

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 330**

51 Int. Cl.:

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 12155900 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017** **EP 2455480**

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:

SCIENZA BIOTECHNOLOGIES 2 B.V. (100.0%)

Haling 1 E

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

ES 2 651 330 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes a enfermedad

La presente invención se refiere a plantas de patata resistentes a enfermedad, en particular a plantas de patata resistentes a *Phytophthora infestans*.

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 *NPR1*.

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

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

Por tanto, la presente invención proporciona una planta de patata, la cual es resistente a *Phytophthora infestans* 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 Phytophthora infestans en la patata.

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 la 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 ARNs 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.

- 5 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 según la invención es de ese modo particularmente útil para controlar la expresión de los sistemas inducibles que conducen a resistencia a enfermedad en plantas.
- 10 En el documento WO 99/45125, por ejemplo, se ha descrito un ejemplo de sistema inducible que conduce a resistencia a enfermedad en plantas, y en el cual el promotor DMR6 puede ser eficaz, en el que una secuencia de nucleótidos antisentido para un gen implicado en la regulación de la ruta metabólica de porfirina C-5 está unido de manera operable a un promotor inducible de patógeno y se usa para transformar células vegetales. La expresión de la secuencia de nucleótidos antisentido en respuesta al patógeno interrumpe eficazmente el metabolismo de la porfirina de la célula vegetal transformada, y el desarrollo de una lesión localizada en la que está contenida la proliferación del patógeno. El documento WO 96/36697 también describe sistemas inducibles que conducen a resistencia a enfermedad en plantas, en los que un promotor inducible controla la expresión de una proteína capaz de provocar la respuesta de hipersensibilidad en una planta. El documento EP 0474857 además describe un método para la inducción de resistencia a patógeno en plantas, que comprende la transformación de plantas con secuencias de polinucleótidos que codifican un par de gen de avirulencia derivado de patógeno/gen de resistencia derivado de planta, en el que la expresión de uno de o tanto péptidos elicitores como el gen de resistencia está regulado por un promotor inducible de patógeno. En, por ejemplo, el documento WO 98/32325 se han descrito ejemplos adicionales de sistemas inducibles que conducen a resistencia a patógenos en plantas.
- 15 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.
- 20 Se divulgan plantas de resistencia a enfermedad, obtenibles mediante dicho método, así como tejido vegetal y semillas obtenidas a partir de dichas plantas.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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,
- 55

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 hirsutum*, *Lactuca sativa*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* (3), *Populus trichocarpa* (2), *Solanum lycopersicum* (2), *Sorghum bicolor*, *Spinacia oleracea*, *Vitis vinifera*, *Zea mays* y *Zingiber officinale*, usando el programa de alineamiento de secuencia múltiple (EBI) CLUSTAL W (1.83). Por debajo de las secuencias los aminoácidos conservados están indicados por puntos, y los aminoácidos idénticos están indicados por asteriscos.

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

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 vellosa 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 (Δ CT, del Inglés “Cycle Threshold”) reflejan el número de ciclos adicionales de amplificación por PCR requeridos para alcanzar una concentración umbral de producto arbitraria en comparación con ACTIN2. Un valor de Δ CT 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 Δ CT refleja el número de ciclos de amplificación por PCR adicionales requeridos para alcanzar el nivel de transcritos de *ACTIN2* adicionales. Un valor de Δ CT 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 vellosa.

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, Wellesbourne, UK) y se mantuvieron sobre *Arabidopsis Ws-0* y *Ler*, respectivamente. Los inóculos se transfirieron semanalmente (400.000 esporas por ml) a plantones saludables de 10 días de edad (Holub, E.B. et al., Mol. Plant Microbe Interact. 7: 223-239, 1994) mediante el uso de una pistola pulverizadora. Los plantones se secaron al aire durante aproximadamente 45 minutos y se incubaron bajo una tapa sellada a una humedad relativa al 100% en una cámara de crecimiento a 16°C con 9 horas de luz por día (100 mE/m²/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 (BC₂, del Inglés “Back crossed”) con la línea parental *Ler eds1-2* así como *Ler*. Se seleccionaron las líneas BC₂, 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 delección (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 F₂ dando como resultado ocho plantas recombinantes F₂ entre los dos marcadores basados en 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*.

- 5 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'-caggtttatggcatactctcacgctc-3'), en combinación con el cebador de borde derecho de ADN-T, Tag3' (5'-tgataccagacgtgtcccgcataa-3') o RB4 (5'-tcacgggttggtgttctacaggac-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

- 15 Se aisló el ARN (a partir de aproximadamente 100 mg de tejido de hoja de plántulas de 10 días de edad) con el kit RNeasy (Qiagen, Venlo, Los Países Bajos) y se trató con el set de DNase libre de RNase (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*

- 20 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'-ttctgggatccaATGGCGGCAAAGCTGATATC-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'-gatatatgaattcttagttagaaaattctcgaggc-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 plántulas resistentes a DL-fosfinotricina (BASTA) y se analizó la susceptibilidad de *H. parasitica* y los niveles de expresión de *DMR6* por RT-PCR

- 30 Líneas "Knock down" de *DMR6* por ARNi

- Se generaron líneas ARNi en el ambiente de *Ler eds1-2* y Col-0. Se generó un amplicón de ADNc de 782 pb de longitud del gen At5g24530 de Col-0. La PCR se hizo con la ADN polimerasa de Phusion (2U/µl) y dos combinaciones diferentes de cebador. El amplicón a partir de la primera combinación de cebador específico a gen *DMR6* (ARNiDMR6F: 5'-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 98°C seguido de 10 ciclos de: 10 seg. a 98°C; 30 seg. a 58°C; 30 seg. a 72°C) en un volumen total de 20 µl. Se realizó la segunda PCR (desnaturalización durante 30 seg. a 98°C seguido por 5 ciclos de: 10 seg. a 98°C; 30 seg. a 45°C; 30 seg. a 72°C y 20 ciclos de 10 seg. a 98°C; 30 seg. a 55°C; 30 seg. a 72°C finalizado por una extensión final de 10 min. a 72°C) con el attB1 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') y el attB2 ((5'-ggggaccacttgtacaagaaagctgggt-3') en un volumen de reacción de 50 µl. El producto de la PCR se purificó en gel y se recombinó 50 ng de inserto dentro de 150 ng del vector pDONR7 con la enzima clonase BP. El vector se transformó en células de *E. coli* DH5α electrocompetente y los plásmidos que contenían el inserto correcto se aislaron y se usaron 100 ng del pDONR7 con el amplicón *DMR6* en la reacción LR para recombinar el inserto en dos direcciones opuestas dentro de 150 ng de vector pHellsgate8. Después de la transformación dentro de *E. coli*, se seleccionaron clones resistentes a Spectomicina y se verificaron los plásmidos aislados por un digest NotI para el tamaño correcto del inserto y por PCR de colonia con un cebador interno sencillo para At5G4530 (DfragmentF: 5'-gagaagtgggatttaaatagaggaa-3'), si los insertos se insertan dos veces en dirección opuesta se podría detectar un amplicón de 1.420 pb. Se transformaron los plásmidos pHellsgate8 correctos con el doble inserto en direcciones opuestas dentro de la cepa de *Agrobacterium* electrocompetente, C58C1. Se aislaron los plásmidos a partir de *Agrobacterium* y se transformaron dentro de *E. coli* para confirmar el tamaño correcto del plásmido y el inserto por digestión NotI. Se usaron cepas de *Agrobacterium* reconfirmadas para la transformación de depresión floral de las plantas Col-0 y *Ler eds1-2*. Las semillas desarrolladas se sometieron a cribado para resistencia a Kanamicina sobre placas GM ^{1/2}x, los plántulas 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'-GGTAGGGCAATTGTTCTTCTTACA-3'), PR-2 (QPR-2F: 5'-AAGGAGCTTAGCCTCACCAC-3' y QPR-2R: 5'-GAGGGAAGCAAGAATGGAAC-3'), PR-1 (QPR-1F: 5'-GAACACGTGCAATGGAGTTT-3' y QPR-1R: 5'-GGTCCACCATTGTTACACCT-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 vellosa, sometido a retrocruzamiento dos veces con la línea parental *Ler eds1-2*, y sobre mutante *dmr6-2* (línea de ADN-T FLAG_445D09) en comparación con las líneas control.

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* T₂ 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 plántones *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 plántones tratados "mock". El nivel de transcrito de *DMR6* era ligeramente pero significativamente mayor en 1 dpi en la interacción incompatible (Δ CT de 3,5, aproximadamente 11 veces la inducción) que en la compatible (Δ CT de 3,0, aproximadamente 8 veces la inducción). El nivel de expresión aumentó más en el momento de alcanzar un nivel alto estable en 4-5 dpi. En estos puntos de tiempo el nivel de transcrito de *DMR6* era mayor en la interacción compatible que en la incompatible. Los niveles de transcrito de *DMR6* elevados durante las interacciones compatibles e incompatibles de *H. parasitica* sugieren un papel de *DMR6* en la defensa vegetal. La expresión asociada a defensa de *DMR6* se podría confirmar en nuestros tres mutantes de defensa aumentada, *dmr3*, *dmr4* y *dmr5* (Van den Ackerveken et al., no publicado). Además, en análisis in silico de los niveles de *DMR6* en el "Genevestigator Mutant Surveyor" (Zimmermann, P., Henning, L., y Gruissem, W. (2005). "Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator." Trends Plant Sci. 10, 407-409) mostró que el gen está fuertemente inducido en los mutantes resistentes a patógeno *mpk4* y *cpr5*. En el mutante doble *cpr5/npr1* el nivel de transcrito de *DMR6* se mantuvo alto indicando que la inducción de la expresión *DMR6* es en su mayoría independiente a *NPR1*. El ácido salicílico parece ser una señal importante en la inducción de la expresión de *DMR6* durante la senescencia como plantas transgénicas *nahG* (expresando el gen de salicilato hidroxilasa bacteriana) mostró solamente bajos niveles de transcrito de *DMR6*.

Para investigar en más detalle cómo se activa la expresión de *DMR6* durante estrés biótico y abiótico, se generaron las líneas indicadoras de *DMR6*. Se estudió la localización de la expresión de *DMR6* en plantas Col-0 y *Ler eds1-2* transgénicas que contenían el promotor *DMR6* unido al gen indicador ("reporter") *uidA* (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 plántones 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 plántones *dmr6-1* y *Ler eds1-2* de 14 días de edad con microarrays CATMA del genoma completo. Se encontraron que se expresaron significativamente de manera diferencial un total de 58 genes en *dmr6-1*, de los cuales 51 genes habían elevado y 7 genes habían reducido los niveles de transcrito. Se han identificado un conjunto pronunciado de los 51 transcritos inducidos como genes asociados con respuestas activadas de defensa vegetal, por ejemplo, ACD6, PR-5, PR-4/HEL y PAD4. Estos datos indican que la pérdida de *DMR6* da como resultado la activación de un conjunto específico de transcritos asociados a defensa. El descubrimiento de que *DMR6* está entre los genes inducidos de *dmr6* corrobora la idea de que *DMR6* está asociado a defensa. Para ensayar si la expresión inducida de los genes asociados a defensa era debida a la pérdida de *DMR6* y no debida a las mutaciones por etano metil sulfonato (EMS) adicionales que permanecían en el mutante *dmr6-1* sometido a retrocruzamiento se verificó el nivel de transcrito de una selección de genes (At4g14365, At1g14880, ACD6, PR-1, PR-2 y PR-5) mediante PCR cuantitativa en tanto el mutante *dmr6-1* como *dmr6-2* (Figura 10). Podríamos ensayar solamente los niveles de transcrito de *DMR6* en el mutante *dmr6-1* (Figura 10a) ya que el mutante *dmr6-2* tiene una inserción de ADN-T que interrumpe el transcrito de *DMR6*. La inducción de *DMR6* tal

como la observada en el análisis de micro array fue confirmada por Q-PCR en *dmr6-1* en comparación con *Ler eds1-2* (Figura 10a). La Figura 10a y b muestran que todos los seis genes seleccionados se elevaron en ambos mutantes *dmr6* en comparación con las líneas parentales. La expresión elevada observada de los genes asociados a defensa seleccionados en los mutantes *dmr6* indica que la falta de *DMR6* activa una respuesta de defensa vegetal. La activación de este conjunto de transcritos asociados a defensa podría ser la causa principal de la resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr6*.

Ejemplo 2

Identificación de ortólogos DMR6 en cultivos

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

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

2. Identificación de ortólogos por medios de hibridación heteróloga

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

3. Identificación de ortólogos por medios de PCR

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

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

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

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

1. El ARNm se aísla usando métodos estándar,

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

3. usando oligonucleótidos directos e inversos degenerados se lleva a cabo una reacción de PCR,
4. los fragmentos de PCR se separan mediante electroforesis de gel de agarosa estándar y fragmentos del tamaño esperado se aíslan a partir del gel,
5. se clonan fragmentos de PCR aislados en un vector de plásmido usando métodos estándar,
- 5 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,
- 10 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 (AATGTTTRATGACAAARGCAT) y dmr6_deg_rv5 (GCCATRTGYTGYCCTTGTYTC). Después de la clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados se diseñaron cebadores específicos a DMR6 de pepino para 5'RACE (Cuc_dmr6_rv1: TCCGGACATTGAACTTGTG y Cuc_dmr6_rv2: TCAAAGAACTGCTTGCCAAC) y 3'RACE (Cuc_dmr6_fw1: CGCACTCACCATTCTCCTTC y Cuc_dmr6_fw2: GGCTCCAAGTCCTCAAAG). Finalmente se amplificó y se secuenció la secuencia completa de ADNc de DMR6 de pepino (Figura 5). Un planteamiento similar se usó para espinaca, *Spinacia oleracea* (Figura 4), *Solanum lycopersicum* (Figura 12) y *Nicotiana benthamiana* (Figura 13).

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

Ejemplo 3

Mutación de semillas

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

Ejemplo 4

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

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

Ejemplo 5

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

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

La expresión local e inducible de los genes modificados por ingeniería, por ejemplo genes de cambio maestros, elicitador o genes Avr, genes antimicrobianos, o genes tóxicos, da como resultado la activación de defensa o muerte

celular que conducirá a resistencia a patógeno, tal como se describe por Gurr and Rushton (Trends in Biotechnology 23: 275-282, 2005). Un buen ejemplo es proporcionado por De wit (Annu. Rev. Phytopathol. 30: 391-418, 1992) quien propone el uso de la combinación Avr9-cf9 para alcanzar muerte celular inducida que conduce a resistencia a enfermedad. La especificidad a tejido y la inducibilidad de la expresión es de importancia principal para tales planteamientos, tal como se describe por Gurr and Rushton (Trends in Biotechnology 23: 283-290, 2005).

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

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

Ejemplo 6

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

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

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

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

Tablas

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

Tabla 1

Especie	Nombre común	Detalle	Número GI	Genbank
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berro de Thale	ARNm	42568064	NM_122361
<i>Aquilegia sp</i>	Aquilegia	ESTs	75461114	DT768847.1
			74538666	DT745001.1
			74562677	DT760187.1
			75461112	DT768846.1
			74562675	DT760186.1
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce	ESTs	5793134	CX672037.1
			57933368	CX673829.1
			63078039	CX309185.1
<i>Coffea canephora</i>	Café	ESTs	82485203	DV705375.1
			82458236	DV684837.1
			82461999	DV688600.1
			82487627	DV707799.1
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodón	ESTs	109842586	DW241146.1
			48751103	CO081622.1
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	ESTs	45992638	CN150358.1
			57813436	CX614669.1
			45985339	CN145819.1
			57821006	CX622219.1
			45989371	CN148311.1
			57821495	CX622708.1
			45959033	CN130459.1
			45985193	CN145752.1
			18058986	BM322209.1
			45958822	CN130381.1
			30164583	CB928312.1
<i>Medicago truncatula</i>	Carretón trucado	Boceto de Genoma		MtrDRAFT_AC119415 g1v1
		proteína	92878635	ABE85154
<i>Oryza sativa 1</i>	Arroz	Genoma		OSJNBb0060I05.4
		proteína	18057095	AAL58118.1
<i>Oryza sativa 2</i>		ARNm	115450396	NM_001055334
		proteína	115450397	NP_001048799
<i>Oryza sativa 3</i>		ARNm	115460101	NM_001060186

ES 2 651 330 T3

Especie	Nombre común	Detalle	Número GI	Genbank
		proteína	115460102	NP_001053651
<i>Populus trichocarpa 1</i>	Chopo	Genoma: LG_XII: 3095392-3103694		
		proteína: Popr1_1:569679, eugene3.00120332		
<i>Populus trichocarpa 2</i>	Chopo	Genoma: LG_XV: 201426-209590		
		proteína: Poptr_1:732726, estExt_Genewisel_v1.C_LG_XV0083		
<i>Solanum lycopersicum 1</i>	Tomate	ESTs	62932307	BW689896.1
			58229384	BP885913.1
			117682646	DB678879.1
			5894550	AW035794.1
			117708809	DB703617.1
			62934028	BW691617.1
			15197716	BI422913.1
			4381742	AI486371.1
			5601946	AI896044.1
			4387964	AI484040.1
			4383017	AI487646.
			5278230	AI780189.1
			12633558	BG133370.1
			76572794	DV105461.1
			117692514	DB718569.1
			4385331	AI489960.1
			4383253	AI487882.1
			4384827	AI489456.1
<i>Solanum lycopersicum 2</i>	Tomate	ESTs	47104686	BT013271.1
			14685038	BI207314.1
			14684816	BI207092.1
<i>Zea mays</i>	Maíz	ESTs	110215403	EC897301.1
			76291496	DV031064.1
			91050479	EB160897.1
			91874282	EB404239.1
			110540753	EE044673.1
			78111856	DV530253.1
			94477588	EB706546.1
			71441483	DR822533.1

Especie	Nombre común	Detalle	Número GI	Genbank
			78111699	DV530096.1
			78107139	DV525557.1
			76017449	DT944619.1
			91048249	EB158667.1
			78104908	DV523326.1
			78088214	DV516607.1
			76291495	DV031063.1
			71441482	DR822532.1
			78088213	DV516606.1
<i>Vitis vinifera</i>	Uvas	ESTs	33396402	CF202029.1
			33399765	CF205392.1
			45770972	CN006824.1
			45770784	CN006636.1
			45770528	CN006380.1
			45770631	CN006483.1
			33400623	CF206250.1
			33396335	CF201962.1
			30134763	CB920101.1
			30305300	CB982094.1
			71857419	DT006474.1
			30305235	CB982029.1
<i>Zingiber officinale</i>	Jengibre	ESTs	87108948	DY375732.1
			87095447	DY362231.1
			87095448	DY362232.1
			87094804	DY361588.1
			87095449	DY362233.1
			87094803	DY361587.1
<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		
<i>Spinacia oleracea</i>	Espinaca	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		
<i>Cucumis sativa</i>	Pepino	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tabaco	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		

Tabla 2

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

Nombre cebador	Gen	INDEL/enzima	Cebador directo	Cebador inverso
IND_MOP9	At5G24210		tttggaacagaaaaagtt ggaggt	catattcaaaagggaatcc caga
IND_K16H17	At5g24420		tgggggtgtggtttattctgtg ac	tggccaatagtagtgatacgc aaga
IND_T4C12	At5g24820		tctcgggtaagacacaagt cgagat	tattccaacttgcgacgtagagc at
IND_T11H3	At5g24950-60		ccaattgggttatttacttga tt	cggctttaacaacatatattcca tt
IND_F21J6	At5g25270		aacacatcaccaagatga atccaga	cctctgccccagaaatattga gat
M450	At5G24450	18	agctttgtatggtagtgccaa tga	gcggtatcgggggtlaaaatc ta
M490	At5g24490	TaqI	atggccaaccactctttgtta c	acaagcaagaagaacagcg aag
M525	At5g24520-30	TaqI	gaaatttggtgttgcatatta tc	tcaagatcttcatattctcattcca tc
M545	At5G24540/50	41	cagctgaagtatgttcatcc cttt	cttgcaattgttgggactaggta a
M555	At5G24550/60	14	tcactaaccagtgaataag gttgc	tatacagcgaatagcaaagcc aag
M470	At5g24470	HphI	ccgcgagtgaatatactct cct	cagtttaacgatgaagtgc gt
M590	At5g24590	Pdml	gcacattgtaccgtactga gtc	tagtggaactctgtccctgagg t

5 Tabla 3

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

<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtDMR6_fw	CACCATGGCGGCAAGCTGATA
	AtDMR6UTR_rv	GACAAACACAAAGGCCAAAGA
<i>Cucumis sativa</i>	cut_fw	CACCATGAGCAGTGTGATGGAGAT
	cucUTR_rv	TGGGCCAAAAAGTTTATCCA
<i>Spinacia oleracea</i>	spi_fw	CACCATGGCAACAAGATATTATCCAC
	spiUTR_rv	TGCTGCTACAAAAGTACAAA
<i>Lactuca sativa</i>	Lsat_fw	CACCATGGCCGCAAAAGTCATCTC
	LsatUTR_rv	CATGGAAACACATATTCCTTCA
<i>Solanum lycopersicum</i>	Slyc1dmr6_fw	CACCATGGAACCAAAAGTTATTCTAGC
	Slyc1dmr6UTR_rv	GGGACATCCCTATGAACCAA

Listado de secuencias

5 <110> Enza Zaden Beheer B.V.
 VAN DAMME, Mireille Maria Augusta
 VAN DEN ACKERVEKEN, Augustinus Franciscus Johannes Maria

 <120> PLANTAS RESISTENTES A ENFERMEDAD

 10 <130> 4/2MG96/24H
 <150> PCT/EP2007/050976
 <151> 01-02-2007

 15 <160> 98
 <170> PatentIn versión 3.3

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

 25 <220>
 <223> cebador directo
 <400> 1

 ttctgggatc caatggcggc aaagcttgat atc 33

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

 35 <220>
 <223> cebador inverso
 <400> 2

 40 gatatatgaa ttcttagtg ttagaaaat tctcgaggc 39

 <210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNiDMR6F

 50 <400> 3

 aaaaagcagg ctgaccgtcc acgtctctct gaa 33

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

 60 <220>
 <223> ARNiDMR6R
 <400> 4

 agaaagctgg gtgaaacgat gcgaccgata gtc 33
 65 <210> 5

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

ES 2 651 330 T3

<400> 10
 5 ctcaaggaga atgggccaca 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> QAt1g14880R
 <400> 11
 15 cgacttg gcc aaatgtgata 20
 <210> 12
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> QAt4g14365F
 25 <400> 12
 tggtttctg aggcattgtaa a 21
 30 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> QAtfg14365R
 <400> 13
 40 agtgcaggaa cattggtgt 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> QACD6F
 50 <400> 14
 tggacagttc tggagcagat 20
 <210> 15
 55 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> QACD6R
 <400> 15
 caactcctcc gctgtgag 18
 65 <210> 16

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

<400> 21
 5 ggtccacca ttgtacacc t 21
 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> QACT2F
 <400> 22
 15 aatcacagca cttgcacca 19
 <210> 23
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> QACT2R
 25 <400> 23
 gagggaagca agaattgaac 20
 30 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Lsat_dmr6_fw1
 <400> 24
 40 gatcaaggct aacacatgg 19
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Lsat_dmr6_fw2
 50 <400> 25
 tcaaccatta cccagtgtgc 20
 <210> 26
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> dmr6_deg_fw1B
 <400> 26
 ttccaggtta ttaaycaygg 20
 65 <210> 27

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> dmr6_deg_fw2B
 <400> 27
 10 cataaaytgga grgaytayct 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> dmr6_deg_fw3b
 20 <400> 28
 garcaaggrc arcayatggc 20
 <210> 29
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> dmr6_deg_fw4
 <400> 29
 aatcctcctt chttcaagga 20
 35 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> dmr6_deg_rv3B
 <400> 30
 45 agtgcattkg ggtchgtrtg 20
 <210> 31
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> dmr6_deg_rv4
 55 <400> 31
 aatgttrtg acaaargcat 20
 60 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> dmr6_deg_rv5

ES 2 651 330 T3

<400> 32
 5 gccatrtgyt gyccttgytc 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cuc_dmr6_rv1
 <400> 33
 15 tccggacatt gaaactgtg 20
 <210> 34
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cuc_dmr6_rv2
 25 <400> 34
 tcaaagaact gcttgccaac 20
 30 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cuc_dmr6_fw1
 <400> 35
 40 cgcactcacc attctccttc 20
 <210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cuc_dmr6_fw2
 50 <400> 36
 ggcctccaag tctcaaag 19
 <210> 37
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> IND_MOP9 Fw
 <400> 37
 ttgggaaca gaaaaagtg gaggt 25
 65 <210> 38

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> IND_MOP9 Rv
 <400> 38
 10 catattcaaa agggaaaatc ccaga 25
 <210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> IND_K16H17 Fw
 20 <400> 39
 tgggggtgtg gtttattctg ttgac 25
 <210> 40
 25 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> IND_K16H17 Rv
 <400> 40
 tggccaatag tagttgatac gcaaga 26
 35 <210> 41
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> IND_T4C12 Fw
 <400> 41
 45 tctcgggtaa gacacaagtc gagat 25
 <210> 42
 <211> 25
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> IND_T4C12 Rv
 55 <400> 42
 tattccaact tgcgacgtag agcat 25
 60 <210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> IND_T11H3 Fw

<400> 43
 5 ccaattgggt tattacttc gatt 24
 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> IND_T11H3 Rv
 <400> 44
 15 cggttttaa caacatat tcca 24
 <210> 45
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo IND_F21J6
 25 <400> 45
 aacacatcac caagatga 18
 30 <210> 46
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador inverso IND_F21J6
 <400> 46
 40 cctctgcccc aagaaatatt gagat 25
 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> M450 fw
 50 <400> 47
 agctttgtat ggtagtgcca atga 24
 <210> 48
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> M450 Rv
 <400> 48
 gcggtatacg ggggttaaaa tcta 24
 65 <210> 49

ES 2 651 330 T3

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

ES 2 651 330 T3

<400> 54
 5 cttgcaattg ttgggactag gtaa 24
 <210> 55
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> M555 Fw
 <400> 55
 15 tcactaacca gtgaaaaagg ttgc 24
 <210> 56
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> M555 Rv
 25 <400> 56
 tatacagcga atagcaaagc caag 24
 30 <210> 57
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> M470 Fw
 <400> 57
 40 ccgcgagtgt aatatatctc tcct 24
 <210> 58
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> M470 Rv
 50 <400> 58
 cagtttaacg catgaagtgc tagt 24
 <210> 59
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> M590 Fw
 <400> 59
 gcatcatttg taccgtactg agtc 24
 65 <210> 60

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

5 <220>
 <223> M590 Rv

 <400> 60

10 tagtggatac tctgtccctg aggt 24

 <210> 61
 <211> 1026
 <212> ADN

15 <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 acaaggtaaa cacatggcag tcaactatta tcctccatgt	600
cctgaacctg agctcactta cggtttacct gctcataccg acccaaacgc cctaaccatt	660
cttcttcaag acaactactgt ttgcggtctc cagatcttga tcgacggtea gtggttcgcc	720
gttaatccac atcctgatgc ttttgtcatc aacataggtg accagttaca ggcattaagt	780
aatggagtat acaaaagtgt ttggcatcgc gctgtaacaa acacagaaaa tccgagacta	840
tcggtcgcat cgtttctgtg ccagctgac tgtgctgtca tgagcccggc caagcccttg	900
tgggaagctg aggacgatga aacgaaacca gtctacaaag atttactta tgcagagtat	960
tacaagaagt tttggagtag gaatctggac caagaacatt gcctcgagaa ttttctaaac	1020
aactaa	1026

20 <210> 62
 <211> 341
 <212> PRT

25 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 62

ES 2 651 330 T3

Met	Ala	Ala	Lys	Leu	Ile	Ser	Thr	Gly	Phe	Arg	His	Thr	Thr	Leu	Pro	1	5	10	15
Glu	Asn	Tyr	Val	Arg	Pro	Ile	Ser	Asp	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	Glu	Val	20	25	30	
Ser	Gln	Leu	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Ser	Thr	Asp	Arg	35	40	45	
Ser	Phe	Leu	Ile	Gln	Gln	Ile	His	Gln	Ala	Cys	Ala	Arg	Phe	Gly	Phe	50	55	60	
Phe	Gln	Val	Ile	Asn	His	Gly	Val	Asn	Lys	Gln	Ile	Ile	Asp	Glu	Met	65	70	75	80
Val	Ser	Val	Ala	Arg	Glu	Phe	Phe	Ser	Met	Ser	Met	Glu	Glu	Lys	Met	85	90	95	
Lys	Leu	Tyr	Ser	Asp	Asp	Pro	Thr	Lys	Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	100	105	110	
Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Glu	Glu	Val	Asn	Asn	Trp	Arg	Asp	Tyr	Leu	Arg	115	120	125	
Leu	His	Cys	Tyr	Pro	Ile	His	Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Trp	Pro	Ser	Asn	130	135	140	
Pro	Pro	Ser	Phe	Lys	Glu	Ile	Val	Ser	Lys	Tyr	Ser	Arg	Glu	Val	Arg	145	150	155	160
Glu	Val	Gly	Phe	Lys	Ile	Glu	Glu	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Leu	165	170	175	
Glu	Lys	Asp	Tyr	Met	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Glu	Gln	Gly	Gln	His	Met	180	185	190	
Ala	Val	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Pro	Cys	Pro	Glu	Pro	Glu	Leu	Thr	Tyr	Gly	195	200	205	
Leu	Pro	Ala	His	Thr	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Gln	Asp	210	215	220	
Thr	Thr	Val	Cys	Gly	Leu	Gln	Ile	Leu	Ile	Asp	Gly	Gln	Trp	Phe	Ala	225	230	235	240

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

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

Asn Phe Leu Asn Asn
340

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

<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

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val

<210> 64

<211> 337

<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

5

10

ES 2 651 330 T3

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

Asn

<210> 65

<211> 337

<212> PRT

<213> Coffea canephora

<400> 65

ES 2 651 330 T3

Met	Glu	Thr	Lys	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	Tyr	Thr	Ser	Leu	Pro	1	5	10	15
Glu	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Glu	Ser	Glu	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	Glu	Val	20	25	30	
Ser	Asp	Cys	Gln	Asn	Val	Pro	Val	Val	Asp	Leu	Gly	Phe	Gly	Asp	Arg	35	40	45	
Asn	Leu	Met	Val	Arg	Gln	Ile	Gly	Asp	Ala	Cys	Arg	Asp	Tyr	Gly	Phe	50	55	60	
Phe	Gln	Val	Ile	Asn	His	Gly	Val	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Met	65	70	75	80
Leu	Glu	Thr	Ala	Thr	Glu	Phe	Phe	Ser	Leu	Pro	Val	Glu	Glu	Lys	Leu	85	90	95	
Lys	Leu	Tyr	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Lys	Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	100	105	110	
Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Glu	Thr	Val	His	Asn	Trp	Arg	Asp	Tyr	Leu	Arg	115	120	125	
Leu	His	Cys	Tyr	Pro	Leu	Glu	Lys	Tyr	Val	Pro	Glu	Trp	Pro	Ser	Asn	130	135	140	
Pro	Pro	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Val	Ser	Asn	Tyr	Cys	Val	Gln	Ile	Arg	145	150	155	160
Glu	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Glu	Glu	Ala	Ile	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Leu	165	170	175	
Asp	Lys	Glu	Cys	Ile	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Asp	Gln	Gly	Gln	His	Met	180	185	190	
Ala	Val	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Pro	Cys	Pro	Gln	Pro	Asp	Leu	Thr	Tyr	Gly	195	200	205	
Leu	Pro	Gly	His	Thr	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Gln	Asp	210	215	220	
Leu	Asn	Val	Ala	Gly	Leu	Gln	Val	Leu	Arg	Asp	Gly	Arg	Trp	Leu	Ala				

ES 2 651 330 T3

[illegible]

Asn

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

<400> 66

atgagcagtg	tgatggagat	ccaacttttg	tgttcagggg	gacgtcacga	gaagttgcc	60
gagaagtatg	aacggcctga	atcggatagg	ccgcggtgt	eggaggtgtg	ttgttgggac	120
aaggttccaa	taatcgactt	gggatgcgag	gagagagaga	tgattgtgaa	gcaagtggag	180
gaggcctgca	agtcttacgg	ctttttccag	gttataaatc	atgggtgtgag	gaaggaattg	240
gtggagaaaag	tgatagaagt	tggcaagcag	ttctttgagc	tgccgatgga	ggagaagttg	300
aaattttatt	cagacgaccc	ttccaagacc	gtcagactct	ccacaagttt	caatgtccgg	360
aaagagcaat	ttcgcaactg	gagggattat	ctcagactcc	attgctatcc	tctctccaac	420
tacaccccc	attggccctc	taacccacca	tccttcaggg	aaatagtgtg	tagttattgc	480
aatgaagtac	gaaaagttgg	gtacagaata	gaggagctaa	tatcggtgtg	cttggggctg	540
gagaaggaat	acataaggaa	gaagttgggt	gaacaaggtc	agcacatggc	tataaattat	600
tatccgccat	gtccccaacc	agaactcacc	tacgggctcc	ctggccatac	ggatcccaac	660
gcactcacca	ttctccttca	ggatctccat	gtcgccggcc	tccaagtcct	caaagatgga	720
aagtggctag	cgggtcaaccc	ccacccaact	gcctttgtaa	tcaatatagg	cgaccaattg	780
caggcattga	gcaatggggg	gtacaagagc	gtttggcacc	gagcgggtgt	caatgttgat	840
aagcccaggc	tgtcggtcgc	ttctttttct	tgcccttgtg	atgacgccct	cattactcct	900
gcaccgctcc	tctcccagcc	ttcccccaat	tacagacctt	tcacctacgc	ccagtactac	960
aatacttttt	ggagcagaaa	cttgatcaa	caacattgct	tggaactatt	taaaaaccac	1020
cctccttaa						1029

ES 2 651 330 T3

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

5

<400> 67

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

ES 2 651 330 T3

195

200

205

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Lys Asn His Pro Pro
340

<210> 68

<211> 337

<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

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn

<210> 69

5 <211> 1014

<212> ADN

<213> Lactuca sativa

<400> 69

10

ES 2 651 330 T3

```

atggccgcaa aagtcattct cagtggattc cgttatacta ctctaccgga gagctacgtc    60
cgtccgggta acgacagacc taacctatct caagtttccg attgcaacga cgttcctgtt    120
attgacatcg gttgtgggtga tagacaactc ataagccaac aaattggcga tgcttgtaga    180
agatacgggt ttttcaggt gattaatcat ggtgtgcctg atgaaatagt ggagaaaatg    240
caacaagtag gtagggagtt tttcctgttg cctgtggaag agaagatgaa gctttactca    300
gaggatccat cgaagacgat gaggttatcc accagcttta acgtccaaaa agaacaaatt    360
cataactggc gagattatct ccgccttcac tgttatctc tggatcaata cagtcctgaa    420
tggccttcaa atccttctta tttcaaggaa tatgttggtta attattgtac agcagtgcga    480
aatttaggaa tgagaatatt agaatcaata tcagaaagtt taggggttaca aaaagaagaa    540
ataaaaacta tattaggcga tcaaggtcaa cacatggcca tcaaccatta cccagtgtgc    600
cctgagcccg agctaacctc cgggctaccc gggcacacag accccaatgc tctcaccatc    660
cttctacagg acacactggt ctctggtctt caggtttctca aagatggcaa atggttagcc    720
gttaaaccac accctaatgc gtttgtaatt aacattgggtg atcagttaga ggcggtgagt    780
aatggtgaat ataaaagtgt atggcatcga gctgtgggtta 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

5 <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

```

```

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

```

ES 2 651 330 T3

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

- 5 <210> 71
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Medicago truncatula

ES 2 651 330 T3

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asn

<210> 72

<211> 342

<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

ES 2 651 330 T3

Leu Ile Ala Ser Val Met Glu Val Gly Arg Glu Phe Phe Arg Leu Pro
 85 90 95
 Ala Glu Glu Lys Ala Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ala Lys Lys Ile
 100 105 110
 Arg Leu Ser Thr Ser Phe Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp
 115 120 125
 Arg Asp Tyr Leu Arg Leu His Cys Tyr Pro Leu His Gln Phe Val Pro
 130 135 140
 Asp Trp Pro Ser Asn Pro Pro Ser Phe Lys Glu Ile Ile Gly Thr Tyr
 145 150 155 160
 Cys Thr Glu Val Arg Glu Leu Gly Phe Arg Leu Tyr Glu Ala Ile Ser
 165 170 175
 Glu Ser Leu Gly Leu Glu Gly Gly Tyr Met Arg Glu Thr Leu Gly Glu
 180 185 190
 Gln Glu Gln His Met Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Gln Cys Pro Glu Pro
 195 200 205
 Glu Leu Thr Tyr Gly Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr
 210 215 220
 Ile Leu Leu Met Asp Asp Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Asn Asp
 225 230 235 240
 Gly Lys Trp Ile Ala Val Asn Pro Gln Pro Gly Ala Leu Val Ile Asn
 245 250 255
 Ile Gly Asp Gln Leu Gln Ala Leu Ser Asn Gly Lys Tyr Arg Ser Val
 260 265 270
 Trp His Arg Ala Val Val Asn Ser Asp Arg Glu Arg Met Ser Val Ala
 275 280 285
 Ser Phe Leu Cys Pro Cys Asn Ser Val Glu Leu Gly Pro Ala Lys Lys
 290 295 300
 Leu Ile Thr Asp Asp Ser Pro Ala Val Tyr Arg Asn Tyr Thr Tyr Asp
 305 310 315 320
 Glu Tyr Tyr Lys Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys
 325 330 335
 Leu Glu Leu Phe Arg Thr
 340

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

10 <400> 73

ES 2 651 330 T3

Met	Ala	Asp	Gln	Leu	Ile	Ser	Thr	Ala	Asp	His	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	1	5	10	15
Asn	Tyr	Val	Arg	Pro	Glu	Ala	Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ala	Asp	Val	Leu	20	25	30	
Ser	Asp	Ala	Ser	Ile	Pro	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Asn	Pro	Asp	Arg	Ala	35	40	45	
Lys	Leu	Val	Ser	Gln	Val	Gly	Ala	Ala	Cys	Arg	Ser	His	Gly	Phe	Phe	50	55	60	
Gln	Val	Leu	Asn	His	Gly	Val	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	65	70	75	80
Ala	Val	Ala	His	Asp	Phe	Phe	Arg	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Lys	Ala	Lys	85	90	95	
Leu	Tyr	Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Lys	Lys	Ile	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	Phe	100	105	110	
Asn	Val	Arg	Lys	Glu	Thr	Val	His	Asn	Trp	Arg	Asp	Tyr	Leu	Arg	Leu	115	120	125	
His	Cys	Tyr	Pro	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Pro	Ser	Asn	Pro	130	135	140	
Pro	Ser	Phe	Arg	Glu	Ile	Ile	Ser	Thr	Tyr	Cys	Lys	Glu	Val	Arg	Glu	145	150	155	160
Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Tyr	Gly	Ala	Ile	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Leu	Glu	165	170	175	
Gln	Asp	Tyr	Ile	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Glu	Gln	Glu	Gln	His	Met	Ala	180	185	190	
Val	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Cys	Pro	Glu	Pro	Glu	Leu	Thr	Phe	Gly	Leu	195	200	205	
Pro	Ala	His	Thr	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Met	Asp	Gln				

ES 2 651 330 T3

210

215

220

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Thr Asp Thr Ser
340

<210> 74

<211> 340

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 74

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 651 330 T3

Glu Lys Leu Tyr Ser Asp Glu Pro Ser Lys Lys Ile Arg Leu Ser Thr
 100 105 110
 Ser Phe Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu
 115 120 125
 Arg Leu His Cys His Pro Leu Glu Glu Phe Val Pro Glu Trp Pro Ser
 130 135 140
 Asn Pro Ala Gln Phe Lys Glu Ile Met Ser Thr Tyr Cys Arg Glu Val
 145 150 155 160
 Arg Gln Leu Gly Leu Arg Leu Leu Gly Ala Ile Ser Val Ser Leu Gly
 165 170 175
 Leu Glu Glu Asp Tyr Ile Glu Lys Val Leu Gly Glu Gln Glu Gln His
 180 185 190
 Met Ala Val Asn Tyr Tyr Pro Arg Cys Pro Glu Pro Asp Leu Thr Tyr
 195 200 205
 Gly Leu Pro Lys His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Pro
 210 215 220
 Asp Pro His Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Arg Asp Gly Asp Gln Trp
 225 230 235 240
 Ile Val Val Asn Pro Arg Pro Asn Ala Leu Val Val Asn Leu Gly Asp
 245 250 255
 Gln Ile Gln Ala Leu Ser Asn Asp Ala Tyr Lys Ser Val Trp His Arg
 260 265 270
 Ala Val Val Asn Pro Val Gln Glu Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Met
 275 280 285
 Cys Pro Cys Asn Ser Ala Val Ile Ser Pro Ala Arg Lys Leu Val Ala
 290 295 300
 Asp Gly Asp Ala Pro Val Tyr Arg Ser Phe Thr Tyr Asp Glu Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Lys Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu
 325 330 335
 Phe Lys Gly Gln
 340

<210> 75

<211> 338

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 75

ES 2 651 330 T3

Met	Asp	Thr	Lys	Val	Leu	Ser	Ser	Gly	Ile	Gln	Tyr	Thr	Asn	Leu	Pro	1	5	10	15
Ala	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Glu	Ser	Glu	Arg	Pro	Arg	Leu	Trp	Glu	Val	20	25	30	
Ser	Thr	Cys	Glu	Asn	Val	Pro	Val	Ile	Asp	Leu	Gly	Cys	Gln	Glu	Arg	35	40	45	
Asp	Gln	Ile	Val	Gln	Gln	Val	Gly	Asp	Ala	Cys	Lys	Asn	Tyr	Gly	Phe	50	55	60	
Phe	Gln	Val	Ile	Asn	His	Gly	Val	Ser	Leu	Glu	Ala	Val	Glu	Lys	Met	65	70	75	80
Leu	Gly	Val	Ala	His	Asp	Phe	Phe	Ser	Leu	Pro	Val	Glu	Glu	Lys	Leu	85	90	95	
Lys	Leu	Tyr	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Lys	Thr	Met	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	100	105	110	
Phe	Asn	Val	Asn	Lys	Glu	Lys	Val	His	Asn	Trp	Arg	Asp	Tyr	Leu	Arg	115	120	125	
Leu	His	Cys	Tyr	Pro	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ala	Pro	Glu	Trp	Pro	Ser	Lys	130	135	140	
Pro	Pro	Pro	Phe	Lys	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Tyr	Cys	Ile	Gln	Val	Arg	145	150	155	160
Glu	Leu	Gly	Phe	Arg	Ile	Gln	Glu	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Leu	165	170	175	
Glu	Lys	Asp	His	Val	Lys	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Gln	Gly	Gln	His	Met	180	185	190	
Ala	Val	Asn	Phe	Tyr	Pro	Pro	Cys	Pro	Glu	Pro	Glu	Leu	Thr	Phe	Gly	195	200	205	
Leu	Pro	Gly	His	Thr	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Gln	Asp	210	215	220	
Gln	Ser	Val	Ala	Gly	Leu	Gln	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Lys	Trp	Val	Ala	225	230	235	240

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

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

Asn Lys

<210> 76

<211> 338

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 76

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 651 330 T3

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

Lys Asn

<210> 77

<211> 337

<212> PRT

<213> Solanum lycopersicum

<400> 77

ES 2 651 330 T3

Met	Glu	Thr	Lys	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Ile	Asn	His	Ser	Thr	Leu	Pro	1	5	10	15
Gln	Ser	Tyr	Ile	Arg	Pro	Glu	Ser	Asp	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	Glu	Val	20	25	30	
Val	Asp	Cys	Glu	Asn	Val	Pro	Ile	Ile	Asp	Leu	Ser	Cys	Gly	Asp	Gln	35	40	45	
Ala	Gln	Ile	Ile	Arg	Gln	Ile	Gly	Glu	Ala	Cys	Gln	Thr	Tyr	Gly	Phe	50	55	60	
Phe	Gln	Val	Ile	Asn	His	Gly	Val	Pro	Lys	Glu	Val	Val	Glu	Lys	Met	65	70	75	80
Leu	Gly	Val	Ala	Gly	Glu	Phe	Phe	Asn	Leu	Pro	Val	Glu	Glu	Lys	Leu	85	90	95	
Lys	Leu	Tyr	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Lys	Thr	Met	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	100	105	110	
Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Glu	Thr	Val	His	Asn	Trp	Arg	Asp	Tyr	Leu	Arg	115	120	125	
Leu	His	Cys	Tyr	Pro	Leu	Glu	Lys	Tyr	Ala	Pro	Glu	Trp	Pro	Ser	Asn	130	135	140	
Pro	Ser	Ser	Phe	Arg	Glu	Ile	Val	Ser	Arg	Tyr	Cys	Arg	Glu	Ile	Arg	145	150	155	160
Gln	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Glu	Glu	Ala	Ile	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Leu	165	170	175	
Asp	Lys	Glu	Cys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Gly	Glu	Gln	Gly	Gln	His	Met	180	185	190	
Ala	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Pro	Cys	Pro	Gln	Pro	Glu	Leu	Thr	Tyr	Gly	195	200	205	
Leu	Pro	Ala	His	Thr	Asp	Pro	Asn	Ser	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Gln	Asp	210	215	220	
Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Leu	Gln	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Lys	Trp	Leu	Ala	225	230	235	240
Val	Lys	Pro	Gln	Pro	Asp	Ala	Phe	Val	Ile	Asn	Leu	Gly	Asp	Gln	Leu	245	250	255	

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

Asn

<210> 78

<211> 342

<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

ES 2 651 330 T3

130

135

140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Lys Asn Asp Gly Thr
340

<210> 79

<211> 336

5 <212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 79

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

ES 2 651 330 T3

Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ala Glu Val Val
 20 25 30
 Thr Gly Ala Arg Ile Pro Val Val Asp Leu Gly Ser Pro Asp Arg Ala
 35 40 45
 Ala Val Val Ala Ala Ile Gly Asp Ala Cys Arg Ser His Gly Phe Phe
 50 55 60
 Gln Val Leu Asn His Gly Val His Ala Asp Leu Val Ala Ala Val Met
 65 70 75 80
 Ala Val Gly Arg Ala Phe Phe Arg Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Lys
 85 90 95
 Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ala Arg Lys Ile Arg Leu Ser Thr Ser Phe
 100 105 110
 Asn Val Arg Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Arg Leu
 115 120 125
 His Cys His Pro Leu Asp Glu Phe Val Pro Asp Trp Pro Ser Asn Pro
 130 135 140
 Pro Asp Phe Lys Asp Thr Met Ser Thr Tyr Cys Lys Glu Val Arg Glu
 145 150 155 160
 Leu Gly Phe Arg Leu Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Ser Leu Gly Leu Glu
 165 170 175
 Ala Ser Tyr Met Lys Glu Thr Leu Gly Glu Gln Glu Gln His Met Ala
 180 185 190
 Val Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Met Asp Gln
 210 215 220
 Asp Val Ala Gly Leu Gln Val Leu His Gly Gly Lys Trp Val Ala Val
 225 230 235 240
 Asn Pro Gln Pro Gly Ala Leu Ile Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Gln
 245 250 255
 Ala Leu Ser Asn Gly Gln Tyr Arg Ser Val Trp His Arg Ala Val Val
 260 265 270

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

<400> 80

```
atggcacaaca agatattatc caccggaatt ccttacaaaa ccctccccga aagctacatc 60
cgacccgaaa atgagaggcc caacttatct caagtctccg attgcgagaa tgtccctggt 120
attgacttgg gtgccaaaga ccgtactcaa acaatccacc aagtcttcaa tgcttgtaaa 180
aattacgggt ttttcaggt 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
tggcctteta accccccttc cttcaaggaa atagttagca agtacataaa agaagttagg 480
gaacttggtt tcagagtcca agaactaata tcagagagtt tagggttgga gaaagattac 540
ataaagaatg tcctaggaga tcaaggacaa cacatggctc ttaattatta ccctgagtgc 600
ccggagccag agatgacata cgggttgccg ggtcatactg accctaattgc ccttaccatc 660
cttctccaag acttgcaagt atctggcctt caaatTTTTA aggatggtaa atggcttgct 720
gtcaaacctc aacctgatgc ttttgtcatt aacattggtg atcaattgca ggcattaagt 780
aacggtatat acaagagtgt atggcacaga gcagttgtga acacagataa gccaaagatta 840
tcagtagctt cattcctctg ccccgccaat gatgcgttga taagcgcgcc aacacctctg 900
accgccaacg gatcaccggc tgtatataga gactatacgt atcctgagta ctacaagact 960
ttctggagta ggaacttgga ccaagagcac tgcttgagc 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

ES 2 651 330 T3

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
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
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
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

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

Asn Gln Thr

<210> 82

<211> 338

<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

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Asn

<210> 83

<211> 336

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 83

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

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

10

ES 2 651 330 T3

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

ES 2 651 330 T3

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

5

<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

ES 2 651 330 T3

180	185	190
Val Asn Tyr Tyr Pro Lys Cys Pro Glu Pro Glu Leu Thr Tyr Gly Leu		
195	200	205
Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp Pro		
210	215	220
His Val Ser Gly Leu Gln Val His Lys Asp Gly Lys Trp Ile Ala Val		
225	230	235
Asp Pro Lys Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Gln		
	245	250
Ala Leu Ser Asn Gly Arg Tyr Lys Ser Val Trp His Arg Ala Val Val		
	260	265
Asn Ser Asn Lys Glu Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro Cys		
	275	280
Asn Ser Val Leu Ile Ser Pro Pro Glu Lys Leu Ile Ala Asp Gly Cys		
	290	295
Pro Ala Val Tyr Arg Ser Tyr Thr Tyr Asp Glu Tyr Tyr Lys Lys Phe		
305	310	315
Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu Phe Lys Lys		
	325	330
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
 5 <400> 87
 caccatgagc agtgtgatgg agat 24
 10 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador inverso cucUTR_rv
 <400> 88
 20 tgggccaaaa agtttatcca 20
 <210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo spi_fw
 30 <400> 89
 caccatggca aacaagatat tatccac 27
 <210> 90
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador inverso spiUTR_rv
 <400> 90
 ttgctgccta caaaagtaca aa 22
 45 <210> 91
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador directo Lsat_fw
 <400> 91
 55 caccatggcc gcaaaagtca tctc 24
 <210> 92
 <211> 22
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso LsatUTR_rv
 65 <400> 92

ES 2 651 330 T3

catggaaca catattcctt ca 22

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

<220>
 10 <223> cebador directo Slyc1dmr6_fw

<400> 93

caccatggaa accaaagtta ttctagc 28

15 <210> 94
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso Slyc1dmr6UTR_rv

<400> 94

25 gggacatccc tatgaaccaa 20

<210> 95
 <211> 1013
 30 <212> ADN
 <213> Solanum lycopersicum

<400> 95

atggaaccaa aagttatttc tagcggaaac aaccactcta ctcttcctca aagttacatc 60

cgaccCGAAT ccgatatagacc acgtctatcg gaagtgggtcg attgtgaaaa tgttccaata 120

attgacttaa gttgCGGAGA tcaagctcaa ataattcgtc aaattggaga agcttggtcaa 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 tgggggttaga taaagagtgt 540

ataaaagatg tattgggtga acaaggacaa catatggcta tcaattatta tcctccttgt 600

ccacaaccag aacttactta tgggcttcCG gcccatactg atccaaattc acttacaatt 660

cttcttcaag acttgcaagt tgcgggtctt caagttctta aagatggcaa atgggttagct 720

35 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

ES 2 651 330 T3

<210> 96
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> Solanum lycopersicum

5

<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

```

ES 2 651 330 T3

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

5 <212> ADN

<213> Nicotiana benthamiana

<400> 97

atggaagcaa aagttctttc cagcggaatc cgccactcta ctatccctca aagttacatc	60
cgccctcaat ccgataggcc gcgcctttct gaagttgctg attgtgaaaa cgttccagta	120
gttgatatag gttgcggtga tagaaacctt attgttcacat aaattggtga agcctgtcgt	180
ctttatgggtt ttttcaggt aattaatcat ggtgtaccaa agaatttaat agacgaaatg	240
ctagagatag ctggggaatt ttttaggctt ccagttgaag agaagttgaa attgtactca	300
gatgacccat cgaagacgat gagattgtcg actagtttta atgtgaaaaa ggagaagggt	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

10

ES 2 651 330 T3

```
ccacaaccag aactcactta tgggctgccg gcacatactg atccaaatgc ccttacaatt 660
cttcttcaag acttagaagt agctgggtctt caagttctta aagatggcga atggttggcc 720
gtcaagcctc aaccagatgc ctttgtcatt aatcttggtg atcaactgca ggcagtgagt 780
aatgggagat acaaaagcgt atggcatcga gctattgtaa attcagacaa agccaggttg 840
tcagtggcct cgttcctttg tccgtgcgat agcgcgaaaa tcagtgcctc 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
```

ES 2 651 330 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn

REIVINDICACIONES

1. Planta de patata que es resistente a *Phytophthora infestans* caracterizada porque la planta tiene un nivel reducido 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 patata que es resistente a *Phytophthora infestans* 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     -----MESSNVLTTGRHSNLPENYVRSVSDRPRLSEVKDCEN-VPVIDL 44
Citrus_sinensis  -----MDTKVLSSGIRYTNLPEGYVRPESERPNLSEVSECKN-VPVIDL 43
Coffea_canephora -----METKVISSGIKYTSLPESYVRPESERPNLSEVSDCQN-VPVVDL 43
Cucumis_sativus  -----MSSVMEIQLLCSGGRHEKLEKYPESDRPRLSEVCCWDK-VPIDL 47
Gossypium_hirsutum -----MDTKVLSSGIHYSSLPEYVRPESERPNLSEVSDCND-VPVIDL 43
Lactuca_sativa   -----MAAKVISSGFRYTTLPESYVRPVNDRPNLSQVSDCND-VPVIDI 43
Medicago_truncatula -----MDTKVLSSGIHYSKLPESYIRPESDRPCLSQVSEFEN-VPIDL 43
Oryza_sativa_1   MAAEAEQQHQLLSTAVH-DTMEPGKYVRPESQRPRDLVVSAR-IPVVDL 48
Oryza_sativa_2   -----MAQQLISTADH-DTLPNGYVRPEAQRPRDLVLSAS-IPVVDL 42
Oryza_sativa_3   -----MATQQLLSTVEHRETLPEGYARPESDRPRLAEVATDSN-IPIDL 44
Populus_trichocarpa_1 -----MDTKVLSSGIQYTNLPASVVRPESERPNLSEVSTCEN-VPVIDL 43
Populus_trichocarpa_2 -----MDTKVISSGVHYTNLPASVVRPESERPNLSEVSTCED-IPVVDL 43
Solanum_lycopersicum_1 -----METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVVDCE-VPIDL 43
Solanum_lycopersicum_2 -----MTTTSVLSSGFNHSSTLPQSYVRPESQRPCMEVVDSDLVVPIDM 45
Sorghum_bicolor  -----MAEQLLSTAVH-DTLPGSYVRPESQRPRLAEVVTGAR-IPVVDL 42
Spinacia_oleracea -----MANKILSTGIPYKTLPEYIRPENERPNLSQVSDCEN-VPIDL 43
Vitis            -----MESKVLSTGIRYTLTPQSYIRPEPERPRLSQVSECKH-VPIDL 43
Zea_mays         -----MAEHLSTAVH-DTLPGSYVRPEPERPRLAEVVTGAR-IPVVDL 42
Zingiber_officinale -----MADMLLSIGEHTMPRNVYVRPENERPHLDNVIADAN-IPVVDL 42
                .: * * * . : * : * . * : * :

```



```

Arabidopsis      S-STDRSFLIQQIHQACARFGFFQVINHGUNKQIIDEMVSVAREFFFSMSM 92
Aquilegia_sp     S-VADESLLAQQIGNACKSHGFFQVINHGVSSELVEKMMESISHEFFHLPL 93
Citrus_sinensis  A-CDDRSLLIVQQVADACKNYGFFQAINHEVPLETVERVLEVAKEFFNLPLV 92
Coffea_canephora G-FGDRNLMVRQIGDACRDYGFQVINHGVSKEAVERMLQVAHDFGLPLV 92
Cucumis_sativus  G-CEEREMIVKQVEEACKSYGFFQVINHGVRKELVEKVIEVGKQFFELPM 96
Gossypium_hirsutum G-CEDRSHIVQQIALACINYGFFQVINHGVSKEAVERMLQVAHDFGLPLV 92
Lactuca_sativa   G-CGDRQLTSQQIGDACRRYGFQVINHGVPDEIVEKMQQVGREFFLLPV 92
Medicago_truncatula G-SHNRTQIVQQIGEACSSYGFFQVNVHGVPLEELKKTAEVAYDFFKLPLV 92
Oryza_sativa_1   A-SPDRAAVVSAVGDACRTHGFFQVNVHGI DAALIASVMEVGREFFRLPA 97
Oryza_sativa_2   A-NPDRAKLVSQVGAACRSHGFFQVNLHGVPELTLSVLAVAHDFRLPA 91
Oryza_sativa_3   A-SPDKPRVIAETIAQACRTYGFQVTNHGIAEELLEKVMVALEFFRLPP 93
Populus_trichocarpa_1 G-CQERDQIVQQVGDACKNYGFFQVINHGVSLEAVEKMLGVAHDFSLPLV 92
Populus_trichocarpa_2 G-CQDRNQIVQQVGDACEHYGFFQVINHGVSLEAVEKMLGVAHDFSLPLV 92
Solanum_lycopersicum_1 S-CGDQAQIIRQIGEACQTYGFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPLV 92
Solanum_lycopersicum_2 S-CTNRNVIVHQIGEACRLYGFFQVINHGVSKEKVIDEMLGVSHEFFKLPLV 94
Sorghum_bicolor  G-SPDRAAVVAAIGDACRSHGFFQVNLHGVHADLVAAVMVAGRAFFRLSP 91
Spinacia_oleracea G-AKDRQTQTIHQVFNACKNYGFFQVINHGVSKELEKMQVAREFFDMSV 92
Vitis            GKDVNRQAQLIQHIADACRLYGFFQVINHGVAEMMEKMLEVADEFYRLPV 93
Zea_mays         G-SPDRGAVVAAVGDACRSHGFFQVNVHGIHAALVAAMVAGRGFFRLPP 91
Zingiber_officinale G-APDKSQIISQIEKACRLYGFFQVNVHGIHAELIKKVLAIALAEFFRLPQ 91
                . : . : * * . * * . * * : . * : . :

```

69

Fig. 1 (continuación)

Solanum_lycopersicum_2	AINFYPCPCPELTGYGLPAHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLST	243
Sorghum_bicolor	AVNFYPCPCPELTGYGLPAHTDPNALTILLMDQDVAGLQVLHGG-KWVAV	240
Spinacia_oleracea	ALNYYPCPEPEMTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVSGLQIFK-DGKWLAV	241
Vitis	AVNYYPCPCPELTGYGLPGHTDPNALTILLQDLRVAGLQVLK-DGTWLAI	242
Zea_mays	AVNFYPCPCPELTGYGLPAHTDPNALTILLMDQDVAGLQVLHAG-QWVAV	240
Zingiber_officinale	AVNYYPCPCPELTGYGLPAHTDPNALTILLQDPHVSGLVHKGK-KWIAV	240
	:.** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*. *:*.**:	
Arabidopsis	NPHPDAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVTNTENPRLSVASFCLPADC	291
Aquilegia_sp	NPYPNAFVVNIGDQIQALSNGNYASVWHRAVTNTDRERISVASFCLPAND	292
Citrus_sinensis	NPLPNAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAIVNAEKARMSVASFCLPND	291
Coffea_canephora	KPHPDAFVVNIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVNADQPLSVASFCLPCDH	291
Cucumis_sativus	NPHPNAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVNVNVDKPLSVASFCLPCDD	295
Gossypium_hirsutum	NPQTNAFVINIGDQLQALSNGTYKSVWHRAIVNTDKPRMSVASFCLPCYDH	291
Lactuca_sativa	KPHPNAFVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRAVNSDNPRMSIASFCLPCND	291
Medicago_truncatula	NPIDPAFVINIGDQLQALSNGLYKSVWHRAIVNAEKPLSVASFCLPCDNE	291
Oryza_sativa_1	NPQPGALVINIGDQLQALSNGKYRSVWHRAVNSDRERMSVASFCLPCNS	296
Oryza_sativa_2	NPQPNALVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVNSDKARMSVASFCLPCND	290
Oryza_sativa_3	NPRPNALVVNLGDIQALSNDAYKSVWHRAVNVFQERMSVASFCLPCNS	293
Populus_trichocarpa_1	DHPDAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFCLPCYDN	291
Populus_trichocarpa_2	NPHPDAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAITNTDKARMSVASFCLPCFDN	292
Solanum_lycopersicum_1	KPQPDFAFVINIGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFCLPCDS	291
Solanum_lycopersicum_2	KPQPNAFVINIGDQLEALSNGKYKSIWHRAIVNSDKARMSVASFCLPCND	293
Sorghum_bicolor	NPQPGALVINIGDQLQALSNGQYRSVWHRAVNSDRERMSVASFCLPCNH	290
Spinacia_oleracea	KPQPDFAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVNTDKPLSVASFCLPADN	291
Vitis	KPHPGAFVVNIGDQLQAVSNGKYKSVWHRAVNAESERLSVASFCLPCND	292
Zea_mays	NPQPGALVINIGDQLQALSNGQYRSVWHRAVNSDRERMSVASFCLPCNH	290
Zingiber_officinale	DKPNAFVINIGDQLQALSNGRYKSVWHRAVNSNKERMSVASFCLPCNS	290
	*. *.**::*:*:*:*:*:*. * *:*.** * *:*.**::*:*	
Arabidopsis	AVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYYKKFWSRNLQEHCLFNFLNN	341
Aquilegia_sp	AIICPA---VKDG---SPSMYKFFTYDEYYKKFWSGNLDQQHCLLELFKE-	335
Citrus_sinensis	AMISPPKALTEDG---SGAVYRDFTYAEYYSKFWSRNLQEHCLLELFKN-	337
Coffea_canephora	AVISAPKPLTADG---SPVVYRDFTYQYKKFWSRNLQEHCLLELFKN-	337
Cucumis_sativus	ALITPAFLLSQ----PSPIYRPFTYQYYNTFWSRNLQDQHCLLELFKNH	340
Gossypium_hirsutum	ALISPAKPLTQHG---CGAVYRDFTYAEYYSKFWSRNLQEHCLLELFKN-	337
Lactuca_sativa	TVIRAPKEIIKEG---SKPVFKEFTYAEYYAKFWTRNLQEHCLLEFFKN-	337
Medicago_truncatula	ALICPAKPLTEDG---SGAVYRGFTYPEYYSKFWSRDLKEHCLLEFFKNN	338
Oryza_sativa_1	VELGPAKKLITDD---SPAVYRNYTYDEYYKKFWSRNLQEHCLLELFRT-	342
Oryza_sativa_2	VLIGPAQKLITDG---SPAVYRNYTYDEYYKKFWSRNLQEHCLLELFRTT	337
Oryza_sativa_3	AVISAPKPLVADG---DAPVYRSFTYDEYYKKFWSRNLQEHCLLELFKGQ	340
Populus_trichocarpa_1	ALITPPKALTDG---TGAVYRDFTYAEYYKKFWSRDLQEHCLLELFKNK	338
Populus_trichocarpa_2	ALITPPKALTDG---TGAIYRDFTYAEYYKKFWSRNLQEHCLLELFKN-	338
Solanum_lycopersicum_1	AKISAPKLLTEDG---SPVIYQDFTYAEYYNKFWSRNLQDQHCLLELFKN-	337
Solanum_lycopersicum_2	SIISAPKLTLEDG---SSAIYRHFTYAEYYEKFWSRNLQDQYCTFLFKND	340
Sorghum_bicolor	VVLGPAKKLVTE---TPAVYRSYTYDEYYKKFWSRNLQEHCLLELFRT-	336
Spinacia_oleracea	ALISAPTPLTANG---SPAVYRDYTYPEYYKTFWSRNLQEHCLLELFKNQ	338
Vitis	AVIGPAKPLTEDG---SAPIYKNFTYAEYYKKFWSRDLQEHCLLELFKN-	338
Zea_mays	VVLGPARKLVTE---TPAVYRNYTYDKYYAKFWSRNLQEHCLLELFRT-	336
Zingiber_officinale	VLISPPPEKLIADG---CPAVYRSYTYDEYYKKFWSRNLQEHCLLELFKKE	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)
ATGGCGGCAAAGCTGATATCCACCGGTTTCCGTCATACTACTTTGCCGGAAACTATGTCCGGCCAATCT
CCGACCGTCCACGTCTCTCTGAAGTCTCTCAACTCGAAGATTTCCCTCTCATCGATCTCTCTTCCACTGA
TCGATCTTTTCTCATCCAACAAATCCACCAAGCTTGTGCCCGATTTCGGATTTTTTCAGGTCATAAATCAC
GGAGTTAACAAACAAATAATAGATGAGATGGTGAGTGTGCGCGTGAGTTCTTTAGCATGTCTATGGAAG
AAAAATGAAGCTATATTGAGACGATCCAACGAAGACAACAAGATTATCGACGAGCTTCAATGTGAAGAA
AGAAGAAGTCAACAATTGGAGAGACTATCTAAGACTCCATTGTTATCCTATCCACAAGTATGTCAATGAG
TGGCCGTCAAACCCCTCCTTCTTTCAAGGAAATAGTAAGTAAATACAGTAGAGAAGTAAGAGAAGTGGGAT
TTAAATAGAGGAATTAATATCAGAGAGCTTAGGTTTAGAAAAAGATTACATGAAGAAAGTGCTTGGTGA
ACAAGGTCAACACATGGCAGTCAACTATTATCCTCCATGTCTGACCTGAGCTCACTTACGGTTTACCT
GCTCATACCGACCCAAACGCCCTAACCATTCTTCTTCAAGACACTACTGTTTGGCGTCTCCAGATCTTGA
TCGACGGTCAGTGGTTCCCGTTAATCCACATCCTGATGCTTTTGTATCAACATAGGTGACCAAGTTACA
GGCATTAAAGTAATGGAGTATACAAAAGTGTGTCATCGCGCTGTAAACAAACACAGAAAATCCGAGACTA
TCGGTCGCATCGTTTCTGTGCCCAGCTGACTGTGCTGTATGAGCCCGGCCAAGCCCTTGTGGGAAGCTG
AGGACGATGAAACGAAACAGTCTACAAAGATTTCACTTATGCAGAGTATTACAAGAAGTTTTGGAGTAG
GAATCTGGACCAAGAACATTGCCTCGAGAATTTCTAAACAATAA
```

```
> proteína DMR6 Arabidopsis thaliana (gi 15238567, Genbank NP_197841)
MAAKLISTGFRHTTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLEDFPLIDLSSDTRSFLIQIHQACARFGFFQVINH
GVNKKIIDEMVSVAREFFSMSMEKKLYSDDPTKTRLSTSFNVKKEEVNNWRDYLRLHCYPIHKYVNE
WPSNPPSFKEIVSKYSREVREVGFKIEELISESLGLEKDYMKKVLGEQQQHMAVNYYPPCEPELTYGLP
AHTDPNALTILLQDITVCGQLILIDGQWFAVNPFPDAFVINIGDQLQALSNGVYKSVVHRAVTNTENPRL
SVASFLCPADCAVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYYKKFWSRNLQEHCLNENLNN*
```

Fig. 3

> CDS ortólogo DMR6 *Lactuca sativa*

ATGGCCGCAAAAGTCATCTCCAGTGGATTCCGGTATACTACTCTACCGGAGAGCTACGTCGGTCCGGTTAA
CGACAGACCTAACCTATCTCAAGTTTCCGATTGCAACGACGTTCTGTTATTGACATCGGTTGTGGTGATA
GACAACTCATAAGCCAACAAATTGGCGATGCTTGTAGAAGATACGGTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGT
GTGCCTGATGAAATAGTGGAGAAAATGCAACAAGTAGGTAGGGAGTTTTTCTGTTGCCTGTGGAAGAGAA
GATGAAGCTTTACTCAGAGGATCCATCGAAGACGATGAGGCTATCCACCAGCTTTAACGTCCAAAAGAAC
AAATTCATAACTGGCGAGATTATCTCCGCCTTCACTGTTATCCTCTGGATCAATACAGTCCTGAATGGCCT
TCAAATCCTTCTTATTTCAAGGAATATGTTGGTAATTATTGTACAGCAGTGCGAAATTTAGGAATGAGAAT
ATTAGAAATCAATATCAGAAAGTTTAGGGTTACAAAAGAAGAAATAAAACTATATTAGGCGATCAAGGTC
AACACATGGCCATCAACCATACCCAGTGTGCCCTGAGCCCGAGCTAACCTACGGGCTACCCGGGCACACA
GACCCCAATGCTCTCACCATCCTTCTACAGGACACACTGGTCTCTGGTCTTCAGGTTCTCAAAGATGGCAA
ATGGTTAGCCGTTAAACCACACCCTAATGCGTTTGTAAATTAACATTGGTGATCAGTTAGAGCGGTTGAGTA
ATGGTGAATATAAAAGTGTATGGCATCGAGCTGTGGTTAACTCAGACAACCCGCGAATGTCTATAGCTTCG
TTTTTGTGTCCTGTGAATGACACCGTTATTAGGGCTCCTAAAGAAATAATAAGGAAGGATCGAAACCTGT
TTTCAAAGAATTTACTTATGCAGAATACTACGCGAAGTTTTGGACAAGAAACCTTGATCAAGAACATTGCT
TAGAATCTTCAAGAACTAG

> proteína ortólogo DMR6 *Lactuca sativa*

MAAKVISSGFRYTTLPESYVRPVNDRPNLSQVSDCNDVPVIDIGCGDRQLISQIGDACRRYGFQVINHG
VPDEIVEKMQVGREFFLLPVEEKMKLYSEDPSKTMRLSTS FNVQKEQIHNRDYLRLHCYPLDQYSPWEP
SNPSYFKEYVGNVCTAVRNLMRILESISESLGLQKEEIKTILGDQGHMAINHYPVCEPELTYGLPGHT
DPNALTILLQDTLVSGQLVKDGKWLAVKPHNFAVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRVAVNSDNPRMSIAS
FLCPCNDTVIRAPKEIIKEGSKPVFKEFTYAEYYAKFWTRNLQEHCLFEFFKN*

Fig. 4

```

> CDS ortólogo DMR6 Spinacia oleracea
ATGGCAAACAAGATATTATCCACCGGAATTCCTTACAAAACCCCTCCCCGAAAGCTACATCCGACCCGAAAA
TGAGAGGCCCAACTTATCTCAAGTCTCCGATTGCGAGAATGTCCCTGTTATTGACTTGGGTGCCAAAGACC
GTACTCAAACAATCCACCAAGTCTTCAATGCTTGTAATAATTACGGGTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGG
GTGTCAAAGGAATTAGCGGAGAAGATGCAAAAGGTAGCTCGAGAGTTCCTCGATATGTCGGTTGAGGAAAA
AATGAAATTATATAGTGACGATCCAACATAAAACACTAAGATTGTCTACAAGTTTTAACGTTAAACAAAGAGG
AAGTTCATAATTGGAGAGATTATCTTAGGCTCCATTGTTGGCCTCTTGAGCAATATGTCCCGAATGGCCT
TCTAACCCCCCTTCCTTCAAGGAAATAGTGAGCAAGTACATAAAGAAGTTAGGGAAGTTGGTTTCAGAGT
CCAAGAACTAATATCAGAGAGTTTAGGGTTGGAGAAAGATTACATAAAGAATGTCTAGGAGATCAAGGAC
AACACATGGCTCTTAATTATTACCTGAGTGCCCGGAGCCAGAGATGACATACGGGTTGCCGGGTCATACT
GACCTTAATGCCCTTACCATCTTCTCCAAGACTTGCAAGTATCTGGCCTTCAAATTTTTAAGGATGGTAA
ATGGCTTGCTGTCAAACCTCAACCTGATGCTTTTGTCTTAACATTTGGTGATCAATTGCAGGCATTAAGTA
ACGGTATATACAAGAGTGTATGGCACAGAGCAGTTGTGAACACAGATAAGCCAAGATTATCAGTAGCTTCA
TTCCTCTGCCCCGCCAATGATGCGTTGATAAGCGCGCCAACACCTCTGACCGCCAACGGATCACCGGCTGT
ATATAGAGACTATACGTATCCTGAGTACTACAAGACTTCTGGAGTAGGAAGTTGGACCAAGAGCACTGCT
TGGAGCTTTTTTAAAAACCAACCTAG

> proteina ortólogo DMR6 Spinacia oleracea
MANKILSTGIPYKTLPEYIRPENERPNLSQVSDCENVPVIDLGAKDRTQTIHQVFNACKNYGFFQVINHG
VSKELAEKMQKVAREFFDMSVEEKMKLYSDPTKTLRLSTSFNVNKEEVHNWRDYLRLHCWPLEQYVPEWP
SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRVQEJ.I.SESLGLEKDYIKNVLGDOGQHMALNYYECPPEPTYGLPGHT
DPNALTILLQDLQVSLQIFKDGKWLAVKPPDAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNTDKPRLSVAS
FLCPANDALISAPTPLTANGSPAVYRDYTYPEYYKTFWSRNLDQEHCLELFKNQT*

```

Fig. 5

```

> CDS ortólogo DMR6 Cucumis sativus
ATGAGCAGTGTGATGGAGATCCAACCTTTTGTGTTTCAGGGGACGTCACGAGAAGTTGCCAGAGAAGTATGA
ACGGCCTGAATCGGATAGGCCGCGGCTGTCCGAGGTGTGTTGTTGGGACAAAGGTTCCAATAATCGACTTGG
GATGCGAGGAGAGAGAGATGATTGTGAAGCAAGTGGAGGAGCCCTGCAAGTCTTACGGCTTTTCCAGGTT
ATAAATCATGGTGTGAGGAAGGAATTGGTGGAGAAAGTGATAGAAGTTGGCAAGCAGTCTTTGAGCTGCC
GATGGAGGAGAAGTTGAAATTTTATTAGACGACCCTTCCAAGACCGTCAGACTCTCCACAAGTTTCAATG
TCCGGAAGAGCAATTTCCCAACTGGAGGGATTATCTCAGACTCCATTGCTATCCTCTCTCCAACCTACACC
CCCCATTGGCCCTCTAACCCACCATCCTTCAGGGAAATAGTGAGTAGTTATTGCAATGAAGTACGAAAAGT
TGGGTACAGAATAGAGGAGCTAATATCGGAGAGCTTGGGGCTGGAGAAGGAATACATAAGGAAGAAGTTGG
GTGAACAAGGTCAGCACATGGCTATAAATTATTATCCGCCATGTCCCAACCAGAACTCACCTACGGGCTC
CCTGGCCATACGGATCCCAACGCACTCACCATTCCTTCAGGATCTCCATGTCGCCGGCTCCAAGTCCCT
CAAAGATGGAAGTGGCTAGCGGTCAACCCCAACCCCAATGCCTTTGTAATCAATATAGGCGACCAATTGC
AGGCATTGAGCAATGGGGTGTAAGAAGAGCGTTTGGCACCGAGCGGTGGTCAATGTTGATAAGCCCAGGCTG
TCGGTCGCTTCTTTCTCTGCCCTTGTGATGACGCCCTCATTACTCCTGCACCGCTCCTCTCCAGCCTTC
CCCCATTTACAGACCTTTCACCTACGCCCACTACTACAATACTTTTGGAGCAGAACTTGGATCAACAC
ATTGCTTGGAATATTTAAAAACCCCTCCTTAA

> proteina ortólogo DMR6 Cucumis sativus
MSSVMEIQLLCSGGRHEKLPEKYERPESDRPRLSEVCCWDKVPFIIDLGCEREMIVKQVEEACKSYGFFQV
INHGVRELVEKVIEVGKQFFELPMEEKLFYSDDPSKTVRLSTSFNVRKEQFRNWRDYLRHLCYPLSNYT
PHWPSNPPSFREIVSSYCNEVRKVGRIEELISESLGLEKEYIRKKLGEQQQHMAINYYPPCPQPELTYGL
PGHTDPNALTILLODLHVAGLQVLKDGKWLAVNPHPNFAVINIGDQLQALSNGVYKSVVHRAVNVNDKPRL
SVASFLCPCDDALITPAPLLSQPSPIYRPFTYAQYYNTFWSRNLDDQHCLELFKNHPP*

```

Fig. 6

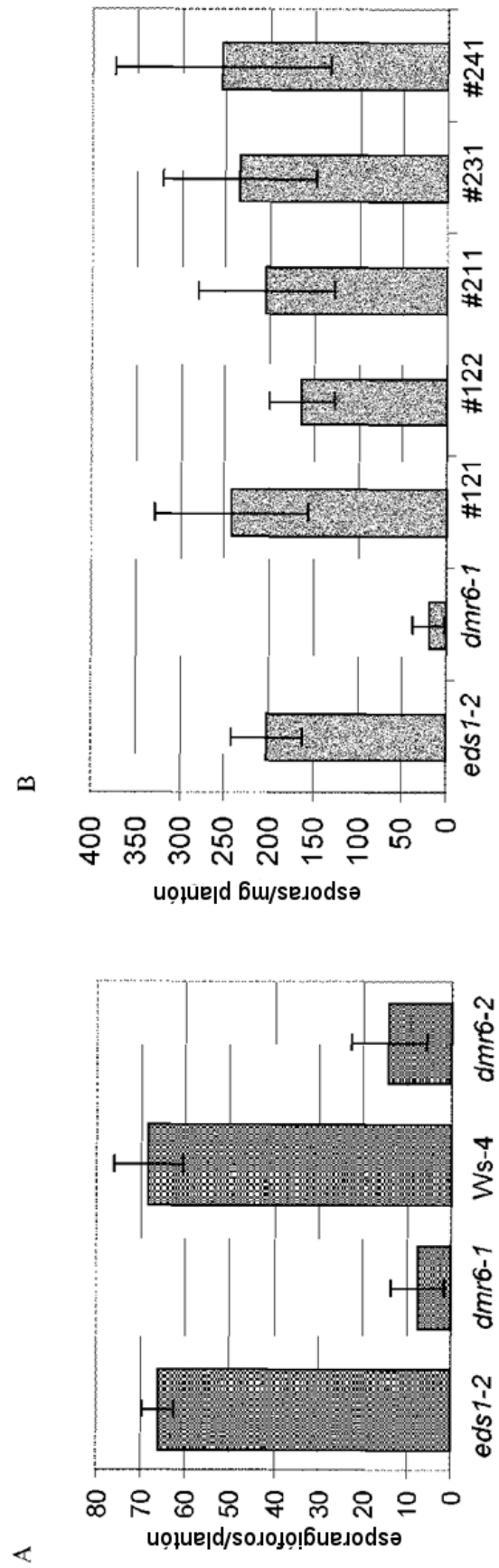


Fig. 7

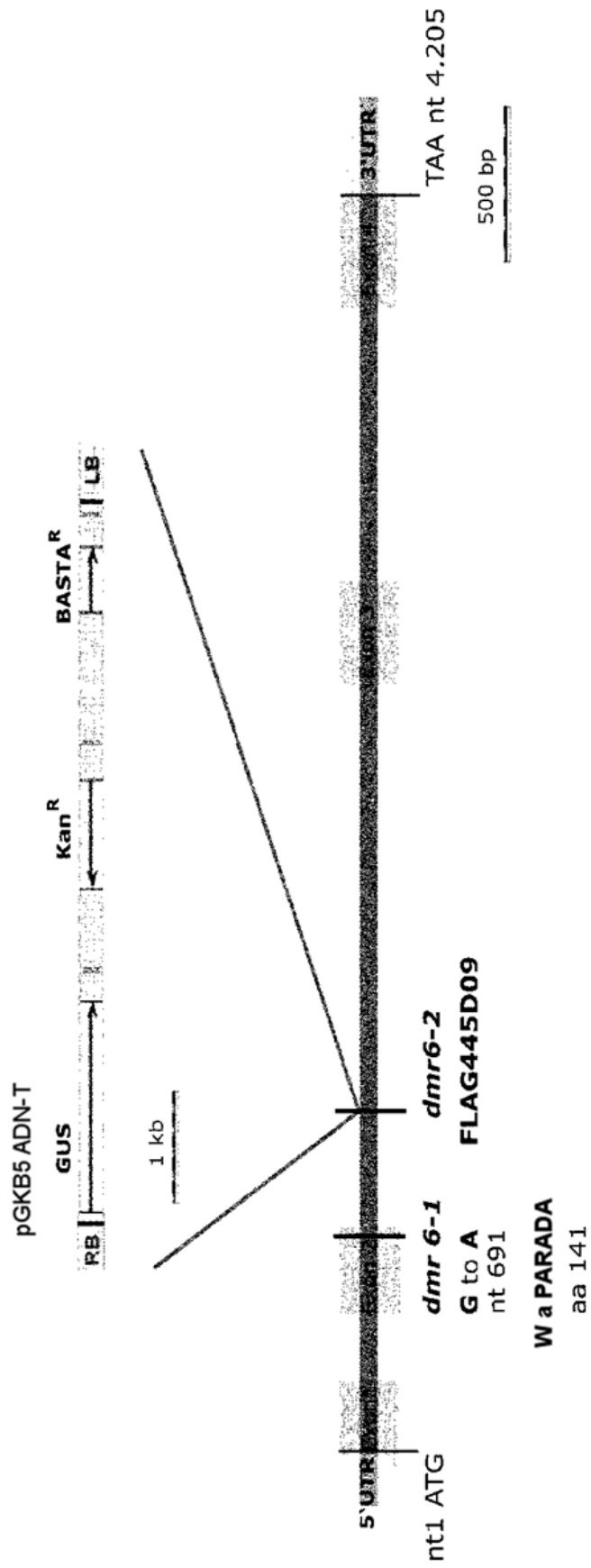


Fig. 8

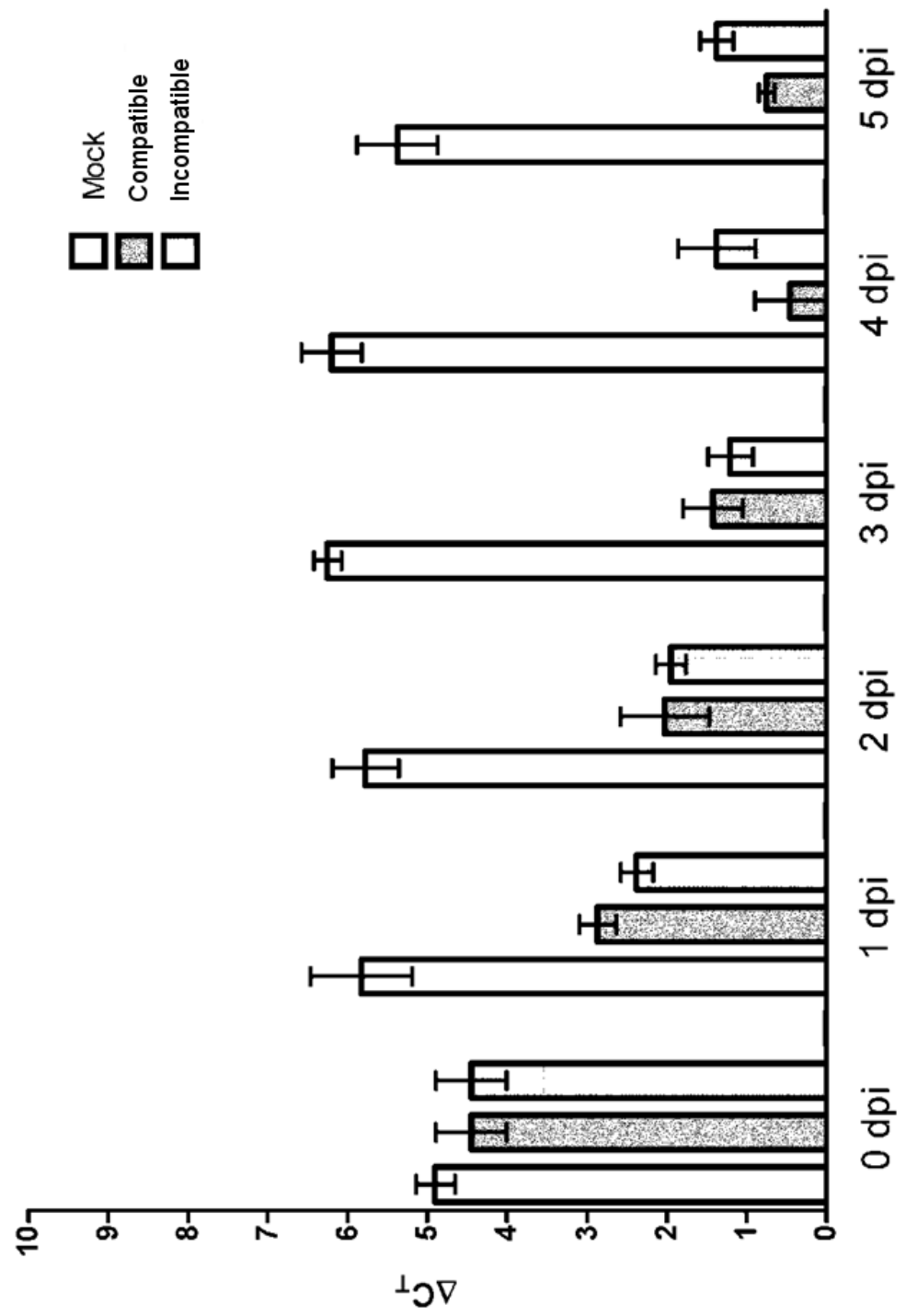


Fig. 9

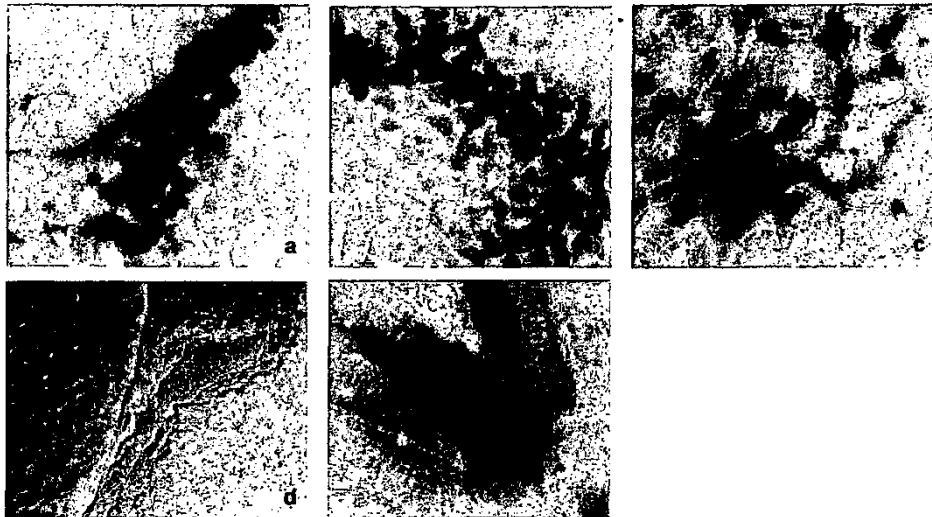


Fig. 10

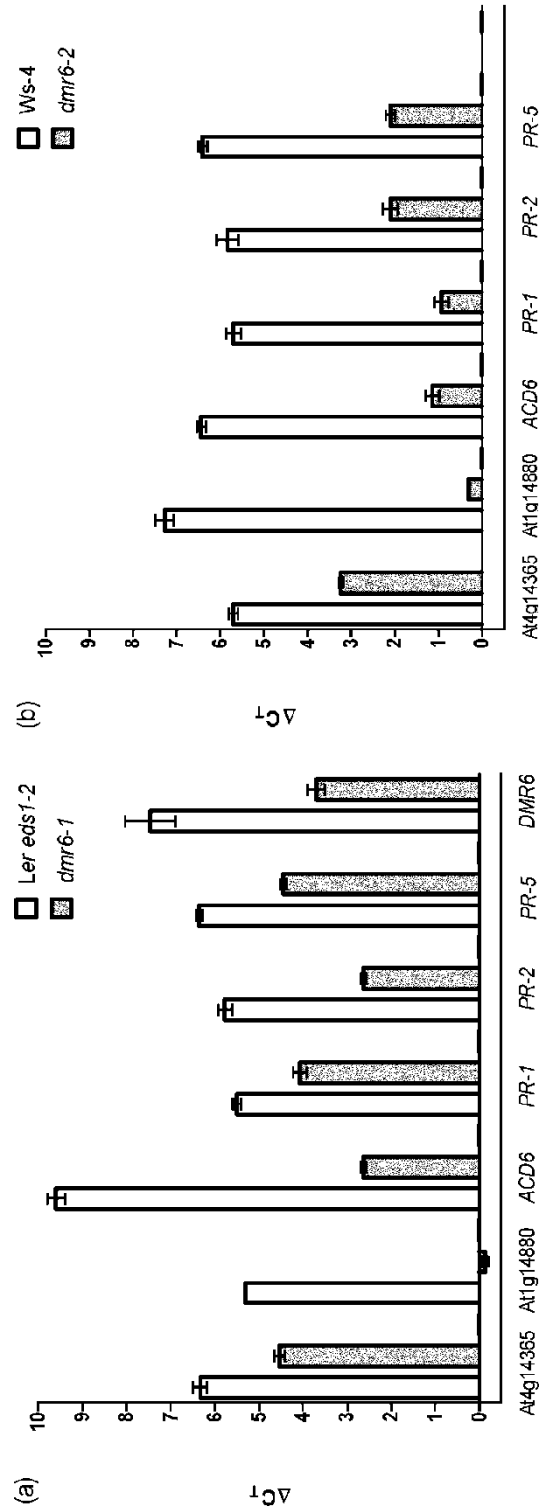


Fig. 11

cattttttctataaaatccaaactaacatctactctt
 ctttaaatctataaacctaaacacatttttaaaactcaaacogatatataattttgtttaatttttaaaactaaactctagtgacttatttataaacccaaa
 cctaaataaatttcgtttttatgttaaatataactctataattttataaaactaaactgaactataattttgttttaattgttaaaactataaatttta
 aataataaattaatctgttttaattaaaagtatacagatttggattttatgtttatataataatgatataataactagtttaaaataaaagttaagagttt
 attcttagaggttaaatgcaagtattgtccgaaaaaacaactaattcaagtagtccgaaaaaaactcotaactagttgagacggcacagagtcacatgagtcacgtacttcaagatttgcctctgga
 taaaaaggaaaaaaatcaaacagatatttaattagaagtgtagacggcacagagtcacatgagtcacgtacttcaagatttgcctctgga
 gtcgaagtcocaaacacatgatggcaccacttccacatacagatcgtgcccgtatttggatagatacggacagtggttttcgtttggacacgtgtcct
 gctttatctcttcgtcgcccaaaaaataccacaatgtcttataccacacacgtgtctgtttatcccaacccacaatttgcacaaaaatacacact
 ttgcattggaagattttctaattatacaactcacattattcgaatttaatttcgatttttagtttcaagaaaaatcattotttggatgggtacttgcctta
 ttaacaggtgtatacttgcatttgccttgcgaatgaaaaataaaatgaaaatgattgttcattgttttaaaaaagtaactaagatacaaatcaaga
 caaatttctgtcgtagttcattaaatttttaatacaactctaaacogattttcaacaatttttaataataaaaaaagttacatatctttgtttaacat
 aatataaaaaataacatgaataaatttttaacataaaaaatccgtttttcaaaaaaagtttagaagtttacgtttctataaaataagttaaaatatg
 aatgctgttttaagacgcaatctagataatttttttaataaaaaaacggagatacatttaaatctataaacttaacttaacttaacttaacttaactta
 tctacaatttaactctatgtaaaataaaactgatttttagtaacatttaagcagtcagagatgtcagcgttaactaaactaaacttaacttaacttaact
 ttgaattttgttttaactaaatctaaacaaaatatattttataaaaaaacggagatacatttaaatctataaacttaacttaacttaacttaacttaact
 aaaaaaaacccaaattataataattataalaagaagatttagttttatgtttacaactcgaataatacaaaataaatgattgttttttaggactacg
 atcaagaacogaaatggccttttccaaacccaaacogagatttgaattttatgggtgggattcgggttaactggagagatagttatcaacaacaaatttaaaata
 gatttagctagatcgggttgggttcggttcgttttgcctctgcactcctcacactcgtttattttatatattgtatgttttaaaagtcaacacatgaa
 tattgaagtagtagtgcactatgataatgttttattcgttaaacacaaattgaaaaagtcacaaaggaaggaagtagtttaatacaagcccttgtgtc
 aaaaataattattttactgtcatcgttaattttatcaatgagttataatctcattttttctctccgaagtcacgacaaataaaaaaacca
 atctcattcgaagtagtacttactgatatgctgtagtgacacagtcgaacogcttgacacaaactcattcagcgtcactgctgacgctagaat
 gatgacattatatacaatgtttttgtctgaattttgttaaggttaaaaaataatgaaatgtagagcttgagattttgattttcgtttttatgttaacta
 gctgaatcgaatccttgagcagtttaatttaatttcgttaattttatctcgtacttctgacgttttlaaaataataataataactttggtagatgcttaag
 gtaattcttttttaataataagatggttagagatctttaaagttagctataaagaaaacoggaataacttttgggtgggttaattgtttctgttga
 agtaatgtgtgtagattttctttgaatttagatttaaaaactatttgttttcagatgttttaagaaaaaaatgtcattcattgcttgcattctta
 cataacttaataagaaaaattataaagttttgtggaatccaggaagcctaactagttatgttttgcacaaaaaataactaggttttgttatggaatt
 aagaaggaaaaaaattgagataaataatataaaaaacaaatttaaacgaattatattagcttaattgataaaagatttttagtgaaacttaaaaaatag
 ttggttaagagattacaacacatttaaccaaactcctagatttttaaaaaaacacttaaaaaacttaaaacttttaatttttttaactat
 aaactttataaaaacccacagctgtcctttcgaataatccactatattcgggtggaattaaataacttcggaataatgcatacttataatacaaa
 acaaatcacttgaacacataatcaattgagagtaggacccagtaaacacgcatgttttataatactcgtatgcacatcgcatataataactca
 aagtcgagcccttccttcttcttatacccttttggatttcttcaatttcttgacatcaatc

Fig. 12

> CDS ortólogo DMR6 *Solanum lycopersicum*

ATGGAAACCAAAGTTATTTCTAGCGGAATCAACCACTCTACTCTTCCTCAAAGTTACATCCG
 ACCCGAATCCGATAGACCACGTCTATCGGAAGTGGTCGATTGTGAAAATGTTCCAATAATTG
 ACTTAAGTTGCGGAGATCAAGCTCAAATAATTCGTCAAATTGGAGAAGCTTGTCAAACCTTAT
 GGTTCCTTTCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGGAAGTTGTAGAGAAAATGCTAGGGGT
 AGCTGGGGAATTTTCAATTTACCAGTAGAAGAGAACTAAAATTATATTCAGATGATCCTT
 CAAAGACCATGAGATTATCAACAAGTTTTAATGTTAAAAAGGAGACAGTTCATAATTGGAGA
 GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTAGAGAAGTATGCTCCTGAATGGCCTTCTAATCC
 ATCATCTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCAGGGAAATTCGTCAACTCGGATTTAGAT
 TAGAAGAAGCCATAGCAGAAAGCCTGGGGTTAGATAAAGAGTGTATAAAGATGTATTGGGT
 GAACAAGGACAACATATGGCTATCAATTATTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTTACTTA
 TGGGCTTCCGCCCCATACTGATCCAAATTCACCTACAATTCTTCTTCAAGACTTGCAAGTTG
 CGGGTCTTCAAGTTCTTAAAGATGGCAAATGGTTAGCTGTAAACCTCAACCTGACGCCTTT
 GTCATTAATCTTGGGGATCAATTGCAGGCAGTAAGTAACGGTAAGTACAGAAGTGTATGGCA
 TCGAGCTATTGTGAATTCAGATCAAGCTAGGATGTCAGTGGCTTCGTTTCTATGTCCGTGTG
 ATAGCGCGAAAATCAGTGCACCAAAGCTGCTGACAGAAGATGGATCTCCAGTGATTTATCAA
 GACTTTACGTATGCTGAGTATTACAACAAG
 TTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGCAACATTGTTTGGAACTTTTCAAGAATAA

> proteína ortólogo DMR6 *Solanum lycopersicum*

METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVVDCENVPIIDLSCGDQAQII RQIG EACQTY
 GFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPEVEKLKLYSDDPSKTMRLSTS FNVKKETVHNWR
 DYLR LHCYPLEKYAPEWPSNPSSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEAI AESLGLDKECIKDV LG
 EQGQHMAINYYPPCPQPELTYGLPAHTDPNSLTILLQDLQVAGLQVLKDGKWLAVKPPQDAF
 VINLGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
 DFTYA EYYNKFWSRNL DQQHCLELFKN.

Fig. 13

> CDS ortólogo DMR6 *Nicotiana benthamiana*

ATGGAAGCAAAAGTTCTTTCCAGCGGAATCCGCCACTCTACTATCCCTCAAAGTTACATCCG
CCCTCAATCCGATAGGCCGCGCCTTTCTGAAGTTGCTGATTGTGAAAACGTTCCAGTAGTTG
ATATAGGTTGCGGTGATAGAAACCTTATTGTTTCATCAAATTGGTGAAGCCTGTCGTCTTTAT
GGTTTTTTCCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGAATTTAATAGACGAAATGCTAGAGAT
AGCTGGGGAATTTTTTAGGCTTCCAGTTGAAGAGAAGTTGAAATTGTACTCAGATGACCCAT
CGAAGACGATGAGATTGTCTGACTAGTTTTAATGTGAAAAAGGAGAAGGTTTACAATTGGAGA
GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTTGAAAATTACGCTCCTGAATGGCCTTCCAATCC
TTCCTCTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCATGGAAGTTTCGACAACCTCGGGTTCAGAT
TGCAGGAAGCCATAGCAGAGAGCCTAGGCTTAGAGAAAGAGTGTATAAAGGATGTATTGGGC
GAACAAGGTCAACACATGGCTATCAATTTCTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTCACTTA
TGGGCTGCCAGCACATACTGATCCAAATGCCCTTACAATTCTTCTTCAAGACTTAGAAGTAG
CTGGTCTTCAAGTTCTTAAAGATGGCGAATGGTTGGCCGTCAAGCCTCAACCAGATGCCTTT
GTCATTAATCTTGGTGATCAACTGCAGGCAGTGAGTAATGGGAGATACAAAAGCGTATGGCA
TCGAGCTATTGTAAATTCAGACAAAGCCAGGTTGTCAAGTGGCTTCGTTTCTTTGTCCGTGCG
ATAGCGCGAAAATCAGTGCTCCAAAGCTCCTCACTGAAGATGGATCTCCTGTCATTTATCAG
GACTTTACCTATGCTGAGTATTACAAAAAGTTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGGAACATTG
TTTGGAACTTTTCAAGAACTAA

> proteína ortólogo DMR6 *Nicotiana benthamiana*

MEAKVLSSGIRHSTIPQSYIRPQSDRPRLESEVADCENVPVVDIGCGDRNLIVHQIGEACRLY
GFFQVINHGVPKNLIDEMLEIAGEFFRLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKEKVNWR
DYLRRLHCYPLENYAPEWPSNPSSFREIVSRYCMEVRQLGFRLOEAIAESLGEKECIKDVLG
EQGQHMAINFYPPCPQPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLKDGEWLAVKPPQDAF
VINLGDQLQAVSNGRYKSVWHRAIVNSDKARLSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
DFTYAEYYKKFWSRNLQEHCLFLFN.

Fig. 14

