

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 150**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

A01H 5/08 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2008 E 12155889 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2455475**

54 Título: **Plantas resistentes a enfermedades**

30 Prioridad:

01.02.2007 WO PCT/EP2007/050976

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

08.03.2018

73 Titular/es:

ENZA ZADEN BEHEER B.V. (100.0%)

Haling 1E

1602 DB Enkhuizen, NL

72 Inventor/es:

VAN DAMME, MIREILLE MARIA AUGUSTA y

VAN DEN ACKERVEKEN, AUGUSTINUS

FRANCISCUS J.M.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 658 150 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes a enfermedades

La presente invención se refiere a plantas de melón resistentes a enfermedades, en particular a plantas de melón resistentes a *Pseudoperonospora cubensis*.

5 La resistencia de plantas a patógenos fúngicos y oomicetos se ha estudiado a fondo, tanto la resistencia específica de patógeno como la resistencia amplia. En muchos casos, la resistencia es determinada por genes dominantes para la resistencia. Se han identificado muchos de estos genes de resistencia específicos de raza o de gen por gen que median en el reconocimiento del patógeno mediante su interacción directa o indirecta con productos génicos de avirulencia u otras moléculas procedentes del patógeno. Este reconocimiento conduce a la activación de una amplia
10 gama de respuestas de defensa de la planta que detienen el crecimiento del patógeno.

En la reproducción de plantas se establece una lucha constante para identificar nuevas fuentes de genes de resistencia dominantes principalmente monogénicos. En cultivares con genes de resistencia individuales recién introducidos, con frecuencia la protección frente a la enfermedad se quiebra con rapidez, porque los patógenos evolucionan y se adaptan con una alta frecuencia y recobran la capacidad para infectar con éxito a la planta hospedante. Por tanto, resulta muy necesaria la disponibilidad de nuevas fuentes de resistencia a enfermedades.
15

Los mecanismos de resistencia alternativos actúan, por ejemplo, a través de la modulación de la respuesta de defensa en las plantas, tal como la resistencia mediada por el gen *mlo* recesivo en cebada al patógeno del oídio *Blumeria graminis f.sp. hordei*. Las plantas que portan alelos mutados del gen *MLO* de tipo salvaje muestran una resistencia casi completa, que coincide con el aborto del intento de penetración fúngica de la pared celular de
20 células epidérmicas individuales atacadas. Así, el gen *MLO* de tipo salvaje actúa como regulador negativo de la respuesta al patógeno. Esto se describe en el documento WO9804586.

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

Se ha obtenido una resistencia amplia a patógenos, o formas sistémicas de resistencia, tales como SAR, de dos formas principales. La primera ha sido mediante la mutación de reguladores negativos de la defensa de la planta y la muerte celular, tal como en los mutantes *cpr*, *lsd* y *acd* de *Arabidopsis*. La segunda ha consistido en la sobreexpresión transgénica de inductores o reguladores de la defensa de la planta, tal como en plantas que sobreexpresan *NPR1*.
30

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

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

En la investigación que condujo a la presente invención se realizó una búsqueda de un mutante de *Arabidopsis thaliana* para una susceptibilidad reducida al patógeno del mildiú *Hyaloperonospora parasitica*. Se generaron mutantes de EMS en la línea *Ler eds1-2* altamente susceptible de *Arabidopsis*. Se analizaron en detalle ocho mutantes resistentes al mildiú (*dmr*), que corresponden a 6 loci diferentes. Un análisis microscópico demostró que, en todos los mutantes, el crecimiento de *H. parasitica* se redujo muchísimo. La resistencia de *dmr3*, *dmr4* y *dmr5* se ha asociado con la activación constitutiva de la defensa de la planta. Además, los mutantes *dmr3* y *dmr4*, pero no *dmr5*, también fueron resistentes a *Pseudomonas syringae* y *Golovinomyces orontii*.
40

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

El mutante *dmr6* se identificó en una búsqueda de pérdida de susceptibilidad en el trasfondo genético de *Arabidopsis Ler eds1-2*. El gen *DMR6* ahora ha sido clonado y caracterizado. Así, se ha descubierto que *DMR6* es el gen At5g24530, que codifica una oxidorreductasa (las secuencias de ADN y de aminoácidos se muestran en la figura 2). Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de una molécula, el oxidante, a otra, el reductor. Según la presente invención, se ha descubierto que la falta de una proteína DMR6 funcional produce la resistencia al mildiú.
50

La presente invención proporciona una planta de melón que es resistente a *Pseudoperonospora cubensis*, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

La resistencia según la invención se basa en un nivel alterado, en particular reducido, o en la ausencia completa de la proteína de DMR6 en plantas. A este respecto, la expresión "proteína de DMR6" se refiere al producto del gen *DMR6*. Estas alteraciones pueden lograrse de diversas formas.

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

10 La modulación del gen DMR6 para disminuir su actividad o su expresión puede lograrse a varios niveles. En primer lugar, el gen endógeno puede mutarse directamente. Esto puede lograrse por medio de un tratamiento mutagénico. Como alternativa, un gen DMR6 modificado puede introducirse en la planta mediante técnicas transgénicas o mediante introgresión, o la expresión de DMR6 puede reducirse a nivel regulatorio, por ejemplo, mediante la modificación de las secuencias reguladoras o mediante silenciamiento de genes.

15 En otra realización de la invención, el nivel reducido de proteína de DMR6 es el resultado de una mutación en el gen *DMR6* que da como resultado una expresión reducida de DMR6, comparado con el gen DMR6 de tipo salvaje en el que no está presente dicha mutación, o da como resultado una menor cantidad de ARNm o una estabilidad menor de la proteína. En una realización concreta, esto se logra mediante mutaciones en la secuencia codificadora de DMR6 que dan como resultado una proteína de DMR6 no funcional.

20 En otra realización de la invención, la expresión reducida puede lograrse mediante la infrarregulación de la expresión del gen *DMR6* a nivel transcripcional o traduccional, por ejemplo, mediante silenciamiento de genes o mediante mutaciones que afectan a la expresión del gen *DMR6*.

Esta invención se basa en las investigaciones realizadas sobre la resistencia a *Hyaloperonospora parasitica* en *Arabidopsis*, pero es un concepto general que puede aplicarse de modo más general en plantas, en particular en plantas de cultivo que son susceptibles a infecciones por patógenos, tales como *Oomycota* y *Fungi*.

25 La invención resulta adecuada para un gran número de enfermedades de plantas provocadas por oomicetos, tales como *Pseudoperonospora cubensis* en el melón.

30 Cuando la modificación de la expresión del gen *DMR6* en una planta se va a realizar mediante modificación genética del gen DMR6 o mediante la identificación de mutaciones en el gen DMR6 y el gen aún se conoce, este gen primero debe identificarse. Para generar plantas resistentes a patógenos, en particular plantas de cultivos, mediante la modificación genética del gen DMR6 o mediante la identificación de mutaciones en el gen DMR6, los genes DMR6 ortólogos deben aislarse de estas especies vegetales.

Están disponibles diversos métodos para la identificación de secuencias ortólogas en otras plantas.

35 Un método para la identificación de secuencias ortólogas de DMR6 en una especie vegetal puede comprender, por ejemplo, la identificación de EST de DMR6 de la especie vegetal en una base de datos; el diseño de cebadores para la amplificación del transcrito completo de DMR6 o ADNc; la realización de experimentos de amplificación con los cebadores para obtener el correspondiente transcrito completo o ADNc; y la determinación de la secuencia de nucleótidos del transcrito o el ADNc. Los métodos adecuados para amplificar el transcrito completo o ADNc en situaciones en las que solo se conoce parte de la secuencia codificadora son las técnicas de PCR avanzadas 5'RACE, 3'RACE, TAIL-PCR, RLM-RACE y vectorette PCR.

40 Como alternativa, si no existen secuencias de nucleótidos disponibles para la especie vegetal de interés, se diseñan cebadores sobre el gen DMR6 de una especie vegetal muy relacionada con la planta de interés, basándose en los dominios conservados según se determina mediante alineamiento de múltiples secuencias de nucleótidos, y se emplean para amplificar mediante PCR la secuencia ortóloga. Estos cebadores son, de modo adecuado, cebadores degenerados.

45 Otro método fiable consiste en evaluar una secuencia concreta como ortólogo de DMR6 mediante la identificación del mejor acierto recíproco. Un candidato a secuencia de DMR6 ortóloga de una especie vegetal concreta se identifica como el mejor acierto a partir de bases de datos de ADN cuando se realiza la búsqueda con la proteína de DMR6 de *Arabidopsis* o su secuencia de ADN, o bien de otra especie vegetal, empleando un programa Blast. La secuencia de nucleótidos ortóloga candidata obtenida de la especie vegetal concreta se emplea para la búsqueda de homología con todas las proteínas de *Arabidopsis* presentes en las bases de datos de ADN (por ejemplo, en NCBI o TAIR) empleando el método de búsqueda BlastX. Si el mejor acierto y puntuación se otorga a la proteína DMR6 de *Arabidopsis*, entonces puede decirse que la secuencia de ADN concreta es un ortólogo o una secuencia ortóloga.

55 La DMR6 es codificada por un único gen en *Arabidopsis*, tal como se deduce a partir de la secuencia del genoma completo que es pública. En el genoma del arroz se han identificado 3 ortólogos y en el álamo se han identificado 2 ortólogos. En la mayoría de las otras especies vegetales ensayadas hasta la fecha, DMR6 parece ser codificada por un único gen, según se determina mediante el análisis de las secuencias de ARNm y los datos de EST procedentes de bases de datos de ADN públicas. Los genes ortólogos y las proteínas se identifican en estas plantas mediante

comparaciones de nucleótidos y de aminoácidos con la información que está presente en bases de datos públicas.

Como alternativa, si no están disponibles secuencias de ADN para la especie vegetal deseada, las secuencias ortólogas se aíslan mediante hibridación heteróloga empleando sondas de ADN del gen *DMR6* de *Arabidopsis* u otra planta, o mediante métodos de PCR, empleando los 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 pueden emplearse para diseñar cebadores para después amplificar mediante PCR las secuencias genómicas o de ARNm completas para el análisis de la secuencia del ADN.

La figura 1 muestra las secuencias de *DMR6* ortólogas (descritas en la tabla 1) que han sido identificadas en bases de datos públicas y que se han obtenido mediante amplificación por PCR del ADNc y la posterior secuenciación. Después de haber identificado las secuencias ortólogas de *DMR6*, se identifica la secuencia de nucleótidos completa de la secuencia reguladora y codificadora del gen mediante técnicas de biología molecular convencionales. Para ello, se realiza una búsqueda en bancos genómicos 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*. Como alternativa, pueden emplearse métodos de PCR avanzados, tales como RACE mediada por ARN ligasa (RLM-RACE), para amplificar directamente las secuencias del gen y del ADNc a partir del ADN genómico o ARNm sometido a transcripción inversa. La secuenciación posterior del ADN da como resultado la caracterización del gen o la secuencia codificadora completos.

Tras conocer la secuencia de ADN del gen, esta información se emplea para preparar un medio para modular la expresión del gen *DMR6*.

Para lograr un nivel reducido de proteína de *DMR6*, la expresión del gen *DMR6* puede infrarregularse, o puede reducirse la actividad enzimática de la proteína *DMR6* mediante sustituciones de aminoácidos que son el resultado de cambios en nucleótidos en la secuencia codificadora de *DMR6*.

La infrarregulación de la expresión del gen *DMR6* puede lograrse mediante silenciamiento de genes empleando ARNi. Para ello, se generan plantas transgénicas que expresan una construcción antisentido de *DMR6*, una construcción de micro-ARN optimizada, una construcción de repetición invertida, o una construcción sentido-antisentido combinada, para generar un ARNbc que se corresponde con *DMR6* que conduce al silenciamiento de genes.

Uno o más reguladores del gen *DMR6* pueden ser infrarregulados (en el caso de activadores transcripcionales) por el ARNi.

Los reguladores pueden ser sobrerregulados (en el caso de proteínas represoras) por la sobreexpresión transgénica. En una realización concreta, la sobreexpresión se logra expresando proteínas represoras del gen *DMR6* de un promotor fuerte, por ejemplo, el promotor 35S que se emplea habitualmente en biotecnología vegetal.

La infrarregulación del gen *DMR6* también puede lograrse mediante mutagénesis de los elementos reguladores en el promotor, en la región del terminador o en intrones potenciales. En muchos casos, las mutaciones en la secuencia codificadora de *DMR6* conducen a sustituciones de aminoácidos o a codones de fin prematuros que afectan negativamente a la expresión o a la actividad de la proteína de *DMR6* codificada.

Estas mutaciones son inducidas en plantas mediante el empleo de productos químicos mutagénicos, tales como metansulfonato de etilo (EMS), mediante irradiación del material vegetal con rayos gamma o neutrones rápidos o mediante otros medios. Los cambios en los nucleótidos resultantes son aleatorios, pero, en una colección grande de plantas mutagenizadas, las mutaciones en el gen *DMR6* pueden identificarse con facilidad empleando el método de TILLING ("Targeting Induced Local Lesions IN Genomes", lesiones locales dirigidas e inducidas en genomas) (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 con PCR del gen de interés a partir de un ADN genómico de una colección grande de planta mutagenizadas en la generación M2. Mediante la secuenciación del ADN o la búsqueda de mutaciones puntuales empleando una nucleasa específica de una sola hebra, tal como la CEL-I nucleasa (Till *et al.* (2004), Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases, *Nucleic Acids Res.*, 32, 2632-2641), se identifican las plantas individuales que presentan una mutación en el gen de interés.

Mediante una búsqueda de muchas plantas se obtiene una colección grande de alelos mutantes, en los que cada uno produce un efecto diferente sobre la expresión del gen o la actividad enzimática. Los niveles de expresión de gen o de proteínas pueden ensayarse, por ejemplo, mediante el análisis de los niveles de transcritos de *DMR6* (por ejemplo, mediante RT-PCR) o mediante la cuantificación de los niveles de la proteína de *DMR6* con anticuerpos.

Las plantas con el nivel de *DMR6* o la expresión de *DMR6* reducidos deseados después se retrocruzan o se cruzan con otras líneas de reproducción para transferir solo el nuevo alelo deseado al trasfondo genético del cultivo deseado.

La presente invención demuestra que las plantas que tienen un nivel reducido o ausente del producto del gen *DMR6*

funcional muestran resistencia a patógenos, en particular de origen fúngico y oomiceto. Con este conocimiento, los expertos en la técnica pueden identificar variantes naturales, desconocidos hasta la fecha, de una especie vegetal concreta que poseen variantes del gen DMR6 que conducen a un nivel reducido o a la ausencia de una proteína de DMR6 funcional o a versiones mutadas de la proteína de DMR6.

5 Se describe el uso de un promotor de DMR6 para proporcionar resistencia a enfermedades a plantas, es decir, para proporcionar a las plantas una resistencia a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomiceto. Se ha demostrado la sobrerregulación transcripcional de DMR6 en respuesta a una infección por patógenos. Tanto el análisis de los transcritos como las líneas de promotor de DMR6-indicador apoyan este descubrimiento (véase el ejemplo 1, a continuación). Por tanto, el promotor de DMR6 inducible por patógenos según la invención resulta particularmente útil para controlar la expresión de sistemas inducibles que conducen a la resistencia de enfermedades en plantas.

10 Un ejemplo de dicho sistema inducible que conduce a la resistencia a enfermedades en plantas y en el que el promotor de DMR6 puede resultar eficaz se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 99/45125, en el que una secuencia de nucleótidos antisentido para un gen implicado en la regulación de la vía metabólica de la porfirina C-5 se une operablemente a un promotor inducible por patógenos y se emplea para transformar células vegetales. La expresión de la secuencia de nucleótidos antisentido en respuesta al patógeno altera de modo eficaz el metabolismo de porfirinas de la célula vegetal transformada y se desarrolla una lesión localizada en donde se contiene la dispersión del patógeno. El documento WO 96/36697 también describe sistemas inducibles que conducen a la resistencia a enfermedades en plantas, en los que un promotor inducible controla la expresión de una proteína capaz de evocar una respuesta de hipersensibilidad en una planta. El documento EP 0474857 describe además un método para la inducción de la resistencia a patógenos en plantas, que comprende transformar plantas con secuencias polinucleotídicas que codifican una pareja de un gen de avirulencia derivado de patógeno/gen de resistencia derivado de plantas, en el que la expresión de uno o ambos del péptido evocador y el gen de resistencia está regulada por un promotor inducible por patógenos. Se han descrito otros ejemplos de sistemas inducibles que conducen a la resistencia a patógenos en plantas, por ejemplo, en el documento WO 98/32325.

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

20 Se describen plantas resistentes a enfermedades que pueden obtenerse mediante dicho método, así como tejidos de la planta y semillas obtenidas de dichas plantas.

25 Se describen plantas que son resistentes a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomiceto, en las que la planta comprende, en su genoma, una construcción de ADN que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está unido operablemente a un promotor inducible por patógeno, en el que el promotor inducible por patógeno es un promotor de DMR6.

30 Se describe la construcción de ADN en sí misma, que comprende al menos un ácido nucleico expresable que está unido operablemente a un promotor inducible por patógeno, en el que el promotor inducible por patógeno es un promotor de DMR6. La construcción de la invención puede utilizarse para transformar células vegetales que pueden regenerarse en plantas transformadas. Además, pueden obtenerse tejidos y semillas de la planta transformada. Los métodos adecuados para introducir la construcción en células vegetales son conocidos por los expertos en la técnica.

35 Según la invención, "unido operablemente" significa que un promotor y un ácido nucleico expresable, por ejemplo, un gen, están conectados de tal forma que se permite el inicio de la transcripción del ácido nucleico expresable (por ejemplo, un gen) por el promotor.

40 Un "ácido nucleico expresable" significa un ácido nucleico (por ejemplo, un gen o parte de un gen) que puede expresarse en la célula, es decir, que puede transcribirse en ARNm y que, en último término, puede traducirse en una proteína. El ácido nucleico expresable puede ser ADN genómico, ADNc, o ADN sintetizado de modo químico o cualquiera de sus combinaciones.

45 Una construcción de ADN comprende todos los elementos de ácido nucleico necesarios que permiten la expresión (es decir, la transcripción) de un ácido nucleico concreto en una célula. Generalmente, la construcción incluye un ácido nucleico expresable, es decir, un ácido nucleico que se va a transcribir, y un promotor. La construcción puede incorporarse de modo adecuado, por ejemplo, en un plásmido o vector.

50 El ácido nucleico expresable preferiblemente es un gen implicado en la respuesta de defensa de una planta, por ejemplo, un gen asociado con la respuesta de hipersensibilidad de una planta. En la respuesta de hipersensibilidad ("hypersensitivity response", HR) de una planta, el sitio en la planta que invade el patógeno sufre una muerte celular localizada debido a la expresión inducida de un mecanismo suicida que activa dicha muerte celular localizada en

respuesta a los patógenos. De esta forma, solo se sacrifican unan pocas células de la planta y se detiene la dispersión del patógeno de modo eficaz. Los ejemplos de dichos genes implicados en la respuesta de defensa de una planta son la proteína reguladora NPR1/NIM1 (Friedrich *et al.*, Mol. Plant Microbe Interact., 14(9):1114-1124,2001) y el factor de transcripción MYB30 (Vailleau *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(15):10179-10184, 2002).

El ácido nucleico expresable puede codificar un polipéptido autólogo o heterólogo capaz de conferir resistencia a una enfermedad a una planta. Un "polipéptido autólogo" significa cualquier polipéptido que se expresa en una célula vegetal transformada a partir de un gen que aparece en la naturaleza en la célula vegetal transformada. Un "polipéptido heterólogo" significa cualquier polipéptido que se expresa en una célula vegetal transformada a partir de un gen que es parcial o totalmente extraño (es decir, no aparece en la naturaleza) para la célula vegetal transformada. Los ejemplos de dichos polipéptidos son la proteína Bax de mamífero, que codifica una proteína proapoptótica y que produce la muerte celular en plantas (Lacomme y Santa Cruz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(14):7956-7961, 1999) y las quitinasas fúngicas (de las Mercedes Dana *et al.*, Plant Physiol., 142(2):722-730, 2006).

El promotor de DMR6 puede ser el promotor de DMR6 de *Arabidopsis*. El promotor de DMR6 comprende una región de 3000 pb que se encuentra cadena arriba de la secuencia codificadora de *DMR6* de *Arabidopsis* (codón de inicio ATG) e incluye la 5'UTR. Preferiblemente, el promotor de DMR6 comprende una secuencia de nucleótidos según se define en la figura 11 y/o cualquiera de sus fragmentos funcionales, es decir, cualquier fragmento (o parte) de dicha secuencia que aún es capaz de iniciar la transcripción del ácido o ácidos nucleicos expresables a los cuales está unido operablemente y/o sus variantes naturales, es decir, los variantes naturales de este promotor que pueden contener pequeños polimorfismos pero que, en general, son al menos 90% idénticos.

El promotor de DMR6 puede ser un promotor de DMR6 ortólogo, es decir, un promotor de un gen DMR6 ortólogo. Los métodos para identificar ortólogos de DMR6 se han descrito en el ejemplo 2 que aparece a continuación. Tras haber identificado los ortólogos de DMR6, los expertos en la técnica serán capaces de aislar el respectivo promotor de dichos ortólogos empleando técnicas de biología molecular convencionales.

Se ha demostrado que el promotor de DMR6 es fuertemente inducido por patógenos y que el promotor de DMR6 no se expresa en gran medida en otros tejidos no infectados. Así, resulta un promotor muy adecuado para su uso en sistemas inducibles para proporcionar resistencia a patógenos de origen vírico, bacteriano, fúngico u oomiceto en plantas. Los ejemplos específicos de patógenos y plantas en las que puede emplearse de modo adecuado el sistema inducible empleando el promotor de DMR6 se han indicado anteriormente.

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

La tabla 1 muestra los números de registro de Genbank y los 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 utilizados en la clonación basada en mapas de DMR6.

La tabla 3 muestra parejas de cebadores para la clonación de ortólogos de *dmr6* en un vector de expresión en plantas adecuado.

La figura 1 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína de DMR6 de *Arabidopsis thaliana* y ortólogos 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*, empleando el programa de alineamiento de múltiples secuencias CLUSTAL W (1.83) (EBI). Por debajo de las secuencias, los aminoácidos conservados se indican mediante puntos, y los aminoácidos idénticos se indican mediante asteriscos.

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

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

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

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

La figura 6 muestra la resistencia al mildiu de los mutantes *dmr6* de *Arabidopsis*. (a) Cuantificación de los

5 esporangióforos del aislado de *H. parasitica* Waco9, 7 días después de la inoculación, en el mutante *dmr6-1* (BC₂, línea E37) comparado con su línea parental *Ler eds1-2*, y en el mutante *dmr6-2* (línea de ADN-T FLAG_445009) comparado con su línea parental *Ws-4*. (b) Restablecimiento 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 la plántula en *Ler eds1-2*, *dmr6-1* y 5 líneas de complementación (n.^{os} 121, 122, 211, 231, y 241).

La figura 7 muestra la estructura del gen *DMR6* de *Arabidopsis* y las mutaciones *dmr6-1* y *dmr6-2* mutations. El gen *DMR6* contiene cuatro exones y una secuencia codificadora de 1026 bases. Se indican los dos alelos: *dmr6-1* con un cambio de base en el exón 2, y *dmr6-2* con una inserción de ADN-T en el intrón 2.

10 La figura 8 muestra los niveles relativos de transcritos de *DMR6* en plantas *Ler* tratadas de modo simulado o inoculadas con un aislado de *H. parasitica* compatible o incompatible. Los niveles de transcritos se determinaron en diferentes días después de la inoculación. La diferencia en los valores umbral de ciclo (Δ CT) refleja el número de ciclos de amplificación de PCR adicionales requeridos para alcanzar una concentración umbral de producto arbitraria comparado con *ACTIN2*. Un valor menor de Δ CT indica un mayor nivel de transcritos.

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

20 La figura 10 muestra el análisis de Q-PCR de los niveles de transcritos de los genes: At4g14365, At1g14880, *ACD6*, *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*, seleccionados por aparecer sobrerregulados en el análisis de micromatrices de *dmr6-1*. (a) Niveles de transcripción de seis genes en *dmr6-1* comparados con *Ler eds1-2* y además el transcrito de *DMR6*. (b) Mayor número de transcritos génicos de seis genes asociados con la defensa en *dmr6-2* frente a *Ws-4*. Δ CT refleja el número de ciclos de amplificación de PCR adicionales requeridos para alcanzar el nivel de transcritos de *ACTIN2*. Un valor menor de Δ CT indica un mayor nivel de transcritos.

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

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

30 La figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada del ortólogo de *DMR6* de *Nicotiana benthamiana*, respectivamente.

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

Ejemplo 1: El gen *DMR6* de *Arabidopsis* (At5g24530) es necesario para la susceptibilidad al mildiu

35 Procedimientos experimentales

Crecimiento e infección de Hyaloperonospora parasitica

40 El aislado Waco9 de *H. parasitica* fue proporcionado por Dr. M. Aarts (WUR, Wageningen, Países Bajos) y el aislado Cala2 fue proporcionado por Dr. E. Holub (Warwick HRI, Wellesbourne, Reino Unido) y se mantuvieron en *Arabidopsis* *Ws-0* y *Ler*, respectivamente. Se trasladaron semanalmente inóculos (400.000 esporas por ml) a plántulas sanas de 10 días de edad (Holub, E. B. *et al.*, Mol. Plant Microbe Interact., 7: 223-239, 1994) utilizando una pistola de pulverización. Las plántulas se secaron al aire durante aproximadamente 45 minutos y se incubaron bajo una tapa sellada a 100% de humedad relativa en una cámara de crecimiento a 16 °C con 9 horas de luz diarias (100 mE/m²/s). Se cuantificaron los niveles de esporulación 7 días después de la inoculación ("days post inoculation", dpi) contando el número de esporangióforos por plántula, para al menos 40 plántulas por línea ensayada (figura 6a) o aislando esporas en agua 5 dpi y determinando la concentración de esporas para obtener el número por mg de tejido foliar (figura 6b).

Generación de líneas dmr6 retrocruzadas

50 Los mutantes *dmr6* fueron retrocruzados dos veces (BC₂) con la línea parental *Ler eds1-2*, así como *Ler*. Las líneas BC₂ generadas con *Ler* se seleccionaron para la presencia del gen *EDS1* de tipo salvaje mediante un análisis de PCR.

Clonación de DMR6

Se realizó un cartografiado preciso del gen *dmr6* con marcadores de PCR diseñados empleando la base de datos Cereon para identificar las diferencias de inserción y delección (IND) entre Col-0 y *Ler*. Se emplearon 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 e IND_F21J6 en el gen At5G25270 para el cartografiado (tabla 2). Se inició una búsqueda adicional de nuevos recombinantes en 300 plantas F₂ que produjo ocho plantas recombinantes F₂ entre los dos marcadores basados en IND_MOP9 e IND_T4C12, que flanquean una región de 61 genes. Siete marcadores adicionales (M450-M590; tabla 2) reducen la región a dieciocho genes candidatos para el locus de *dmr6*, entre At5g24420 y At5g24590. El análisis de la secuencia de At5g24530 indica una mutación puntual que conduce a un codón de fin en el exón 2 en el mutante *dmr6-1*.

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

Se identificó un segundo alelo de *dmr6*, 445D09, una línea de inserción de ADN-T FLAG generada por INRA Versailles en el trasfondo genético del número de registro Ws-4. La inserción del ADN-T se confirmó mediante PCR empleando un cebador diseñado en el gen At5g24530, cebador LP (5'-caggtttatggcatatctcacgctc-3'), en combinación con el cebador del límite derecho del ADN-T, Marcador3' (5'-tgataccagacgtgccccgataa-3') o RB4 (5'-tcacgggtgggtttctacaggac-3'). La inserción exacta del ADN-T en el segundo intrón de At5g24530 se confirmó mediante la secuenciación de amplicones generados con los cebadores de ADN-T del límite izquierdo y derecho en combinación con los cebadores específicos de genes LP o RP (5'-atgtccaagtcataagccacaag-3').

Síntesis de ADNc

Se aisló el ARN (a partir de aproximadamente 100 mg de tejido foliar procedente de plántulas de 10 días de edad) con el kit RNeasy (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y se trató con el kit RNase-free DNase (Qiagen). Se cuantificó el ARN total empleando un espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japón). El ADNc se sintetizó con transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y oligo(dT)15 (Promega, Madison, WI, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante.

Complementación del mutante *dmr6-1*

Se generaron líneas de complementación transformando plantas *dmr6* mediante el método de inmersión floral con *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998) que contenía el gen At5g24530 de Col-0 por detrás del promotor de 35S. La construcción se generó mediante amplificación con PCR de At5g24530 de longitud completa a partir del ADNc de Col-0 con cebadores que incluyen los sitios de restricción que se emplearon para la clonación direccional. Se generó un cebador directo (5'-tctgggtccaATGGCGGCAAAGCTGATATC-3') que contenía un sitio de restricción BamHI cerca del codón de inicio (ATG), amplificado en el extremo 5' de *DMR6* y, en el extremo 3' después del codón de fin, se generó un sitio EcoRI con un cebador inverso (5'-gatatatgaattcttagttgttagaaaattctcgaggc-3'). El 35S-*DMR6*-Tn se clonó en pGreenII0229 (Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., y 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 plántulas resistentes a DL-fosfotricina 300 µM (BASTA) y se analizaron para la susceptibilidad a *H. parasitica* y para los niveles de expresión de *DMR6* mediante RT-PCR.

Líneas inactivadas de *DMR6* con ARNi

Se generaron líneas de ARNi sobre el trasfondo genético 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 realizó con la ADN polimerasa Phusion (2 U/µl) y dos combinaciones diferentes de cebadores. El amplicón de la primera combinación de cebadores específica del gen *DMR6* (RNAiDMR6F: 5'-aaaagcaggctGACCGTCCACGTCTCTCTGAA-3' y RNAiDMR6R: 5'-AGAAAGCTGGGTGAAACGATGCGACCGATAGTC-3') se empleó como molde para la segunda amplificación de PCR con cebadores generales que permiten la recombinación en el vector pDONR7 del sistema de clonación GateWay. Para la segunda PCR se emplearon 10 µl de la primera PCR (desnaturalización durante 30 sg a 98 °C, seguida de 10 ciclos de: 10 sg a 98 °C; 30 sg a 58 °C; 30 sg a 72 °C) en un volumen total de 20 µl como molde. La segunda PCR (desnaturalización durante 30 sg a 98 °C, seguida de 5 ciclos de: 10 sg a 98 °C; 30 sg a 45 °C; 30 sg a 72 °C y 20 ciclos de 10 sg a 98 °C; 30 sg a 55 °C; 30 sg a 72 °C, finalizando con una extensión final de 10 min a 72 °C) con attB1 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') y attB2 (5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt-3') se realizó en un volumen de reacción de 50 µl. El producto de la PCR se purificó en gel, y 50 ng del inserto se recombinaron con 150 ng del vector pDONR7 con la enzima clonasa BP. El vector se transformó en células de *E. coli* DH5α electrocompetentes, y los plásmidos que contenían el inserto correcto se aislaron y se emplearon 100 ng de pDONR7 con el amplicón de *DMR6* en la reacción de LR para recombinar el inserto en dos direcciones opuestas en 150 ng del vector pHellsgate8. Después de la transformación en *E. coli* se seleccionaron los clones resistentes a espectomicina, y los plásmidos aislados se verificaron mediante una digestión con NotI para el tamaño correcto del inserto y mediante una PCR de colonia con un único cebador interno para At5G24530 (DfragmentoF: 5'-gagaagtgggttttaaataagaggaa-3'). Si los insertos habían sido insertados dos veces en direcciones opuestas puede detectarse un amplicón de 1420 pb. Los plásmidos pHellsgate8 correctos con el inserto doble en direcciones opuestas se transformaron en la cepa electrocompetente de *Agrobacterium* C58C1. Los plásmidos se aislaron de *Agrobacterium* y se volvieron a transformar en *E. coli* para confirmar el tamaño correcto del plásmido y del inserto mediante digestión con NotI. Las cepas de *Agrobacterium* reconfirmadas se emplearon para la transformación mediante inmersión floral de plantas Col-0 y *Ler eds1-2*. Las semillas desarrolladas se seleccionaron para la resistencia a kanamicina en placas 1/2x GM, las plántulas T₁ se trasladaron, y la siguiente generación de semillas T₂

se analizó para la expresión de DMR6 y la susceptibilidad a *H. parasitica*.

Perfil de expresión génica del mutante *dmr6*

El ARN total se aisló como se describió anteriormente. El ARNm se amplificó con el kit MessageAmp aRNA (Ambion). Se hibridaron portaobjetos de la matriz CATMA (Crowe *et al.*, 2003) que contenían aproximadamente 25.000 marcadores específicos de gen según 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 la PCR cuantitativa se generaron moldes de ADNc como se describió previamente. Se determinaron los umbrales de ciclo por transcripto por triplicado empleando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) empleando SYBR Green I (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) como tinte indicador. Los conjuntos de cebadores para los transcritos fueron *DMR6* (QDMR6F: 5'-TGTCATCAACATAGGTGACCAG-3' y QDMR6R: 5'-CGATAGTCACGGATTTTCTGTG-3'), At1g14880 (QAt1g14880F: 5'-CTCAAGGAGAATGGTCCACA-3' y QAt1g14880R: 5'-CGACTTGGCCAAATGTGATA-3'), At4g14365 (QAt4g14365F: 5'-TGGTTTTCTGAGGCATGTA-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'-GGTAGGGCAATTGTTCCCTTAGA-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'-GGTTCCACCATTGTTACACCT-3') y ACT-2 (QACT2F: 5'-AATCACAGCACTTGCACCA-3' y QACT2R: 5'-GAGGGAAGCAAGAATGGAAC-3') que generaron fragmentos de 100 pares de bases.

Resultados

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

Van Damme *et al.*, 2005, *supra*, describen un mutante *dmr6* que es resistente a *H. parasitica*. El nivel de resistencia puede estudiarse contando el número de esporangióforos por plántula siete días después de la inoculación con *H. parasitica* (aislado Waco9 o Cala2, que pueden obtenerse de Dr. G. Van den Ackerveken, Plant-Microbe Interactions Group, University of Utrecht, Utrecht, Países Bajos). La línea parental, *Ler eds1-2* (Parker *et al.*, 1996, Plant Cell, 8:2033-2046), que es muy susceptible, se emplea como control positivo (y se considera 100%).

La reducción en la formación de esporangióforos en los mutantes *dmr6* infectados comparados con las plántulas de las líneas parentales se muestra en la figura 6a, en la que se muestran los resultados de la cuantificación de *Hyaloperonospora parasitica*, la esporulación de Waco9 (esporangióforos/plántula) en el mutante *dmr6-1* resistente al mildiu, retrocruzado dos veces con la línea parental *Ler eds1-2*, y en el mutante *dmr6-2* (línea de ADN-T FLAG-445009), comparado con las líneas control.

Según la invención, el gen responsable de la resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr6* de van Damme *et al.*, 2005, *supra*, ha sido clonado mediante una combinación de cartografiado y secuenciación de los genes candidatos. Previamente, la mutación *dmr6* recesiva se cartografió cerca del marcador nga139 en el cromosoma 5 en una región que incluye 74 genes. Un cartografiado preciso conecta el locus de *dmr6* con un intervalo de cartografiado que contiene los BAC T13K7 y K18P6 entre los marcadores At5g24420 y At5g24590 localizados en los correspondientes genes. Esto permite que el intervalo de *dmr6* esté confinado dentro de una región de 18 genes candidatos. El análisis comparativo de secuencias de los 18 genes en *dmr6* y la línea parental *Ler eds1-2* reveló una mutación puntual en el segundo axón del gen At5g24530. Este único cambio de base de G a A, típico para una mutación EMS, cambia un TGG (un codón *trp*) a un TGA (codón de fin prematuro) en la posición de nucleótido 691 de la secuencia codificadora (figura 7). El codón de fin temprano trunca la enzima oxidoreductasa predicha de 342 aa en la posición 141 antes del dominio catalítico conservado, lo cual sugiere que *dmr6* es un alelo nulo. Se predice que la secuencia codificadora de At5g24530 (figura 2) codifica una proteína con una masa de 39,4 kDa. Hasta la fecha no se ha descrito ningún papel biológico para At5g24530.

At5g24530 es DMR6

Se identificó un segundo alelo, *dmr6-2*, en la línea de inserción de ADN-T (FLAG_445D09) a partir de la colección de mutantes de INRA, Versailles. La presencia y la localización del inserto de ADN-T en el segundo intrón de At5g24530 (figura 7) fue confirmada mediante PCR y el análisis de la secuencia (los datos no se muestran). La progenie de la línea Flag_445D09 homocigótica para la inserción de ADN-T fue resistente a *H. parasitica*, aislado Waco9, mientras que la línea parental (Ws-4) resultó susceptible (figura 6a). El transcrito de At5g24530 puede amplificarse mediante RT-PCR utilizando los cebadores en el exón 2 y 3 en Ws-4, pero no en la línea *dmr6-2* homocigótica (los datos no se muestran), lo cual indica que *dmr6-2* puede considerarse un segundo alelo nulo.

Para corroborar la idea de que At5g24530 es necesario para la susceptibilidad a *H. parasitica*, el mutante *dmr6-1* se transformó con el ADNc de At5g24530 clonado bajo el control del promotor de 35S. En cinco plántulas T₂ *dmr6-1* independientes, la fuerte sobreexpresión de At5g24530 fue confirmada mediante RT-PCR (los datos no se muestran). Todas las líneas T₃, homocigóticas para el transgén, mostraron restablecimiento de la susceptibilidad a *H. parasitica*, aislado Cala2 (figura 6b), lo cual confirma que At5g24530 es DMR6. La complementación, junto con la

identificación de dos mutantes *dmr6* independientes claramente indica que es necesario un gen *DMR6* funcional para la susceptibilidad a *H. parasitica*.

DMR6 se activa transcripcionalmente durante una infección por H. parasitica

5 Para estudiar la expresión de *DMR6* durante una infección por *H. parasitica* se midieron los niveles relativos de transcritos mediante PCR cuantitativa en seis momentos diferentes desde el día 0 (2 horas) después de la inoculación en el día 5 después de la inoculación ("days post inoculation", dpi) (figura 8). Se aisló el ARN de plántulas *Ler* de diez días de edad que había sido inoculados con pulverización de agua (simulación), y aislado compatible o incompatible de *H. parasitica*. A las 2 horas después de la inoculación (0 dpi), los niveles de transcritos de *DMR6* fueron iguales en los diferentes tratamientos. Comenzando desde 1 dpi, el nivel de transcritos de *DMR6* aumentó significativamente en la interacción compatible e incompatible comparado con las plántulas tratadas de modo simulado. El nivel de transcritos de *DMR6* fue ligera pero significativamente mayor a 1 dpi en la interacción incompatible (Δ CT de 3,5, inducción en aproximadamente 11 veces) que en la interacción compatible (Δ CT de 3,0, inducción de aproximadamente 8 veces). El nivel de expresión aumenta aún más a lo largo del tiempo para alcanzar un nivel alto estable a 4-5 dpi. En estos momentos, el nivel de transcritos de *DMR6* fue mayor en la interacción compatible que en la interacción incompatible. Los elevados niveles de transcritos de *DMR6* durante las interacciones compatibles e incompatibles de *H. parasitica* sugieren un papel de *DMR6* en la defensa de la planta. La expresión asociada a la defensa de *DMR6* puede confirmarse en los tres mutantes de los inventores potenciados para la defensa, *dmr3*, *dmr4*, y *dmr5* (Van den Ackerveken *et al.*, no publicado). Además, el análisis informático de los niveles de *DMR6* con Genevestigator Mutant Surveyor (Zimmermann, P., Hennig, L., y Gruissem, W. (2005), Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator, Trends Plant Sci., 10,407-409) demostró que el gen está fuertemente inducido en los mutantes resistentes a patógenos *mpk4* y *cpr5*. En el mutante doble *cpr5/npr1*, el nivel de transcritos de *DMR6* permanece alto, lo cual indica que la inducción de la expresión de *DMR6* es fundamentalmente independiente de *NPR1*. El ácido salicílico parece ser una importante señal en la inducción de la expresión de *DMR6* durante la senescencia, puesto que las plantas transgénicas *nahG* (que expresan el gen de salicilato hidroxilasa bacteriano) muestran solo niveles bajos de transcritos de *DMR6*.

30 Para investigar con más detalle el modo en que la expresión de *DMR6* es activada durante un estrés biótico y abiótico se generaron líneas indicadoras de *DMR6*. Se estudió la localización de la expresión de *DMR6* en plantas transgénicas *Col-0* y *Ler eds1-2* que contenían el promotor de *DMR6* unido al gen indicador *uidA* (β -glucuronidasa, GUS) (*pDMR6::GUS*). Para visualizar el crecimiento de las hifas de *H. parasitica* mediante tinción con azul de tripano, así como la actividad GUS, se empleó magenta-Xgluc como sustrato de la β -glucuronidasa, que produce un precipitado de color magenta. En plantas no infectadas no puede detectarse expresión de GUS en los diferentes orgánulos de la planta: raíces, meristemo, flores, polen y semillas. La expresión de *DMR6* resultó inducida en las interacciones compatibles de *Ler eds1-2* infectada con *Cala2* (figura 9a) y *Col-0* infectada con el aislado *Waco9* (figura 9b). La expresión de GUS también resultó inducida en la interacción incompatible de *Ler eds1-2* inoculada con el aislado *Emoy2* (figura 9c). Tal como se muestra en las figuras 9a y 9b, la expresión de *DMR6* está confinada a las células en las que *H. parasitica* ha formado haustorios. Las células de la planta que contienen los haustorios formados más recientemente no muestran niveles detectables de actividad GUS (figura 9a, indicado por asteriscos). Durante la interacción incompatible (figura 9c), la actividad del promotor de *DMR6* solo puede detectarse en las células que estaban en contacto con las hifas invasoras iniciales. En las células muertas, que resultan de la respuesta de hipersensibilidad (HR, visualizadas mediante tinción con azul de tripano indicadas en la figura 9c por un asterisco) no se pudo detectar actividad GUS, probablemente debido a la degradación de las proteínas en estas células. Para ensayar si la expresión de *DMR6* en células que contienen haustorios está provocada por una respuesta de tipo herida, se hirieron plántulas mediante una incisión con tijeras y se tiñeron para determinar la actividad GUS tres días después. No se observó expresión del promotor de *DMR6* de GUS, lo cual indica que la expresión de *DMR6* no es inducida por las heridas (figura 9d). Además, la inducción local de la expresión de *DMR6* se ensayó en respuesta al tratamiento con benzotiadiazol (BTH), un análogo funcional del ácido salicílico (SA). A los 3 días después del tratamiento con BTH, la actividad GUS se localizaba principalmente en las hojas recién formadas, pero no en las hojas maduras (figura 9e). El análisis de las líneas *pDMR6::GUS* confirma los datos de expresión descritos anteriormente y enfatiza la inducción estrictamente localizada de *DMR6* en respuesta a una infección por *H. parasitica*.

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

55 Para aclarar el modo en que la carencia de *DMR6* da como resultado una resistencia a *H. parasitica*, se analizó el transcriptoma del mutante *dmr6-1* comparado con la línea parental *Ler eds1-2*. Se hibridaron sondas derivadas del ARNm de las partes epigeas de plántulas de 14 días de edad de *dmr6-1* y *Ler eds1-2* con micromatrices del genoma completo de CATMA. Se descubrió que un total de 58 genes eran significativamente expresados diferencialmente en *dmr6-1*, de los cuales 51 genes tienen unos niveles elevados de transcritos y 7 genes tienen unos niveles reducidos de transcritos. Se ha identificado un conjunto pronunciado de 51 transcritos inducidos como genes asociados con respuestas activadas de defensa de la planta, por ejemplo, ACD6, PR-5, PR-4/HEL y PAD4. Estos datos indican que la falta de *DMR6* da como resultado la activación de un conjunto específico de transcritos asociados a la defensa. El descubrimiento de que *DMR6* está entre los genes inducidos por *dmr6-1* corrobora la idea de que *DMR6* está asociado a la defensa. Para determinar si la expresión inducida de los genes asociados a la defensa es debida a la falta de *DMR6* y no a mutaciones de etanmetilsulfonato (EMS) adicionales que permanecen en el mutante

retrocruzado *dmr6-1*, se verificó el nivel de transcritos de una selección de genes (At4g14365, At1g14880, *ACD6*, *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*) mediante una PCR cuantitativa en los mutantes *dmr6-1* y *dmr6-2* (figura 10). Solo se pudo ensayar los niveles de transcritos de *DMR6* en el mutante *dmr6-1* (figura 10a), puesto que el mutante *dmr6-2* (figura 10b) posee una inserción de ADN_T que altera el transcrito de *DMR6*. La inducción de *DMR6*, tal como se observa en el análisis de micromatrices, se confirmó mediante Q-PCR en *dmr6-1* comparado con *Ler eds1-2* (figura 10a). Las figuras 10a y b demuestran que los seis genes seleccionados se encuentran a niveles elevados en ambos mutantes *dmr6*, comparado con las líneas parentales. La elevada expresión observada de los genes asociados con la defensa seleccionados en los mutantes *dmr6* indica que la falta de *DMR6* activa una respuesta de defensa de la planta. La activación de este conjunto de transcritos asociados con la defensa puede ser la causa principal de la resistencia a *H. parasitica* en los mutantes *dmr6*.

Ejemplo 2: Identificación de los ortólogos de DMR6 en cultivos

1. Selección de bancos basándose en la homología de secuencia

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la secuencia codificadora de DMR6 y la secuencia de proteína de *Arabidopsis thaliana* se muestran en la figura 2. Se compararon bancos públicos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos con las secuencias de la figura 2. Esta comparación produjo la identificación de las secuencias codificadoras completas de DMR6 y las secuencias de aminoácidos predichas 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 la secuencia de las proteínas ortólogas identificadas de este modo se ofrece en la tabla 1 y se visualiza en un alineamiento múltiple en la figura 1. Para muchas otras especies de plantas pueden identificarse fragmentos de ADN ortólogos mediante BlastX como mejores aciertos recíprocos con la secuencias de proteína de DMR6 de *Arabidopsis* o de otra planta.

2. Identificación de los ortólogos mediante hibridación heteróloga

La secuencia de ADN de DMR6 de *Arabidopsis thaliana*, tal como se muestra en la figura 2, se emplea como sonda para buscar secuencias homólogas mediante hibridación con el ADN de cualquier especie vegetal empleando métodos convencionales de la biología molecular. Empleando este método se detectan genes ortólogos mediante hibridación Southern con ADN digerido con enzimas de restricción o mediante hibridación con bancos genómicos o de ADNc. Estas técnicas son muy conocidas por los expertos en la técnica. Como sonda alternativa, puede emplearse la secuencia de ADN de DMR6 de cualquier otra especie vegetal que tenga un parentesco más cercano.

3. Identificación de los ortólogos mediante PCR

Para muchas especies de cultivos están disponibles secuencias parciales de ARNm o génicas de DMR6 que se emplean para diseñar cebadores para después amplificar mediante PCR la secuencia genómica o de ADNc completa. Cuando están disponibles las secuencias 5' y 3', la secuencia interna que falta se amplifica mediante PCR con un cebador 5' directo y un cebador 3' inverso específicos de DMR6. En los casos en que solo están disponibles secuencias 5', internas o 3', se diseñan cebadores directos e inversos. En combinación con cebadores de policonectores de plásmidos disponibles, los insertos se amplifican a partir de bancos genómicos y de ADNc de la especie vegetal de interés. De una forma similar, las secuencias 5' o 3' que faltan se amplifican mediante técnicas de PCR avanzadas: 5'RACE, 3' RACE, TAIL-PCR, RLM-RACE o vectorette PCR.

Como ejemplo se proporciona la secuenciación del ADNc de DMR6 de *Lactuca sativa* (lechuga). A partir de la base de datos Genbank EST en el NCBI se identificaron varios EST de DMR6 de *Lactuca* empleando la herramienta tblastn comenzando a partir de la secuencia de aminoácidos de DMR6 de *Arabidopsis*. El agrupamiento y el alineamiento de los EST produjeron una secuencia consenso para un fragmento 5' de DMR6. Para obtener el ADNc completo de DMR6 de lechuga se empleó el kit RLM-RACE (Ambion) con ARNm de plántulas de lechuga. Las secuencias 3' de ARNm se obtuvo empleando dos cebadores que fueron diseñados en la secuencia consenso 5' de DMR6 derivada de EST (Lsat_dmr6_fw1: CGATCAAGGTCAACACATGG, y Lsat_dmr6_fw2: TCAACCATTACCCAGTGTGC) y los cebadores 3'RACE del kit. Basándose en la secuencia ensamblada se diseñaron nuevos cebadores para amplificar la secuencia codificadora completa de DMR6 a partir del ADNc para proporcionar la secuencia de nucleótidos y la secuencia de proteína derivada presentadas en la figura 3.

Se han identificado las secuencias codificadoras completas de DMR6 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 cebadores oligonucleotídicos degenerados (para los nucleótidos degenerados, se emplean las abreviaturas según los símbolos de nucleótidos de IUB que son los códigos convencionales empleados por todas las empresas 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 de ADNc de DMR6 internas de una especie vegetal concreta es el siguiente:

1. Se aísla el ARNm empleando métodos convencionales.
2. Se sintetiza el ADNc empleando un cebador dT oligonucleotídico y métodos convencionales.
3. Empleando oligonucleótidos directos e inversos degenerados se realiza una reacción de PCR.
4. Se separan los fragmentos de la PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa convencional y se aíslan del gel los fragmentos con el tamaño esperado.
5. Los fragmentos de la PCR aislados se clonan en un vector plasmídico empleando métodos convencionales.
6. Los plásmidos con los tamaños de inserto correctos, según se determina mediante PCR, se analizan mediante secuenciación de ADN.
7. El análisis de la secuencia empleando blastX revela los fragmentos que contienen las secuencias de DMR6 internas correctas.
8. La secuencia de ADN interna después puede emplearse para diseñar cebadores específicos de gen y de especie para 5' y 3' RACE para obtener la secuencia codificadora completa de DMR6 mediante RLM-RACE (tal como se describió anteriormente).

Como ejemplo, se proporciona la secuenciación del ADNc de DMR6 de *Cucumis sativus* (pepino). Para el pepino, varias combinaciones de cebadores seleccionados entre los siguientes cebadores tuvieron éxito en la amplificación de un tramo de la 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 (AGTGCATTGGGTCHGTRTG), dmr6_deg_rv4 (AATGTTTRATGACAAARGCAT) y dmr6_deg_rv5 (GCCATRTGYTGYCCTTGTYTC). Después de la clonación y la secuenciación de los fragmentos amplificados se diseñaron cebadores específicos de 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: GGCCTCCAAGTCTCAAG). Por último, la secuencia de ADNc de DMR6 de pepino completa se amplificó y se secuenció (figura 5). Se empleó una estrategia similar para la espinaca, *Spinacia oleracea* (figura 4), *Solanum lycopersicum* (figura 12) y *Nicotiana benthamiana* (figura 13).

Los ortólogos identificados según se describe en este ejemplo pueden modificarse empleando técnicas muy conocidas para inducir mutaciones que reducen la expresión o la actividad de DMR6 para obtener plantas no genéticamente modificadas resistentes a *Fungi* u *Oomycota*. Como alternativa, la información genética de los ortólogos puede emplearse para diseñar vehículos para el silenciamiento de genes y para transformar las correspondientes plantas de cultivo para obtener plantas que son resistentes a *Oomycota*.

Ejemplo 3: Mutación de semillas

Se tratan semillas de la especie vegetal de interés con un mutágeno para introducir mutaciones puntuales aleatorias en el genoma. Las plantas mutadas se cultivan para producir semillas y la siguiente generación se selecciona para la ausencia de reducción de actividad o de los niveles de transcritos de DMR6. Esto se logra controlando el nivel de la expresión del gen DMR6 o mediante la búsqueda de cambios en nucleótidos (mutaciones) mediante el método TILLING, mediante secuenciación de ADN o mediante cualquier otro método para identificar cambios en nucleótidos. Las plantas seleccionadas son homocigóticas o se hacen homocigóticas por autopolinización o inter cruzamiento. Las plantas homocigóticas seleccionadas con actividad del transcrito de DMR6 reducida o ausente se ensayan para la mayor resistencia al patógeno de interés para confirmar el aumento en la resistencia a la enfermedad.

Ejemplo 4: Transferencia de un alelo mutado al trasfondo genético de un cultivo deseado

La introgresión de un alelo mutante deseado en un cultivo se logra mediante el cruzamiento y la selección genotípica del alelo mutante. Este es un procedimiento convencional en la reproducción asistida por marcadores actual de los cultivos.

Ejemplo 5: Uso del promotor de *DMR6* para la expresión de genes inducida por patógenos y la generación de plantas resistentes a enfermedades

El control preciso de la expresión de transgenes es crucial para la modificación de plantas con mayor resistencia a enfermedades. En el pasado, la sobreexpresión constitutiva de transgenes con frecuencia ha producido plantas de baja calidad. Por tanto, se ha sugerido utilizar promotores inducibles por patógenos, con los cuales los transgenes se expresan solo cuándo y dónde son necesarios: en los sitios de la infección.

La expresión local e inducible de genes modificados, por ejemplo, genes de activación maestra, genes evocadores o Avr, genes antimicrobianos o genes tóxicos, produce la activación de la defensa o la muerte celular que conducen a la resistencia al patógeno, tal como describen Gurr y Rushton (Trends in Biotechnology, 23:275-282, 2005). Un buen ejemplo es proporcionado por De wit (Annu. Rev. Phytopathol., 30:391-418, 1992) que propone el uso de la

combinación de Avr9-Cf9 para lograr la muerte celular inducida que conduce a la resistencia a la enfermedad. La especificidad de tejido y la inducibilidad de la expresión tienen una enorme importancia en estas estrategias, tal como describen Gurr y Rushton (Trends in Biotechnology, 23:283-290, 2005).

5 Según la presente invención, se ha demostrado que el promotor de DMR6 muestra una expresión fuerte, inducible y localizada basándose en el análisis de promotor-GUS. Por tanto, el promotor de DMR6 resulta muy adecuado para modificar la resistencia a enfermedades en plantas transgénicas. El promotor de DMR6 consiste en una región de 2,5 kb que se encuentra cadena arriba de la secuencia codificadora de DMR6 de *Arabidopsis* (codón de inicio ATG) e incluye la 5'UTR (según se muestra en la figura 11). Este promotor inducible por patógeno después se emplea para modificar construcciones de transgenes adecuadas empleando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

10 Con el uso de secuencias de ADN ortólogo procedente de especies vegetal concretas, se diseñan cebadores para la PCR. Estos entonces se emplean para la selección de bancos genómicos de la especie vegetal de interés para identificar los clones genómicos que contienen el ortólogo de DMR6 con sus secuencias de promotor y reguladoras. Como alternativa, los clones genómicos se aíslan mediante la selección de un banco con un fragmento de PCR marcado que se corresponde con el gen de DMR6 ortólogo. La secuenciación revela la secuencia de nucleótidos del promotor. La región de 2-5 kb cadena arriba de la secuencia codificadora del DMR6 ortólogo (codón de inicio ATG), que incluye la 5'UTR, después se amplifica mediante PCR para modificar las construcciones de transgenes para la transformación de plantas.

Ejemplo 6

20 Este ejemplo demuestra la complementación del mutante *dmr6-1* en *Arabidopsis thaliana* por los ortólogos de *DMR6* procedentes de 4 especies de cultivo diferentes. Para ello, se clonan ortólogos de *DMR6* de *Cucumis sativa* (Cs), *Spinacia oleracea* (So), *Lactuca sativa* (Ls) y *Solanum lycopersicum* (Sl) en un vector de expresión en plantas bajo el control del promotor 35S y, después, este vector se transforma en un mutante *dmr6-1* de *Arabidopsis thaliana*.

25 Brevemente, se aísla el ARNm empleando métodos convencionales y se sintetiza el ADNc empleando un cebador dT oligonucleotídico y métodos convencionales. Después se generan fragmentos de PCR empleando parejas de cebadores para cada cultivo, según se indica en la siguiente tabla 3. Los productos de la PCR generados se clonan en un vector pENTR/D-TOPO empleando el kit de clonación pENTR/D-TOPO de Invitrogen, y los plásmidos resultantes con los tamaños de inserto correctos, según se determina mediante PCR, se analizan mediante secuenciación de ADN. La recombinación con el vector pB7WG2,0 se realiza empleando LR clonasa II de Invitrogen, y los plásmidos resultantes se analizan mediante PCR y digestión con enzimas de restricción. Los plásmidos adecuados se transforman en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 PGV2260, y los plásmidos de *Agrobacterium* se analizan mediante PCR y digestión con enzimas de restricción.

30 Las plantas de *Arabidopsis thaliana* *dmr6-1* se transforman con las anteriores construcciones sumergiéndolas en una disolución de *Agrobacterium* y se verifica la sobreexpresión de los cultivos DMR6 en plantas T1 de *Arabidopsis* mediante RT-PCR utilizando los cultivos con los cebadores de clonación de DMR6 (tabla 3). Por último, plantas T2 y T3 de *Arabidopsis* fueron infectadas con *Hyaloperonospora parasitica* Cala2 para confirmar la complementación. Los resultados se muestran en la figura 14.

35 Tal como se muestra en la figura 14, todos los ortólogos de *DMR6* ensayados fueron capaces de complementar el mutante *dmr6-1* de *Arabidopsis thaliana*, lo cual indica que los ortólogos de DMR6 identificados codifican proteínas de DMR6 con una funcionalidad similar al DMR6 de *Arabidopsis thaliana*.

Tablas

45 La tabla 1 lista los números GI (identificador de GenInfo) y el número de registro de Genbank para los marcadores de secuencia expresados ("Expressed Sequence Tags", EST) y las secuencias de ARNm o de proteína del ARNm de DMR6 de *Arabidopsis* y secuencias ortólogas de otras especies vegetales. Un número GI (identificador de GenInfo, a veces escrito en minúsculas, "gi") es un número entero exclusivo que identifica una secuencia concreta. El número GI consiste en una serie de dígitos que se asignan consecutivamente a cada registro de secuencia procesada por NCBI. Por tanto, el número GI cambia cada vez que cambia la secuencia. El NCBI asigna números GI a todas las secuencias procesadas en Entrez, incluyendo las secuencias de nucleótidos de DDBJ/EMBL/GenBank, las secuencias de proteínas de SWISS-PROT, PIR y muchos otros. Por tanto, el número GI proporciona un identificador de secuencia exclusivo que es independiente de la base de datos original, que especifica una secuencia exacta. Si una secuencia en GenBank se modifica, incluso en un único par de bases, se asigna un nuevo número GI a la secuencia actualizada. El número de registro sigue siendo el mismo. El número GI siempre es estable y recuperable. Por tanto, la referencia a números GI en la tabla proporciona una identificación clara e inequívoca de la correspondiente secuencia.

55

ES 2 658 150 T3

Tabla 1

Especies	Nombre común	Detalle	Número GI	Genbank
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis</i>	ARNm	42568064	NM_122361
<i>Aquilegia sp.</i>	aguileña	EST	75461114	DT768847.1
			74538666	DT745001.1
			74562677	DT760187.1
			75461112	DT768846.1
			74562675	DT760186.1
<i>Citrus sinensis</i>	naranja dulce	EST	5793134	CX672037.1
			57933368	CX673829.1
			63078039	CX309185.1
<i>Coffea canephora</i>	café	EST	82485203	DV705375.1
			82458236	DV684837.1
			82461999	DV688600.1
			82487627	DV707799.1
<i>Gossypium hirsutum</i>	algodón	EST	109842586	DW241146.1
			48751103	CO081622.1
<i>Sorghum bicolor</i>	sorgo	EST	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 de rodaja	boceto de genoma		MtrDRAFT_AC119415g1v1
		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 2 658 150 T3

		proteína	115460102	NP_001053651
<i>Populus trichocarpa 1</i>	álamo	Genoma: LG-XII:3095392-3103694		
		proteína: Poptr1_1:569679, eugene3.00120332		
<i>Populus trichocarpa 2</i>	álamo	Genoma: LG_XV:201426-209590		
		proteína: Poptr1_1:732726, estExt_Genewise1_v1.C_LG_XV0083		
<i>Solanum lycopersicum 1</i>	tomate	EST	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	EST	47104686	BT013271.1
			14685038	BI207314.1
			14684816	BI207092.1
<i>Zea mays</i>	maíz	EST	110215403	EC897301.1
			76291496	DV031064.1
			91050479	EB160897.1
			91874282	EB404239.1
			110540753	EE044673.1
			78111856	DV530253.1
			94477588	EB706546.1
			71441483	DR822533.1
			78111699	DV530096.1

ES 2 658 150 T3

			78107139	DV525557.1
			76017449	DT944619.1
			91048249	EB158667.1
			78104908	DV523326.1
			78088214	DV516607.1
			76291495	DV031063.1
			71441482	DR822532.1
			78088213	DV516606.1
<i>Vitis vinifera</i>	vid	EST	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	EST	87108948	DY375732.1
			87095447	DY362231.1
			87095448	DY362232.1
			87094804	DY361588.1
			87095449	DY362233.1
			87094803	DY361587.1
<i>Lactuca sativa</i>	lechuga	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		
<i>Spinacia oleracea</i>	espinaca	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		
<i>Cucumis sativus</i>	pepino	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		
<i>Nicotiana benthamiana</i>	tabaco	Secuencia descrita en esta solicitud de patente		

ES 2 658 150 T3

Tabla 2 - Secuencias de cebadores de marcadores de inserción/delección (diferencia de tamaño entre paréntesis) empleados en el cartografiado y la clonación del gen DMR6

Nombre del cebador	Gen	INDEL/enzima	Cebador directo	Cebador inverso
IND_MOP9	At5G24210		ttgggaacagaaaaagt ggaggt	catattcaaaaggaaatcc caga
IND_K16H17	At5g24420		tggggttggtttattctgtg ac	tggccaatagtagtgatacgc aaga
IND_T4C12	At5g24820		tctcgggaagacacaagt cgagat	tattccaactgcgacgtagagc at
IND_T11H3	At5g24950-60		ccaattgggttattacttoga tt	cggctttaacaacatatattcca tt
IND_F21J6	At5g25270		aacacatcaccaagatga atccaga	cctctgccccaaagaatattga gat
M450	At5G24450	18	agcttgtatgtagtgccaa tga	gcggtatacgggggttaaaatc ta
M490	At5g24490	TaqI	atggccaaccactcttgta c	acaagcaagaagaacagcg aag
M525	At5g24520-30	TaqI	gaaattgggttggttcattta tc	tcaagatctcatattctattcca tc
M545	At5G24540/50	41	cagctgaagtagttcatcc cttt	cttgcaattgtgggactaggta a
M555	At5G24550/60	14	tcactaaccagtgaaaaag gltgc	tatacagcgaatagcaaagcc aag
M470	At5g24470	HphI	ccgagagtgtaataatctct cct	cagttaacgcatgaagtgcta gt
M590	At5g24590	Pdml	gcatcattgtaccgtactga gtc	tagtgatactctgtccctgagg t

5 Tabla 3 - Parejas de cebadores para la clonación de ortólogos de dmr6 en un vector de expresión en plantas adecuado

<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtDMR6_fw	CACCATGGCGGCAAAGCTGATA
	AtDMR6UTR_rv	GACAAACACAAAGGCCAAAGA
<i>Cucumis sativa</i>	cuc_fw	CACCATGAGCAGTGTGATGGAGAT
	cucUTR_rv	TGGGCCAAAAAGTTTATCCA
<i>Spinacia oleracea</i>	spi_fw	CACCATGGCAAACAAGATATTATCCA C
	spiUTR_rv	TTGCTGCCTACAAAAGTACAAA
<i>Lactuca sativa</i>	Leat_fw	CACCATGGCCGCAAAAGTCATCTC
	LsatUTR_rv	CATGGAAACACATATTCCTTCA

ES 2 658 150 T3

<i>Solanum lycopersicum</i>	Slyc1dmr6_fw	CACCATGGAAACCAAAGTTATTTCTA GC
	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 ENFERMEDADES

10 <130> 4/2MG91/24C

<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

30 ttctgggatc caatggcggc aaagcttgat atc 33

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

35 <220>
<223> cebador inverso

<400> 2

40 gatatatgaa ttcttagtg ttagaaaat tctcgaggc 39

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

50 <220>
<223> ARNiDMR6F

<400> 3

55 aaaagcagg ctgaccgtcc acgtctct gaa 33

60 <210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

ES 2 658 150 T3

<223> ARNiDMR6R
 <400> 4
 5 agaaagctgg gtgaaacgat gcgaccgata gtc 33
 <210> 5
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> attB1
 15 <400> 5
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct 29
 <210> 6
 20 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> attB2
 <400> 6
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt 29
 30 <210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador interno para At5G24530
 <400> 7
 40 gagaagtggg atttaaata gaggaa 26
 <210> 8
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> QDMR6F
 50 <400> 8
 tgtcatcaac atagtgacc ag 22
 55 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> QDMR6R
 <400> 9
 65 cgatagtcac ggatttctg tg 22

ES 2 658 150 T3

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> QAt1g114880F
 <400> 10
 10 ctcaaggaga atggtccaca 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> QAt1g14880R
 20 <400> 11
 cgacttgcc aaatgata 20
 25 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> QAt4g14365F
 <400> 12
 35 tggtttctg aggcataa a 21
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> QAtg14365R
 45 <400> 13
 agtcaggaa cattggtg 20
 50 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> QACD6F
 <400> 14
 60 tggacagttc tggagcagat 20
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

ES 2 658 150 T3

<223> QACD6R
 <400> 15
 5 caactcctcc gctgtgag 18
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> QPR-5F
 15 <400> 16
 ggcaaatac tccagtattc aca 23
 <210> 17
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> QPR-5R
 <400> 17
 ggtagggcaa ttgtcctta ga 22
 30 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> QPR-2F
 <400> 18
 40 aaggagctta gcctcaccac 20
 <210> 19
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> QPR-2R
 50 <400> 19
 gagggaagca agaatggaac 20
 55 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> QPR-1F
 <400> 20
 65 gaacacgtgc aatggagttt 20

ES 2 658 150 T3

<210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> QPR-1R
 <400> 21
 10 ggtccacca ttgtacacc t 21
 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> QACT2F
 20
 <400> 22
 aatcacagca cttgcacca 19
 25 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> QACT2R
 <400> 23
 35 gaggaagca agaatggaac 20
 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Lsat-dmr6-fw1
 45 <400> 24
 gatcaaggtc aacacatgg 19
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Lsat_dmr6_fw2
 55 <400> 25
 tcaaccatta cccagtgtgc 20
 60 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> dmr6-deg.fw1B
 <400> 26
 5 ttccaggtda ttaaycaygg 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> dmr6_deg_fw2B
 15 <400> 27
 cataaytgga grgaytayct 20
 <210> 28
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> dmr6_deg_fw3b
 <400> 28
 garcaaggrc arcayatggc 20
 30 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> dmr6_deg_fw4
 <400> 29
 40 aatcctcctt chttcaagga 20
 <210> 30
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> dmr6_deg_rv3B
 <400> 30
 agtgcattkg ggtchgtrtg 20
 55 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> dmr6_deg_rv4
 <400> 31
 65 aatgttratg acaaargcat 20

ES 2 658 150 T3

<210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> dmr6_deg_rv5
 <400> 32
 10 gccaatrgyt gyccttgytc 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Cuc-dmr6-rv1
 20
 <400> 33
 tccggacatt gaaactgtg 20
 25 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Cuc_dmr6_rv2
 <400> 34
 35 tcaaagaact gcttgccaac 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cuc-dmr6-fw1
 45 <400> 35
 cgcactcacc attctcttc 20
 <210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cuc_dmr6_fw2
 55 <400> 36
 ggctccaag tcctcaaag 19
 60 <210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65
 <220>

<223> IND_MOP9 Fw
 <400> 37
 5 tttgggaaca gaaaaagtg gaggt 25
 <210> 38
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> IND_MOP9 Rv
 15 <400> 38
 catattcaaa agggaaaatc ccaga 25
 <210> 39
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> IND_K16H17 Fw
 <400> 39
 30 tggggtgtg gtttattctg ttgac 25
 <210> 40
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> IND_K16H17 Rv
 <400> 40
 40 tggccaatag tagttgatac gcaaga 26
 <210> 41
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> IND_T4C12 Fw
 <400> 41
 tctcgggtaa gacacaagtc gagat 25
 55 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> IND_T4C12 Rv
 <400> 42
 65 tattccaact tgcgacgtag agcat 25

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

ES 2 658 150 T3

<223> M450 Rv
 <400> 48
 5 gcggtatacg ggggttaaaa tcta 24
 <210> 49
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> M490 Fw
 15 <400> 49
 atggccaacc actcttggtt ac 22
 <210> 50
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> M490 Rv
 <400> 50
 30 acaagcaaga agaacagcga ag 22
 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> M525 Fw
 <400> 51
 40 gaaattgggt tggggcatt tadc 24
 <210> 52
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> M525 Rv
 50 <400> 52
 tcaagatctt catattctca ttcca 25
 55 <210> 53
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> M545 Fw
 <400> 53
 65 cagctgaagt atgttcatc ccttt 25

ES 2 658 150 T3

5 <210> 54
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M545 Rv

<400> 54

10 cttgcaattg ttgggactag gtaa 24

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

<220>
<223> M555 Fw

20 <400> 55

tcactaacca gtgaaaaagg ttgc 24

25 <210> 56
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> M555 Rv

<400> 56

35 tatacagcga atagcaaagc caag 24

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

40 <220>
<223> M470 Fw

45 <400> 57

ccgcgagtgt aatatatctc tcct 24

50 <210> 58
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> M470 Rv

<400> 58

60 cagtttaacg catgaagtgc tagt 24

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

65 <220>

ES 2 658 150 T3

<223> M590 Fw
 <400> 59

5 gcatcattg taccgtactg agtc 24

<210> 60
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> M590 Rv

15 <400> 60

tagtggatac tctgtccctg aggt 24

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

20 <400> 61

25 atggcggcaa agctgatatc caccggtttc cgtcatacta ctttgccgga aaactatgtc 60
 cggccaatct ccgaccgtcc acgtctctct gaagtctctc aactcgaaga tttccctctc 120
 atcgatctct cttocactga tcgatctttt ctcatccaac aaatccacca agcttgtgcc 180
 cgattcggat tttttcaggt cataaatcac ggagttaaca aacaaataat agatgagatg 240
 gtgagtgttg cgcgtgagtt ctttagcatg tctatggaag aaaaaatgaa gctatattca 300
 gacgatccaa cgaagacaac aagattatcg acgagcttca atgtgaagaa agaagaagtc 360
 aacaattgga gagactatct aagactccat tgttatccta tccacaagta tgtcaatgag 420
 tggccgtcaa accctccttc tttcaaggaa atagtaagta aatacagtag agaagtaaga 480
 gaagtgggat ttaaaataga ggaattaata tcagagagct taggtttaga aaaagattac 540
 atgaagaaag tgcttggtga acaaggtcaa cacatggcag tcaactatta tcctccatgt 600
 cctgaacctg agctcactta cggtttacct gctcataccg acccaaacgc cctaaccatt 660
 cttcttcaag acaactactgt ttgcggtctc cagatcttga tcgacggtca gtggttcgcc 720
 gttaatccac atcctgatgc ttttgtcatc aacataggtg accagttaca ggcattaagt 780
 aatggagtat acaaaagtgt ttggcatcgc gctgtaacaa acacagaaaa tccgagacta 840
 tcggtcgcac cgtttctgtg cccagctgac tgtgctgtca tgagcccggc caagcccttg 900
 tgggaagctg aggacgatga aacgaaacca gtctacaaag atttcaacta tgcagagtat 960
 tacaagaagt tttggagttag gaatctggac caagaacatt gcctcgagaa ttttctaaac 1020
 aactaa 1026

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

30 <400> 62

ES 2 658 150 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 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

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

Asn Phe Leu Asn Asn
340

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

5

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val

<210> 64

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Citrus sinensis

<400> 64

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

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

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

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

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

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

ES 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn

<210> 65

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Coffea canephora

<400> 65

ES 2 658 150 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 2 658 150 T3

<210> 67
 <211> 342
 <212> PRT
 5 <213> Cucumis sativus

<400> 67

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 658 150 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

5

10

ES 2 658 150 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
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> Lactuca sativa

<400> 69

5

10

ES 2 658 150 T3

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

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

5

<400> 70

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

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

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

10

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

ES 2 658 150 T3

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asn

<210> 72

<211> 342

5 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 72

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

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

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

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

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

ES 2 658 150 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 2 658 150 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 2 658 150 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

5

<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

10

ES 2 658 150 T3

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

<210> 75

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 75

ES 2 658 150 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 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

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

Asn Lys

<210> 76

<211> 338

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 76

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Asn

<210> 77

<211> 337

<212> PRT

<213> Solanum lycopersicum

<400> 77

5

ES 2 658 150 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 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

Asn

<210> 78

<211> 342

5 <212> PRT

<213> Solanum lycopersicum

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 658 150 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 2 658 150 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 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

5

<400> 80
 atggcaaaca agatattatc caccggaatt ccttacaaaa ccctccccga aagctacatc 60
 cgacccgaaa atgagaggcc caacttatct caagtctccg attgcgagaa tgtccctggt 120
 attgacttgg gtgcaaaga 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
 tggccttcta accccccttc cttcaaggaa atagttagca agtacataaa agaagttagg 480
 gaacttggtt tcagagtcca agaactaata tcagagagtt tagggttgga gaaagattac 540
 ataaagaatg tcctaggaga tcaaggacaa cacatggctc ttaattatta ccctgagtgc 600
 ccggagccag agatgacata cggggtgccc ggtcactactg accctaagtc ccttaccatc 660
 cttctccaag acttgcaagt atctggcctt caaatTTTTA aggatggtaa atggcttgct 720
 gtcaaacctc aacctgatgc ttttgtcatt aacattggtg atcaattgca ggcattaagt 780
 aacggtatat acaagagtgt atggcacaga gcagttgtga acacagataa gccaaagatta 840
 tcagtagctt cattcctctg ccccgccaat gatgcggtga taagcgcgcc aacacctctg 900
 accgccaacg gatcaccggc tgtatataga gactatacgt atcctgagta ctacaagact 960
 10 ttctggagta ggaacttggg ccaagagcac tgcttgagc tttttaaaaa ccaaacttag 1020

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

15

<400> 81

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

20

ES 2 658 150 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 2 658 150 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.

5

<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

10

ES 2 658 150 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 2 658 150 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 2 658 150 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 2 658 150 T3

180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 85
- <211> 22
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> cebador directo AtDMR6_fw
- <400> 85
- caccatggcg gcaaagctga ta 22
- 15 <210> 86
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 20 <220>
- <223> cebador inverso AtDMR6UTR_rv
- <400> 86
- 25 gacaaacaca aaggccaag a 21
- <210> 87
- <211> 24
- <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo cuc_fw
 5 <400> 87
 caccatgagc 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
 <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
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso LsatUTR_rv
 65 <400> 92

ES 2 658 150 T3

catggaaca catattcctt ca 22

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

10 <220>
 <223> cebador directo Slyc1dmr6_fw

<400> 93

15 caccatggaa accaaagtta ttctagc 28

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

20 <220>
 <223> cebador inverso Slyc1dmr6UTR_rv

<400> 94

25 gggacatccc tatgaaccaa 20

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

<400> 95

atggaacca aagttatttc tagcggaaac aaccactcta ctcttcctca aagttacatc 60

cgaccCGaat cCGatagacc acgtctatcg gaagtggctg attgtgaaa tgttccaata 120

attgacttaa gttgCGgaga tcaagctcaa ataattcgtc aaattggaga agcttgtcaa 180

acttatgggt tctttcaggt aattaatcat ggtgtaccaa aggaagttgt agagaaaatg 240

ctaggggtag ctggggaatt tttcaattta ccagtagaag agaaactaaa attatattca 300

gatgatcctt caaagaccat gagattatca acaagtttta atggttaaaa ggagacagtt 360

cataattgga gagattatct cagacttcat tgttatctc tagagaagta tgctcctgaa 420

tggccttcta atccatcatc tttcagggaa atcgtgagca gatattgcag ggaaattcgt 480

caactcggat ttagattaga agaagccata gcagaaagcc tggggttaga taaagagtgt 540

ataaaagatg tattgggtga acaaggacaa catatggcta tcaattatta tcctccttgt 600

ccacaaccag aacttactta tgggcttccg gcccatactg atccaaatc acttacaatt 660

cttcttcaag acttgcaagt tgcgggtcct caagttctta aagatggcaa atggttagct 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 ggaatttggg ccagcaacat tgtttggaac ttttcaagaa taa 1013

ES 2 658 150 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 2 658 150 T3

195	200	205
Leu Pro Ala His Thr Asp 210	Pro Asn Ser 215	Leu Thr Ile Leu Leu Gln Asp 220
Leu Gln Val Ala Gly 225	Leu Gln Val Leu Lys Asp 230	Gly Lys Trp Leu Ala 235 240
Val Lys Pro Gln 245	Pro Asp Ala Phe Val 245	Ile Asn Leu Gly Asp Gln Leu 250 255
Gln Ala Val Ser Asn Gly Lys Tyr 260	Arg Ser Val Trp His Arg Ala Ile 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 ggcgctttct gaagttgctg attgtgaaaa cgttccagta	120
gttgatatag gttgcggtga tagaaacctt attgttcatc aaattggtga agcctgtcgt	180
ctttatgggt ttttcaggt aattaatcat ggtgtaccaa agaatttaat agacgaaatg	240
ctagagatag ctggggaatt ttttaggctt ccagttgaag agaagttgaa attgtactca	300
gatgacctat cgaagacgat gagattgtcg actagtttta atgtgaaaaa ggagaaggtt	360
cacaattgga gagattatct cagacttcat tgttatcctc ttgaaaatta cgctcctgaa	420
tggccttcca atccttctc tttcagggaa atcgtgagca gatattgcat ggaagttcga	480
caactcgggt tcagattgca ggaagccata gcagagagcc taggcttaga gaaagagtgt	540
10 ataaaggatg tattgggcga acaaggtcaa cacatggcta tcaatttcta tcctccttgt	600

ES 2 658 150 T3

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

<210> 98

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Nicotiana benthamiana

<400> 98

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 658 150 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una planta de melón que es resistente a *Pseudoperonospora cubensis*, que se caracteriza porque la planta tiene un nivel reducido o presenta una ausencia completa de la proteína de DMR6, comparada con una planta que no es resistente al patógeno, en la que dicha planta presenta una mutación en su gen *DMR6* que da como resultado una expresión reducida de DMR6, comparado con el gen DMR6 de tipo salvaje en el que no está presente dicha mutación.
- 2.- Método para obtener una planta de melón que es resistente a *Pseudoperonospora cubensis*, que comprende reducir el nivel endógeno de la proteína de DMR6 en la planta mediante la mutación del gen DMR6 de la planta.
- 10 3.- Método según la reivindicación 2, en el que la mutación se realiza mediante un tratamiento mutagénico de la planta, en particular con mutágenos o radiación.
- 4.- Método según la reivindicación 2, en el que la reducción del nivel endógeno en la planta se logra reduciendo la expresión del gen *DMR6* de la planta mediante silenciamiento de genes o ARNi.

Fig. 1

```

Arabidopsis          -----MAAKLISTGFRHTTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLED-FPLIDL 43
Aquilegia_sp        -----MESSNVLTTGTRHSNLPENYVRSVSDRPRLSEVKDCEN-VPVIDL 44
Citrus_sinensis     -----MDTKVLSSGIRYTNLPEGYVRPESERPRLSEVSECKN-VPVIDL 43
Coffea_canephora    -----METKVISSGIKYTSLPESYVRPESERPRLSEVSDCQN-VPVVDL 43
Cucumis_sativus     --MSSVMEIQLLCSGGRHEKLPKEYERPESDRPRLSEVCCWDK-VPVIDL 47
Gossypium_hirsutum  -----MDTKVLSSGIHYSSLPESYVRPESERPRLSEVSDCQN-VPVIDL 43
Lactuca_sativa      -----MAAKVLSSGFRHTTLPEYVRPVNDRPNLSQVSDCND-VPVIDI 43
Medicago_truncatula -----MDTKVLSSGIHYSKLPESYIRPESDRPCLSQVSEFEN-VPVIDL 43
Oryza_sativa_1      MAAEAEQQHQQLLSTAVH-DTMPGKYVRPESQRPRLDLVSDAR-IPVVDL 48
Oryza_sativa_2      -----MADQLISTADH-DTLPNGYVRPEAQRPRLDLVSDAS-IPVVDL 42
Oryza_sativa_3      -----MATTTQLLSTVEHRETLPESYVRPESDRPRLAEVATDSN-IPVIDI 44
Populus_trichocarpa_1 -----MDTKVLSSGIQYTNLPASYVRPESERPRLWEVSTCEN-VPVIDL 43
Populus_trichocarpa_2 -----MDTKVLSSGVHYTNLPASYVRPESERPRLSEVSTCED-VPVIDL 43
Solanum_lycopersicum_1 -----METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVSDCEN-VPVIDL 43
Solanum_lycopersicum_2 -----MTTTSVLSSGFHSTLPQSYVRPESQRPCMSEVSDDLVPM 45
Sorghum_bicolor     -----MAEQLLSTAVH-DTLPGSYVRPESQRPRLAEVVTGAR-IPVVDL 42
Spinacia_oleracea   -----MANKILLSTGIPIKTLPEYIRPENERPNLSQVSDCEN-VPVIDL 43
Vitis               -----MESKVLSTGIRYTLTLPQSYIRPEPERPRLSQVSECKH-VPVIDL 43
Zea_mays            -----MAEHLSTAVH-DTLPGSYVRPEPERPRLAEVVTGAR-IPVVDL 42
Zingiber_officinale -----MADMLLSIGEH-DTMPRNYVRPENERPHLDNVIADAN-IPVVDL 42
                    ::          .:* * *. ;** : * .*:::
    
```

```

Arabidopsis          S-STDRSFLIQQIHQACARFGFFQVINHGKQI IDEMVSVAREFFSMSM 92
Aquilegia_sp        S-VADESLLAQQIGNACKSHGFFQVINHGVSSELVEKMMESISHEFFHLPL 93
Citrus_sinensis     A-CDDRSLIVQQVADACKNYGFFQAINHEVPLETVERVLEVAKEFFNLPV 92
Coffea_canephora    G-FGDRNLMVRQIGDACRDYGFQVINHGVSKDVAVKMLETATEFFSLPV 92
Cucumis_sativus     G-CEEREMIVKQVEEACKSYGFQVINHGVRKELVEKVI EVGKQFFELPM 96
Gossypium_hirsutum  G-CEDRSHIVQQIALACINYGFFQVINHGVSKEAVERMLQVAHDFGLPV 92
Lactuca_sativa      G-CGDRQLISQQIGDACRRYGFQVINHGVPDEIVEKMQQVGREFFLLPV 92
Medicago_truncatula G-SHNRTQIVQQIGEACSSYGFQVVNHGVPLEELKKTAEVAYDFFKLPV 92
Oryza_sativa_1      A-SPDRAAVVSAVGDACRTHGFFQVVNHGIDAALIASVMEVGREFFRLPA 97
Oryza_sativa_2      A-NPDRAKLVSVGAACRSHGFFQVLNHHGVPVELTSLVLAVAHDFRRLPA 91
Oryza_sativa_3      A-SPDKPRVIAEIAQACRTYGFQVTVNHGIAEELLEKVMVALEFFRLLP 93
Populus_trichocarpa_1 G-CQERDQIVQQVGDACKNYGFFQVINHGVSLEAVEKMLGVAHDFSLPV 92
Populus_trichocarpa_2 G-CQDRNQIVQQVGDACEHYGFQVINHGVSLEAVEKMLGVAHDFSLPV 92
Solanum_lycopersicum_1 S-CGDQAQIIRQIGEACQTYGFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPV 92
Solanum_lycopersicum_2 S-CTNRNVIVHQIGEACRLYGFQVINHGVSCKVIDEMLGVSHEFFKLPV 94
Sorghum_bicolor     G-SPDRAAVVAAGDACRSHGFFQVLNHHGVHADLVAAVMAVGRAFFRLSP 91
Spinacia_oleracea   G-ARDRTQTIHQVFNACKNYGFFQVINHGVSKELAEKMQKVAEFFDMSV 92
Vitis               GKDVNRAQLIQHIADACRLYGFQVINHGVAEMMEKMLEVADEFYRLPV 93
Zea_mays            G-SPDRGAVVAAGDACRSHGFFQVVNHGIAAALVAAVMAAGRFFRLLP 91
Zingiber_officinale G-APDKSQIISQIEKACRLYGFQVVNHGIAAELIKKVLAIALEFFRLLPQ 91
                    . . . : ** .****. ** : . *:::
    
```

Fig. 1 (continuación)

Arabidopsis	EEKMKLYSDDPKTRRLSTSFNVKKEEVNWRDYLRLHCYPIHKYVNEWP	142
Aquilegia_sp	DVKMQFYSDDPKTRMLSTSFNLKKEVHNWRDYLRLHCHPIEKYVQEW	143
Citrus_sinensis	EEKLKLYSDDPKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDKYVPEWP	142
Coffea_canephora	EEKLKLYSDDPKTRMLSTSFNVKKEQVHNWRDYLRLHCYPLEKYVPEWP	142
Cucumis_sativus	EEKLKLYSDDPKTRMLSTSFNVKKEQVHNWRDYLRLHCYPLSNYTPHWP	146
Gossypium_hirsutum	EEKMKLYSDDPKTRMLSTSFNVKKEKVNWRDYLRLHCYPLHKYVPEWP	142
Lactuca_sativa	EEKMKLYSDDPKTRMLSTSFNVNKEEVNWRDYLRLHCYPLDNYVPEWP	142
Medicago_truncatula	EEKMKLYSDDPKTRMLSTSFNVNKEEVNWRDYLRLHCYPLDNYVPEWP	142
Oryza_sativa_1	EEKAKLYSDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLHQFVDPWP	147
Oryza_sativa_2	EEKAKLYSDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLHRYLPDWP	141
Oryza_sativa_3	EEKAKLYSDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLDQYVPEWP	142
Populus_trichocarpa_1	EEKLKLYSDDPKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDKYAPPEWP	142
Populus_trichocarpa_2	EEKLKLYSDDPKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDKYVPEWP	142
Solanum_lycopersicum_1	EEKLKLYSDDPKTRMLSTSFNVKKEQVHNWRDYLRLHCYPLEKYAPPEWP	142
Solanum_lycopersicum_2	EEKMKLYSDDPKTRMLSTSFNVKKEQVHNWRDYLRLHCYPLDKYAPPEWP	144
Sorghum_bicolor	EEKAKLYSDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLDEFVDPWP	141
Spinacia_oleracea	EEKMKLYSDDPKTRMLSTSFNVNKEEVNWRDYLRLHCHPLDEFVDPWP	142
Vitis	EEKMKLYSDDPKTRMLSTSFNVNKEKVNWRDYLRLHCYPLDQYTPPEWP	143
Zea_mays	EEKAKLYSDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCHPLDEFVDPWP	141
Zingiber_officinale	EEKAKLYSDPAKKIRLSTSFNVRKETVHNWRDYLRLHCYPLEEFVDPWP	141
	: * : : * : : * : : . * * * * * : * * . * * * * * * * : : . * *	
Arabidopsis	SNPPSFKEIVSKYSREVREVGFKIEELISESLGLEKDYMKVGLGEGQGHM	192
Aquilegia_sp	SVPTFKDVVATYCKEVRKGLRLLGISLSLGLLEEDYIEKVLGDQGGH	193
Citrus_sinensis	SNPSTFKFVSTYCEVRLGGLYRVELEISESLGLEKDYIKKVLGEGQGHM	192
Coffea_canephora	SNPPSFKEMVSNYCVQIRELGLRLEEAIAESLGLDKECIKVLGDQGGH	192
Cucumis_sativus	SNPPSFREIVSSYCNVVRKVGRIEELISESLGLEKEYIRKVLGEGQGHM	196
Gossypium_hirsutum	SNPPSFQIVSDYCVQVRELGYRLQELISESLGLEKDYIKKVLGEGQGHM	192
Lactuca_sativa	SNPSYFKEVYVGNICTAVRNLGMRIESESISESLGLQKEBIKTILGDQGGH	192
Medicago_truncatula	SNPPSFKETVANYCKEVRLEGLRIEYIISESLGLEKDYLRNALGEGQGHM	192
Oryza_sativa_1	SNPPSFKEIIGTYCTEVRELGFRLYEAISESLGLEGGYMRTELGEQGGH	197
Oryza_sativa_2	SNPPSFREIISTYCKEVRLEGLFRLYGAISESLGLEQDYIKKVLGEGQGHM	191
Oryza_sativa_3	SNPAQFKEIMSTYCKEVRQLGLRLLGAIISVSLGLEEDYIEKVLGEGQGHM	193
Populus_trichocarpa_1	SKPPFFKDIVSSYCIQVRELGFRIQELISESLGLEKDHVKNVGLGEGQGHM	192
Populus_trichocarpa_2	SNPPFFKEIVRSYSIQVRELGFRIQELISESLGLEKDHVKNVGLGEGQGHM	192
Solanum_lycopersicum_1	SNPPSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEAIAESLGLDKECIKVLGEGQGHM	192
Solanum_lycopersicum_2	SNPPSFREIVSKYCMVRELGYRLEEAISESLGLEKDCIKKVLGEGQGHM	194
Sorghum_bicolor	SNPPDFKDTMSTYCKEVRLEGLFRLYAAISESLGLEASMYKTELGEQGGH	191
Spinacia_oleracea	SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRLVQELISESLGLEKDYIKKVLGDQGGH	192
Vitis	SNPPSFKEIVSSYCKEVRLEGLFRLOEMISESLGLEKDHVKNVGLGEGQGHM	193
Zea_mays	SNPPDFKETMGTYCKEVRLEGLFRLYAAISESLGLEASMYKTELGEQGGH	191
Zingiber_officinale	SNPPSFKDVFGSYCQVRLGFRILGILSLSLGLLEEYLVVRVGLGEGQGHM	191
	* * . * : : . * : * : * : : * : * * * : : * : * * *	
Arabidopsis	AVNYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDTPVCGLQILI-DGQWFAV	241
Aquilegia_sp	AVNYPPCPEPELTYGLPRHTDPNTITILLQDQEVAGLQVLH-NGKWWAV	242
Citrus_sinensis	AVNFYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLK-DDKWWAV	241
Coffea_canephora	AVNYPPCQPDLYTYGLPGHTDPNALTILLQDLNVAGLQVLR-DGRWLAV	241
Cucumis_sativus	AINYPPCQPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAV	245
Gossypium_hirsutum	AVNYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV	241
Lactuca_sativa	AVNYPPCQPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAV	241
Medicago_truncatula	AVNYPPCQPELTYGLPGHTDPNALTILLQDLHVAGLQVLK-DGKWLAI	241
Oryza_sativa_1	AVNYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDQVAGLQVLNDG-KWIAV	246
Oryza_sativa_2	AVNFYPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDQVAGLQVLKEG-RWIAV	240
Oryza_sativa_3	AVNFYPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLMDQVAGLQVLKEG-RWIAV	240
Populus_trichocarpa_1	AVNFYPPCPEPELTYGLPGHTDPNALTILLQDQSVAGLQVLK-DGKWWAV	241
Populus_trichocarpa_2	AVNFYPPCPEPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLSVAGLQVLLKDGKWWAV	242
Solanum_lycopersicum_1	AINYPPCQPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLQVAGLQVLK-DGKWLAV	241

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

>Arabidopsis thaliana cds de DMR6 (gi 42568064, Genbank NM_122361)
 ATGGCGGCAAAGCTGATATCCACCGGTTTCCGTCATACTACTTTGCCGGAAAACATATGTCCGGCCAATCT
 CCGACCGTCCACGTCTCTCTGAAGTCTCTCAACTCGAAGATTTCCCTCTCATCGATCTCTCTCCACTGA
 TCGATCTTTTCTCATCCAACAAATCCACCAAGCTTGTGCCCGATTCCGGATTTTTTCAGGTCATAAATCAC
 GGAGTTAACAAACAAATAATAGATGAGATGGTGAAGTGTGCGCGTGAGTTCTTTAGCATGTCTATGGAAG
 AAAAAATGAAGCTATATTCAGACGATCCAACGAAGACAACAAGATTATCGACGAGCTTCAATGTGAAGAA
 AGAAGAAGTCAACAATTGGAGAGACTATCTAAGACTCCATTGTTATCCTATCCACAAGTATGTCAATGAG
 TGGCCGTCAAACCCCTCCTTTCAAGGAAATAGTAAGTAAATACAGTAGAGAAGTAAGAGAAGTGGGAT
 TAAAAATAGAGGAATTAATATCAGAGAGCTTAGGTTTAGAAAAAGATTACATGAAGAAAGTGCTTGGTGA
 ACAAGGTCAACACATGGCAGTCAACTATTATCCTCCATGTCTGAACTGAGCTCACTTACGGTTTACCT
 GCTCATACCGACCCAAACGCCCTAACCATTCTTCTTCAAGACACTACTGTTTGGGCTCTCCAGATCTTGA
 TCGACGGTCAGTGGTTCGCCGTTAATCCACATCCTGATGCTTTTGTCAACATAGGTGACCAGTTACA
 GGCATTAAGTAATGGAGTATACAAAAGTGTGGCATCGCGCTGTAACAAACACAGAAAATCCGAGACTA
 TCGGTGCGCATCGTTTCTGTGCCAGCTGACTGTGCTGTCATGAGCCCGCCAAGCCCTTGTGGGAAGCTG
 AGGACGATGAAACGAAACCAGTCTACAAAGATTTCACTTATGCAGAGTATTACAAGAAGTTTTGGAGTAG
 GAATCTGGACCAAGAACATTGCCTCGAGAATTTTCTAAACAATA

> Arabidopsis thaliana proteína de DMR6 (gi 15238567, Genbank NP_197841)
 MAAKLISTGFRHTTLPENYVRPISDRPRLSEVSQLEDFPLIDLSSSTRSFLIQQIHQACARFGFFQVINH
 GVNKQIIDEMVSVAREFFSMSMEEKMKLYSDDPTKTRRLSTSFNVKKEEVNNWRDYLRLHCYPIHKYVNE
 WPSNPPSEKEIVSKYSREVREVGFKIEELISESLGLEKDYMKKVLGEQGHMAVNYYPPCFPEPELTYGLP
 AHTDPNALTILLQDTTVCGLQILIDGQWFAVNPDPDAFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRAVTNTENPRL
 SVASFLCPADCAVMSPAKPLWEAEDDETKPVYKDFTYAEYKFKFWSRNLDDQEHCLNENFLNN*

Fig. 3

>Lactuca sativa CDS del ortólogo de DMR6

ATGGCCGCAAAGTCATCTCCAGTGGATTCCGGTATACTACTCTACCGGAGAGCTACGTCCGTCCGGTTAA
 CGACAGACCTAACCTATCTCAAGTTTCCGATTGCAACGACGTTCCCTGTTATTGACATCGGTTGTGGTGATA
 GACAACCTATAAGCCAACAAATTGGCGATGCTTGTAGAAGATACGGTTTTTCCAGGTGATTAATCATGGT
 GTGCCTGATGAAATAGTGGAGAAAATGCAACAAGTAGGTAGGGAGTTTTTCTGTTGCCTGTGGAAGAGAA
 GATGAAGCTTTACTCAGAGGATCCATCGAAGACGATGAGGCTATCCACCAGCTTTAACGTCCAAAAAGAAC
 AAATTCATAACTGGCGAGATTATCTCCGCCTTCACTGTTATCCTCTGGATCAATACAGTCCTGAATGCCT
 TCAAATCCTTCTTATTTCAAGGAATATGTTGGTAATTATTGTACAGCAGTGCGAAATTTAGGAATGAGAAT
 ATTAGAATCAATATCAGAAAGTTTAGGGTTACAAAAGAAGAAATAAAAATATATTAGGCGATCAAGGTC
 AACACATGGCCATCAACCATTACCCAGTGTGCCCTGAGCCCGAGCTAACCTACGGGCTACCCGGGCACACA
 GACCCCAATGCTCTCACCATCCTTCTACAGGACACACTGGTCTCTGGTCTCAGGTTCTCAAAGATGGCAA
 ATGGTTAGCCGTTAAACCACACCCTAATGCGTTTTGTAATTAACATTGGTGATCAGTTAGAGGCGGTGAGTA
 ATGGTGAATATAAAAGTGTATGGCATCGAGCTGTGGTTAACTCAGACAACCCGGAATGTCTATAGCTTCG
 TTTTGTGTCTTGTAAATGACACCGTTATTAGGGCTCCTAAAGAAATAATAAAGGAAGGATCGAAACCTGT
 TTTCAAAGAAATTTACTTATGCAGAATACTACGCGAAGTTTTGGACAAGAAACCTTGATCAAGAACATTGCT
 TAGAATTCTTCAAGAACTAG

>Lactuca sativa proteína del ortólogo de DMR6

MAAKVISSGFRYTTLPESYVRPVNDRPNLSQVSDCNDVPVIDIGCGDRQLISQQIGDACRRYGFQVINHG
 VPDEIVEKMQQVGREFFLLPVEEKMKLYSEDPSKTMRLSTSFNVQKEQIHNWRDYLRLHCYPLDQYSPEWP
 SNPSYFKEYVGNICTAVRNLGMRILESISESLGLQKEEIKTILGDQGOHMAINHYPCPEPELTYGLPGHT
 DPNALTILLQDTLVSGLQVLKDGKWLAVKPHPNAFVINIGDQLEAVSNGEYKSVWHRAVVNSDNPRMSIAS
 FLCPCNDTVIRAPKEIIKEGSKPVFKEFTYA EYYAKFWTRNLDOEHCL EFKN*

Fig. 4

>Spinacia oleracea CDS del ortólogo de DMR6

ATGGCAAACAAGATATTATCCACCGGAATTCCTTACAAAACCTCCCCGAAAGCTACATCCGACCCGAAAA
 TGAGAGGCCCAACTTATCTCAAGTCTCCGATTGCGAGAATGTCCCTGTTATTGACTTGGGTGCCAAAGACC
 GTACTCAAACAATCCACCAAGTCTTCAATGCTTGTAATAATACGGGTTTTCCAGGTGATTAATCATGGG
 GTGTCAAAGGAATTAGCGGAGAAGATGCAAAAGGTAGCTCGAGAGTTCTTCGATATGTCGGTTGAGGAAAA
 AATGAAATTATATAGTGACGATCCAACATAAAACACTAAGATTGTCTACAAGTTTTAACGTTAACAAAGAGG
 AAGTTCATAATTGGAGAGATTATCTTAGGCTCCATTGTTGGCCTCTTGAGCAATATGTCCCCGAATGGCCT
 TCTAACCCCTTCCTTCAAGGAAATAGTGAGCAAGTACATAAAAGAAGTTAGGGAACCTGGTTTCAGAGT
 CCAAGAACTAATATCAGAGAGTTTAGGGTTGGAGAAAGATTACATAAAGAATGTCCTAGGAGATCAAGGAC
 AACACATGGCTCTTAATTATTACCCTGAGTGCCCGGAGCCAGAGATGACATACGGGTTGCCGGGTCATACT
 GACCCCTAATGCCCTTACCATCCTTCTCCAAGACTTGCAAGTATCTGGCCTTCAAATTTTTAAGGATGGTAA
 ATGGCTTGCTGTCAAACCTCAACCTGATGCTTTTGTCAATTAACATGGGTGATCAATTGCAGGCATTAAGTA
 ACGGTATATACAAGAGTGTATGGCACAGAGCAGTTGTGAACACAGATAAGCCAAGATTATCAGTAGCTTCA
 TTCTCTGCCCGCCAATGATGCGTTGATAAGCGCGCAACACCTCTGACCGCCAACGGATCACCGGCTGT
 ATATAGAGACTATACGTATCCTGAGTACTACAAGACTTTCTGGAGTAGGAACCTGGACCAAGAGCACTGCT
 TGGAGCTTTTTAAAAACCAACCTAG

>Spinacia oleracea proteína del ortólogo de DMR6

MANKILSTGIPYKTLPEYIRPENERPNLSQVSDCENVPVIDLGAKDRQTIIHQVFNACKNYGFFQVINHG
 VSKELAEKMQKVARFFDMSVEEKMKLYSDDPTKTLRLSTSFVFNKEEVHNWRDYLRHLHCWPLEQYVPEWF
 SNPPSFKEIVSKYIKEVRELGFRVQELISESLGLEKDYIKNVLGDQGGHMLNYYPECPEPEPTYGLPGHT
 DPNALTIILLQDLQVSLQIFKDGKWLAVKQPDAFVINIGDQLQALSNGIYKSVWHRAVVNTDKPRLSVAS
 FLCPANDALISAPTPLTANGSPAVYRDYTYPEYYKTFWSRNLDQEHCLLELFKNQT*

Fig. 5

>Cucumis sativus CDS del ortólogo de DMR6
 ATGAGCAGTGTGATGGAGATCCAACCTTTTGTGTTTCAGGGGGACGTCACGAGAAGTTGCCAGAGAAGTATGA
 ACGGCCTGAATCGGATAGGCCCGGCTGTCCGAGGTGTGTTGTTGGGACAAGGTTCCAATAATCGACTTGG
 GATGCGAGGAGAGAGAGATGATTGTGAAGCAAGTGGAGGAGGCTGCAAGTCTTACGGCTTTTCCAGGTT
 ATAAATCATGGTGTGAGGAAGGAATTGGTGGAGAAAGTGATAGAAGTTGGCAAGCAGTTCCTTTGAGCTGCC
 GATGGAGGAGAAGTTGAAATTTTATTCAGACGACCCTTCCAAGACCGTCAGACTCTCCACAAGTTTCAATG
 TCCGAAAAGAGCAATTCGCAACTGGAGGGATTATCTCAGACTCCATTGCTATCCTCTCTCCAACCTACACC
 CCCATTGGCCCTCTAACCACCATCCTTCAGGGAAATAGTGAGTAGTTATTGCAATGAAGTACGAAAAGT
 TGGGTACAGAATAGAGGAGCTAATATCGGAGAGCTTGGGGCTGGAGAAGGAATACATAAGGAAGAAGTTGG
 GTGAACAAGGTGAGCACATGGCTATAAATTATTATCCGCCATGTCCCAACCAGAACTCACCTACGGGCTC
 CCTGGCCATACGGATCCCAACGCACTCACCATTCTCCTTCAGGATCTCCATGTCGCCGGCTCCAAGTCCT
 CAAAGATGAAAAGTGGCTAGCGGTCAACCCCAACCCCAATGCCTTTGTAATCAATATAGGCGACCAATTGC
 AGGCATTGAGCAATGGGGTGTACAAGAGCGTTTGGCACCGAGCGGTGGTCAATGTTGATAAGCCAGGCTG
 TCGGTGCTTCTTTTCTGCCCCTGTGATGACGCCCTCATTACTCCTGCACCGCTCCTCTCCAGCCTTC
 CCCATTTACAGACCTTTCACCTACGCCAGTACTACAATACTTTTTGGAGCAGAAACTTGGATCAACAAC
 ATTGCTTGGAACATTTAAAAACCACCTCCTTAA

>Cucumis sativus proteína del ortólogo de DMR6
 MSSVMEIQLLCSGGRHEKLEPEKYERPESDRPRLSEVCCWDKVPILDLGCEEREMIVKQVEEACKSYGFFQV
 INHGVRKELVEKVIEVGKQFFELPMEEKLFYSDDPSKTVRLSTSFNVRKEQFRNWRDYLRHLHCYPLSNYT
 PHWPSNPPSFREIVSSYCNEVRKVGRIEELISESLGLEKEYIRKKLGEQQHMAINYYPPCPQPELTYGL
 PGHTDPNALITILLQDLHVAGLQVLKDGKWLAVNPHPNFVINIGDQLQALSNGVYKSVWHRVAVNVDPRL
 SVASFCLPCDDALITPAPLLSQSPPIYRPFYTAQYNYNTFWSRNLDDQHCLLELFKNHPP*

Fig. 6

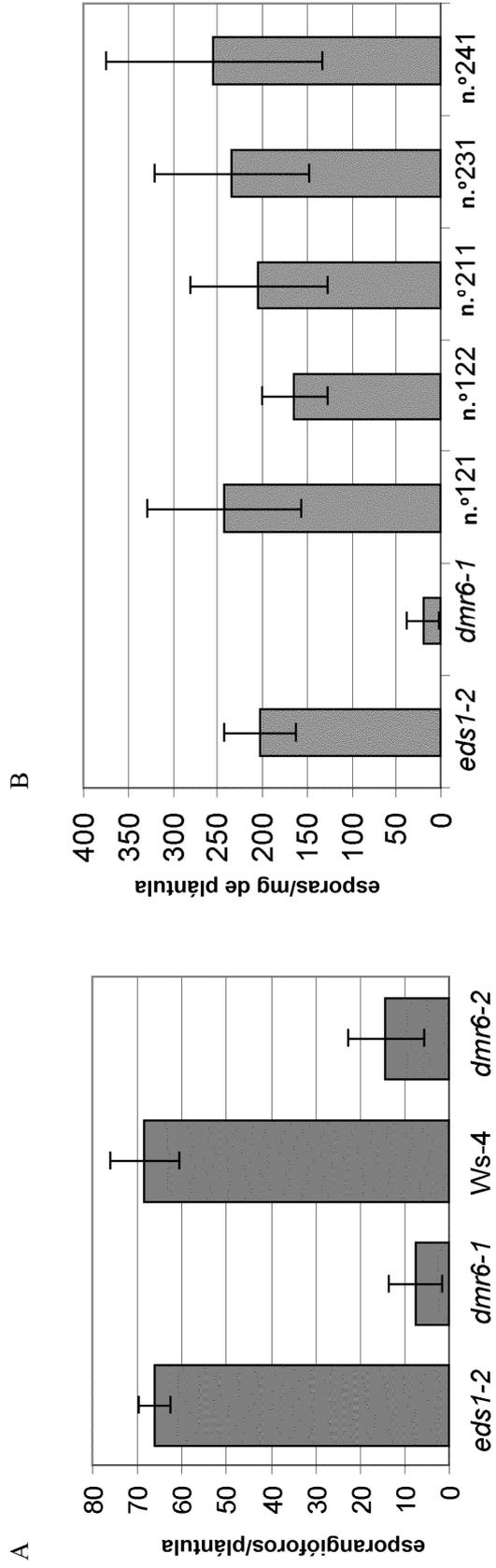


Fig. 7

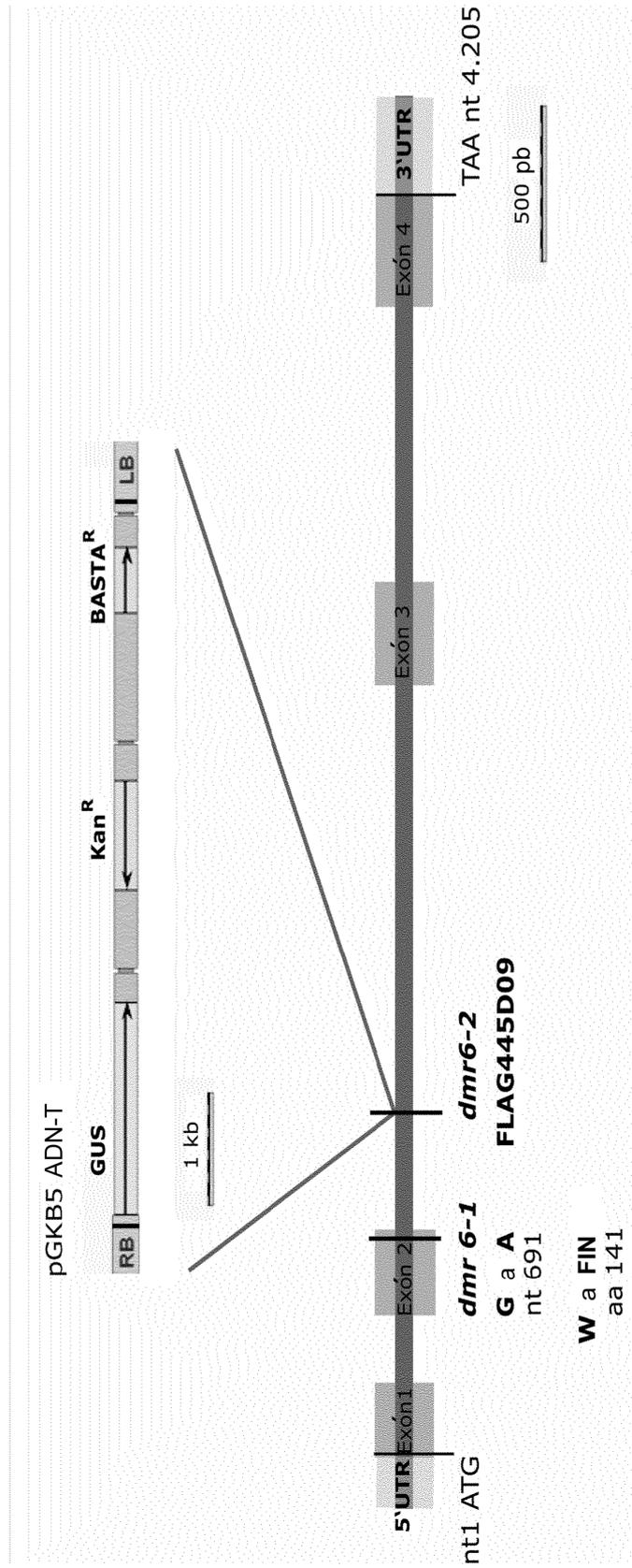


Fig. 8

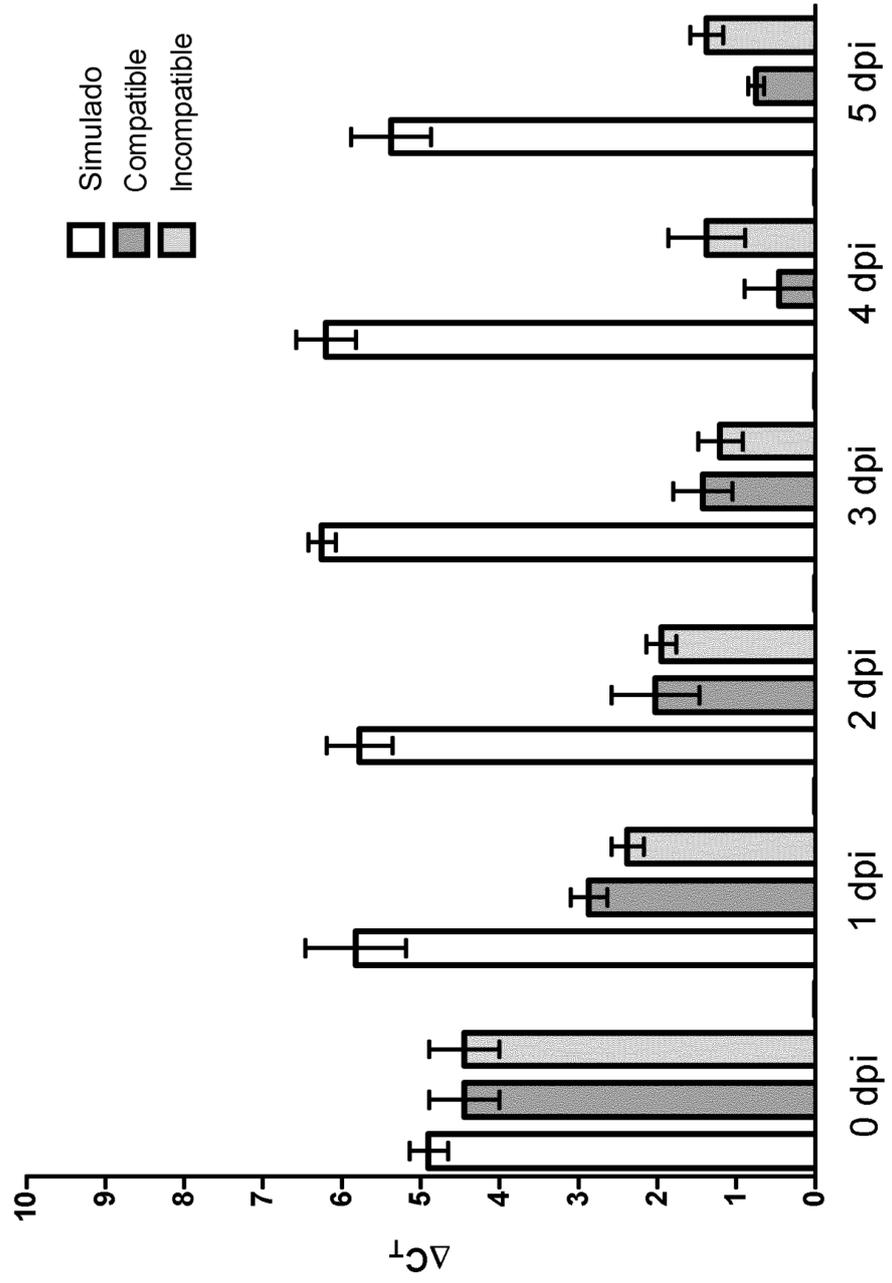


Fig. 9

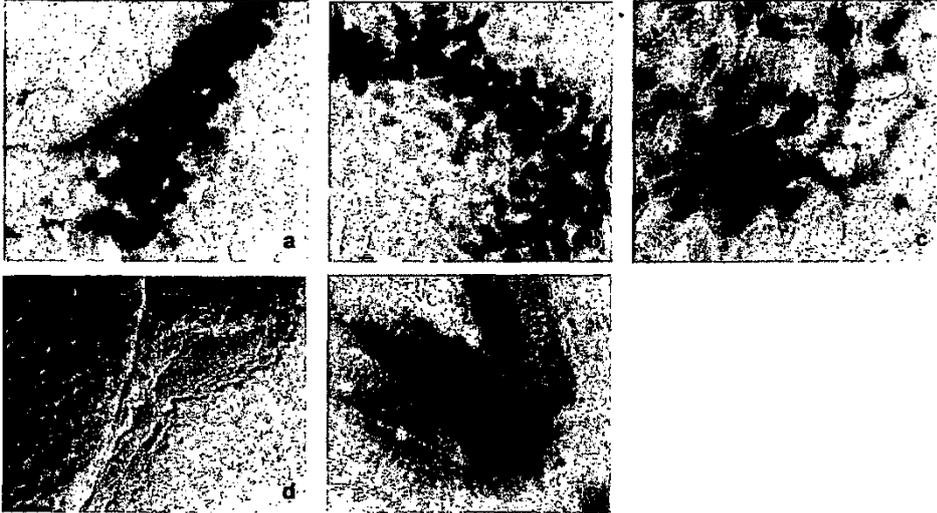


Fig. 10

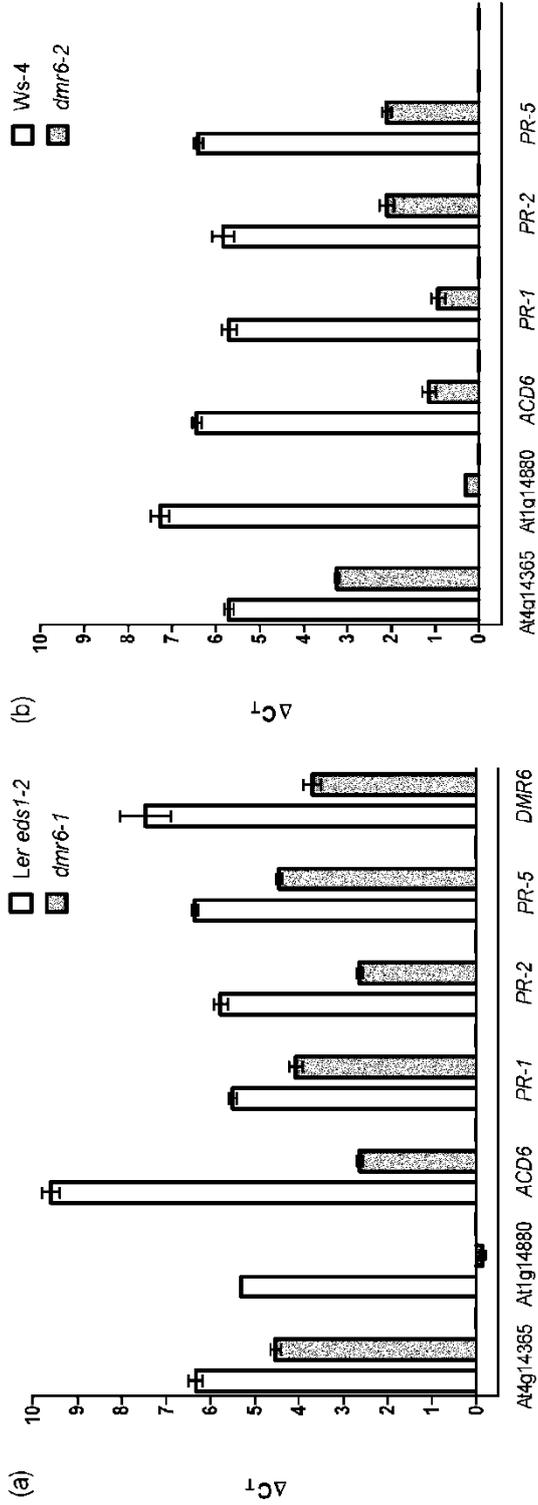


Fig. 12

```
>Solanum lycopersicum CDS del ortólogo de DMR6
ATGGAACCAAAGTTATTTCTAGCGGAATCAACCACTCTACTCTTCCTCAAAGTTACATCCG
ACCCGAATCCGATAGACCACGTCTATCGGAAGTGGTCGATTGTGAAAATGTTCCAATAATTG
ACTTAAGTTGCGGAGATCAAGCTCAAATAATTCGTCAAATTGGAGAAGCTTGTCAAACCTTAT
GGTTTCTTTCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGGAAGTTGTAGAGAAAATGCTAGGGGT
AGCTGGGGAAATTTTTCAATTTACCAGTAGAAGAGAAAATAAAATTATATTCAGATGATCCTT
CAAAGACCATGAGATTATCAACAAGTTTTAATGTTAAAAAGGAGACAGTTCATAATTGGAGA
GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTAGAGAAGTATGCTCCTGAATGGCCTTCTAATCC
ATCATCTTTCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCAGGGAAATTCGTCAACTCGGATTTAGAT
TAGAAGAAGCCATAGCAGAAAGCCTGGGGTTAGATAAAGAGTGATAAAAAGATGTATTGGGT
GAACAAGGACAACATATGGCTATCAATTATTATCCTCCTTGCCACAACCAGAACTTACTTA
TGGGCTTCCGGCCCATACTGATCCAAATTCACCTACAATTCTTCTTCAAGACTTGCAAGTTG
CGGGTCTTCAAGTCTTAAAGATGGCAAATGGTTAGCTGTAAAACCTCAACCTGACGCCTTT
GTCATTAATCTTGGGGATCAATTGCAGGCAGTAAGTAACGGTAAGTACAGAAGTGTATGGCA
TCGAGCTATTGTGAATTCAGATCAAGCTAGGATGTCAGTGGCTTCGTTTCTATGTCCGTGTG
ATAGCGCGAAAATCAGTGCACCAAAGCTGCTGACAGAAGATGGATCTCCAGTGATTTATCAA
GACTTTACGTATGCTGAGTATTACAACAAG
TTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGCAACATTGTTTGGAACTTTTCAAGAATAA
```

```
>Solanum lycopersicum proteína del ortólogo de DMR6
METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVDCENVPIIDLSCGDQAQIIRQIGEACQTY
GFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKETVHNWR
DYLRHLHCYPLEKYAPEWPSNPSSFREIVSRYCREIRQLGFRLEEIAESLGLDKECIKDVLG
EQGQHMAINYYPPCPQPELTYGLPAHTDPNSLTILLQDLQVAGLQVLKDGKWLAVKQPDAF
VINLGDQLQAVSNGKYRSVWHRAIVNSDQARMSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
DFTYAEYYNKFWSRNLQQHCLLELFKN.
```

Fig. 13

>Nicotiana benthamiana CDS del ortólogo de DMR6
 ATGGAAGCAAAGTTCTTTCCAGCGGAATCCGCCACTCTACTATCCCTCAAAGTTACATCCG
 CCCTCAATCCGATAGGCCGCGCCTTTCTGAAGTTGCTGATTGTGAAAACGTTCCAGTAGTTG
 ATATAGGTTGCGGTGATAGAAACCTTATTGTTTCATCAAATTGGTGAAGCCTGTCGTCTTTAT
 GGTTTTTTCCAGGTAATTAATCATGGTGTACCAAAGAATTTAATAGACGAAATGCTAGAGAT
 AGCTGGGGAATTTTTTAGGCTTCCAGTTGAAGAGAAGTTGAAATTGTACTCAGATGACCCAT
 CGAAGACGATGAGATTGTCGACTAGTTTTAATGTGAAAAGGAGAAGGTTCACAAATTGGAGA
 GATTATCTCAGACTTCATTGTTATCCTCTTGAATAATTACGCTCCTGAATGGCCTTCCAATCC
 TTCTCTTTCCAGGGAAATCGTGAGCAGATATTGCATGGAAGTTCGACAACCTCGGGTTCAGAT
 TGCAGGAAGCCATAGCAGAGAGCCTAGGCTTAGAGAAAAGAGTGTATAAAGGATGTATTGGGC
 GAACAAGGTCAACACATGGCTATCAATTTCTATCCTCCTTGTCCACAACCAGAACTCACTTA
 TGGGCTGCCAGCACATACTGATCCAAATGCCCTTACAATTCTTCTTCAAGACTTAGAAGTAG
 CTGGTCTTCAAGTCTTAAAGATGGCGAATGGTTGGCCGTCAAGCCTCAACCAGATGCCTTT
 GTCATTAATCTTGGTGATCAACTGCAGGCAGTGAGTAATGGGAGATACAAAAGCGTATGGCA
 TCGAGCTATTGTAATTCAGACAAAGCCAGGTTGTCAGTGGCTTCGTTCTTTGTCCGTGCG
 ATAGCGCGAAAATCAGTGCTCCAAAGCTCCTCACTGAAGATGGATCTCCTGTCATTTATCAG
 GACTTTACCTATGCTGAGTATTACAAAAAGTTCTGGAGCAGGAATTTGGACCAGGAACATTG
 TTTGGAACTTTTCAAGAACTAA

>Nicotiana benthamiana proteína del ortólogo de DMR6
 MEAKVLSSGIRHSTIPQSYIRPQSDRPRLESEVADCENVPVVDIGCGDRNLIVHQIGEACRLY
 GFFQVINHGVPKNLIDEMLEIAGEFFRLPVEEKLKLYSDDPSKTMRLSTSFNVKKEKVNWR
 DYLRHLHCYPLENYAPEWPSNPSSFREIVSRYCMEVRQLGFRLQEAI AESLGLEKECIKDVLG
 EQQHMAINFYPPCPQPELTYGLPAHTDPNALTILLQDLEVAGLQVLKDGWLVAVKQPDAF
 VINLGDQLQAVSNGRYKSVVHRAIVNSDKARLSVASFLCPCDSAKISAPKLLTEDGSPVIYQ
 DFTYAEYYKKFWSRNLQEHCLELFFKN.

Fig. 14

