

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 551**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2015 PCT/EP2015/063682**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2015 E 15734588 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.08.2021 EP 3167051**

54 Título: **Plantas resistentes a *Phytophthora* pertenecientes a la familia *Solanaceae***

30 Prioridad:

18.06.2014 WO PCT/EP2014/062802

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

20.12.2021

73 Titular/es:

**ENZA ZADEN BEHEER B.V. (100.0%)
Haling 1E
1602 DB Enkhuizen, NL**

72 Inventor/es:

**VAN SCHIE, CHRISTIANUS CORNELIS
NICOLAAS;
POSTHUMA, KARIN INGEBORG;
ZEILMAKER, TIEME y
DE BOER, GEERT JOHANNES**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 886 551 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 *Phytophthora* pertenecientes a la familia *Solanaceae*

5 La presente invención se refiere a plantas de pimiento dulce o *Capsicum spp.* resistentes a *Phytophthora* pertenecientes a la familia *Solanaceae* en donde dicha resistencia está codificada por una combinación de dos genes separados.

10 El patógeno vegetal *Phytophthora* (clase: *Oomycetes*, orden: *Peronosporales*, familia: *Pythiaceae*) es un género de *Oomycetes* (mohos acuáticos) que dañan las plantas, capaces de causar grandes pérdidas económicas en los cultivos en todo el mundo, así como daños ambientales en los ecosistemas naturales. Los patógenos de *Phytophthora* son en su mayoría patógenos de dicotiledóneas y generalmente son parásitos específicos del huésped. El género fue descrito por primera vez por Heinrich Anton de Bary en 1875. Se han descrito aproximadamente 100 especies entre las que se encuentran patógenos vegetales de importancia económica como *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans* y *Phytophthora nicotinae*.

15 *Phytophthora infestans* fue el agente infeccioso del tizón de la papa que causó la Gran Hambruna Irlandesa (1845-1849), y sigue siendo el patógeno más destructivo de los cultivos de solanáceas, incluidos el tomate y la papa. El agente de pudrición del tallo y la raíz de la soja, *Phytophthora sojae*, también ha causado problemas en la industria agrícola desde hace mucho tiempo. En general, las enfermedades de las plantas causadas por este género son difíciles de controlar químicamente, por lo que el crecimiento de cultivares resistentes es la principal estrategia de manejo. Otras enfermedades importantes por *Phytophthora* son:

20 *Phytophthora cactorum* - causa la pudrición de la raíz del rododendro que afecta a los rododendros, azaleas y causa chancro sangrante en árboles de madera dura; *Phytophthora capsici* - infecta frutas de cucurbitáceas, tales como pepinos y calabazas, *Phytophthora cinnamomi* - causa pudrición de la raíz de canela que afecta a plantas ornamentales leñosas que incluyen arborvitae y azalea, *Phytophthora fragariae* - causa pudrición de raíz roja que afecta a las fresas; *Phytophthora kernoviae* - patógeno de hayas y rododendros, que también se encuentra en otros árboles y arbustos que incluyen el roble y la encina, *Phytophthora megakarya* - una de las especies de la enfermedad de la mazorca negra del cacao, es invasiva y probablemente responsable de la mayor pérdida de cosechas de cacao en África; *Phytophthora palmivora* - causa pudrición de la fruta en cocos y nueces de betel, *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora quercina* - causa la muerte del roble y *Phytophthora sojae* - causa la pudrición de la raíz de la soja.

25 *Phytophthora* se conoce a veces como un organismo similar a los hongos, pero se clasifica en un reino diferente: *Chromalveolata* (antes *Stramenopila* y antes *Chromista*). *Phytophthora* es morfológicamente muy similar a los hongos verdaderos, pero su historia evolutiva es bastante distinta. A diferencia de los hongos, las chromalveolatas están más relacionadas con las plantas que con los animales. Mientras que las paredes celulares de los hongos están compuestas principalmente de quitina, las paredes celulares de la chromalveolata están compuestas principalmente de celulosa. Los niveles de ploidía son diferentes entre estos dos grupos; *Phytophthora* tiene cromosomas diploides (emparejados) en la etapa vegetativa (en crecimiento, no reproductivo) de la vida. Los hongos casi siempre son haploides en este estado. Las vías bioquímicas también difieren, especialmente las altamente conservadas.

30 *Phytophthoras* puede reproducirse sexualmente o asexualmente. En muchas especies, las estructuras sexuales nunca se han observado o solo se han observado en apareamientos de laboratorio. En especies homotálicas, las estructuras sexuales aparecen en un solo cultivo. Las especies heterotálicas tienen cepas de apareamiento, designadas como A1 y A2. Cuando se aparean, los anteridios introducen gametos en el oogonio, ya sea por el paso del oogonio a través del anteridio (anfiginio) o por el anteridio que se une a la mitad proximal (inferior) del oogonio (paragineo), y la unión produce oosporas. Como los animales, pero no como la mayoría de los hongos "verdaderos", la meiosis es gamética y los núcleos somáticos son diploides. Los tipos de esporas asexuales (mitóticas) son clamidosporas y esporangios que producen zoosporas. Las clamidosporas suelen ser esféricas y pigmentadas, y pueden tener una pared celular engrosada para ayudar en su función como estructura de supervivencia. Los esporangios pueden ser retenidos por las hifas subtendientes (no caducas) o pueden desprenderse fácilmente por la tensión del viento o del agua (caducas) que actúan como estructuras de dispersión. Además, los esporangios pueden liberar zoosporas, que tienen dos flagelos diferentes que usan para nadar hacia una planta huésped.

35 Las *Solanaceae* o solanáceas, son una familia económicamente importante de plantas con flores. La familia abarca desde hierbas hasta árboles e incluye varios cultivos agrícolas importantes, plantas medicinales, especias, malezas y ornamentales. Muchos miembros de la familia contienen alcaloides potentes y algunos son muy tóxicos.

40 La familia *Solanaceae* pertenece al orden Solanales, en el grupo de las astéridas de las dicotiledóneas (*Magnoliopsida*). La familia *Solanaceae* está formada por aproximadamente 98 géneros y unas 2700 especies, con una gran diversidad de hábitats, morfología y ecología.

65

- 5 La familia tiene una distribución mundial con presencia en todos los continentes excepto en la Antártida. La mayor diversidad de especies se encuentra en América del Sur y América Central. Las *Solanaceae* incluyen una serie de especies comúnmente recolectadas o cultivadas. Quizás el género económicamente más importante de la familia es *Solanum*, que comprende la papa (*Solanum tuberosum*, de hecho, otro nombre común de la familia es la "familia de la papa"), del tomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena o planta de la berenjena (*Solanum melongena*). Otro género importante es *Capsicum* que comprende pimientos y pimientos dulces o morrones (*Capsicum annuum*).
- 10 El género *Physalis* produce las llamadas cerezas molidas, así como el tomatillo (*Physalis philadelphica*), la uchuva y el farolillo chino. El género *Lycium* contiene los licios y el yaoyín *Lycium barbarum*. *Nicotiana* contiene, entre otras especies, la planta del tabaco. Algunos otros miembros importantes de *Solanaceae* incluyen varias plantas ornamentales como *Petunia*, *Browallia* y *Lycianthes*, la fuente de alcaloides psicoactivos, *Datura*, *Mandragora* (mandrágora) y *Atropa belladonna* (belladonna mortal). Algunas especies se conocen universalmente por sus usos medicinales, sus efectos psicotrópicos o por ser venenosas.
- 15 Con la excepción del tabaco (*Nicotianoideae*) y la petunia (*Petunioideae*), la mayoría de los géneros económicamente importantes están incluidos en la subfamilia *Solanoideae*. Finalmente, pero no menos importante, las solanáceas incluyen muchos organismos modelo que son importantes en la investigación de cuestiones biológicas fundamentales a nivel celular, molecular y genético, como el tabaco, la petunia y *N. benthaminia*.
- 20 El documento WO 2008/092505 describe plantas que son resistentes a un patógeno de origen viral, bacteriano, fúngico u oomiceto, en donde las plantas tienen un nivel reducido, una actividad reducida o una ausencia completa de proteína DMR6 en comparación con las plantas que no son resistentes al patógeno, en particular organismos de los hongos o el filo Oomycota.
- 25 Tieme Zeilmaker: "Functional and applied aspects of the DOWNY MILDEW RESISTANT 1 and 6 genes in Arabidopsis (tesis doctoral)", 6 de febrero de 2012 (2012-02-06), Universiteit Utrecht describe varios homólogos de DMR6 que tienen funciones parcialmente redundantes pero distintas en la supresión de la inmunidad en *Arabidopsis*.
- 30 Al considerar la importancia económica de muchas plantas miembros de la familia *Solanaceae* y el efecto destructivo del patógeno vegetal *Phytophthora* en muchos miembros de esta familia, es un objetivo, entre otros objetivos, de la presente invención proporcionar plantas resistentes a *Phytophthora* y especialmente pimiento dulce (*Capsicum annuum*) o *Capsicum spp.*
- 35 El objetivo anterior, entre otros objetivos, cumple con la presente invención al proporcionar plantas como se indica en las reivindicaciones adjuntas.
- 40 Se describen plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae* en donde las presentes plantas comprenden un rasgo genético que proporciona resistencia a *Phytophthora* y en donde el presente rasgo de resistencia está codificado por una combinación de al menos dos genes que tienen una expresión reducida, o una transcripción reducida, o una actividad reducida de las proteínas codificadas por los presentes genes en comparación con la misma planta perteneciente a la familia *Solanaceae* que es susceptible a *Phytophthora*.
- 45 Se describen plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae* seleccionadas del grupo que consiste en patata, petunia, tomate, berenjena, tabaco y pimiento dulce.
- 50 De acuerdo con la presente invención, las presentes plantas son pimiento dulce (*Capsicum annuum*) o *Capsicum spp.*, la resistencia a *Phytophthora* es la resistencia a *Phytophthora capsici* y la combinación de al menos dos genes son genes que codifican proteínas de acuerdo con SEQ ID No. 16 y SEQ ID No. 17 o proteínas que tienen al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID No. 16 y/o SEQ ID No. 17, preferiblemente al menos 95 % de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 99 % de identidad de secuencia.
- 55 Se describen plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae* en donde las plantas comprenden un rasgo genético que proporciona resistencia a *Phytophthora*, en donde el presente rasgo de resistencia se obtiene mediante la regulación negativa de la actividad de la combinación de dos genes o la reducción de la actividad de las proteínas codificadas por los genes en una planta susceptible a *Phytophthora*, en donde los dos genes que codifican las combinaciones de SEQ ID Nos. 1 y 2 o SEQ ID Nos. 3 y 4 o SEQ ID Nos. 5 y 6 o proteínas que tienen al menos 80 %, 85 % o 90 % de identidad de secuencia con las mismas tal como 91 %, 92 %, 93 % y 94 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95 % de identidad de secuencia, tal como 96 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad de secuencia.
- 60 Dadas las propiedades ventajosas de los presentes genes para proporcionar plantas resistentes a *Phytophthora*, se describe el uso de una combinación de dos genes, en donde dicha combinación de dos genes que codifica combinaciones de proteínas son SEQ ID Nos. 16 y 17 o proteínas que tienen al menos 90 % de identidad de secuencia para proporcionar resistencia a *Phytophthora* en plantas de pimiento dulce (*Capsicum annuum*) o *Capsicum spp.*
- 65

El uso descrito comprende una expresión reducida, o transcripción reducida, de los genes presentes o una actividad reducida de proteínas codificadas por los genes presentes en comparación con plantas de pimiento dulce (*Capsicum annuum*) o *Capsicum spp* que son susceptibles a *Phytophthora*.

5 Se describen proteínas y genes adecuados para proporcionar resistencia a *Phytophthora* a plantas en donde las proteínas se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 17, 18 y 19 y proteínas que tienen al menos 90 % de identidad de secuencia con la misma, preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 99 %.

10 La invención se ilustrará con más detalle en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1 (papa)

15 Construcciones de ARNi dirigidas a las SEQ ID Nos. 7 y 8 de papa

Se realizaron 3 construcciones de ARNi diferentes, que albergan/dirigidas a:

- 20
1. Extremo 5' de la SEQ ID No. 7: equivalente a la secuencia codificante -159-200 (-159 desde el comienzo significa en 5'utr).
 2. Quimera del extremo 5' de SEQ ID Nos. 7 y 8: equivalente a la secuencia codificante 4-199 + 1-204.
 3. Parte intermedia de la SEQ ID No. 7 (altamente homóloga a la parte intermedia de la SEQ ID No. 8): equivalente a la secuencia codificante 334-743.

25 Los fragmentos se amplificaron a partir de ADN genómico y se clonaron en el vector pENTR-D-TOPO. Para la construcción quimérica, se acoplaron 2 fragmentos mediante el uso de cebadores con proyecciones complementarias, y la posterior extensión y amplificación para crear el fragmento fusionado. Los fragmentos se transfirieron mediante el uso de una reacción Gateway LR al vector de ARNi pK7GWiWG2 (Karimi y otros, 2002, Trends Plant Sci 7), lo que crea una repetición invertida con estructura de horquilla. Debido a que el vector pK7GWiWG2 requiere estreptomycin para la selección bacteriana, y la cepa de *Agrobacterium* usada para la transformación de la papa (LBA4404) ya lleva un marcador de selección de estreptomycin, el casete completo de ARNi (horquilla) se transfirió a un vector de transformación vegetal diferente, pGreen0029 (marcador de selección tanto bacteriano como de plantas = Kanamicina) (Hellens y otros, 2000, Plant Mol Biol 42). Las construcciones finales permiten la expresión estable de un ARN en horquilla dirigido por el promotor 35S que forma un ARNbc que induce el silenciamiento, después de que el intrón que forma el bucle en horquilla se separa. Se mantuvieron al menos seis transformantes T1 independientes para cada construcción.

40 Detalles del ensayo de *Phytophthora infestans*

Se tomaron hojas desprendidas de plantas T1 (transgénicos de primera generación) y se colocaron en una bandeja con 100 % de HR con pecíolos en algodón húmedo u Oasis. Se recolectaron zoosporas/espangios de *Phytophthora infestans* (P.inf) de cultivos de P.inf (placas de centeno-sacarosa-agar), y se colocó una gota de 10 µl de suspensión de esporas que contenía 10e3 de espangios (10e5/ml) a cada lado de la vena media. Las bandejas se incubaron a 18 °C. Las tasas de infección de las hojas se puntuaron el día 11, como 1. Completamente infectado/sobrecrecimiento, 2. Parcialmente infectado (10-50 % del área) y 3. Limpio (<10 % del área).

50 Como se muestra en las Figuras 1 y 2, las plantas con silenciamiento doble (SEQ ID Nos. 7 y 8) de la Figura 2a muestran que solo el 50 % está infectado, las plantas con silenciamiento doble (quiméricas) de la Figura 2b muestran que solo el 60 % está infectado, mientras que el grupo de control de la Figura 1 muestra que todas las plantas estaban infectadas. Como se muestra en la Figura 3, del 40 al 50 % de las plantas con SEQ ID No. 7 y SEQ ID No. 8 silenciadas están limpias, mientras que de las plantas que solo tienen SEQ ID No. 7 silenciada solo el 10 % de las plantas se puntúan como parcialmente infectadas. Por consiguiente, el silenciamiento de ambas SEQ ID Nos. 7 y 8 proporciona resistencia a *Phytophthora infestans*.

55 Ejemplo 2 (petunia)

Las líneas de inserción de transposones se identificaron a partir de una colección/biblioteca (Vandenbussche y otros, 2008, Plant Journal 54). Se encontraron 2 alelos de inserción de transposones dTph1 en SEQ ID No. 9 y 3 alelos de inserción de transposones dTph1 en SEQ ID No. 10. Se hicieron varios cruces para generar dobles mutantes.

60 Detalles del ensayo de *Phytophthora nicotianae*

Las plantas se cultivaron en tierra para macetas estándar, en macetas individualmente, a 23 °C.

65

Se recolectaron esporas de *P. nicotianae* de cultivos (placas de frijol-lima-agar o agar V8), y se gotearon 2 ml de suspensión de esporas que contenía esporas 10e4 (ensayo Sept) sobre el suelo con cada planta. El colapso de la planta se monitoreó regularmente.

5 Como se muestra en la Figura 4, los dobles mutantes, es decir, las plantas que tienen mutaciones en SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 10 tienen un porcentaje de plantas vivas del 45 %, mientras que el porcentaje de plantas vivas de simples mutantes (mutante en SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 10) es solo el 20 %.

Ejemplo 3 (tomate)

10 Las plantas de tomate se transformaron con dos construcciones, ya sea para proporcionar la sobreexpresión de ambas SEQ ID Nos. 11 y 12, o para proporcionar el silenciamiento de ambas SEQ ID Nos. 11 y 12. Las construcciones de silenciamiento de SEQ ID No. 11 en tomate se generaron mediante el uso de la clonación Gateway de un fragmento de 300 pb idéntico a la parte intermedia del CDS de la SEQ ID No. 11.

15 Secuencia:

TTGGGTGAACAAGGACAACATATGGCTATCAATTATTATCCTCCTTGTCCACAACCAG
 20 AACTTACTTATGGGCTTCCGGCCATACTGATCCAAATTCACTTACAATTCTTCTTCAA
 GACTTGCAAGTTGCGGGTCTTCAAGTTCTTAAAGATGGCAAATGGTTAGCTGTAAAAC
 CTCAACCTGACGCCTTTGTCATTAATCTTGGGGATCAATTGCAGGCAGTAAGTAACGG
 25 TAAGTACAGAAGTGTATGGCATCGAGCTATTGTGAATTCAGATCAAGCTAGGATGTCA
 GTGGCTTCGTTT

Mediante el uso de los cebadores:

30 S. Lycopersicum AttB1-F aaaaagcaggctcttgggtgaacaaggacaaca
 S. Lycopersicum AttB2-R agaaagctgggtaaaacgaagccactgacatcc

35 El vector de ENTRADA generado se clonó por Gateway en el vector binario pHellsgate12. Después, la transformación de *Agrobacterium* de acuerdo con el procedimiento estándar para tomate. Las construcciones de silenciamiento fueron capaces de silenciar ambas SEQ ID Nos. 11 y 12, debido a similitudes en las secuencias.

40 La descendencia de las plantas de tomate transformadas se sometió a una prueba de enfermedad mediante la inoculación del aislado US11 de *Phytophthora infestans*. 7 días después de la inoculación, las plantas se analizaron visualmente mediante la asignación de puntuación a las hojas en una escala visual de 1 a 9, en donde 1 significa susceptible y 9 significa resistente. Como un control de susceptibles se usaron las plantas TS33, TS19 y OT9. Como control de resistentes se usa la accesión silvestre LA1269 resistente conocida. Se midieron 8 hojas por planta. La siguiente tabla proporciona la puntuación promedio de las 8 hojas por planta

45

LA1269	RC	8,7
TS33	VC	1,3
TS19	VC	1,5
OT9	VC	2,0
551-06-01	sobreexpresión	2,8
551-06-02	sobreexpresión	3,3
551-06-03	sobreexpresión	3,0
551-06-07	sobreexpresión	1,5
551-06-08	sobreexpresión	2,3
551-06-09	sobreexpresión	2,3
551-06-12	sobreexpresión	2,3
556-02-01	silenciamiento	6,5
556-02-02	silenciamiento	8,5
556-02-03	silenciamiento	8,3
556-02-06	silenciamiento	7,3
556-02-11	silenciamiento	7,3
556-01-01	silenciamiento	7,8
556-01-02	silenciamiento	8,3
556-01-03	silenciamiento	8,5
556-01-04	silenciamiento	8,5
556-01-05	silenciamiento	8,5
556-01-06	silenciamiento	6,0
556-01-07	silenciamiento	5,5
556-01-08	silenciamiento	8,5
556-01-09	silenciamiento	7,0
556-01-10	silenciamiento	8,5
556-01-11	Silenciamiento	8,8
556-01-12	Silenciamiento	7,8

En la tabla se muestra que las plantas que sobreexpresan las SEQ ID Nos. 11 y 12 son susceptibles al aislado US11. La planta silenciada proporciona puntuaciones significativamente más altas que el control susceptible OT9. Por ejemplo, la planta 556-01-08 tiene una puntuación promedio de 8,5. Una muestra de esta planta se muestra en la Figura 5 en el recuadro G10, y no está infectada de manera similar a la planta de control resistente LA1296 como se muestra en el recuadro D8. Por consiguiente, el silenciamiento de ambas SEQ ID Nos. 11 y 12 proporciona resistencia a *Phytophthora infestans*.

5

10 Ejemplo 4 (*N. benthamiana*)

Para investigar si *DMR6* mediaba la resistencia en *N. benthamiana* contra *Phytophthora infestans*, se clonó el ortólogo de *DMR6* en un vector de expresión VIGS. Las plantas de *N. benthamiana* se silenciaron para *DMR6* y se inocularon posteriormente con una solución de esporas de *P. infestans*. Hasta 7 dpi, las plantas se puntuaron para el desarrollo de enfermedades. Este experimento se realizó tres veces con resultados similares. El silenciamiento de *DMR6* claramente resulta en una menor colonización por parte del patógeno en comparación con el control de vector vacío o las plantas no silenciadas de tipo salvaje.

15

Secuencia de silenciamiento del constructo *DMR6*

20

acaactcgggttcagattgcaggaagccatagcagagagcctaggcttagagaaagagtgtataaaggatgtattggcgcaacaagggtcaac
 acatggctatcaatttctatcctccttgcaccacaaccagaactcacttatgggctgccagcacatactgatccaaatgcccttacaattcttctcaag
 5 acttagaagtagctggctctcaagttctaaagatggcgaatgggtggccgtcaagcctcaaccagatgcctttgtcattaatcttgggatcaactg
 caggcagtgagtaatgggagatacaaaaagcgtatggcatcgcagctattgtaaattcagacaaaagccaggtgtcagtggttcgtcttctgtcc
 gtgcgatagcgcgaaatcagtct

10 Se usó VIGS para silenciar y probar la función de *N. benthamiana* DMR6. Como un control visual de los procedimientos, también se dirigió al gen PDS. Las plantas silenciadas con PDS se usaron para indicar en qué momento comenzó el silenciamiento. El silenciamiento debe haber comenzado \pm 2 días antes de que se observe el blanqueamiento debido a los niveles de proteína ya establecidos en la planta. Pero al comienzo del período de silenciamiento, el silenciamiento no será a una tasa alta y esperar dos días le da tiempo al mecanismo para establecer una buena tasa de silenciamiento. Otra ventaja de usar plantas silenciadas con PDS es que dan una indicación de qué partes de las plantas están silenciadas. El blanqueo se observó en todas las partes por encima de la inoculación. En las plantas inoculadas al vacío, el nuevo tejido mostró un fuerte fotoblanqueo y partes de algunos de los cotiledones también mostraron áreas blancas. En las plantas inoculadas con jeringa el blanqueamiento fue más fuerte en las hojas más jóvenes, en las hojas totalmente crecidas el pigmento ya está sintetizado y el silenciamiento será más difícil de observar visualmente. Se observó el blanqueo de las plantas silenciadas con PDS 8-10 días después de la inoculación con la cepa de *Agrobacterium* que contenía el vector TRV. El día 8 se iniciaron los ensayos de infección.

25 Se realizaron dos experimentos VIGS separados. Las plantas de ambos experimentos se usaron para ensayos de infección de hojas desprendidas. El ensayo de infección por *P. capsici* se realizó 8 días después de la agroinfiltración, en las hojas 2-6 por encima de la hoja infiltrada. La solución de zoosporas que contiene 5×10^3 esporas/ml-1 se aplicó a hojas desprendidas. El primer VIGS mostró bajas tasas de infección de *P. capsici* después de 7 días (ver tabla 1.). Idealmente, el 100 % de las hojas no silenciadas presentan infección.

30 Tabla 1. Resultados del ensayo de infección del 1er experimento VIGS. Ninguna de las hojas silenciadas con *DMR6* mostró infección. 3 de cada 7 hojas no silenciadas mostraron infección.

	Infectado	No infectado	Total	% Infectado
35 DMR6 silenciado	0	11	11	0 %
No silenciado	3	4	7	43 %

40 Se cree que esta baja esporulación es la causa de la baja infección de las hojas de *N. benthamiana*. Sin embargo, ninguna de las hojas silenciadas con DMR6 mostró síntomas de infección, a diferencia el 40 % de las hojas que no fueron silenciadas mostraron infección. Para aumentar la tasa de infección, se realizaron cambios en la adquisición de esporas y en el método de infección, lo que provocó una infección más agresiva durante el segundo ensayo de infección. Se encontró una hoja no infectada silenciada con DMR6 y otras hojas silenciadas con DMR6 mostraron una infección retardada y una propagación más lenta de la infección.

Ejemplo 5

Introducción

50 Varios genes que codifican reguladores negativos de la inmunidad se activan durante la infección por patógenos, de modo que la respuesta de defensa inducible se controla y regula a la baja para evitar la sobreactivación. Ejemplos de ello son la Nudix hidrolasa que codifica *NUDT7* y el factor de transcripción que codifica *WRKY48* que son inducidos después de la infección o el tratamiento MAMP. De manera similar, el gen *DOWNY MILDEW RESISTANT 6 (DMR6)* se activa durante la infección con aislamientos compatibles e incompatibles del mildiú veloso *Hyaloperonospora arabidopsidis*. La inactivación de *DMR6* por mutación conduce a una baja activación constitutiva de genes relacionados con la defensa y la resistencia al mildiú veloso *H. arabidopsidis*.

60 DMR6 pertenece a la superfamilia de oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato Fe (II) (2OG oxigenasas, dominio Pfam PF03171). Esta superfamilia comprende 151 miembros en Arabidopsis. Sin embargo, para la mayoría de estas proteínas, incluida la DMR6, se desconoce su actividad metabólica. Se sabe que las 2OG oxigenasas catalizan una gran cantidad de reacciones que implican la oxidación de un sustrato mediante el uso de O₂ molecular. Ellas comúnmente usan hierro como cofactor y requieren 2-oxoglutarato como cosustrato para suministrar dos electrones. Una característica general de estas enzimas es la presencia del motivo conservado HxD/Ex_nH ubicado en una hoja beta de doble hebra. Junto con dos hojas beta de cuatro hebras (pliegue en rollo de gelatina) encapsula el centro

activo. Las 2OG oxigenasas están implicadas en el metabolismo secundario y la biosíntesis de moléculas de señalización, por ejemplo, la biosíntesis de flavonoides, giberelinas y alcaloides.

En este ejemplo, analizamos funcionalmente la oxigenasa DMR6 de *Arabidopsis* y las OXIGENASAS SIMILARES A DMR6 (DLO) 1 y 2 relacionadas. La sobreexpresión de DMR6, DLO1 y DLO2 aumentó la susceptibilidad a la enfermedad, lo que indica que las tres proteínas pueden actuar como un regulador negativo de la inmunidad. DLO1, pero no DLO2, está altamente corregulado con DMR6, sin embargo, difieren en su expresión espacial durante la infección por mildiú veloso. Se encontró que el doble mutante *dmr6-3_dlo1* era completamente resistente a *H. arabidopsidis* y mostró un crecimiento fuertemente reducido asociado con altos niveles de ácido salicílico.

Resultados

La sobreexpresión de DMR6 resulta en una mayor susceptibilidad a patógenos (hemi) biotróficos

Se describió previamente que las plántulas del mutante *dmr6-1* eran más resistentes a *H. arabidopsidis*, pero no a *P. syringae*. Sin embargo, cuando se probó en plantas adultas *dmr6-1*, se observó una fuerte resistencia a *P. syringae* DC3000. También las plantas adultas *dmr6-1* fueron más resistentes al biotrofo obligado *H. arabidopsis* en comparación con las plántulas. Además, fue evidente una fuerte resistencia al oomiceto hemi-biotrófico *Phytophthora capsici* en las plantas *dmr6-1* en comparación con la línea parental *Ler eds1-2*; mientras que todas las plantas mutantes *dmr6-1* sobrevivieron, *P. capsici* destruyó la gran mayoría de plantas de la línea parental y complementó el mutante *dmr6-1*. La resistencia del mutante *dmr6-1* a diferentes (hemi) biotrofos sugiere que en las plantas de tipo salvaje DMR6 regula negativamente la inmunidad a estos patógenos.

Para estudiar esto, la secuencia codificante de DMR6 se expresó a partir del promotor constitutivo 35S en líneas transgénicas Col-0. Las líneas de sobreexpresión de DMR6- mostraron un claro aumento en la susceptibilidad a la enfermedad de *H. arabidopsidis* y *P. syringae*. El nivel de esporulación de *H. arabidopsidis*, que es una medida de la infección por mildiú veloso, se duplicó en las líneas de sobreexpresión de DMR6 en comparación con el control. Además, el desarrollo de clorosis asociada a la enfermedad fue más pronunciado en las líneas de sobreexpresión de DMR6 que en las plantas Col-0 no transgénicas.

La mayor susceptibilidad de las plantas de seis semanas a la bacteria *P. syringae* también fue claramente visible. Mientras que la línea de control (Col-0) mostró un nivel relativamente bajo de clorosis y lesiones a los 3 días después de la inoculación, la línea de sobreexpresión de DMR6- mostró síntomas de enfermedad más graves, es decir, más clorosis, más lesiones y más grandes. La mayor susceptibilidad de los sobreexpresores de DMR6 a la infección por *P. syringae* se confirmó mediante ensayos de crecimiento bacteriano que mostraron un aumento de los títulos bacterianos 1 y 3 días después de la inoculación en comparación con el control Col-0. Además, la expresión de los genes marcadores de defensa PR-1, PR-2 y PR-5 en tejido foliar no infectado se redujo entre un 50 y un 80 % en la línea de sobreexpresión de DMR6 en comparación con las plantas Col-0 de tipo salvaje que ya tienen un muy bajo nivel de expresión. La inmunidad reducida de la línea de sobreexpresión de DMR6, junto con la resistencia mejorada del mutante *dmr6-1*, apoya fuertemente el papel de DMR6 como un regulador negativo de la inmunidad.

DMR6 y las OXYGENASAS SIMILARES A DMR6 representan ramas separadas de un clado distinto en plantas con flores

El genoma de *Arabidopsis* contiene más de 150 genes de la 2OG oxigenasa, algunos de los cuales son similares a DMR6. Para analizar la conservación evolutiva de DMR6 y las oxigenasas relacionadas en plantas con flores, analizamos filogenéticamente la familia de las 2OG oxigenasas que contienen el dominio Pfam de la superfamilia de las 2OG oxigenasas-Fe (II) PF03171. A partir de *Arabidopsis thaliana* y dieciocho plantas con flores, cuyas secuencias genómicas y modelos de proteínas estaban disponibles en la base de datos Phytozome v7.0 (www.Phytozome.net), se seleccionaron un total de 2951 proteínas que contenían el dominio PF03171 mediante el uso del algoritmo HMMER3. Para filtrar pequeños fragmentos de proteínas y eliminar proteínas muy grandes, sólo incluimos proteínas que no superaban una diferencia de longitud del 20 % con respecto a DMR6. Además, solo se retuvieron las proteínas que tienen una diferencia de longitud del dominio oxidorreductasa de menos del 20 % en comparación con DMR6. Esto resultó en una selección de 2038 proteínas que cumplen con todos los criterios, incluidas 110 de las 151 2OG oxigenasas predichas de *A. thaliana*. La agrupación filogenética resultó en un árbol en el que se muestran muchos clados distintos que representan diferentes actividades enzimáticas. Las oxigenasas bien caracterizadas incluyen flavonona-3-hidroxilasa (F3H), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) oxidasa y antocianidina sintasa (ANS) que están presentes en distintos clados diferentes del clado DMR6. Se pueden distinguir dos ramas separadas en el clado DMR6 que contienen cada una 2OG oxigenasas de dicotiledóneas y monocotiledóneas, lo que indica que estos subclados ya estaban presentes en el ancestro de todas las plantas con flores o antes (82 % de confianza de arranque). Las duplicaciones de genes en el clado DMR6 son frecuentes en monocotiledóneas en la parte superior del árbol y en soja y vid en ambas ramas del clado DMR6. En el subclado inferior, dos homólogos de DMR6 de *A. thaliana* se agrupan junto con dos proteínas de *Arahidopsis lyrata*, lo que sugiere que son el resultado de una duplicación de genes relativamente reciente en el ancestro común de estas dos especies.

Estas proteínas de *A. thaliana* ahora se denominan OXIGENASA SIMILAR A DMR6 o DLO (con el gen At4g10500 que codifica DLO1 y At4g10490 que codifica DLO2). Además, el subclado DLO muestra una clara separación de las proteínas monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo que sugiere que el ancestro de todas las plantas con flores ya poseía un DLO además de DMR6. Agrupados estrechamente a DMR6, los DLO forman un grupo interesante que posteriormente se analizó con más detalle, al enfocarse en los genes *DLO1* y *DLO2* de *A. thaliana*.

La sobreexpresión de *DLO1* y *DLO2* complementa al mutante *dmr6*

Los DLO podrían tener la misma actividad biológica que DMR6 y, por lo tanto, se probaron para la complementación del mutante *dmr6-1*. Con este fin, *DLO1* y *DLO2* se expresaron bajo el promotor constitutivo 35S y se transformaron en el fondo mutante *dmr6-1*. Se analizaron cuatro líneas T3 independientes, transformadas con 35S:*DLO1* o 35S:*DLO2*, para determinar su nivel de expresión y se seleccionaron 3 líneas por construcción que mostraron una clara expresión transgénica. Para comprobar la complementación, se infectaron plantas de 2 semanas de edad con el aislado Cala2 de *H. arabidopsidis* y 5 días después de la inoculación (dpi) se puntuó el número de esporas por mg de plántulas como medida de susceptibilidad.

Curiosamente, aunque *dmr6-1* mostró una clara resistencia, las plantas 35S:*DLO1* y 35S:*DLO2* fueron altamente susceptibles, similares o superiores a Ler *eds1-2* que es la línea parental del mutante *dmr6-1*. Como tanto *DLO1* como *DLO2* pueden complementar el fenotipo mutante *dmr6-1*, concluimos que los DLO tienen una función similar a la de DMR6.

Como la sobreexpresión de *DMR6* en el fondo Col-0 resulta en una mayor susceptibilidad al mildiú velloso y otros patógenos, a continuación, investigamos si la sobreexpresión de *DLO1* y *DLO2* también haría que Col-0 sea más susceptible. Se seleccionaron transformantes que expresan los transgenes 35S:*DLO1* y 35S:*DLO2* y se incluyeron como controles Col-0 que sobreexpresa *DMR6* y el mutante Col *eds1-2* altamente susceptible. Los ensayos de enfermedad con *H. arabidopsidis* mostraron que la sobreexpresión de *DLO1* y *DLO2* aumentó la susceptibilidad en comparación con la línea parental Col-0, como lo muestra el mayor nivel de esporulación. La susceptibilidad mejorada observada fue comparable a las plantas con sobreexpresión de *DMR6* y al mutante Col *eds1-2*. Esto confirma que las proteínas *DLO1* y *DLO2* tienen una actividad similar o idéntica a *DMR6* lo que resulta en los mismos efectos fenotípicos.

La expresión de *DLO1*, pero no de *DLO2*, está relacionada con la inmunidad

Las líneas de sobreexpresión y complementación de *DLO1* y *DLO2* se generaron todas mediante el uso del promotor 35S. Sin embargo, es probable que la expresión de los DLO de tipo salvaje esté altamente regulada, similar a la de *DMR6*, que se activa fuertemente durante la defensa de la planta. Por lo tanto, analizamos los datos de expresión génica disponibles públicamente para determinar si *DLO1* y *DLO2* muestran una expresión relacionada con la inmunidad similar a *DMR6*. Para este análisis, se usaron datos de 9 experimentos de micromatrices de Affymetrix diferentes, todos relacionados con el perfil transcripcional después del ataque de patógenos, la aplicación de hormonas relacionadas con la defensa y el tratamiento con inductor/efector.

El análisis de expresión se enfocó en 30 2OG oxigenasas que pertenecen al gran clado que contiene los DLO y *DMR6*. La agrupación jerárquica de los genes permitió agrupar los genes de 2OG oxigenasa de acuerdo con sus patrones de expresión, lo que proporciona información sobre qué genes están corregulados durante las respuestas inmunitarias de las plantas. Sorprendentemente, *DLO1* se agrupa con *DMR6*, mientras que *DLO2* no muestra ninguna corregulación con *DMR6* o *DLO1*. Tanto *DMR6* como *DLO1* se activan después de la infección con el mildiú velloso *H. arabidopsidis*, el mildiú polvoroso *Erysiphe orontii* y la bacteria *P. syringae*, así como el tratamiento con SA. *DLO2* se agrupa muy lejos de *DMR6* y *DLO1* y parece no responder en los diferentes experimentos. Un análisis más detallado de los datos de micromatrices disponibles mediante el uso de Genevestigator reveló que *DLO2* no se expresa en respuesta a ningún tratamiento o en ningún tejido, a excepción de silicuas, lo que sugiere que *DLO2* no tiene un papel en la inmunidad de los tejidos vegetales vegetativos.

La sensibilidad de los DLO a la infección por *H. arabidopsidis* se verificó experimentalmente mediante PCR cuantitativa (qPCR). *DMR6* y *DLO1* están altamente activados en plantas infectadas con un aislado compatible o incompatible de *H. arabidopsidis*. También después del tratamiento con el imitador de SA BTH, tanto *DMR6* como *DLO1* se activan fuertemente. Por el contrario, *DMR6* y *DLO1* no responden al jasmonato de metilo (MeJA), que se sabe que activa genes inducidos por ácido jasmónico. La expresión de *DLO2* es indetectable (valores de cT superiores a 35) en las diferentes condiciones experimentales lo que confirma los datos de Genevestigator. El hecho de que tanto *DMR6* como *DLO1* se activen durante la respuesta inmunitaria de la planta sugiere que en las hojas de las plantas de tipo salvaje *DLO1* también actúa como un regulador negativo de la defensa. Sin embargo, la pregunta que permanece es ¿por qué los mutantes *dmr6* tienen un fenotipo de resistencia tan claro en presencia de un gen *DLO1* intacto que podría asumir la función de *DMR6*?

DLO1 y *DMR6* muestran una expresión espacial diferente en hojas infectadas

Para analizar la expresión específica de tejido de *DLO1* durante la infección por mildiú veloso, generamos líneas transgénicas que contienen una construcción con el promotor *DLO1* fusionado con el gen reportero *GUS* (pro_{DLO1}:*GUS*). Dado que no observamos ninguna expresión de *DLO2*, no se construyó ninguna fusión *GUS* con el promotor de *DLO2*. Después de la infección por *H. arabidopsidis*, la expresión espacial de *DMR6* se detectó específicamente en los sitios que están en contacto directo con el patógeno, como se ha descrito anteriormente. Por el contrario, la expresión de *DLO1* no se indujo en células que están en estrecho contacto con el patógeno, sino solo en o alrededor de las venas principales de cotiledones y hojas infectados. Curiosamente, la expresión de *DLO1* se observó solo en áreas de la hoja que están cerca de los sitios de infección por *H. arabidopsidis*, lo que indica que la activación de *DLO1* depende de la presencia del patógeno. La ausencia de actividad *DLO1* en células que contienen haustorios podría explicar por qué *DLO1* no puede complementar completamente la pérdida de actividad *DMR6* en los mutantes *dmr6*. Si bien estos datos muestran distintas actividades de los genes *DMR6* y *DLO1*, el grado de redundancia de estos genes no está claro y, por lo tanto, se estudió genéticamente más a fondo.

La función de *DLO1* es parcialmente redundante con *DMR6*

El análisis de redundancia en líneas mutantes se realiza mejor en el mismo fondo genético. Por lo tanto, obtuvimos mutantes en el fondo Col-0 para *DMR6* (línea GABI-KAT GK-249H03.01, mutante designado *dmr6-3*) y *DLO1* (línea SALK 059907, llamado *dlo1*). Se generaron dobles mutantes *dmr6-3_dlo1* y se analizaron fenotípicamente junto con los simples mutantes *dmr6-3* y *dlo1*, así como con la línea parental Col-0. El nivel de susceptibilidad a *H. arabidopsidis* Waco9 se redujo fuertemente en el mutante *dmr6-3*, pero sólo se redujo ligeramente en el mutante *dlo1*. La combinación de las dos mutaciones en el doble mutante *dmr6-3_dlo1* resultó en plantas que mostraron una resistencia completa a *H. arabidopsidis*.

A continuación, probamos el nivel de expresión del gen de defensa en los mutantes, ya que investigaciones anteriores sobre los mutantes *dmr6-1* y *dmr6-2* mostraron niveles aumentados de expresión de *PR-1* y otros genes de defensa. Además, el mutante *dmr6-3* mostró una expresión elevada de *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*, lo que confirma los resultados anteriores. El mutante *dlo1* solo no mostró una inducción significativa de la expresión de los tres genes PR.

Por el contrario, el doble mutante *dmr6-3_dlo1* mostró niveles extremadamente altos de expresión del gen de defensa. Las transcripciones de *PR-1* fueron más de 30 000 veces más altas en el mutante *dmr6-3_dlo1* que en Col-0, y más de 100 veces más altas que en el simple mutante *dmr6-3*. En los mutantes probados hubo una clara correlación entre el nivel de resistencia al mildiú veloso y el aumento en la expresión de genes de defensa, lo que sugiere que la resistencia es causada por la activación de las respuestas inmunitarias de las plantas. Nuestros datos muestran que la mutación *dlo1* mejora la inmunidad del simple mutante *dmr6-3*, lo que indica que *DLO1* y *DMR6* actúan parcialmente redundantes.

Esto fue corroborado adicionalmente por el fenotipo de crecimiento de los mutantes. Las plantas cultivadas durante 5,5 semanas en condiciones de días cortos mostraron diferencias notables entre los genotipos. Mientras que el mutante *dlo1* crece de manera similar a Col-0, y el mutante *dmr6-3* solo muestra una ligera reducción del crecimiento, el doble mutante *dmr6-3_dlo1* mostró una fuerte reducción del crecimiento que resultó en plantas enanas. La reducción del crecimiento y el nivel de resistencia al mildiú veloso están correlacionados en los mutantes probados, lo que sugiere que estos dos fenotipos están funcionalmente vinculados.

Es bien sabido que una fuerte activación de la inmunidad vegetal puede ir acompañada de una reducción severa del crecimiento, que en muchos casos puede estar relacionada con niveles elevados de SA. De hecho, los niveles de SA fueron más de 200 veces más altos en el doble mutante *dmr6-3_dlo1* que en el control Col-0, y ~20 veces mayor que en el mutante *dmr6-3*. El simple mutante *dmr6-3* mostró un modesto ~aumento de 10 veces en SA en comparación con el control Col-0, mientras que el mutante *dlo1* no acumuló más SA que Col-0.

Para probar si el alto nivel de SA en *dmr6-3_dlo1* es la causa del fenotipo enano y el alto nivel de resistencia al mildiú veloso, el doble mutante se cruzó con el mutante *sid2*, que está fuertemente comprometido en la biosíntesis de SA como resultado de la pérdida de la isocorismato sintasa 1. El triple mutante *dmr6-3_dlo1_sid2* mostró una recuperación casi completa del fenotipo de crecimiento del doble mutante *dmr6-3_dlo1*, aunque permaneció ligeramente más pequeño que el mutante *sid2*. Los ensayos de la enfermedad mostraron que también el alto nivel de resistencia del doble mutante *dmr6-3_dlo1* y del simple mutante *dmr6-3* se redujo fuertemente en ausencia de SID2. Debido al bajo nivel de SA, el mutante *sid2* es más susceptible a *H. arabidopsidis* que el Col-0 de tipo salvaje. El nivel de susceptibilidad a *H. arabidopsidis* correlaciona bien con el nivel de SA total en los mutantes. Tanto *dmr6* como el doble mutante *dmr6-3_dlo1* no muestran esporulación a 5 dpi y tienen los niveles de SA más altos. El triple mutante *dmr6-3_dlo1_sid2* todavía produce más SA que Col-0, lo que podría explicar su menor susceptibilidad al mildiú veloso.

Se concluyó que tanto la resistencia a *H. arabidopsidis* como la reducción del crecimiento del mutante *dmr6-3_dlo1* es el resultado de niveles aumentados de SA. Los fenotipos extremos del doble mutante demuestran que los genes *DLO1* y *DMR6* actúan de forma redundante. Sin embargo, el simple mutante *dmr6* es más resistente al mildiú veloso que el mutante *dlo1*. Junto con la localización diferente observada de la expresión de los genes *DMR6* y

DLO1, los datos actuales indican que los genes *DMR6* y *DLO1* tienen funciones distintas, pero parcialmente redundantes como reguladores negativos de la inmunidad vegetal.

Listado de secuencias

5

<110> Enza Zaden Beheer B.V.

<120> PLANTAS RESISTENTES A *PHYTOPHTHORA* PERTENECIENTES A LA FAMILIA SOLANACEAE

10

<130> 4/2RV34/52P

<150> PCT/EP2014/062802

<151> 2014-06-18

15

<160> 23

<170> BiSSAP 1.2

20

<210> 1

<211> 337

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

25

<400> 1

30

```

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

```

60

325 330 335

Asn

65

<210> 2

<211> 342

<212> PRT

ES 2 886 551 T3

<213> Solanum tuberosum
<400> 2

5 Met Glu Thr Thr Ser Val Leu Ser Gly Gly Phe Asn His Ser Thr Leu
1 5 10
Pro Glu Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Gln Arg Pro Arg Met Ser Glu
20 25 30
Val Val Asp Arg Asp Asp Leu Val Pro Val Ile Asp Met Ser Cys Thr
35 40 45
10 Asp 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 Met Asp
65 70 75 80
15 Glu Met Leu Gly Val Ala 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
20 Thr Ser Phe Asn Val Lys Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr
115 120 125
Leu Arg Leu His Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Tyr Ala Pro Glu Trp Pro
130 135 140
Ser Asn Pro Pro Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Lys Tyr Cys Met Glu
145 150 155 160
25 Val Arg Gln Val 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 Pro Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr
195 200 205
30 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 Glu Trp
225 230 235 240
35 Leu Ser Ile Lys Pro Gln Pro Asp 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
40 Cys Pro Asn Asp Cys Ser Ile Ile Ser Ala Pro Lys Thr Leu Ile Glu
290 295 300
Asp Gly Ser Ser Ala Ile Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Thr Glu Tyr Tyr
305 310 315 320
45 Asp 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

50 <210> 3
<211> 340
<212> PRT
<213> Petunia

55 <400> 3

5 Met Glu Ser Asn Val Ile Ser Ser Gly Thr Lys Tyr Thr Asn Leu Pro
 1 5 10
 Lys Ser Tyr Val Arg Pro Glu Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val
 20 25 30
 5 Asp Asp Cys Gln Asp Asn Ile Pro Val Ile Asp Leu Cys Cys Arg Asp
 35 40 45
 Asn Asn Val Ile Ile Gln Gln Ile Glu Glu Ala Cys Arg Leu Tyr Gly
 50 55 60
 10 Phe Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Pro Lys Lys Leu Ile Glu Glu
 65 70 75 80
 Met Leu Gly Val Ala His Glu Phe Phe Lys Leu Pro Val Glu Glu Lys
 85 90 95
 15 Met Lys Leu Tyr Ser Asp Asp Pro Ser Lys Thr Met Arg Leu Ser Thr
 100 105 110
 Ser Phe Asn Val Lys Lys Glu Thr Val His Asn Trp Arg Asp Tyr Leu
 115 120 125
 Arg Leu His Cys Tyr Pro Leu Glu Lys Tyr Ala Pro Glu Trp Pro Ser
 130 135 140
 20 Thr Pro Ser Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Arg Tyr Cys Ile Glu Val
 145 150 155 160
 Arg Gln Leu Gly Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Ile Ser Glu Ser Leu Gly
 165 170 175
 25 Leu Glu Lys Asp Cys Ile Lys Asn Ile Leu Gly Glu 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 Ala His Thr Asp Pro Asn Ala Leu Thr Ile Leu Leu Gln
 210 215 220
 30 Asp Leu Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Lys Pro Arg Ala Asn Ala Phe Val Ile Asn Leu Gly Asp Gln
 245 250 255
 35 Leu Gln Ala Leu Ser Asn Gly Lys Tyr Arg Ser Val Trp His Arg Ala
 260 265 270
 Ile Val Asn Ser Asp Lys Pro Arg Leu Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys
 275 280 285
 40 Pro Ser Asp Cys Ala Ile Ile Ser Ala Pro Lys Thr Leu Thr Glu Asp
 290 295 300
 Gly Ser Pro Thr Ile Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Pro Glu Tyr Tyr Lys
 305 310 315 320
 Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Met Glu Leu Phe
 325 330 335
 45 Lys Lys Gly Ser
 340

<210> 4
 <211> 337
 50 <212> PRT
 <213> Petunia

<400> 4

55 Met Glu Thr Lys Val Leu Ser Ser Gly Ile Arg His Ser Thr Leu Pro
 1 5 10 15
 Gln Asn Tyr Val Arg Pro Lys Ser Asp Arg Pro Arg Leu Ser Glu Val
 20 25 30
 60 Ala Asn Cys Glu Asn Val Pro Val Ile Asp Leu Gly Cys Ala Asp Arg
 35 40 45
 Thr Leu Ile Ile His Gln Ile Ser Glu Ala Cys Arg Leu Tyr Gly Phe
 50 55 60
 Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Pro Lys Lys Ile Val Glu Glu Met
 65 70 75 80
 65 Leu Glu Ile Ala Gly Glu Phe Phe Arg Leu Pro Val Glu Glu Lys Leu

ES 2 886 551 T3

5 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
 10 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
 15 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
 20 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

25 <210> 6
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Solanum lycopersicum
 <400> 6

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

ES 2 886 551 T3

				260					265					270			
	Ile	Ile	Ser	Ala	Pro	Lys	Thr	Leu	Thr	Glu	Asp	Gly	Ser	Ser	Ala	Ile	
			275					280					285				
5	Tyr	Arg	Asp	Phe	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Phe	Trp	Ser	Arg	
	290						295					300					
	Asn	Leu	Asp	Gln	Glu	Tyr	Cys	Leu	Glu	Leu	Phe	Lys	Asn	Asp	Gly	Thr	
	305					310					315					320	

10 <210> 7
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> Solanum tuberosum

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.1014
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Solanum tuberosum"

20 <400> 7

	atggaacga	aagttatttc	cagcggaaatc	caccactcta	ctctccctca	aagttacatc	60
	cgacccgaat	ccgataggcc	acgtctatcg	gatgtggctg	attgcgaaaa	tgttccaata	120
25	attgacttag	gttgcggaga	ccaagctcaa	ataatccgtc	taattggaga	agcttgtaa	180
	acttatggtt	tctttcaggt	aattaatcat	ggtgtaccaa	aggaagttgt	agagaaaatg	240
	ctaggggtag	ctggggaatt	tttcaatcta	ccagtagaag	agaagctaaa	attgtattca	300
30	gatgatcctt	caaagacat	gagattatct	actagtttta	atgttaaaaa	ggagacagtt	360
	cataattgga	gagattatct	cagacttcat	tgtcatcctc	tggagaaata	tgctcctgaa	420
35	tggccttcta	atccatcgtc	tttcagggat	atcgtgagca	gatattgcac	ggaagttcga	480
	caactcggat	ttagattgga	ggaagccata	gcagagagcc	tgggcttaga	gaaagagtg	540
	attaaagatg	tattgggaga	acaaggccaa	catatggcta	tcaattttta	tcctccttgt	600
40	ccacaaccag	aactcacata	tgggcttccg	gcccactactg	atccaaattc	acttacaatt	660
	cttcttcaag	acttgcaagt	ttctggtcct	caagttctta	aagatggtaa	atggttggt	720
	gtcaaacctc	aaccagatgc	ctttgtcatt	aatcttggtg	atcaattgca	ggcagtaagt	780
45	aacggtaagt	acaaaagtgt	atggcatcga	gctattgtga	attcagatca	agctaggatg	840
	tcagtggcct	cgttcctatg	tccgtgcatg	agcgcgaaaa	tcagtgtctc	aaaactcctg	900
50	acagaagatg	gatctccagt	catttatcag	gacttcacgt	atgctgagta	ttacaagaag	960
	ttctggagca	ggaatttga	ccaggaacat	tgtttgaac	ttttcaagaa	ttaa	1014

55 <210> 8
 <211> 1029
 <212> ADN
 <213> Solanum tuberosum

60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.1029
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Solanum tuberosum"

65 <400> 8

ES 2 886 551 T3

	atggaacaa caagtgttct ttccggtgga ttcaaccact caaccctccc tgaatcttac	60
	gttcgacctg aatoccaaag accccgcatg tctgaagttg ttgatcgtga tgatcttggt	120
5	ccagttatcg atatgtcttg tactgatagg aacgttatcg ttcacaaat tggcgaagct	180
	tgtcgccttt atgggttttt ccaggtgata aatcacggtg tatcaaagaa ggttatggat	240
	gaaatgttg gggtagctca tgaatTTTTT aagcttccag tggagaaaa gatgaaattg	300
10	tactcagatg atccatcaaa gactatgaga ttatcaacta gttttaatgt taagaaggaa	360
	actgttcata attggagaga ttatcttagg ctacactgtt atcctttgga caaatatgcc	420
	cctgaatggc cttctaatac tccttctttc agggaaatag tgagcaaata ttgcatggaa	480
15	gtagacaag ttggatatag attagaagaa gcaatatcag agagcctag gctcgagaaa	540
	gattgtatta aaaatgtgtt ggggaacaa ggacaacata tggctatcaa tttttatcct	600
	ccatgtccac aacctgaact aacttatggg ttaccagccc atacagatcc aatgcaatt	660
20	acaattcttc ttcaagattt gcaagtggct ggccttcaag ttcttaagga tggagaatgg	720
	ttatctatta aacctcaacc tgatgccttt gtcacaaatc ttggtgatca attggaggca	780
25	ttgagtaatg gaaagtataa aagtatatgg catagagcta ttgtaaattc agataaagca	840
	aggatgtctg tggcttcttt cctctgtccc aatgattgtt ccattatcag tgctccaaaa	900
	accttaattg aagatggatc ttcagccatt tatcgagatt tcaattatac tgaatattat	960
30	gacaaatTTT ggagcaggaa tttagaccag gaatattgtt tagaactTTT caagaacgat	1020
	ggaacctag	1029

35 <210> 9
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> Petunia

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.1014
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Petunia"

45 <400> 9

	atggaacaa aagttctttc aagtggaatc cgtcattcta ccctccctca aaattatgtc	60
	cgacccaaat ccgataggcc acgtctttca gaagtggcca attgtgaaaa cgttccagtt	120
50	attgacttgg gttgtgctga cagaactctc ataattcatc aaattagcga agcctgtcgt	180
	ctttatgggt ttttccaggt aataaacat ggtgtaccaa aaaaaatagt tgaggaaatg	240

ES 2 886 551 T3

5 ctagagatag ctggggagtt ttttaggcta ccagttgaag agaagcttaa gttgtattca 300
 gatgaccctt caaagaccat gagattatca actagtttta atgtaaagaa ggagacggtg 360
 10 cacaattgga gagattatct cagacttcat tgttatcctc tggagaaata tgctcctgaa 420
 tggccttcaa atccttcatc tttcagggaa atcgtgagca gatattgcac ggaagttcga 480
 caacttggat tcagattgca agaagccata gcagaaagct taggcttaga gaaagagtgt 540
 15 ataaaggatg tgttaggtga acaagggtcaa catatggcta taaactttta tcctccatgc 600
 ccagaaccag aactcactta cgggctgcca gccataaccg atccaaatgc tcttacaatt 660
 cttcttcaag acttgcaagt agctggcttc caagtcttta aagatggcaa atggttggct 720
 20 gtcaaacctc agcccgatgc ctttgttgtt aatctcgggtg atcaactgca ggcagtgagt 780
 aacggaaggt acaaaagcgt atggcatcga gctgttgtaa atacagaaaa tgccaggatg 840
 tctgtggctt cgttcttatg tcctctgat agtgcaaaaa tcagtgctcc aaaactcctc 900
 actgatgatg gatctccaat aatttatcgg gacttcacgt atgcagagta ttacaagaag 960
 ttctggagca ggaatttggga ccaagaacat tgtttggaaac ttttcaagaa ttaa 1014

25 <210> 10
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> Petunia
 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.1023
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Petunia"
 35 <400> 10

40 atggaatcta atgttatttc cagcgggaacc aaatacacia acctccctaa aagttatggt 60
 cgcccagaat cccaacgacc tcggttatct gaagtagacg attgccaaga taatattcca 120
 gttattgatt tgtgttgag agacaataac gttatcattc acaaaattga agaagcttgt 180
 45 cgtctttatg gcttttttca ggtaataaac catggtgtac caaagaaact aatagaggaa 240
 atgctagggg tagctcatga gtttttcaag ctaccagtgg aagagaagat gaagttgtac 300
 tcagatgatc catcaaagac catgagatta tcaacaagtt ttaatgtgaa gaaggaaact 360
 50 gttcataatt ggagagacta tcttagattg cactgctatc ctttggagaa atatgccct 420
 gaatggcctt ctactccctc ttctttcag gaaatcgta gcagatattg catagaagtt 480
 cgacaacttg gatatagatt acaagaagca atatcagaga gcttaggcct agagaaagat 540
 55 tgtataaaaa atatattggg tgaacaaggt caacatatgg ctgttaatta ttaccctcca 600
 tgtccagaac cagaactaac ttatggtttg ccagccata ctgatcctaa tgccttact 660
 atacttcttc aagacttgca agtagcaggt cttcaagttc tcaaggatgg taaatggta 720

60

ES 2 886 551 T3

5 tctgtgaaac ctogggccaa tgcctttgtc atcaatcttg gtgatcaatt gcagggcgtg 780
 agtaatggaa aatatagaag tgtatggcac agagctatag taaattcaga caaaccaagg 840
 ctgtcagtggt cttctttctt gtgtcctagt gattgtgoga taatcagtgc tccaaaaacc 900
 ttaactgaag atgggtctcc aaccatttat cgggatttca cgtatccaga atattacaag 960
 10 aaattttggg gcagaaattt agatcaagaa cactgtatgg aacttttcaa gaaaggaagc 1020
 tag 1023

15 <210> 11
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> Solanum lycopersicum

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.1014
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Solanum lycopersicum"

<400> 11

25 atggaaacca aagttatttc tagcggaatc aaccactcta ctcttcctca aagttacatc 60
 cgacccgaat ccgatagacc acgtctatcg gaagtggctg attgtgaaa tgttccaata 120
 attgacttaa gttgocgaga tcaagctcaa ataattcgtc aaattggaga agcttgtcaa 180
 30 acttatgggt tctttcaggt aattaatcat ggtgtaccaa aggaagtgt agagaaaatg 240
 ctaggggtag ctggggaatt tttcaattta ccagtagaag agaaactaaa attatattca 300
 gatgatcctt caaagacat gagattatca acaagtttta atgttaaaaa ggagacagtt 360
 35 cataattgga gagattatct cagacttcat tgttatctc tagagaagta tgctcctgaa 420
 tggccttcta atccatcatc tttcagggaa atcgtgagca gatattgagc ggaatcctg 480
 caactcggat ttagattaga agaagccata gcagaaagcc tggggtaga taaagagtgt 540
 40 ataaaagatg tattgggtga acaaggacaa catatggcta tcaattatta tcctccttgt 600
 ccacaaccag aacttactta tgggcttccg gcccactctg atccaaattc acttacaatt 660
 45 cttcttcaag acttgcaagt tgcgggtctt caagttctta aagatggcaa atggttagct 720
 gtaaaacctc aacctgacgc ctttgtcatt aatcttgggg atcaattgca ggcagtaagt 780
 aacgtaagt acagaagtgt atggcatcga gctattgtga attcagatca agctaggatg 840
 50 tcagtggctt cgtttctatg tccgtgtgat agcgcgaaaa tcagtgcacc aaagctgctg 900
 acagaagatg gatctccagt gatttatcaa gactttacgt atgctgagta ttacaacaag 960
 ttctggagca ggaatttggg ccagcaacat tgtttgggaa ttttcaagaa ctaa 1014

55 <210> 12
 <211> 963
 <212> ADN
 <213> Solanum lycopersicum

60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.963
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Solanum lycopersicum"

65 <400> 12

ES 2 886 551 T3

atgatgacaa caacaagtgt tctttctagt ggattcaacc actcaaccct ccctcaatct 60
 tacggtcgac ctgaatctca aagaccttgc atgtctgaag ttgttgatag cgacgatctt 120
 5 gtcccagtca ttgatatgtc ttgtactgat aggaacgtta tcgttcatca aatcggtgaa 180
 gcttgtcgtc tttatgggtt ttttcaggtg ataaatcacg gtgtgtcgaa gaagcgatg 240
 gatgaaatgt tagggactat gagattatca actagtttta atgttaagaa ggaaactgtt 300
 10 cataattgga gagattatct taggctacat tgttatcctt tggacaaata tggccctgaa 360
 tggccttcta atcctccttc tttcagggaa atagtaagca aatattgcat ggaagttaga 420
 gagcttggat atagattgga agaagcaata tcagagagct tagggcttga gaaggattgt 480
 15 ataaaaaatg tgtaggtgga acaaggacaa catatggcta tcaattttta tcctcagtgt 540
 ccacaacctg aattaactta tgggttacca gccatacag atccaaatgc aattacaatt 600
 cttcttcaag atttgcaagt ggctggcctt caagtctta aggatgaaa atggttatct 660
 20 attaaacctc agcctaagtc ctttgtcatc aatcttgggt atcaattgga ggcgttgagt 720
 aatgggaagt ataaaagtat atggcataga gctattgtaa attcagacaa agcaaggatg 780
 25 tctgtggctt cttttctctg tcccaatgat tgttccatta tcagtgtctc aaaaacctta 840
 actgaagatg gatcttctgc aatttatcga gatttcactt atgctgaata ttatgaaaaa 900
 ttctggagca ggaatttaga tcaggaatat tgtttagaac tttttaagaa cgatggaacc 960
 30 tag 963

<210> 13
 <211> 34
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1.34

40 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /nota="cebador AttB1-F de S. Lycopersicum" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 13
 aaaaagcagg cttctgggt gaacaaggac aaca 34

45 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.33
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /nota="cebador AttB2-R de S. Lycopersicum" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 14
 agaaagctgg gtaaaacgaa gccactgaca tcc 33

60 <210> 15
 <211> 303
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 65 <222> 1.303

ES 2 886 551 T3

<223> /tipo_mol="ADN no asignado" /nota="construcción de silenciamiento para SEQ ID Nos 11 y 12"
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 15

```

5          ttgggtgaac aaggacaaca tatggctatc aattattatc ctcttgtcc acaaccagaa      60
          cttacttatg ggcttccggc ccatactgat ccaaattcac ttacaattct tcttcaagac      120
          ttgcaagttg cgggtcttca agttcttaaa gatggcaaat ggtagctgt aaaacctcaa      180
10         cctgacgcct ttgtcattaa tcttggggat caattgcagg cagtaagtaa cggtaagtac      240
          agaagtgtat ggcacgcgac tattgtgaat tcagatcaag ctaggatgtc agtggcttcg      300
15         ttt                                                                303
    
```

<210> 16

<211> 375

<212> PRT

20 <213> Capsicum annum

<400> 16

```

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

ES 2 886 551 T3

130 135 140
 Leu His Cys Tyr Pro Leu Glu Lys Tyr Ala Pro Glu Trp Pro Ser Asn
 145 150 155 160
 Pro Ser Ser Phe Ser Tyr Arg Glu Ile Val Ser Arg Tyr Cys Thr Glu
 5 Val Arg Gln Leu Gly Phe Arg Leu Gln Glu Ala Ile Ala Glu Ser Leu
 165 170 175
 180 185 190
 Gly Leu Glu Lys Glu Cys Ile Lys Asp Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln
 195 200 205
 10 His Met Ala Ile Asn Phe Tyr Pro Pro Cys Pro Gln Pro Glu Leu Thr
 210 215 220
 Tyr Gly Leu Pro Ala His Thr Asp Pro Asn Ser Leu Thr Ile Leu Leu
 225 230 235 240
 Gln Asp Leu Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp
 245 250 255
 15 Leu Ala Val Lys Pro Gln Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Leu Gly Asp
 260 265 270
 Gln Leu Gln Ala Val Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Ser Val Trp His Arg
 275 280 285
 Ala Ile Val Asn Ser Asp Lys Ala Arg Met Ser Val Ala Ser Phe Leu
 290 295 300
 20 Cys Pro Cys Asp Ser Ala Lys Ile Ser Ala Pro Lys Leu Leu Thr Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Pro Val Ile Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Ala Glu Tyr Tyr
 325 330 335
 25 Lys Lys Phe Trp Ser Arg Asn Leu Asp Gln Glu His Cys Leu Glu Leu
 340 345 350
 Phe Lys Asn Lys Gly Arg Leu Ala Asp Gln Ile Arg Trp Ile Ser Asp
 355 360 365
 Val Ser Asn Ile Tyr Thr Leu
 370 375

30 <210> 17
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Capsicum annum
 35 <400> 17

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

60

ES 2 886 551 T3

5 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
 10 Gln Asp Leu Gln Val Glu Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp
 225 230 235 240
 Leu Ser Val Lys Pro Gln Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Leu Gly Asp
 245 250 255
 Gln Leu Gln Ala Leu Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Ser Val 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 Ser Asp Cys Ser Ile Ile Ser Ala Pro Lys Ala Leu Thr Glu
 290 295 300
 15 Asp Gly Ser Ser Ala Ile Tyr Arg Asp Phe Thr Tyr Thr Glu Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Asn Lys Phe Trp Ser Arg Ser Leu Asp Gln Glu Arg Arg Leu Lys Leu
 325 330 335
 20 Phe Lys Lys Val Tyr Thr
 340

<210> 18

<211> 337

<212> PRT

25 <213> Nicotiana benthamiana

<400> 18

30 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 Asp Ile Gly Cys Gly Asp Arg
 35 35 40 45
 Asn Leu Ile Val His Gln Ile Gly Glu Ala Cys Arg Leu Tyr Gly Phe
 50 55 60
 35 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
 40 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
 45 Pro Ser Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Arg Tyr Cys Met Glu Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Leu Gly Phe Arg Leu Gln Glu Ala Ile Ala Glu Ser Leu Gly Leu
 165 170 175
 Glu Lys Glu Cys Ile Lys Asp Val Leu Gly Glu Gln Gly Gln His Met
 180 185 190
 50 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
 55 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
 60 Val Asn Ser Asp Lys Ala Arg Leu Ser Val Ala Ser Phe Leu Cys Pro

ES 2 886 551 T3

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

10 <210> 19
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

15 <400> 19

Met Glu Thr 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 20 25 30
 Val Asp Cys Glu Asn Val Pro Val Ile Asp Met Gly Cys Gly Asp Arg
 35 40 45
 Asn His Ile Ile Arg Gln Ile Gly Glu Ala Cys His Leu Tyr Gly Phe
 50 55 60
 Phe Gln Val Ile Asn His Gly Val Pro Thr Asn Leu Val Glu Glu Met
 25 65 70 75 80
 Leu Glu Ile Ala Arg 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 Ala Ser Phe Arg Glu Ile Val Ser Arg Tyr Cys Thr Glu Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Leu Gly Phe Arg Leu Gln Glu Ala Ile Ala Glu Ser Leu Gly Leu
 165 170 175
 Glu Lys Val 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 Gln Val Ala Gly Leu Gln Val Leu Lys Asp Gly Lys Trp Leu Ala
 225 230 235 240
 Val Lys Pro Gln Pro Asp Ala Phe Val Ile Asn Leu Gly Asp Gln Leu
 245 250 255
 Gln Ala Val Ser Asn Gly 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 Phe Phe Lys
 325 330 335
 Asn

60 <210> 20
 <211> 1139
 <212> ADN
 <213> Capsicum annuum

65 <220>
 <221> fuente
 <222> 1.1139
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Capsicum annuum"

ES 2 886 551 T3

5 caactcgggt tcagattgca ggaagccata gcagagagcc taggcttaga gaaagagtgt 540
ataaaggatg tattgggcga acaagggtcaa cacatggcta tcaatttcta tcctccttgt 600
ccacaaccag aactcactta tgggctgcca gcacatactg atccaaatgc ccttacaatt 660
cttcttcaag acttagaagt agctggctct caagtctta aagatggcga atggttggcc 720
gtcaagcctc aaccagatgc ctttgtcatt aatcttgggtg atcaactgca ggcagtgagt 780
10 aatgggagat acaaaagcgt atggcatcga gctattgtaa attcagacaa agccaggttg 840
tcagtggctt cgttcctttg tccgtgcgat agcgcgaaaa tcagtgtcc aaagctcctc 900
actgaagatg gatctcctgt catttatcag gactttacct atgctgagta ttacaaaaag 960
15 ttctggagca ggaatttga ccaggaacat tgtttggaac ttttcaagaa ctaa 1014

20 <210> 23
<211> 1014
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

25 <220>
<221> fuente
<222> 1.1014
<223> /tipo_mol="ADN no asignado" /organismo="Nicotiana tabacum"

30 <400> 23
atggaagcaa aagttctttc cagcggaaatc cgccactcta ctatccctca aagttacatc 60
cgccctcaat ccgataggcc gcgcctttct gaagttgctg attgtgaaaa cgttccagta 120
35 gttgatatag gttgcggtga tagaaacctt attgttcacat aaattggtga agcctgtcgt 180
ctttatggtt ttttccagggt aattaatcat ggtgtaccaa agaatttaat agacgaaatg 240
ctagagatag ctggggaatt ttttaggctt ccagttgaag agaagttgaa attgtactca 300
40 gatgacccat cgaagacgat gagattgtcg actagtttta atgtgaaaa ggagaagggt 360
cacaattgga gagattatct cagacttcat tgttatcctc ttgaaaatta cgctcctgaa 420
tggccttcca atccttctc tttcagggaa atcgtgagca gatattgcat ggaagttcga 480
45 caactcgggt tcagattgca ggaagccata gcagagagcc taggcttaga gaaagagtgt 540
ataaaggatg tattgggcga acaagggtcaa cacatggcta tcaatttcta tcctccttgt 600
ccacaaccag aactcactta tgggctgcca gcacatactg atccaaatgc ccttacaatt 660
50 cttcttcaag acttagaagt agctggctct caagtctta aagatggcga atggttggcc 720
gtcaagcctc aaccagatgc ctttgtcatt aatcttgggtg atcaactgca ggcagtgagt 780
aatgggagat acaaaagcgt atggcatcga gctattgtaa attcagacaa agccaggttg 840
55 tcagtggctt cgttcctttg tccgtgcgat agcgcgaaaa tcagtgtcc aaagctcctc 900
actgaagatg gatctcctgt catttatcag gactttacct atgctgagta ttacaaaaag 960
60 ttctggagca ggaatttga ccaggaacat tgtttggaac ttttcaagaa ctaa 1014

REIVINDICACIONES

1. Planta perteneciente a la familia *Solanaceae* en donde dicha planta comprende un rasgo genético que proporciona resistencia a *Phytophthora* y en donde dicho rasgo genético que proporciona resistencia a *Phytophthora* está codificado por una combinación de al menos dos genes que tienen una expresión o transcripción reducida de dichos dos genes en comparación con dicha planta perteneciente a la familia *Solanaceae* que es susceptible a *Phytophthora* en donde:
- 5 dicha planta es pimiento dulce (*Capsicum annuum*) o *Capsicum spp.*, dicha resistencia a *Phytophthora* es la resistencia a *Phytophthora capsici* y dicha combinación de al menos dos genes son genes que codifican proteínas de acuerdo con las SEQ ID No. 16 y SEQ ID No. 17, o proteínas que tienen al menos 90 % de
- 10 identidad de secuencia con las SEQ ID Nos. 16 y 17.