGLPAHTDPNAITILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLSI 243
Sorghum_bicolor             AVNFYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDQDVAGLQVLHGG-KWVAV 240
Spinacia_oleracea           ALNYYPECPEPEMTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVSGLQIFK-DGKWLAV 241
Vitis                       AVNYYPPCPQPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLRVAGLQVLK-DGTWLAI 242
Zea_mays                    AVNFYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDPDVAGLQVLHAG-QWVAV 240
Zingiber_officinale         AVNYYPKCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDPHVSGLQVHKDG-KWIAV 240
                            *:*.** **:*::*:*** *****::**** .  *.***:   .  *. :

Arabidopsis                 NPHPDAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVTNTENPRLSVASFLCPADC 291
Aquilegia_sp                NPYPNAFVVNIGDQIQALSNGNYASVWHRATVNTDRERISVASFLCPAND 292
Citrus_sinensis             NPLPNAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAIVNAEKARMSVASFLCPNND 291
Coffea_canephora            KPHPDAFVVNIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNADQPRLSVASFLCPCDH 291
Cucumis_sativus             NPHPNAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVVNVDKPRLSVASFLCPCDD 295
Gossypium_hirsutum          NPQTNAFVINIGDQLQALSNGTYKSVWHRAIVNTDKPRMSVASFLCPYDH 291
Lactuca_sativa              KPHPNAFVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRAVVNSDNPRMSIASFLCPCND 291
Medicago_truncatula         NPIPDAFVINIGDQLQALSNGLYKSVWHRAIVNAEKPRLSVASFLCPDNE 291
Oryza_sativa_1              NPQPGALVINIGDQLQALSNGKYRSVWHRAVVNSDRERMSVASFLCPCNS 296
Oryza_sativa_2              NPQPNALVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVVNSDKARMSVASFLCPCND 290
Oryza_sativa_3              NPRPNALVVNLGDQIQALSNDAYKSVWHRAVVNPVQERMSVASFMCPCNS 293
Populus_trichocarpa_1       DPHPDAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFLCPYDN 291
Populus_trichocarpa_2       NPHPDAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFLCPFDN 292
Solanum_lycopersicum_1      KPQPDAFVINLGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDS 291
Solanum_lycopersicum_2      KPQPNAFVINLGDQLEALSNGKYKSIWHRAIVNSDKARMSVASFLCPNDC 293
Sorghum_bicolor             NPQPGALIINIGDQLQALSNGQYRSVWHRAVVNSDRERMSVASFLCPCNH 290
Spinacia_oleracea           KPQPDAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNTDKPRLSVASFLCPAND 291
Vitis                       KPHPGAFVVNIGDQLQAVSNGKYKSVWHRAVVNAESERLSVASFLCPCND 292
Zea_mays                    NPQPGALIINIGDQLQALSNGQYRSVWHRAVVNSDRERMSVASFLCPCNH 290
Zingiber_officinale         DPKPNAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVVNSNKERMSVASFLCPCNS 290
                            .* ..*:::*:***::*:**. * *:**** .*    *:*:***:** :

Arabidopsis                 AVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYYKKFWSRNLDQEHCLENFLNN 341
Aquilegia_sp                AIICPA---VKDG---SPSMYKKFTYDEYYKKFWSGNLDQQHCLELFKE- 335
Citrus_sinensis             AMISPPKALTEDG---SGAVYRDFTYAEYYSKFWSRNLDQEHCLELFKN- 337
Coffea_canephora            AVISAPKPLTADG---SPVVYRDFTYAQYYKKFWSRNLDQEHCLELFKN- 337
Cucumis_sativus             ALITPAPLLSQ-----PSPIYRPFTYAQYYNTFWSRNLDQQHCLELFKNH 340
Gossypium_hirsutum          ALISPAKPLTQHG---CGAVYRDFTYAEYYSKFWGRNLDQEHCLELFKN- 337
Lactuca_sativa              TVIRAPKEIIKEG---SKPVFKEFTYAEYYAKFWTRNLDQEHCLEFFKN- 337
Medicago_truncatula         ALICPAKPLTEDG---SGAVYRGFTYPEYYSKFWSRDLEKEHCLEFFKNN 338
Oryza_sativa_1              VELGPAKKLITDD---SPAVYRNYTYDEYYKKFWSRNLDQEHCLELFRT- 342
Oryza_sativa_2              VLIGPAQKLITDG---SPAVYRNYTYDEYYKKFWSRNLDQEHCLELFRTT 337
Oryza_sativa_3              AVISPARKLVADG---DAPVYRSFTYDEYYKKFWSRNLDQEHCLELFKGQ 340
Populus_trichocarpa_1       ALITPPKALTDDG---TGAVYRDFTYAEYYKKFWSRDLDQEHCLELFKNK 338
Populus_trichocarpa_2       ALITPPKALTDDG---TGAIYRDFTYAEYYKKFWSRNLDQEHCLELFKN- 338
Solanum_lycopersicum_1      AKISAPKLLTEDG---SPVIYQDFTYAEYYNKFWSRNLDQQHCLELFKN- 337
Solanum_lycopersicum_2      SIISAPKTLTEDG---SSAIYRHFTYAEYYEKFWSRNLDQEYCLELFKND 340
Sorghum_bicolor             VVLGPAKKLVTED---TPAVYRSYTYDEYYKKFWSRNLDQEHCLELFRT- 336
Spinacia_oleracea           ALISAPTPLTANG---SPAVYRDYTYPEYYKTFWSRNLDQEHCLELFKNQ 338
Vitis                       AVIGPAKPLTEDG---SAPIYKNFTYAEYYKKFWGRDLDQEHCLELFKN- 338
Zea_mays                    VVLGPARKLVTED---TPAVYRNYTYDKYYAKFWSRNLDQEHCLELFRT- 336
Zingiber_officinale         VLISPPEKLIADG---CPAVYRSYTYDEYYKKFWSRNLDQEHCLELFKKE 337
                              : ..  :           ::: :** :** .**  :*::::*** *
```

Fig. 1 (continuación)

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

Fig. 2

> CDS DMR6 Arabidopsis thaliana (gi 42568064, Genbank NM_122361)

ATGGCGGCAAAGCTGATATCCACCGGTTTCCGTCATACTACTTTGCCGGAAAACTATGTCCGGCCAATCT
CCGACCGTCCACGTCTCTCTGAAGTCTCTCAACTCGAAGATTTCCCTCTCATCGATCTCTCTTCCACTGA
TCGATCTTTTCTCATCCAACAAATCCACCAAGCTTGTGCCCGATTCGGATTTTTTCAGGTCATAAATCAC
GGAGTTAACAAACAAATAATAGATGAGATGGTGAGTGTTGCGCGTGAGTTCTTTAGCATGTCTATGGAAG
AAAAAATGAAGCTATATTCAGACGATCCAACGAAGACAACAAGATTATCGACGAGCTTCAATGTGAAGAA
AGAAGAAGTCAACAATTGGAGAGACTATCTAAGACTCCATTGTTATCCTATCCACAAGTATGTCAATGAG
TGGCCGTCAAACCCTCCTTCTTTCAAGGAAATAGTAAGTAAATACAGTAGAGAAGTAAGAGAAGTGGGAT
TTAAAATAGAGGAATTAATATCAGAGAGCTTAGGTTTAGAAAAAGATTACATGAAGAAAGTGCTTGGTGA
ACAAGGTCAACACATGGCAGTCAACTATTATCCTCCATGTCCTGAACCTGAGCTCACTTACGGTTTACCT
GCTCATACCGACCCAAACGCCCTAACCATTCTTCTTCAAGACACTACTGTTTGCGGTCTCCAGATCTTGA
TCGACGGTCAGTGGTTCGCCGTTAATCCACATCCTGATGCTTTTGTCATCAACATAGGTGACCAGTTACA
GGCATTAAGTAATGGAGTATACAAAAGTGTTTGGCATCGCGCTGTAACAAACACAGAAAATCCGAGACTA
TCGGTCGCATCGTTTCTGTGCCCAGCTGACTGTGCTGTCATGAGCCCGGCCAAGCCCTTGTGGGAAGCTG
AGGACGATGAAACGAAACCAGTCTACAAAGATTTCACTTATGCAGAGTATTACAAGAAGTTTTGGAGTAG
GAATCTGGACCAAGAACATTGCCTCGAGAATTTTCTAAACAACTAA

> proteína DMR6 Arabidopsis thaliana (gi 15238567, Genbank NP_197841)

MAAKLISTGFRHTTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLEDFPLIDLSSTDRSFLIQQIHQACARFGFFQVINH
GVNKQIIDEMVSVAREFFSMSMEEKMKLYSDDPTKTTRLSTSFNVKKEEVNNWRDYLRLHCYPIHKYVNE
WPSNPPSFKEIVSKYSREVREVGFKIEELISESLGLEKDYMKKVLGEQGQHMAVNYYPPCPEPELTYGLP
AHTDPNALTILLQDTTVCGLQILIDGQWFAVNPHPDAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVTNTENPRL
SVASFLCPADCAVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYYKKFWSRNLDQEHCLENFLNN*

Fig. 3

> CDS ortólogo DMR6 Lactuca sativa

ATGGCCGCAAAAGTCATCTCCAGTGGATTCCGGTATACTACTCTACCGGAGAGCTACGTCCGTCCGGTTAA
CGACAGACCTAACCTATCTCAAGTTTCCGATTGCAACGACGTTCCTGTTATTGACATCGGTTGTGGTGATA
GACAACTCATAAGCCAACAAATTGGCGATGCTTGTAGAAGATACGGTTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGT
GTGCCTGATGAAATAGTGGAGAAAATGCAACAAGTAGGTAGGGAGTTTTTCCTGTTGCCTGTGGAAGAGAA
GATGAAGCTTTACTCAGAGGATCCATCGAAGACGATGAGGCTATCCACCAGCTTTAACGTCCAAAAAGAAC
AAATTCATAACTGGCGAGATTATCTCCGCCTTCACTGTTATCCTCTGGATCAATACAGTCCTGAATGGCCT
TCAAATCCTTCTTATTTCAAGGAATATGTTGGTAATTATTGTACAGCAGTGCGAAATTTAGGAATGAGAAT
ATTAGAATCAATATCAGAAAGTTTAGGGTTACAAAAAGAAGAAATAAAAACTATATTAGGCGATCAAGGTC
AACACATGGCCATCAACCATTACCCAGTGTGCCCTGAGCCCGAGCTAACCTACGGGCTACCCGGGCACACA
GACCCCAATGCTCTCACCATCCTTCTACAGGACACACTGGTCTCTGGTCTTCAGGTTCTCAAAGATGGCAA
ATGGTTAGCCGTTAAACCACACCCTAATGCGTTTGTAATTAACATTGGTGATCAGTTAGAGGCGGTGAGTA
ATGGTGAATATAAAAGTGTATGGCATCGAGCTGTGGTTAACTCAGACAACCCGCGAATGTCTATAGCTTCG
TTTTTGTGTCCTTGTAATGACACCGTTATTAGGGCTCCTAAAGAAATAATAAAGGAAGGATCGAAACCTGT
TTTCAAAGAATTTACTTATGCAGAATACTACGCGAAGTTTTGGACAAGAAACCTTGATCAAGAACATTGCT
TAGAATTCTTCAAGAACTAG

> proteína ortólogo DMR6 Lactuca sativa

MAAKVISSGFRYTTLPESYVRPVNDRPNLSQVSDCNDVPVIDIGCGDRQLISQQIGDACRRYGFFQVINHG
VPDEIVEKMQQVGREFFLLPVEEKMKLYSEDPSKTMRLSTSFNVQKEQIHNWRDYLRLHCYPLDQYSPEWP
SNPSYFKEYVGNYCTAVRNLGMRILESISESLGLQKEEIKTILGDQGQHMAINHYPVCPEPELTYGLPGHT
DPNALTILLQDTLVSGLQVLKDGKWLAVKPHPNAFVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRAVVNSDNPRMSIAS
FLCPCNDTVIRAPKEIIKEGSKPVFKEFTYAEYYAKFWTRNLDQEHCLEFFKN*

Fig. 4

> CDS ortólogo DMR6 Spinacia oleracea

ATGGCAAACAAGATATTATCCACCGGAATTCCTTACAAAACCCTCCCCGAAAGCTACATCCGACCCGAAAA
TGAGAGGCCCAACTTATCTCAAGTCTCCGATTGCGAGAATGTCCCTGTTATTGACTTGGGTGCCAAAGACC
GTACTCAAACAATCCACCAAGTCTTCAATGCTTGTAAAAATTACGGGTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGG
GTGTCAAAGGAATTAGCGGAGAAGATGCAAAAGGTAGCTCGAGAGTTCTTCGATATGTCGGTTGAGGAAAA
AATGAAATTATATAGTGACGATCCAACTAAAACACTAAGATTGTCTACAAGTTTTAACGTTAACAAAGAGG
AAGTTCATAATTGGAGAGATTATCTTAGGCTCCATTGTTGGCCTCTTGAGCAATATGTCCCCGAATGGCCT
TCTAACCCCCCTTCCTTCAAGGAAATAGTGAGCAAGTACATAAAAGAAGTTAGGGAACTTGGTTTCAGAGT
CCAAGAACTAATATCAGAGAGTTTAGGGTTGGAGAAAGATTACATAAAGAATGTCCTAGGAGATCAAGGAC
AACACATGGCTCTTAATTATTACCCTGAGTGCCCGGAGCCAGAGATGACATACGGGTTGCCGGGTCATACT
GACCCTAATGCCCTTACCATCCTTCTCCAAGACTTGCAAGTATCTGGCCTTCAAATTTTTAAGGATGGTAA
ATGGCTTGCTGTCAAACCTCAACCTGATGCTTTTGTCATTAACATTGGTGATCAATTGCAGGCATTAAGTA
ACGGTATATACAAGAGTGTATGGCACAGAGCAGTTGTGAACACAGATAAGCCAAGATTATCAGTAGCTTCA
TTCCTCTGCCCCGCCAATGATGCGTTGATAAGCGCGCCAACACCTCTGACCGCCAACGGATCACCGGCTGT
ATATAGAGACTATACGTATCCTGAGTACTACAAGACTTTCTGGAGTAGGAACTTGGACCAAGAGCACTGCT
TGGAGCTTTTTAAAAACCAAACCTAG

>proteína ortólogo DMR6 Spinacia oleracea

MANKILSTGIPYKTLPESYIRPENERPNLSQVSDCENVPVIDLGAKDRTQTIHQVFNACKNYGFFQVINHG
VSKELAEKMQKVAREFFDMSVEEKMKLYSDDPTKTLRLSTSFNVNKEEVHNWRDYLRLHCWPLEQYVPEWP
SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRVQELISESLGLEKDYIKNVLGDQGQHMALNYYPECPEPEMTYGLPGHT
DPNALTILLQDLQVSGLQIFKDGKWLAVKPQPDAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNTDKPRLSVAS
FLCPANDALISAPTPLTANGSPAVYRDYTYPEYYKTFWSRNLDQEHCLELFKNQT*

Fig. 5

>CDS ortólogo DMR6 Cucumis sativus

ATGAGCAGTGTGATGGAGATCCAACTTTTGTGTTCAGGGGGACGTCACGAGAAGTTGCCAGAGAAGTATGA
ACGGCCTGAATCGGATAGGCCGCGGCTGTCGGAGGTGTGTTGTTGGGACAAGGTTCCAATAATCGACTTGG
GATGCGAGGAGAGAGAGATGATTGTGAAGCAAGTGGAGGAGGCCTGCAAGTCTTACGGCTTTTTCCAGGTT
ATAAATCATGGTGTGAGGAAGGAATTGGTGGAGAAAGTGATAGAAGTTGGCAAGCAGTTCTTTGAGCTGCC
GATGGAGGAGAAGTTGAAATTTTATTCAGACGACCCTTCCAAGACCGTCAGACTCTCCACAAGTTTCAATG
TCCGGAAAGAGCAATTTCGCAACTGGAGGGATTATCTCAGACTCCATTGCTATCCTCTCTCCAACTACACC
CCCCATTGGCCCTCTAACCCACCATCCTTCAGGGAAATAGTGAGTAGTTATTGCAATGAAGTACGAAAAGT
TGGGTACAGAATAGAGGAGCTAATATCGGAGAGCTTGGGGCTGGAGAAGGAATACATAAGGAAGAAGTTGG
GTGAACAAGGTCAGCACATGGCTATAAATTATTATCCGCCATGTCCCCAACCAGAACTCACCTACGGGCTC
CCTGGCCATACGGATCCCAACGCACTCACCATTCTCCTTCAGGATCTCCATGTCGCCGGCCTCCAAGTCCT
CAAAGATGGAAAGTGGCTAGCGGTCAACCCCCACCCCAATGCCTTTGTAATCAATATAGGCGACCAATTGC
AGGCATTGAGCAATGGGGTGTACAAGAGCGTTTGGCACCGAGCGGTGGTCAATGTTGATAAGCCCAGGCTG
TCGGTCGCTTCTTTTCTCTGCCCTTGTGATGACGCCCTCATTACTCCTGCACCGCTCCTCTCCCAGCCTTC
CCCCATTTACAGACCTTTCACCTACGCCCAGTACTACAATACTTTTTGGAGCAGAAACTTGGATCAACAAC
ATTGCTTGGAACTATTTAAAAACCACCCTCCTTAA

>proteína ortólogo DMR6 Cucumis sativus

MSSVMEIQLLCSGGRHEKLPEKYERPESDRPRLSEVCCWDKVPIIDLGCEEREMIVKQVEEACKSYGFFQV
INHGVRKELVEKVIEVGKQFFELPMEEKLKFYSDDPSKTVRLSTSFNVRKEQFRNWRDYLRLHCYPLSNYT
PHWPSNPPSFREIVSSYCNEVRKVGYRIEELISESLGLEKEYIRKKLGEQGQHMAINYYPPCPQPELTYGL
PGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLKDGKWLAVNPHPNAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVVNVDKPRL
SVASFLCPCDDALITPAPLLSQPSPIYRPFTYAQYYNTFWSRNLDQQHCLELFKNHPP*

Fig. 6

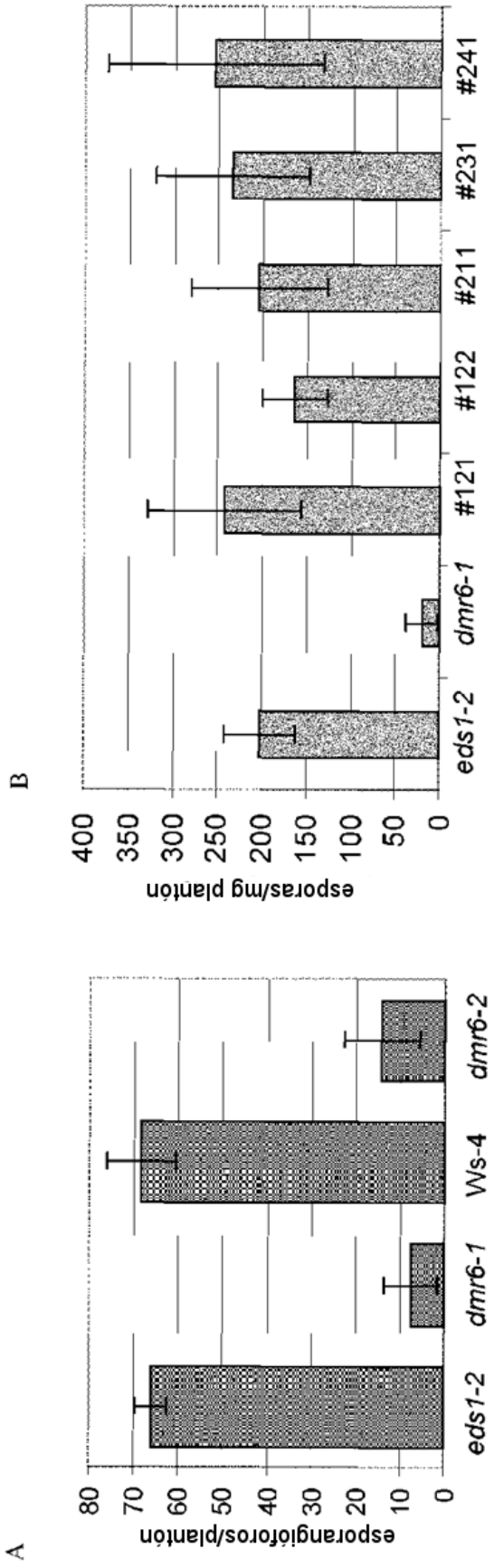

A
esporangióforos/planton
0
10
20
30
40
50
60
70
80
eds1-2
dmr6-1
Ws-4
dmr6-2
B
esporas/mg planton
0
50
100
150
200
250
300
350
400
eds1-2
dmr6-1
#121
#122
#211
#231
#241

Fig. 7

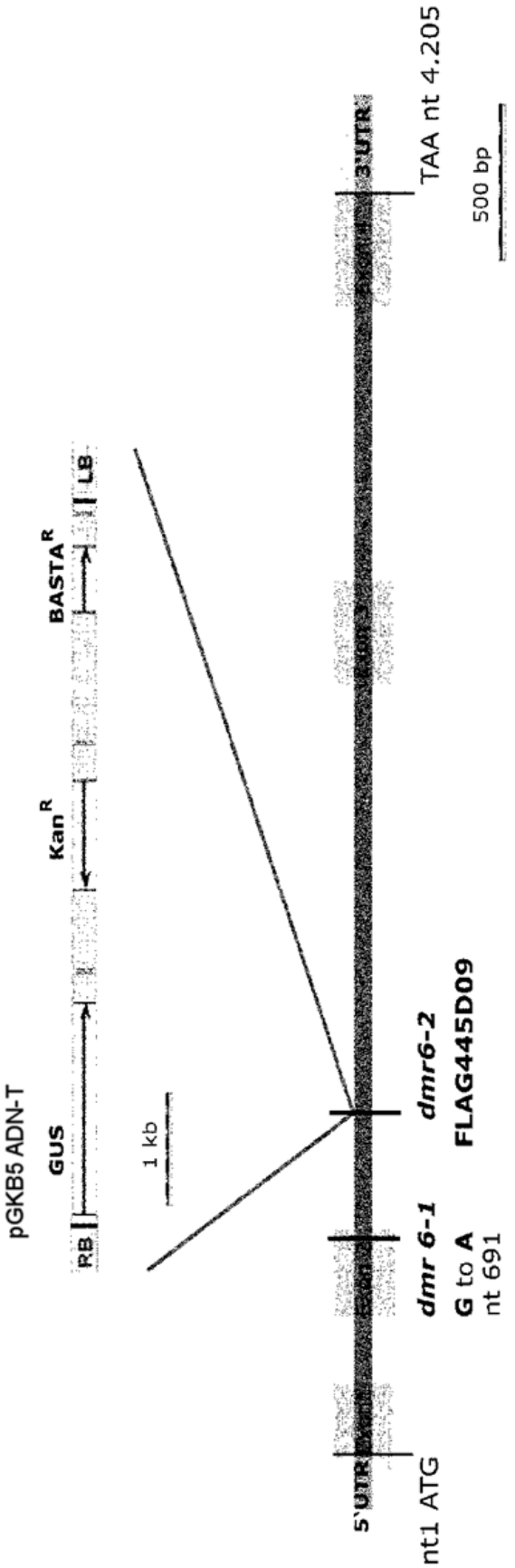

pGKB5 ADN-T
GUS
RB
Kan^R
BASTA^R
LB
1 kb
5'UTR
nt1 ATG
dmr 6-1
G to A
nt 691
W a PARADA
aa 141
dmr6-2
FLAG445D09
3'UTR
TAA nt 4.205
500 bp

Fig. 8

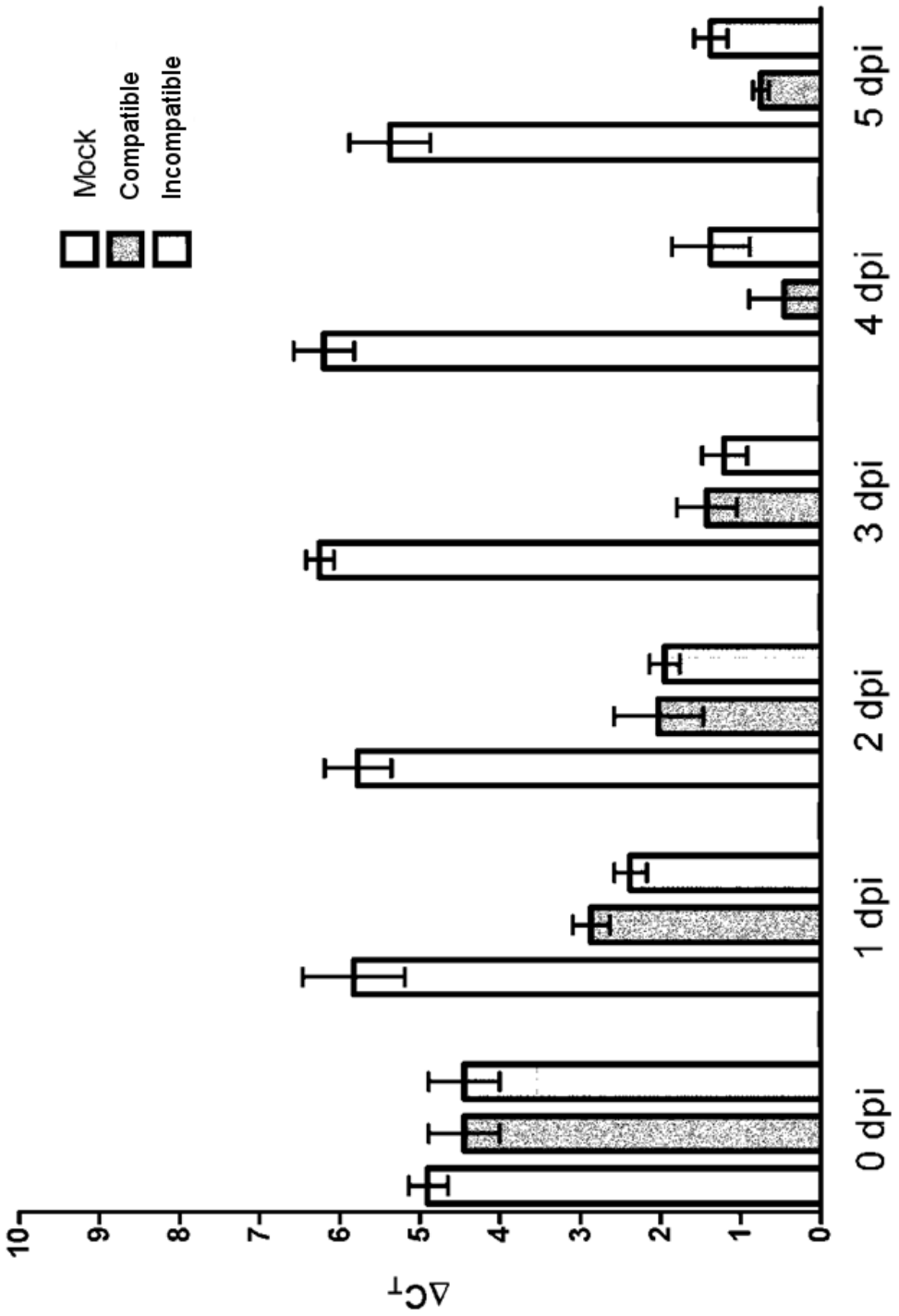

Mock
Compatible
Incompatible
ΔCT
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0 dpi
1 dpi
2 dpi
3 dpi
4 dpi
5 dpi

Fig. 9

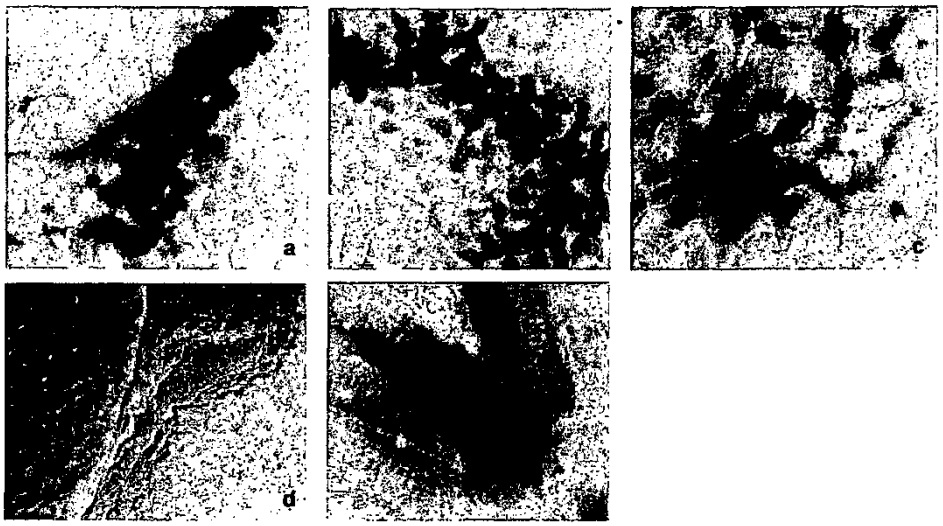


Fig. 10

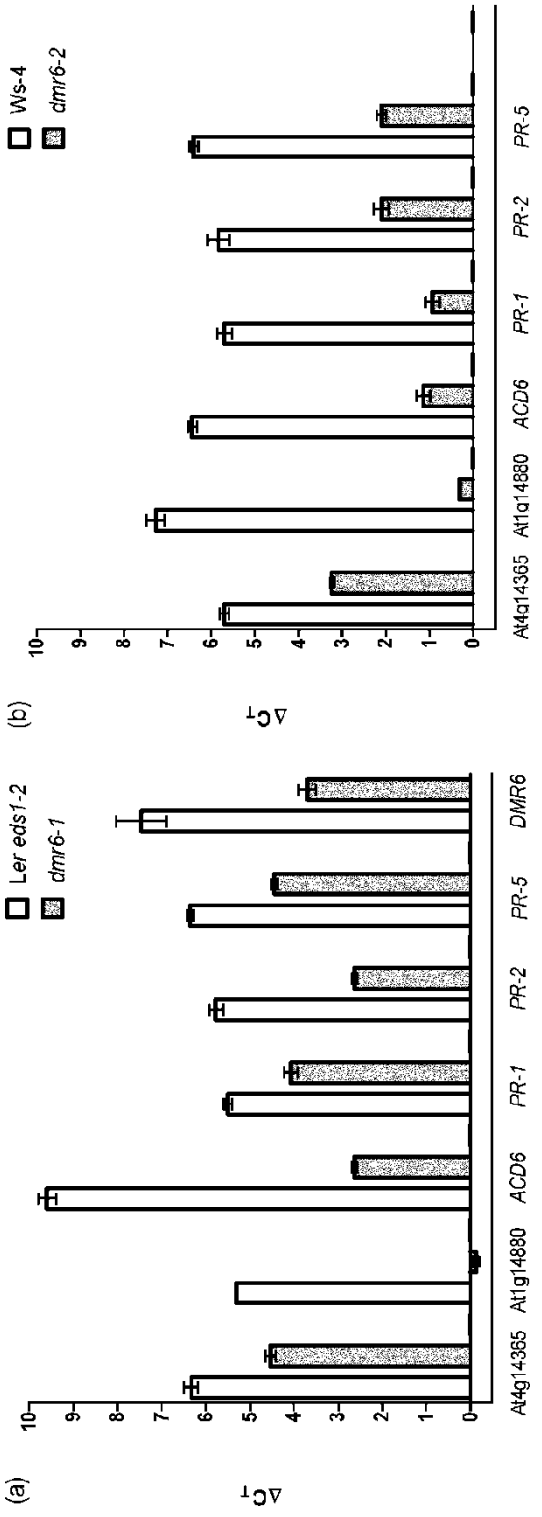

(a)
(b)
ΔCT
Ler eds1-2
dmr6-1
Ws-4
dmr6-2
At4g14365
At1g14880
ACD6
PR-1
PR-2
PR-5
DMR6

Fig. 11

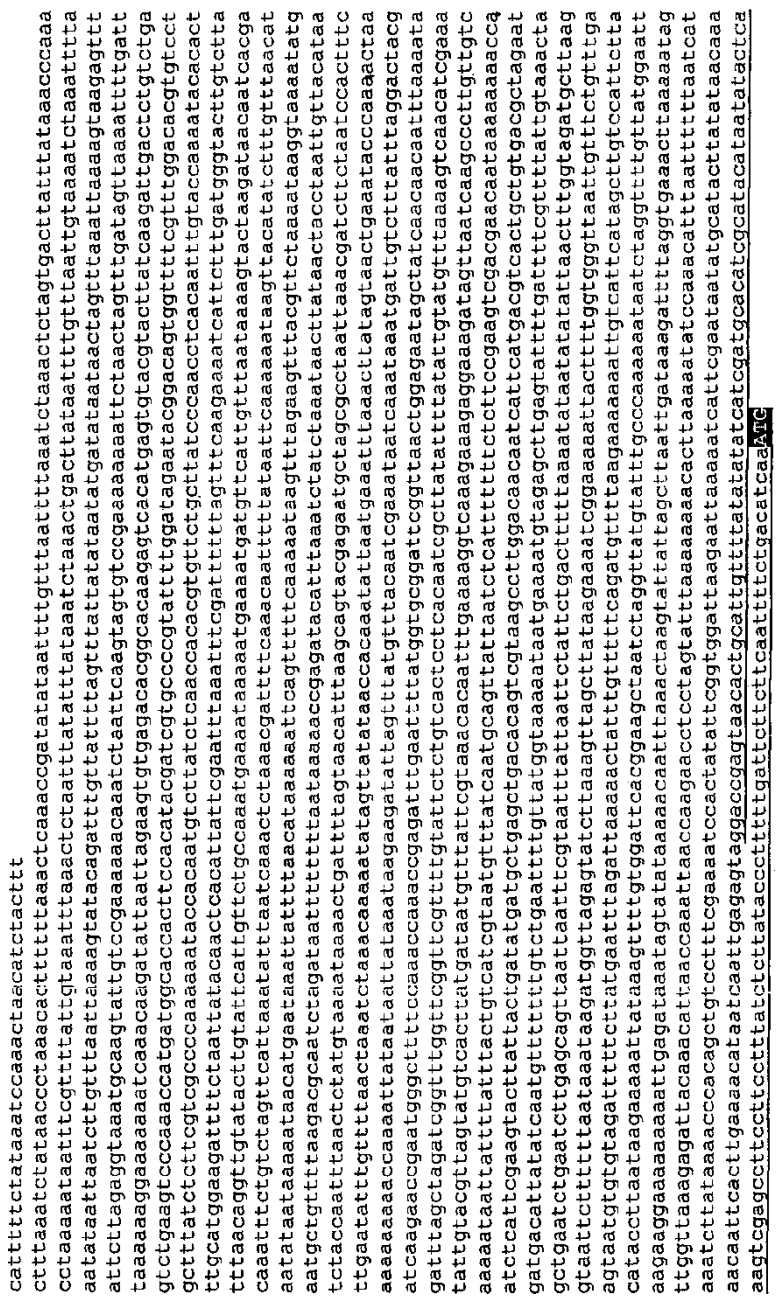


Fig. 12

> CDS ortólogo DMR6 Solanum lycopersicum

ATGGAAACCAAAGTTATTTCTAGCGGAATCAACCACTCTACTCTTCCTCAAAGTTACATCCG
ACCCGAATCCGATAGACCACGTCTATCGGAAGTGGTCGATTGTGAAAATGTTCCAATAATTG
ACTTAAGTTGCGGAGATCAAGCTCAAATAATTCGTCAAATTGGAGAAGCTTGTCAAACTTAT
GGTTTCTTTCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGGAAGTTGTAGAGAAAATGCTAGGGGT
AGCTGGGGAATTTTTCAATTTACCAGTAGAAGAGAAACTAAAATTATATTCAGATGATCCTT
CAAAGACCATGAGATTATCAACAAGTTTTAATGTTAAAAAGGAGACAGTTCATAATTGGAGA
GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTAGAGAAGTATGCTCCTGAATGGCCTTCTAATCC
ATCATCTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCAGGGAAATTCGTCAACTCGGATTTAGAT
TAGAAGAAGCCATAGCAGAAAGCCTGGGGTTAGATAAAGAGTGTATAAAAGATGTATTGGGT
GAACAAGGACAACATATGGCTATCAATTATTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTTACTTA
TGGGCTTCCGGCCCATACTGATCCAAATTCACTTACAATTCTTCTTCAAGACTTGCAAGTTG
CGGGTCTTCAAGTTCTTAAAGATGGCAAATGGTTAGCTGTAAAACCTCAACCTGACGCCTTT
GTCATTAATCTTGGGGATCAATTGCAGGCAGTAAGTAACGGTAAGTACAGAAGTGTATGGCA
TCGAGCTATTGTGAATTCAGATCAAGCTAGGATGTCAGTGGCTTCGTTTCTATGTCCGTGTG
ATAGCGCGAAAATCAGTGCACCAAAGCTGCTGACAGAAGATGGATCTCCAGTGATTTATCAA
GACTTTACGTATGCTGAGTATTACAACAAG
TTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGCAACATTGTTTGGAACTTTTCAAGAATAA

> proteína ortólogo DMR6 Solanum lycopersicum

METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVVDCENVPIIDLSCGDQAQIIRQIGEACQTY
GFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKETVHNWR
DYLRLHCYPLEKYAPEWPSNPSSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEAIAESLGLDKECIKDVLG
EQGQHMAINYYPPCPQPELTYGLPAHTDPNSLTILLQDLQVAGLQVLKDGKWLAVKPQPDAF
VINLGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
DFTYAEYYNKFWSRNLDQQHCLELFKN.

Fig. 13

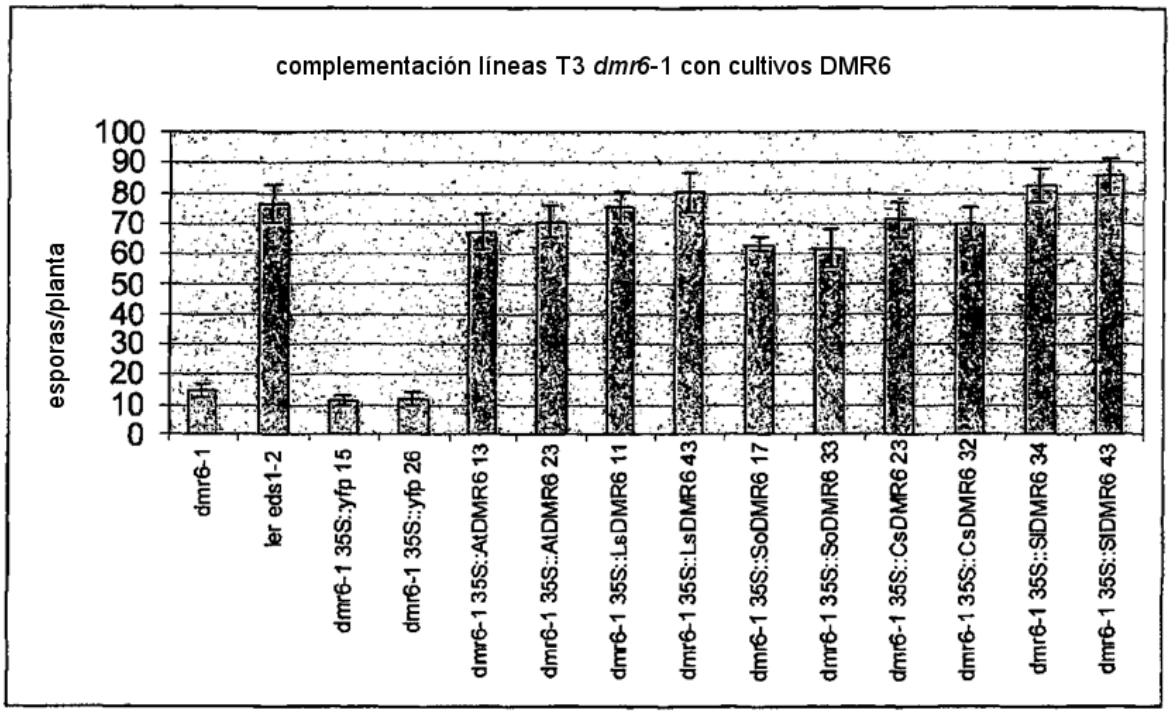
> CDS ortólogo DMR6 Nicotiana benthamiana

ATGGAAGCAAAAGTTCTTTCCAGCGGAATCCGCCACTCTACTATCCCTCAAAGTTACATCCG
CCCTCAATCCGATAGGCCGCGCCTTTCTGAAGTTGCTGATTGTGAAAACGTTCCAGTAGTTG
ATATAGGTTGCGGTGATAGAAACCTTATTGTTCATCAAATTGGTGAAGCCTGTCGTCTTTAT
GGTTTTTTCCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGAATTTAATAGACGAAATGCTAGAGAT
AGCTGGGGAATTTTTTAGGCTTCCAGTTGAAGAGAAGTTGAAATTGTACTCAGATGACCCAT
CGAAGACGATGAGATTGTCGACTAGTTTTAATGTGAAAAAGGAGAAGGTTCACAATTGGAGA
GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTTGAAAATTACGCTCCTGAATGGCCTTCCAATCC
TTCCTCTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCATGGAAGTTCGACAACTCGGGTTCAGAT
TGCAGGAAGCCATAGCAGAGAGCCTAGGCTTAGAGAAAGAGTGTATAAAGGATGTATTGGGC
GAACAAGGTCAACACATGGCTATCAATTTCTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTCACTTA
TGGGCTGCCAGCACATACTGATCCAAATGCCCTTACAATTCTTCTTCAAGACTTAGAAGTAG
CTGGTCTTCAAGTTCTTAAAGATGGCGAATGGTTGGCCGTCAAGCCTCAACCAGATGCCTTT
GTCATTAATCTTGGTGATCAACTGCAGGCAGTGAGTAATGGGAGATACAAAAGCGTATGGCA
TCGAGCTATTGTAAATTCAGACAAAGCCAGGTTGTCAGTGGCTTCGTTCCTTTGTCCGTGCG
ATAGCGCGAAAATCAGTGCTCCAAAGCTCCTCACTGAAGATGGATCTCCTGTCATTTATCAG
GACTTTACCTATGCTGAGTATTACAAAAAGTTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGGAACATTG
TTTGGAACTTTTCAAGAACTAA

>proteína ortólogo DMR6 Nicotiana benthamiana

MEAKVLSSGIRHSTIPQSYIRPQSDRPRLSEVADCENVPVVDIGCGDRNLIVHQIGEACRLY
GFFQVINHGVPKNLIDEMLEIAGEFFRLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKEKVHNWR
DYLRLHCYPLENYAPEWPSNPSSFREIVSRYCMEVRQLGFRLQEAIAESLGLEKECIKDVLG
EQGQHMAINFYPPCPQPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLKDGEWLAVKPQPDAF
VINLGDQLQAVSNGRYKSVWHRAIVNSDKARLSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
DFTYAEYYKKFWSRNLDQEHCLELFKN.

Fig. 14


complementación líneas T3 *dmr6*-1 con cultivos DMR6
esporas/planta
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
dmr6-1
ler eds1-2
dmr6-1 35S::yfp 15
dmr6-1 35S::yfp 26
dmr6-1 35S::AtDMR6 13
dmr6-1 35S::AtDMR6 23
dmr6-1 35S::LsDMR6 11
dmr6-1 35S::LsDMR6 43
dmr6-1 35S::SoDMR6 17
dmr6-1 35S::SoDMR6 33
dmr6-1 35S::CsDMR6 23
dmr6-1 35S::CsDMR6 32
dmr6-1 35S::SlDMR6 34
dmr6-1 35S::SlDMR6 43