

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 994**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

A01H 5/06 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/EP2013/076618**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14091021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13819001 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2931902**

54 Título: **Método para desarrollar plantas de remolacha azucarera resistentes a herbicidas**

30 Prioridad:

13.12.2012 EP 12196858
13.12.2012 US 201261736817 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2018

73 Titular/es:

SESVANDERHAVE N.V. (100.0%)
Industriepark 15, Soldatenplein Zone 2, No. 15
3300 Tienen, BE

72 Inventor/es:

WEYENS, GUY;
LEFÈBVRE, MARC;
HAIN, RÜDIGER y
JOHANN, GERHARD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 684 994 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

Método para desarrollar plantas de remolacha azucarera resistentes a herbicidas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para generar plantas de remolacha azucarera resistentes a herbicidas, por ejemplo inhibidor(es) de la enzima acetohidroxiácido sintasa (ALS).

La presente invención se refiere, además, a las plantas que se obtienen mediante este método.

La remolacha azucarera es un cultivo agrícola importante en las regiones templadas y subtropicales.

En la agricultura moderna, los herbicidas son ampliamente utilizados para controlar la proliferación de malas hierbas.

10 El desarrollo de plantas de remolacha azucarera resistentes a herbicidas como inhibidores de ALS se puede llevar a cabo mediante el uso de enfoques transgénicos.

De hecho, la introducción de ADN extraño que porta un gen que confiere resistencia a un herbicida se ha realizado con éxito en una diversidad de cultivos de campo, incluida la remolacha azucarera.

15 El documento WO 95/10178 describe una resistencia inducida por transgénicos al herbicida Bialaphos. El gen que codifica la resistencia se introduce en protoplastos de células protectoras de la remolacha azucarera, después estos protoplastos se regeneran en plantas de remolacha azucarera. Esas plantas son más resistentes a la fosfinotricina química y su derivado glufosinato. Plantas no transformadas no adquirieron resistencia a Bialaphos.

20 En el mejor de los casos, se regeneraron 28 callos regenerados a partir de 83000 protoplastos; en el peor, 1 callo se regeneró a partir de 190 000 protoplastos. Posteriormente, algunos de estos callos pueden mostrar embriogénesis somática y pueden regenerar plántulas de remolacha azucarera, con una eficiencia del 1% y, una característica muy ventajosa, de hasta el 30%.

Este enfoque, sin embargo, no se utiliza comúnmente en la técnica, que se basa ampliamente en la transformación más directa de callos de explantes obtenidos de órganos de remolacha azucarera tales como embriones y/o discos foliares.

25 Todavía existe una importante necesidad de desarrollar plantas resistentes a herbicidas, tales como en el cultivo de remolacha azucarera, y ello sin depender de vectores de ADN y/o en la inserción de genes extraños.

30 Por otro lado, el desarrollo de una planta de remolacha azucarera resistente a herbicida(s), tales como los inhibidores de ALS, teóricamente puede realizarse a través de un cultivo clásico con una planta de remolacha azucarera que contendría un gen de resistencia natural. Sin embargo, un enfoque de este tipo lleva mucho tiempo y, al leer saber y entender de la solicitante, no tuvo éxito, a pesar del hecho de que se documentaron plantas resistentes a los inhibidores de ALS de origen natural, al menos para especies distintas de la remolacha azucarera, incluyendo una diversidad de especies de malas hierbas. Especialmente, es muy poco probable que un doble mutante (es decir, una planta que tiene dos mutaciones en el mismo gen ALS) se produzca en la naturaleza.

35 La solicitud de patente WO 98/02527 describe un método para la fabricación de planta de remolacha azucarera resistente a algunos inhibidores de ALS, tales como herbicidas de sulfonilurea, que comprende las etapas de exponer a callos de sulfonilurea obtenidos a partir de explantes de *B. vulgaris* y regenerar plantas de los pocos mutantes espontáneos que puedan crecer en presencia de este herbicida.

40 Este método proporcionó una planta que tiene una mutación en el gen ALS, en que la prolina en la posición 188 de la enzima ALS codificada (que corresponde a la posición 197 de la enzima ALS de *Arabidopsis thaliana*) se sustituye por una serina. Sin embargo, este mutante no se utiliza comercialmente, porque los tratamientos con los herbicidas modernos preferidos de sulfonilureas ALS (p. ej., foramsulfuron) exhiben una cierta fitotoxicidad en ensayos de campo a la tasa de dosis necesaria.

La solicitud de patente WO 2012/049268 se basa en el mismo método, excepto que los callos obtenidos de explantes de *B. vulgaris* están expuestos a foramsulfuron y, por lo tanto, dieron como resultado plantas de remolacha azucarera resistentes a varios inhibidores de ALS, incluido foramsulfuron.

45 Este método proporcionó una planta que tiene una mutación en el gen ALS, en donde el triptófano en la posición 569 de la enzima ALS codificada (que corresponde a la posición 574 de la enzima ALS de *Arabidopsis thaliana*) está sustituido por una leucina.

Los ensayos de campo de este homocigoto 569/569 mutante mostraron buena resistencia a foramsulfuron, a yodosulfuron (otro inhibidor de ALS), así como a mezclas de diferentes inhibidores de ALS.

50 Ambos métodos publicados se benefician de las etapas bien establecidas de aislamiento de callos de explantes

individuales tales como embriones. Sin embargo, este es un enfoque lento que implica (i) aislamiento de un gran número de embriones recientes, (ii) su cultivo repetido en medio de cultivo solidificado en agar y (iii) la selección de los callos regenerables utilizando enfoques de selección morfológica.

5 Se han desarrollado otras estrategias para transferir rasgos genéticos a la remolacha azucarera y éstas se basan en protoplastos de mesófilos (que son diferentes de protoplastos de células guardianas en el estoma) como material de partida (Krens et al., 1990, Theor. App. Genet., vol 79, páginas 390 -396).

10 Gurel et al. 2008, Critical reviews in Plant Science, 27, 108-140, describe aplicaciones biotecnológicas para la remolacha azucarera. Se describen siete diferentes técnicas de cultivo *in vitro*. Entre ellas se encuentra el cultivo de protoplastos a partir de células guardianas en el estoma con fines de transformación, o de callos friables a partir de explantes de hipocotilo etiolado, siendo este último mucho más eficiente. Sin embargo, este enfoque que usa protoplastos está asociado a dificultades importantes.

15 Hall et al. 1997, J. Exp. Botany, 48, 255-263 han utilizado un cultivo de 500000 protoplastos de células guardianas en el estoma para llevar a cabo un experimento de transformación con ADN extraño. La eficiencia de transformación fue superior al 2%. Por otro lado, se informa que el cultivo *in vitro* de plantas está asociado a un fallo estomático, apuntando a problemas en las células correspondientes y, por lo tanto, a la producción de una gran cantidad de protoplastos de células guardianas en el estoma tales como cantidades necesarias para llevar a cabo un método que implica un evento mutacional.

Sumario de la invención

20 En un aspecto amplio, la presente invención describe un método para producir una planta de remolacha azucarera mutante que es resistente a un herbicida, que comprende las etapas de:

- obtener protoplastos a partir de células guardianas en el estoma aisladas de una planta de remolacha azucarera;
- aplicar a un cultivo *in vitro* de estos protoplastos una composición que comprende este herbicida a una concentración que es letal para más del 99% de las células cultivadas *in vitro*; y
- 25 - regenerar plantas de remolacha azucarera a partir de las células supervivientes de estas células cultivadas *in vitro*,
- posiblemente seleccionar plantas de remolacha azucarera regeneradas que tienen una mutación en el gen que codifica el o los péptidos fijados como objetivo por este herbicida,

30 en el que estos protoplastos de células guardianas en el estoma se pre-seleccionan por su capacidad para regenerarse en una planta de remolacha azucarera, en el que los protoplastos pre-seleccionados tienen una probabilidad de más de 10% (número de protoplastos en crecimiento:número total de protoplastos en cultivo) de dividirse y regenerarse en un callo viable, en el que callos obtenidos por dichos protoplastos tienen más de 10% (número de brotes productores de callos:número total de callos) de capacidad de desarrollar brotes, y en donde este herbicida se aplica a más de 20 000 000 de estos protoplastos.

35 El herbicida utilizado en el presente método puede ser un herbicida que no se fija como objetivo al gen ALS.

Los herbicidas preferidos (que no se fijan como objetivo a ALS) se seleccionan del grupo que consiste en:

- Inhibidores de 4-HPPD (tales como mesotriona, isoxaflutol, pirasulfotol, benzobiciclon, benzofenap, pirazolinnato, pirazoxifeno, tembotriona, topramezona, sulcotriona y sulcotrion), inhibidores de la biosíntesis de carotenoides (tales como flurtamona, fluridona, flurocloridona, beflubutamida, norflurazon, picolinafen y diflufenican);
- 40 - inhibidores de EPSP sintasa (tales como glifosato o glifosato-trimesio);
- inhibidores de fosfosistema II (tales como fenil-carbamatos, por ejemplo, fenmedifam o desmedifam), piridazinonas (por ejemplo, cloridazona = pirazono), triazinas (por ejemplo, cianazina, remtal, eglinazina-etilo, proglinazina-etilo, ametrina, atrazina, desmetrina, dimetametrina), prometon, prometrina, propazina,
- 45 simazina, simetrina, terbumetona, terbutilazina, terbutrina, metoprotina), tiazinonas (por ejemplo, metamitrona, metribuzina, hexazinona), uracilos (bromacilo, lenacilo, terbacilo), ureas (dimefurona, isoprotrurona, linurona, monolinurona, etidimurona, metabenzitiazurona, tebutiurona, diurona, fenurona, neburona sidurona, isourona, clorobromurona, clorotolurona, cloroxurona, fluometurona, metobromurona metoxurona, tiazafurona, monurona, ciclurona, monolinurona), o amicarbazona, solan, propanilo,
- 50 bentazona, bromoxinilo, ioxinilo, bromofenoxima, piridato, piridafol;
- inhibidores de fosfosistema I (tales como diquat o paraqua);
- inhibidores de la división celular (tales como carbetamida, clorprofam, profam, naproanilida, difennamida,

napropamida, butenaclor, metazaclor, dietatil-etilo, acetoclor, alaclor, butaclor, propaclor Monsanto, propisoclor, dimetaclor, dimetenamida, metolaclor, pretilaclor, S-metolaclor, petoxamida, tenilclor, anilofos, cafenstrol, indanofan, bromobutida, piperofos, flufenacet, mefenacet, fentrazamida);

- 5 - inhibidores del ensamblaje de microtúbulos (tales como propizamida = pronamida, tebutam, clortal-dimetilo = DCPA, flucloralina, pendimetalina, butralina, benefin = benfluralina, etalfluralina, orizalina, trifluralina, prodiamina, dinitramina, butamifos, ditiopir, tiazopir);
- 10 - inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa (tales como difeniléteres (acifluorfen-sodio, bifenox, etoxifen-etilo, clornitrofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, clometoxifen, fluordifen, fomesafen, lactofen, nitrofen, aclonifen), N-fenilftalimidias (cinidon-etilo, flumiclorac-pentilo, flumioxazina, flumiclorac-pentilo), oxadiazoles (oxadiargilo, oxadiazono), oxazolidindionas, (pentoxazona), fenilpirazoles (fluazolato, piraflufeno-etilo), pirimidindionas (saflufenacil, benzfendizona, butafenacil), tiadiazoles (tidiazimina, flutiaceto-metilo), triazolinonas (azafenidina, carfentrazona-etil-sulfentrazona), pirazonol, profluzol, flufenpir-etilo);
- 15 - inhibidores de la acetil CoA carboxilasa (tales como ariloxifenoxipropionatos (tales como clodinafop-propargilo, cihalofop-butilo, diclofop-metilo, fenoxaprop-P-etilo, fluazifop-P-butilo, haloxifop-etotilo, haloxifop-metilo, haloxifop-P-metilo, propaquizafop, quizalofop-P-etilo o quizalofop-P-tefuril), ciclohexanodionas (tales como aloxidim, butroxidim, cletodim, cicloxidim, profoxidim, setoxidim, tepraloxidim o tralcoxidim) o fenilpirazolina (pinoxaden));
- inhibidores de la síntesis de la pared celular (tales como indaziflam, isoxaben, clortiamida, diclobenil, quinclorac o flupoxam);
- 20 - inhibidor de la glutamina sint(et)asa (glufosinato de amonio o bialafos = bilanafos) y
- auxina sintética (tal como TBA, dicamba, cloramben, benazolin-etil 4, diclorprop-P, mecoprop-P, 2,4,5-T (weedar) 2,4-D (Weedar), 2,4-DB (butirol), diclorprop, MCPB, mecoprop, MCPA-tioetilo, clomeprop, Agroxone 4, aminopirialid, clopiralid, fluroxipir, halauxifen-metilo, picloram, triclopir, quinclorac o quinmerac),

25 más preferiblemente del grupo que consiste en inhibidores de 4 HPPD, inhibidores de la biosíntesis de carotenoides, inhibidores de EPSP sintasa, inhibidores de fotosistema II, inhibidores de fotosistema I, inhibidores del ensamblaje de microtúbulos, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa y auxina sintética.

Otro herbicida altamente preferido es un inhibidor de ALS.

30 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para producir una planta de remolacha azucarera mutante que es resistente a uno o más inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (ALS), que comprende las etapas de:

- obtener protoplastos a partir de células guardianas en el estoma aisladas de una planta de remolacha azucarera;
- 35 - aplicar a un cultivo *in vitro* de dichos protoplastos una composición que comprende uno o más inhibidores de ALS a una concentración que es letal para (más del 99% (preferiblemente más del 99,9% o incluso más del 99,99%) de) células cultivadas *in vitro* (pero permitiendo que algunos mutantes escapen); y
- 40 - regenerar plantas de remolacha azucarera a partir de las células supervivientes de dichas células cultivadas *in vitro*, en donde dichos protoplastos de células guardianas en el estoma se seleccionan previamente por su capacidad para regenerarse en una planta de remolacha azucarera, en donde los protoplastos pre-seleccionados tienen una probabilidad de más de 10% (número de protoplastos en crecimiento:número de protoplastos totales en cultivo) de dividirse y regenerarse en un callo viable, en el que callos obtenidos por dichos protoplastos tienen más de 10% (número de brotes productores de callos:número total de callos) de capacidad de desarrollar brotes, y en donde dicho o dichos inhibidores de ALS se aplican a más de 2 000 000 (preferiblemente más de 10 000 000 o incluso más de 50 000 000 de dichos protoplastos.

45 Preferiblemente, este método comprende las sub-etapas de aislar protoplastos de células guardianas en el estoma de plantas de remolacha azucarera de diferentes genotipos y medir para cada uno de los genotipos la proporción de dichos protoplastos que crecen cuando dichos protoplastos se ponen en cultivo.

50 Preferiblemente este método comprende, además, la etapa de secuenciar el genoma de las plantas regeneradas de las células cultivadas *in vitro* supervivientes, ventajosamente para identificar una mutación en el gen ALS y/o para seleccionar plantas de remolacha azucarera regeneradas que tienen una o más, preferiblemente una, dos o más mutaciones en el gen ALS.

Ventajosamente, remolacha azucarera que tiene una o varias mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Glicina 112, Alanina 113, Metionina 115, Arginina 133, Valina 187, Arginina 190, Alanina 196, Fenilalanina 197, Lisina 247, Metionina 346, Histidina 347, Arginina 368, Aspartato 370, Aspartato 371, Arginina 372, Metionina 565, Valina 566, Fenilalanina 573, Serina 648 y Glicina 649,

preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en Alanina 196, Aspartato 371, Arginina 372, Serina 648 y Glicina 649, se obtiene y/o se selecciona por el método de la presente invención. Otra planta de remolacha azucarera preferida que tiene una mutación de la Prolina en la posición 188 y del Triptófano en la posición 569 se obtiene y/o selecciona por el método de la presente invención.

- 5 Preferiblemente, remolacha azucarera que tiene dos o más mutaciones tiene dos mutaciones en un alelo, lo que significa que el péptido codificado alberga dos mutaciones que sinergizan la resistencia hacia inhibidores de ALS (especialmente hacia composiciones que comprenden varios inhibidores de ALS). Un ejemplo de remolacha azucarera más preferida es una remolacha azucarera que tiene una mutación de la Prolina en la posición 188 y del Triptófano en la posición 569 en un alelo (y posiblemente las mismas mutaciones en el segundo alelo, alternativamente, el segundo alelo alberga diferentes mutaciones).

Alternativamente, la remolacha azucarera que tiene dos mutaciones tiene una mutación en cada uno de los alelos.

- 15 El método de la presente invención permite regenerar una planta de remolacha azucarera que tiene una mutación en el gen ALS en las posiciones que codifican Prolina 188 y una o más mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican Glicina 112, Alanina 113, Metionina 115, Arginina 133, Valina 187, Arginina 190, Alanina 196, Fenilalanina 197, Lisina 247, Metionina 346, Histidina 347, Arginina 368, Aspartato 370, Aspartato 371, Arginina 372, Metionina 565, Valina 566, Triptófano 569 (preferiblemente mutado en Glicina), Fenilalanina 573, Serina 648 y Glicina 649. Un ejemplo de remolacha azucarera preferida es un remolacha azucarera que tiene una mutación de la Prolina en la posición 188 y de otra mutación (posiblemente no el triptófano 569 o el Trp569Gly) en el mismo alelo.

- 20 El método de la presente invención permite regenerar una planta de remolacha azucarera que tiene una mutación en el gen ALS en la posición que codifica Triptófano 569 (preferiblemente mutada en Leucina) y una o más mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican Glicina 112, Alanina 113, Metionina 115, Arginina 133, Valina 187, Prolina 188 (preferiblemente mutada en Treonina, Arginina, Leucina, Glutamina o Alanina), Arginina 190, Alanina 196, Fenilalanina 197, Lisina 247, Metionina 346, Histidina 347, Arginina 368, Aspartato 370, Aspartato 371, Arginina 372, Metionina 565, Valina 566, Fenilalanina 573, Serina 648 y Glicina 649.

- 25 Un ejemplo de remolacha azucarera preferida es una remolacha azucarera que tiene una mutación del triptófano en la posición 569 y otra mutación (posiblemente no la Prolina 188 o la Pro188Ser) en el mismo alelo.

- 30 El método de la presente invención permite regenerar una planta de remolacha azucarera que tiene una o más mutaciones en el gen ALS, en donde dicha una o más mutaciones se selecciona del grupo que consiste en Alanina 113 Prolina 188, Alanina 196, Aspartato 371, Arginina 372, Triptófano 569, Serina 648 y Glicina 649, en donde dicha Alanina 113 está mutada en Valina o Treonina, en donde dicha Prolina 188 está mutada en Treonina, Arginina, Leucina, Glutamina o Alanina, en donde dicha Alanina 196 está mutada en Valina, en donde dicho Aspartato 371 está mutado en Glutamato, en donde dicha Arginina 372 está mutada en Histidina, en donde dicho Triptófano 569 está mutado en Glicina, en donde dicha Serina 648 está mutada en Treonina y en donde dicha Glicina 649 está mutada en Aspartato.

- 35 Preferiblemente, la remolacha azucarera que tiene dos o más de estas mutaciones específicas tiene dos mutaciones en un alelo, lo que significa que el péptido codificado alberga dos mutaciones que sinergizan la resistencia hacia inhibidores de ALS (especialmente hacia composiciones que comprenden varios inhibidores de ALS).

- 40 El método de la presente invención permite regenerar una planta de remolacha azucarera que tiene una mutación en el gen ALS en la posición que codifica Prolina 188 y una mutación en el gen ALS en la posición que codifica Triptófano 569.

Ventajosamente, este método comprende una etapa preliminar de deducir la concentración del uno o más inhibidores de ALS en la que la composición (que comprende uno o más inhibidores de ALS) es letal para al menos 99% (preferiblemente al menos 99,9% o incluso 99,99%) de las células cultivadas *in vitro* (aunque permiten el escape de algunos mutantes).

- 45 El inhibidor de ALS preferido presente en la composición (dicha composición comprende, además, otro inhibidor de ALS, que es preferiblemente de otra clase que el inhibidor de sulfonilurea ALS, tal como tiencarbazona-metilo) a ser añadido a los protoplastos de células guardianas en el estoma cultivadas *in vitro* es foramsulfuron, preferiblemente a una concentración de 10^{-9} mol/l a (más preferiblemente) 10^{-6} mol/l.

- 50 Otro inhibidor de ALS adecuado presente en la composición a añadir a los protoplastos de células guardianas en el estoma cultivadas *in vitro* es etoxisulfuron (posiblemente, esta composición comprende, además, otros inhibidores de ALS).

Un aspecto relacionado de la presente invención es una planta de remolacha azucarera mutada obtenible mediante el método de la presente invención, tal como una remolacha azucarera que tiene una mutación en el triptófano 569 y/o en la prolina 188.

- 55 Otro aspecto relacionado de la presente invención es una planta de remolacha azucarera mutada que comprende

SEQ.ID.NO.3 (o SEQ.ID.NO.4) y/o SEQ.ID.NO.5 (o SEQ.ID.NO:6).

Una planta de remolacha azucarera descrita en esta memoria corresponde al depósito bajo NCIMB 42050 o NCIMB 42051.

5 La presente invención también está relacionada con tejido o parte de planta (por ejemplo, células guardianas en el estoma o tiras de hojas) o semillas derivadas de la planta mutada de la invención, así como con su uso para la introducción de otro rasgo genético.

La presente invención también está relacionada con el uso de los protoplastos de células guardianas en el estoma (que se regeneran bien) desarrollados en la presente invención para la introducción de otro rasgo genético distinto a la resistencia a inhibidores de ALS.

10 Descripción detallada de la invención

15 Los autores de la invención han descubierto que protoplastos de células guardianas en el estoma de remolacha azucarera representan un buen material de partida para inducir resistencia a herbicidas tales como inhibidores de ALS, a pesar del hecho de que la regeneración de una planta de remolacha azucarera de un protoplasto de células guardianas en el estoma es muy difícil, de baja ocurrencia y requiere procesos más largos y más complejos que la regeneración directa a partir de callos obtenidos de explantes, tal como se utiliza habitualmente en la técnica.

20 De hecho, el callo (los callos) de los explantes es (son) una masa de células no diferenciadas (o desdiferenciadas) que, en condiciones de cultivo apropiadas, se diferenciarán (o se volverán a diferenciar) y regenerarán una planta de remolacha azucarera totalmente funcional. En dicho método, las semillas se recogen en grandes cantidades, luego se esterilizan fácilmente y así se obtienen explantes en grandes cantidades. Un método de este tipo es conveniente, ya que permite realizar una gran parte del trabajo sin las dificultades de un entorno estéril.

Por otro lado, las células guardianas en el estoma tienen una organización bien definida en la planta, y su aislamiento del tejido de la planta da como resultado una o más células individuales, y luego después de un tratamiento en protoplastos individuales.

25 En el método de la presente invención, las plántulas se deben cultivar *in vitro* y se deben mantener en condiciones estériles, a continuación se aíslan células guardianas en el estoma de estas plántulas pequeñas y se obtienen protoplastos al tiempo que se mantienen condiciones estériles, luego se induce a estos protoplastos individuales a producir nuevamente su pared de la célula, para crecer primero en micro-callos y luego en una planta de remolacha azucarera.

30 Se encontró que los protoplastos de las células guardianas en el estoma de la remolacha azucarera eran muy vulnerables, reduciendo el alcance de su aplicación: por ejemplo, la adición de un mutágeno, en lugar de favorecer la aparición de un rasgo genético deseado, era letal para los protoplastos en muchos casos.

En otras palabras, fue completamente inesperado tener éxito en el uso de protoplastos de células guardianas en el estoma como un material de partida para desarrollar una planta de remolacha azucarera que ha adquirido un rasgo genético deseado a través de la mutación.

35 Además, los autores de la invención han encontrado que la capacidad de división de los protoplastos de células guardianas en el estoma depende mucho de los genotipos de remolacha azucarera: los protoplastos de células guardianas en el estoma de la mayoría de los genotipos exhiben una capacidad muy baja (casi cero) para dividirse (crecer), mientras que los protoplastos de algunos genotipos específicos tienen una capacidad considerable para crecer *in vitro*.

40 Los autores de la invención han identificado que el cultivo en medio sólido (medio que contiene polímero, tal como medio que contiene alginato o tipo agarosa) de cantidades muy grandes de estos protoplastos de células guardianas en el estoma, luego la exposición del material cultivado (normalmente en forma de callos regenerados) a herbicidas tales como inhibidor o inhibidores de ALS resultó en la selección de algunas células mutadas que son resistentes a esta molécula de herbicida, a pesar de que, en ausencia de mutágenos añadidos, se sabe que las mutaciones espontáneas son muy raras, y de que el método no puede tomar ventaja de la diversidad genética dentro de una población, en la selección de una planta mutante ya existente que exhibe la resistencia deseada hacia uno o más inhibidores de ALS.

45 Algunas de estas células mutadas con resistencia adquirida a los herbicidas, tal como la inhibición de ALS, fueron capaces, además, de regenerarse en plantas de remolacha azucarera viables. Aunque los protoplastos son muy difíciles de utilizar en la práctica, el presente método, no obstante, produjo mutantes muy rápidamente estables que adquirieron resistencia frente al herbicida.

El método de la presente invención permite la producción de plantas de remolacha azucarera resistentes a herbicidas (resistentes al inhibidor de ALS) que tienen una o varias mutaciones, incluyendo una o varias mutaciones en la enzima que es el objetivo del herbicida, por ejemplo un inhibidor de ALS (tal como una mutación del gen ALS,

en donde el gen ALS codifica una proteína ALS que contiene un aminoácido diferente de triptófano en la posición 569 de la proteína ALS, correspondiente a la posición 574 de la ALS de *Arabidopsis thaliana*), posiblemente además de al menos otra mutación en este gen y/o a otras mutaciones en otros genes.

5 Un aspecto de la presente invención es, por lo tanto, un método para producir plantas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*, y también *Beta vulgaris maritima* ssp) resistente a uno o más inhibidores de ALS, que comprende las etapas de:

- obtener (protoplastos de) células guardianas en el estoma aisladas de una planta de remolacha azucarera (sensible a inhibidores de ALS);
- 10 - aplicar a estas células cultivadas *in vitro* una composición que comprende uno o más inhibidores de ALS a una concentración que es letal para estas células cultivadas *in vitro* (al menos el 99% de las células (de tipo salvaje) son exterminadas por el inhibidor de ALS, pero algunos mutantes puede escapar del tratamiento); y

regenerar plantas de remolacha azucarera a partir de las células supervivientes.

15 Este método puede verse como una alternativa a la introducción de un transgén (por ejemplo, descrito en el documento WO 95/10178). Sin embargo, un método basado en la mutación de un gen o genes endógenos es más laborioso en comparación con un enfoque transgénico. De hecho, la introducción de un gen transgénico (mutado) es mucho más rápida, flexible y predecible.

20 La ausencia de resistencia inducida por transgenes se refiere al hecho de que la resistencia adquirida al o a los inhibidores de ALS no es provocada directamente por la inserción *in vitro* de un ADN (extraño) en los protoplastos de células guardianas en el estoma (o en las células obtenidas de los mismos) tal como un ADN (extraño) que codifica una proteína que proporciona directamente resistencia al o a los inhibidores de ALS tal como una proteína que reduce localmente la toxicidad del o de los inhibidores de ALS (p. ej., una enzima que degrada el o los inhibidores de ALS o reduce su concentración intracelular), o una proteína ALS que es resistente al o a los inhibidores de ALS, tal como una enzima mutante de ALS que retiene actividad y funcionalidad significativas incluso en presencia de

25 inhibidores.

Sin embargo, la planta obtenida por el método de la invención puede cruzarse adicionalmente con una planta transgénica con el fin de acumular otro rasgo genético en la progenie. La planta (o una parte de la misma), obtenida mediante la presente invención puede utilizarse, además, en un método transgénico posterior para introducir otro rasgo genético (diferente del rasgo genético obtenido en el método de la presente invención).

30 Posiblemente, este método comprende, además, la etapa de añadir un agente mutágeno al cultivo de los protoplastos de células guardianas en el estoma aisladas.

35 Agentes mutágenos adecuados son exposición física (tal como rayos UV o rayos X) o exposición a agentes químicos (tal como sulfonato de etil metano (EMS), por ejemplo al 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2% o incluso al 2,5%). Sin embargo, la viabilidad de los protoplastos se vio afectada negativamente por algunos tratamientos de mutagénesis habitualmente realizados, tales como el tratamiento de más EMS al 0,2%.

Alternativamente, este método, por lo tanto, no comprende la etapa de añadir un agente mutágeno.

En el contexto de la presente invención, un herbicida preferiblemente se refiere a cualquier molécula que, cuando se aplica a una dosis dada, se utiliza para el control de malas hierbas.

40 Herbicidas preferidos utilizados en el presente método (para desarrollar plantas de remolacha azucarera resistentes a este herbicida) tienen una actividad específica conocida en un péptido (de modo que una única mutación en el gen correspondiente puede conferir resistencia a este herbicida). En otras palabras, los herbicidas preferidos son específicos para un objetivo peptídico (habitualmente inhiben específicamente la actividad de una enzima vegetal) y/o se conoce su péptido diana (para estar en una posición de seleccionar la remolacha azucarera resistente para una mutación en el gen diana).

45 En el contexto de la presente invención, un inhibidor de ALS se refiere a cualquier molécula que inhiba la función del gen ALS.

Preferiblemente, el o los inhibidores de ALS utilizados en la presente invención no inhiben (sustancialmente) otras enzimas (remolacha azucarera) que la ALS.

50 Ventajosamente, el o los inhibidores de ALS se seleccionan y utilizan en la presente invención en una concentración en la que se inhibe más del 90% (más del 95%, más del 99%, más del 99,9%) de la función de la enzima ALS de tipo salvaje, pero sustancialmente no afecta la función de las enzimas no relacionadas.

Inhibidores de ALS adecuados (para llevar a cabo el método) se seleccionan del grupo que consiste en herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de sulfonilaminocarboniltriazolinona, herbicidas de imidazolinona, herbicidas de

triazolopirimidina y herbicidas de pirimidinil(tio) benzoato. Ventajosamente, la composición de herbicida comprende al menos un herbicida de sulfonilurea y al menos una triazolopirimidina.

5 Los inhibidores de ALS preferidos (para llevar a cabo el método) son foramsulfuron, amidosulfuron, tiencarbazona-metil, etoxisulfuron y mezclas de los mismos (especialmente una composición que comprende tiencarbazona-metilo y cualquiera de foramsulfuron o amidosulfuron); sin embargo, el mutante de remolacha azucarera regenerado es ventajosamente resistente frente a varios inhibidores de ALS.

10 Se pueden utilizar otros inhibidores de ALS (incluyendo mezclas de inhibidores de ALS), y la persona experta conoce qué mutación proporciona una fuerte resistencia a un inhibidor de ALS dado (p. ej., se sabe que la mutación del triptófano en la posición 569 está asociada a resistencia a foramsulfuron); por lo tanto, dada la flexibilidad y la eficacia del presente método, la persona experta puede diseñar plantas de remolacha azucarera que han adquirido varias mutaciones y, por tanto, una resistencia más amplia frente a herbicidas tales como inhibidores de ALS (p. ej., mezclas de inhibidores de ALS).

15 Más preferiblemente, este método comprende una etapa preliminar de seleccionar un genotipo (línea) de planta de remolacha azucarera por su capacidad de regenerar los protoplastos de células guardianas en el estoma en una planta de remolacha azucarera completamente funcional, y/o el método de la presente invención se lleva a cabo en protoplastos de células guardianas en el estoma aislados de genotipos (líneas) de remolacha azucarera que están bien regenerados.

20 Una etapa preliminar adecuada (de seleccionar genotipos de plantas de remolacha azucarera por la capacidad de sus protoplastos de células guardianas en el estoma de regenerar las células en una planta de remolacha azucarera) implica la comparación (independientemente de sus posibles características ventajosas tales como rendimiento o resistencia a infecciones parasitarias) de al menos 10 diferentes genotipos de plantas de remolacha azucarera (de diferentes antecedentes genotípicos), preferiblemente al menos 15 genotipos diferentes, o incluso al menos 30 genotipos diferentes, en cuanto a la capacidad de sus protoplastos de células guardianas en el estoma de regenerarse en una planta de remolacha azucarera (mucho más preferiblemente su capacidad de crecer *in vitro* y/o formar callos), y la selección de un genotipo (línea) que regenera bien para llevar a cabo el método de la presente invención.

25 En el contexto de la presente invención, protoplastos de células guardianas en el estoma bien regenerativas se refieren a protoplastos que tienen una probabilidad de más del 10% (crecimiento: total) o incluso más del 20% (crecimiento: total) o 50% (crecimiento: total) para dividir y/o crecer y/o regenerarse en callos de remolacha azucarera viables (cuando se cultivan en los medios de cultivo adecuados y sin presión de selección exógena tal como la molécula tóxica/herbicida a aplicar en el método de la presente invención).

30 Callo (callos) se refiere a una masa de células indiferenciadas. En la técnica, los callos se pueden obtener a partir de explantes tales como embriones o explantes derivados de parénquima a partir de hojas o cotiledones. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, los callos son el resultado del crecimiento de protoplastos de células guardianas en el estoma (bien regenerantes).

35 Los callos obtenidos por estos protoplastos bien regenerantes tienen más del 10% (número de brotes productores de callos : número total de callos; brotes:total), preferiblemente más del 20% (brotes:total) o incluso más del 30% (brotes:total) de capacidad para desarrollar brotes.

40 Preferiblemente, protoplastos de células guardianas en el estoma de remolacha azucarera que se regeneran bien se refieren a protoplastos que tienen más del 0,1% (planta de remolacha azucarera : número total de protoplastos) (más preferiblemente más del 1%) de capacidad para regenerarse en una planta de remolacha azucarera viable.

En este método, la composición que comprende el herbicida (p. ej., uno o más inhibidores de ALS) se aplica a un cultivo *in vitro* de más de 20 000 000 de estos protoplastos de células guardianas en el estoma de remolacha azucarera (bien regeneradas).

45 Preferiblemente, la composición que comprende el uno o más inhibidores de ALS se aplica a un cultivo *in vitro* de más de 50 000 000 de estos protoplastos de células guardianas en el estoma (bien regenerantes) de remolacha azucarera.

50 Preferiblemente, al menos 50 000, tal como aproximadamente 100 000, protoplastos de células guardianas en el estoma (bien regenerantes) por mililitro se cultivaron en un medio que contenía polímero (tal como un medio que contenía alginato o agarosa).

Posiblemente, estos protoplastos de células guardianas en el estoma (bien regenerantes) de remolacha azucarera se cultivan durante al menos aproximadamente una semana (preferiblemente aproximadamente 3 semanas y/o menos de 4 semanas) en medio que contiene polímero (alginato), antes de la aplicación de la composición que comprende el (uno o más) inhibidor(es) de ALS (tales como foramsulfuron y posiblemente tiencarbazona-metilo).

55 Preferiblemente, este método comprende, además, la etapa de comparar el crecimiento de la célula guardiana en el

estoma mutada y el crecimiento de células guardianas en el estoma de tipo salvaje (y/o no tratadas previamente y/o aún no tratadas con herbicida) en un medio que no comprende inhibidor de ALS, y posiblemente de seleccionar mutante(s) que mantengan al menos el 75% del crecimiento, preferiblemente al menos el 90% del crecimiento de la célula de tipo salvaje correspondiente.

- 5 Preferiblemente, o además, este método comprende, además, la etapa de comparar el crecimiento y/o el rendimiento de la remolacha azucarera regenerada a partir de la célula mutada y el crecimiento y/o el rendimiento de remolacha azucarera del tipo salvaje (y/o no tratada previamente y/o aún no tratado por el inhibidor de ALS) en ensayos de invernadero y en condiciones agronómicas sin inhibidor de ALS alguno, y posiblemente de seleccionar plantas de remolacha azucarera resistentes a inhibidores de ALS que mantengan al menos el 75% del crecimiento y/o rendimiento, preferiblemente al menos el 90% del crecimiento y/o del rendimiento de la remolacha azucarera de tipo salvaje.

Preferiblemente, este método comprende, además, la etapa de secuenciar las plantas regeneradas a partir de los protoplastos supervivientes y/o identificar una o varias mutaciones que están (pueden estar) asociadas a la resistencia al herbicida (p. ej., uno o más inhibidores de ALS).

- 15 En el contexto de la presente invención, el término "mutación" se refiere preferiblemente a un (único) cambio en la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido fijado como objetivo por el herbicida (p. ej., la proteína ALS) que provoca un cambio en el aminoácido correspondiente, de modo que la planta resultante ha adquirido cierta resistencia al herbicida, tales como los inhibidores de ALS.

- 20 En otras palabras, en el contexto de la presente invención, "mutación" se entiende preferiblemente como equivalente a una "mutación puntual" que permite cierta resistencia al herbicida (el inhibidor de ALS). Por consiguiente, "varias mutaciones" se refieren preferiblemente, en la presente invención, a (una pila de) múltiples mutaciones puntuales, provocando cada una de las mutaciones puntuales un cambio del aminoácido codificado con el fin de proporcionar cierta resistencia a un herbicida (p. ej., un inhibidor de ALS y/o un herbicida no es un inhibidor de ALS). Por lo tanto, preferiblemente, en el contexto de la presente invención 'mutación' no comprende cambios en la secuencia de nucleótidos que no modifican la proteína codificada (tal como un cambio en el tercer aminoácido de un triplete codificante), cambio en aminoácidos que no se asocian con resistencia a herbicidas (tal como un inhibidor de ALS), ni cambios simultáneos múltiples en la secuencia de nucleótidos.

- 25 Ventajasamente, esta etapa de identificación de la o las mutaciones asociadas a la resistencia frente al (uno o más) inhibidores de ALS (preferiblemente una o dos mutaciones en el gen ALS) está acoplada al desarrollo de cebadores oligonucleotídicos que se extienden por esta mutación.

Ventajosamente, esta etapa de identificación de la o las mutaciones en el gen ALS es seguida por mediciones de la actividad enzimática (*in vitro*) de la proteína codificada por los genes ALS de tipo salvaje y por los mutados.

- 30 Preferiblemente, estas mediciones enzimáticas de la enzima ALS de tipo salvaje y de la enzima ALS mutada se realizan en presencia de uno o más inhibidores de ALS (a una o a varias concentraciones con el fin de derivar una curva de inhibición).

- 35 Posiblemente, estas medidas enzimáticas de la enzima de tipo salvaje y de la enzima mutada se realizan (adicionalmente) en ausencia de inhibidores de ALS (para comparar la actividad enzimática de la enzima mutada, preferiblemente en ausencia del inhibidor de ALS, la enzima mutada mantiene al menos el 50% de la actividad de la enzima de tipo salvaje, más preferiblemente al menos el 75%, aún más preferiblemente al menos el 90%, al menos el 95% o incluso al menos el 99%).

- 40 Preferiblemente, el método de la presente invención comprende una etapa de comparar composiciones que comprenden uno o más inhibidores de ALS a diferentes concentraciones, y deducir la concentración a la que el inhibidor de ALS, y/o inhibidor de ALS en una formulación especial dentro de esta composición, es/son letales para un cultivo *in vitro* de la de protoplastos de células guardianas en el estoma aislado de la planta de remolacha azucarera (tales como protoplastos de células guardianas en el estoma cultivadas en alginato durante al menos una semana).

- 45 Por ejemplo, esta etapa de deducir la concentración a la cual (uno o más) inhibidores de ALS es/son letales para el protoplasto de células guardianas en el estoma aisladas de la planta de remolacha azucarera se realiza en un cultivo *in vitro* de los protoplastos de células guardianas en el estoma aislados de la planta de remolacha azucarera de tipo salvaje (y/o sin tratamiento previo y/o aún no tratado por el inhibidor de ALS).

En el contexto de la presente invención, la concentración letal de la composición que comprende (uno o más) inhibidores de ALS se refiere a una concentración suficiente para matar al menos 99%, preferiblemente al menos 99,9%, más preferiblemente al menos 99,99% de las células cultivadas (aún permitiendo que algunos mutantes escapen de este tratamiento).

- 55 Alternativamente, o además, esta etapa de deducir la concentración a la que el (uno o más) inhibidores de ALS es o son letales para un cultivo *in vitro* de protoplastos de células guardianas en el estoma aisladas de la planta de

remolacha azucarera se realiza (adicionalmente) en un cultivo *in vitro* de células guardianas en el estoma mutadas (en células que han adquirido una mutación en el gen ALS y que son resistentes al o a los inhibidores de ALS).

5 La comparación de la concentración letal del inhibidor de ALS (en una composición que comprende este inhibidor de ALS) sobre las células no tratadas previamente y sobre las mutadas se expresa ventajosamente como una relación (o como varias relaciones, una relación por cada inhibidor de ALS ensayado).

10 Preferiblemente, para un inhibidor de ALS, la concentración letal en células no tratadas previamente es 50 veces menor que la concentración letal en células mutadas, más preferiblemente, la concentración letal en células no tratadas previamente es 200 veces menor que la concentración letal en célula(s) mutada(s), aún más preferentemente, la concentración letal en la o las células no tratadas previamente es 1000 veces menor que la concentración letal en la o las células mutadas.

El herbicida (utilizado en el método de la presente invención) puede ser una mezcla (de inhibidores) que comprende al menos un inhibidor de ALS, tal como foramsulfuron.

15 Posiblemente, el inhibidor de ALS utilizado en el método de la invención es una mezcla de inhibidores de ALS, tales como una sulfonilurea (p. ej., foramsulfuron) y otro inhibidor de ALS seleccionado del grupo que consiste en yodosulfuron, amidosulfuron y tiencarbazona-metilo.

20 Preferiblemente, el inhibidor de ALS utilizado en el método de la invención es (o comprende) foramsulfuron, tal como foramsulfuron aplicado a un cultivo *in vitro* de protoplastos de una semana de edad (o a tres semanas de edad) (más particularmente al cultivo *in vitro* que comprende callos regenerados a partir de estos protoplastos cultivados) en medio que contiene alginato y mantenido durante el cultivo *in vitro* de las células a una concentración de 10^{-9} - 10^{-6} mol/l (o 10^{-9} - 10^{-6} mol/l).

Un aspecto relacionado de la presente invención es una planta de remolacha azucarera mutada, obtenible mediante este método (por ejemplo cuando este método comprende el uso de uno o más herbicidas (no inhibidores de ALS) o el uso de uno o más inhibidores de ALS, o comprende el uso de un inhibidor de ALS y no siendo un herbicida un inhibidor de ALS).

25 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es una remolacha azucarera (obtenible mediante el método de la presente invención) que tiene una o varias mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Glicina 112, Alanina 113, Metionina 115, Arginina 133, Valina 187, Arginina 190, Alanina 196, Fenilalanina 197, Lisina 247, Metionina 346, Histidina 347, Arginina 368, Aspartato 370, Aspartato 371, Arginina 372, Metionina 565, Valina 566, Fenilalanina 573, Serina 648 y Glicina 649.

30 Una remolacha azucarera preferida (que puede obtenerse mediante el método de la presente invención) tiene una o varias mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Alanina 113 (p. ej., Valina o Treonina mutada), Prolina 188 mutada en Treonina, Arginina, Leucina, Glutamina o Alanina, Alanina 196 (p. ej., mutada en Valina), Aspartato 371 (p. ej., mutado en glutamato), Arginina 372 (p. ej., mutada en Histidina), Triptófano 569 mutado en Glicina, Serina 648 (p. ej., mutada en Treonina) y Glicina 649 (p. ej., mutada en Aspartato).

40 Un aspecto relacionado de la presente invención es una planta de remolacha azucarera mutada (o una célula de planta de remolacha mutada tal como una célula guardianas en el estoma mutada aislada de remolacha azucarera) que comprende una mutación en el gen ALS, en donde el triptófano en la posición 569 en la enzima ALS codificada (correspondiente a la posición 574 en la enzima ALS de *Arabidopsis thaliana*) está sustituida con otro aminoácido (tal como una leucina) y posiblemente otra (una o varias) mutación, preferiblemente otra (una o varias) mutación en el gen ALS, tal como una mutación que provoca una sustitución de aminoácidos adicional en el gen ALS.

45 Otra planta de remolacha azucarera preferida es una que tenga una mutación del Triptófano en Leucina en la posición 569 y una o varias mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Glicina 112, Alanina 113, Metionina 115, Arginina 133, Valina 187, Arginina 190, Alanina 196, Fenilalanina 197, Lisina 247, Metionina 346, Histidina 347, Arginina 368, Aspartato 370, Aspartato 371, Arginina 372, Metionina 565, Valina 566, Fenilalanina 573, Serina 648 y Glicina 649.

50 Una remolacha azucarera preferida (obtenible mediante el método de la presente invención) tiene una mutación de Triptófano en mutación de Leucina en la posición 569 y una o varias mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Alanina 113 (p. ej., mutado en Valina o Treonina), Prolina 188 mutada en Treonina, Arginina, Leucina, Glutamina o Alanina, Alanina 196 (p. ej., mutada en Valina), Aspartato 371 (p. ej., mutado en Glutamato), Arginina 372 (p. ej., mutada en Histidina), Serina 648 (p. ej., mutada en Treonina) y Glicina 649 (p. ej., mutada en Aspartato).

55 Esta planta de remolacha azucarera mutada es resistente a uno o varios inhibidores de ALS utilizados, tales como una sulfonilurea (p. ej., foramsulfuron) y ventajosamente a otro u otros inhibidores de ALS, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en yodosulfuron, amidosulfuron y tiencarbazona-metilo.

Un aspecto relacionado de la presente invención es una planta de remolacha azucarera mutada (o una célula de planta de remolacha azucarera mutada tal como una célula guardiana en el estoma mutada, aislada de remolacha azucarera) que comprende una mutación en el gen ALS, en donde la prolina en la posición 188 en la enzima ALS codificada (correspondiente a la posición 197 en la enzima ALS de *Arabidopsis thaliana*) está sustituida con otro aminoácido (tal como una serina).

Alternativamente, una planta de remolacha azucarera preferida (obtenible mediante el método de la presente invención) tiene una mutación de la Prolina en Serina en la posición 188 y una o varias mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Glicina 112, Alanina 113, Metionina 115, Arginina 133, Valina 187, Arginina 190, Alanina 196, Fenilalanina 197, Lisina 247, Metionina 346, Histidina 347, Arginina 368, Aspartato 370, Aspartato 371, Arginina 372, Metionina 565, Valina 566, Fenilalanina 573, Serina 648 y Glicina 649.

Una remolacha azucarera preferida (obtenible mediante el método de la presente invención) tiene una mutación de Prolina en Serina en el gen ALS en la posición 188 y una o más mutaciones del gen ALS en las posiciones que codifican Alanina 113 (p. ej., mutada en Valina o Treonina), Aspartato 371 (p. ej., mutado en glutamato), Arginina 372 (p. ej., mutada en Histidina), Triptófano 569 mutado en Glicina, Serina 648 (p. ej., mutada en Treonina) y Glicina 649 (p. ej., mutada en Aspartato).

Otro aspecto relacionado de la presente invención es una planta de remolacha azucarera mutada (o una célula de planta de remolacha azucarera mutada tal como una célula guardiana en el estoma mutada, aislada de remolacha azucarera) que comprende una mutación de triptófano en la posición 569 en la enzima ALS y una mutación de prolina en la posición 188 en la enzima ALS, así como posiblemente otra (una o varias) mutación, preferiblemente otra (una o varias) mutación en el gen ALS.

Preferiblemente, (un alelo de) el gen de ALS de esta planta de remolacha azucarera mutada corresponde a SEQ. ID. NO: 3 o SEQ. ID. NO: 5.

Ventajosamente, la planta de remolacha azucarera mutada de la presente invención comprende SEQ. ID. NO: 3 (en un alelo) y SEQ. ID. NO: 5 (en el segundo alelo).

Posiblemente, la planta de remolacha azucarera mutada de la presente invención comprende SEQ. ID. NO: 3 (en un alelo) y SEQ. ID. NO: 1 o SEQ. ID. NO: 7 (en el segundo alelo).

Otro aspecto relacionado de la presente invención es un fragmento de nucleótidos (de al menos 20 o al menos 25 nucleótidos consecutivos, pero de menos de 200 nucleótidos consecutivos, preferiblemente de menos de 50 nucleótidos consecutivos) que cubre la una o más mutaciones; posiblemente, este fragmento es para uso como cebador o sonda (que incluye una sonda de nucleótidos que está marcada, además, p. ej., mediante un resto no nucleotídico o utilizando radiactividad, o una sonda marcada con una secuencia de ácido nucleico extraña al gen ALS de la remolacha azucarera).

Todavía otro aspecto relacionado de la presente invención es el uso de este fragmento de nucleótidos que se extiende por la mutación para la selección asistida por marcador de plantas de remolacha azucarera que tienen una resistencia frente a la molécula tóxica (herbicida).

Ejemplos

Ejemplo Comparativo

Debido a que la remolacha azucarera mutada se generó satisfactoriamente en la técnica (p. ej., en el documento WO 98/02527) tras la adición de herbicida ALS a callos que son explantes de remolacha azucarera salvaje, los autores de la invención seleccionaron en primer lugar el genotipo (línea) de remolacha azucarera derivado de la línea del documento WO 98/02527 y protoplastos aislados de sus células guardianas en el estoma.

Varios millones de estos protoplastos (en promedio, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 millones y hasta 11 millones por experimento, en total, herbicida ALS se aplicó a aproximadamente 150 millones de protoplastos) se aislaron como en el documento WO 95/10178, colocado en medio de cultivo que comprende alginato, y se trató con medio de cultivo MS que comprende 10^{-9} a 10^{-6} mol/l de foramsulfuron.

Los autores de la invención han regenerado entonces la remolacha azucarera, siguiendo el protocolo tal como se describe en el documento WO 95/10178, y observaron que solo unos pocos callos sobrevivieron al inhibidor de ALS. Sin embargo, con una excepción, ninguno de estos callos regenerados era capaz de convertirse en una planta de remolacha azucarera. La única planta de remolacha azucarera regenerada no mostró mutación en el gen ALS (que codifica la enzima objetivo de foramsulfuron).

Por lo tanto, esta línea de remolacha azucarera, cuya línea parental se mostró, sobre la base de la exposición directa de callos (de un explante) a un herbicida, para adquirir resistencia a este herbicida inducida por la mutación, no fue útil para el mismo propósito, cuando el método implica protoplastos de células guardianas en el estoma.

Ejemplo 1 Selección de genotipos (líneas) de remolacha azucarera para protoplastos bien regenerados

Los autores de la invención han comparado varios genotipos de plantas de remolacha azucarera en cuanto a su capacidad de regeneración a partir de protoplastos de células guardianas en el estoma.

5 Los autores de la invención han encontrado genotipos que tienen aproximadamente 0,01% (o incluso menos) de capacidad para regenerarse y varios genotipos que tienen (mucho) más de 0,1% de capacidad para regenerarse.

Los autores de la invención han establecido, además, una distinción entre el crecimiento de los protoplastos (su capacidad de crecer y dividirse *in vitro*), la capacidad de los callos crecidos de formar brotes y la proporción de callos en crecimiento para regenerar una planta.

Tabla 1: Comparación de algunos genotipos de remolacha azucarera

Genotipo	Protoplastos/ Gramo	Porcentaje de células en crecimiento	Porcentaje de formación de brotes	Porcentaje de plantas obtenidas
F06R38309	1500000	0,02	55,67	3,43
F06R38313	500000	0,04	0,14	0,00
F06R38323	1000000	0,19	0,49	10,81
F07R38836	500000	0,26	10,51	0,73
REL1	1000000	0,07	70,00	44,00

10 Aunque los valores que reflejan la capacidad de un protoplasto de células guardianas en el estoma para regenerarse en una planta de remolacha entera, cuando se tomaron en conjunto fueron mayores para la línea celular "Rel1", esta línea celular se consideró no suficientemente útil para ejecutar la presente invención.

15 Los autores de la invención han llegado a la conclusión, además, de que el parámetro "porcentaje de células en crecimiento" es mucho más importante para ejecutar la presente invención que los otros parámetros.

Los autores de la invención han seleccionado un genotipo que tiene más de 0,25% de protoplastos de células guardianas en el estoma que pueden crecer *in vitro*.

Ejemplo 2 Tratamiento con herbicidas de protoplastos

20 Los autores de la invención han aplicado el mismo enfoque que en el ejemplo comparativo, pero basándose en protoplastos de células guardianas en el estoma que crecen bien (por ejemplo identificado como en el Ejemplo 1, también pueden utilizarse plantas depositadas como NCIMB 42050 o NCIMB 42051, así como otras plantas de remolacha azucarera que tienen una alta proporción de protoplastos de células guardianas en el estoma en crecimiento).

25 En total, se trataron aproximadamente 68 millones de protoplastos de células guardianas en el estoma en buen estado de crecimiento con una composición de herbicida ALS que comprende foramsulfuron hasta 10⁻⁶ M.

Los autores de la invención obtuvieron 46 callos.

30 Varias plantas regeneradas muestran una mutación en el gen diana, el gen ALS: en cada caso una mutación en el codón para triptófano en la posición 569 (W569L, que corresponde al triptófano en la posición 574 en *Arabidopsis thaliana*). Los dos alelos de los genes ALS de este mutante son codificados por SEQ. ID. NO: 3 y SEQ. ID. NO: 7. Otros callos crecidos fueron secuenciados y tienen mutaciones en el gen ALS (incluyendo mutaciones en otras posiciones), pero no se regeneraron en una planta.

35 Por lo tanto, los autores de la invención concluyen que el método de la presente invención es muy útil para desarrollar plantas que tienen mutaciones desarrolladas que provocan resistencia a un herbicida, especialmente dado que este método no implica el uso de ADN extraño y/o la introducción de vectores de ADN que codifican elementos genéticos que ya se sabe que confieren resistencia a los inhibidores de ALS, y arrojó resultados positivos en solo unos pocos meses.

Los autores de la invención repitieron luego este método y aplicaron adicionalmente un mutágeno (al 0,05% a 0,2%) a los protoplastos con el fin de aumentar el número de mutaciones.

Ejemplo 3 Tratamiento con inhibidor de ALS de remolachas azucareras

Los autores de la invención compararon el comportamiento de remolachas azucareras regeneradas que tienen la SEQ. ID. NO: 3 mutada (heterocigoto para esta mutación) y una variedad comercial de remolacha azucarera de tipo salvaje (no tratada previamente).

5 La variedad (heterocigota) mutada mostró buena resistencia a foramsulfuron (12.5 g/ha, hasta 3 aplicaciones), incluso cuando el herbicida ha sido combinado con un compuesto orgánico (25 g/ha de éster metílico de aceite de colza) para aumentar su efecto.

Como era de esperar, la planta salvaje (no tratada previamente) era muy sensible a foramsulfuron, incluso después de la primera aplicación.

10 El mismo experimento se realizó utilizando amidosulfuron (15 g/ha), y proporcionó el mismo nivel de resistencia en las plantas mutadas.

Por otro lado, las plantas salvajes (no tratadas previamente) eran muy sensibles a amidosulfuron, especialmente cuando se combinaban con el compuesto orgánico, y/o después de varias aplicaciones de amidosulfuron.

15 El mismo experimento se realizó utilizando yodosulfuron (3,5 g/ha), y demostró un buen nivel de resistencia en las plantas mutadas cuando se añadió yodosulfuron, pero esta resistencia disminuyó cuando se aplicó yodosulfuron junto con el compuesto orgánico.

Como era de esperar, la planta salvaje (no tratada previamente) era muy sensible al yodosulfuron incluso después de una aplicación y sin el compuesto orgánico.

20 Se realizó el mismo experimento utilizando 7,5 g/ha de tiencarbazona-metilo, y proporcionó aproximadamente el mismo nivel de resistencia que para el yodosulfuron en las plantas mutadas. La planta salvaje (no tratada previamente) era muy sensible a tiencarbazona-metilo en todas las concentraciones testadas e independientemente de la adición del compuesto orgánico.

25 Los autores de la invención concluyen que, en comparación con el tipo salvaje, la planta de remolacha azucarera mutada que comprende SEQ. ID. NO: 3 (depositada bajo el Tratado de Budapest NCIMB 42051) ofrece la mejor resistencia contra foramsulfuron.

Los autores de la invención concluyen, además, que esta planta mutada (heterocigótica) ha adquirido adicionalmente cierta resistencia (aunque parcial) frente a otros inhibidores de ALS, incluyendo frente a inhibidores que pertenecen a otras clases químicas.

30 **Ejemplo 4** Tratamiento con inhibidor de ALS de remolachas azucareras que tienen mutaciones adicionales en el gen ALS

Los autores de la invención desarrollaron luego una planta de remolacha azucarera mutada que comprende SEQ. ID. NO: 3 y SEQ. ID. NO: 5 (en dos alelos diferentes). Un mutante dual resultante de este tipo ha sido depositado bajo el Tratado de Budapest bajo NCIMB 42050. Se puede generar una planta que comprenda tanto SEQ. ID. NO: 3 como SEQ. ID. NO: 5 basándose en varias técnicas, incluyendo, por ejemplo, una subsiguiente etapa de mutagénesis aplicada al mutante único NCIMB 42051.

Los autores de la invención compararon luego la resistencia de esta planta mutante dual (una mutación en un alelo en el aminoácido 569 y una mutación en el otro alelo en el aminoácido 188) con la remolacha azucarera mutante (una mutación en la posición 569).

40 La línea de plantas mutantes duales conserva al menos todas las características de resistencia como en el Ejemplo 3, y también ha adquirido una buena resistencia (compatible con la aplicación de campo) hacia tratamientos con tiencarbazona-metilo y amidosulfuron, incluso cuando se pone en composición con compuestos orgánicos.

Por lo tanto, esta planta mutante dual muestra una resistencia sinérgica mejorada frente a varios inhibidores de ALS en comparación con la resistencia atribuida a la planta mutante individual (en la posición 569 en el gen ALS).

45 **Ejemplo 5** Ensayos de invernadero: tratamiento con inhibidor de ALS de diferentes remolachas azucareras en comparación directa

Plantas de remolacha azucarera mutadas que comprenden SEQ. ID. NO: 3 y SEQ. ID. NO: 5 (en dos alelos diferentes) de acuerdo con la presente invención (tal como se describe en el Ejemplo 4 anterior, "Línea A") se trataron con diferentes inhibidores de ALS en comparación directa con plantas de remolacha azucarera en donde el triptófano en la posición 569 de la enzima ALS codificada está sustituido por una leucina ("Línea B"), plantas de remolacha azucarera descritas en el documento WO 98/02527, en donde la prolina en la posición 188 de la enzima ALS codificada se sustituye por una serina ("Línea C"), y plantas de remolacha azucarera de variedad tradicional (de tipo salvaje) que no tienen una mutación en las posiciones 569 y 188 ("Línea WT").

5 Varios grupos de semillas de las cuatro diferentes plantas de remolacha azucarera mencionadas se sembraron por separado en el invernadero y crecieron hasta la fase BBCH 14 para *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* (es decir, 4 hojas (el segundo par) desplegadas) de acuerdo con la monografía "Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen", 2ª edición, 2001, ed. Uwe Meier, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft. Posteriormente, los grupos separados resultantes de plantas de remolacha azucarera se trataron individualmente cada uno con un inhibidor de ALS (ALS-in) en las cantidades (g/ha) indicadas en la Tabla 2.

10 El día 14 después de la aplicación del inhibidor de ALS respectivo, el daño (es decir, la fitotoxicidad) a cada una de las plantas de remolacha azucarera se calificó en una escala del 0% (es decir, sin daño, sin fitotoxicidad) al 100% (es decir, las plantas se exterminaron por completo). La calificación promedio para cada uno de los grupos de plantas también se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2:

ALS-in	ALS-in g/ha	Línea A	Línea B	Línea C	Línea WT
Foramsulfuron	13	26,9%	45,6%	77,5%	80,0%
Yodosulfuron-metil-Na	3,5	22,5%	38,8%	80,0%	82,5%
Amidosulfuron	15	6,3%	37,5%	51,9%	73,1%
Tiencarbazono-metilo	7,5	8,1%	35,6%	37,5%	84,4%
Bispiribac-Na	50	17,5%	38,1%	71,7%	80,0%
Metosulam	15	13,1%	40,6%	69,4%	79,4%

15 Adicionalmente, los fenotipos tempranos típicos de cada una de las plantas de remolacha azucarera se inspeccionaron después del tratamiento con una mezcla que comprende tiencarbazono-metilo y foramsulfuron. Un fenotipo temprano representativo de cada una de las líneas se muestra en la Figura 1 (Fig.1).

La Fig. 1 también demuestra que las plantas de remolacha azucarera de acuerdo con la presente invención ("Línea A") muestran una resistencia mejorada al inhibidor de ALS, es decir, se observaron un crecimiento superior y menos efectos fitotóxicos en comparación con los otros fenotipos tempranos.

20 **Ejemplo 6** Ensayos de campo: tratamiento con inhibidor de ALS de diferentes remolachas azucareras en comparación directa

Tabla 3

Tabla 3: Efecto de inhibidores de ALS sobre plantas de remolacha azucarera. Los valores representan el porcentaje medio de daño medido

		Sensible	574 hetero	574 y 197	574 homo
1	SIN TRATAR	0	0	0	0
2	AE F 130360 00 WG50 A1 25 g / HA (Foramsulfuron)	97	22	5	0
3	BYH18636 15 g/Ha (Tiencarbazono)	97	39	5	0
4	ae f115008 00 wg 10 a2 7 g/ha (yodosulfuron)	98	65	23	28
5	AE F130060 00 WG75 A2 60 g/Ha (mesosulfuron)	91	24	18	0
6	HOESTAR 30 g/Ha (amidosulfuron)	97	34	0	0
7	AEF095404 00 WG60 A2 60 g/Ha (etoxisulfuron)	99	39	0	0
8	RAPTOR 40 g/Ha (imazamox)	98	44	35	8
9	TACCO 30 g/Ha (metosulam)	97	27	0	3
10	NOMINEE 50 g/Ha (bispiribac)	98	78	70	28
11	MOTIVELL 60 g/Ha (nicosulfuron)	98	53	28	13

12	GROPPER SX 8 g/Ha (metosulfuron)	100	74	50	35
13	LEXUS 50 DF 10 g/Ha (flupirsulfuron)	70	0	0	0
14	ATRIBUT 70 g/Ha (propoxicarabazona)	91	25	0	5
15	SIMPLICITY 50 g/Ha (piroxisulam)	97	45	28	0
16	PRIMUS 10 g/Ha (florasulam)	99	55	38	0
17	POINTER SX 30 g/Ha (tribenuron)	98	74	28	20
18	CATO 13 g/Ha (rimsulfuron)	68	8	0	0
19	MONITOR 80 WG 10 g/Ha (sulfosulfuron)	93	23	0	0
20	DEBUT YX1 15 g/Ha (triflusaluron)	0	0	0	0
21	EVEREST 40 g/Ha (flucarbazona)	93	18	0	0
22	HARMONY 7,5 g/Ha (tiensulfuron)	98	39	0	0
23	Nº 2 y Nº 3 (Foramsulfuron + Tiencarbazona) 1 L/Ha	100	65	35	5

Los autores de la invención han sometido a ensayo composiciones comerciales a la dosis que permite la destrucción de las malas hierbas.

5 El control sensible (es decir, una remolacha azucarera que no tiene mutación en el gen ALS) fue exterminado por todos los herbicidas excepto uno. Los autores de la invención han medido daños pequeños a la planta control (sin tratar), alcanzando a veces 35% o incluso 40%. Estos 'daños' reflejan las condiciones agronómicas de este ensayo de campo.

10 Por otra parte, la planta de remolacha azucarera que es heterocigota en la posición 569 (574) se ha vuelto parcialmente resistente frente a varias composiciones herbicidas. La planta que ha incorporado la mutación 569 (574) en ambos alelos y, por lo tanto, es homocigota (569/569) tiene una resistencia incrementada adicional: solo la composición de 7 herbicidas es moderadamente tóxica (de 5% a 35%).

15 Una planta de remolacha azucarera que incorporó la mutación en la posición 569 (574) en un alelo del gen ALS y una mutación en la posición 188 (197) en el segundo alelo del gen ALS también ha adquirido resistencia mejorada, ya que 9 composiciones herbicidas son moderadamente tóxicas, y solo 3 son bastante tóxicas. Sorprendentemente, una planta de este tipo, en donde se ha perdido una mutación que proporciona una resistencia fuerte (569) y que se ha agregado una mutación que proporciona solo una resistencia débil (188) hacia el inhibidor de ALS, proporciona una resistencia incluso mejor que la planta homocigótica (569/569) en 3 condiciones diferentes de este ensayo de campo.

PCT

20 Copia impresa (Original en Formato Electrónico) (Esta hoja no es parte y no cuenta como una hoja de la solicitud internacional)

0-1	Formulario PCT/RO/134 (SAFE) Indicaciones Relacionadas con Microorganismo(s) u Otro Material Biológico Depositado(s) (PCT Regla 13bis) Preparado utilizando	
0-1-1		Presentación En Línea PCT Versión 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	Solicitud Internacional Nº	PCT/EP2013/076618

0-3	Referencia de expediente de la Solicitante o el Agente	BPSESS0010PC
1	Las indicaciones hechas a continuación se refieren a el o los microorganismos u otro material biológico depositados a los que se alude en la descripción en: Número de párrafo	
1-1		8
1-3	Identificación de depósito	
1-3-1	Nombre de la institución depositaria	NCIMBNCIMB Ltd.
1-3-2	Dirección de la institución depositaria	Fergusson Building, Craibstone Estate Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido
1-3-3	Fecha de depósito	24 de septiembre de 2012 (24.09.2012)
1-3-4	Número de Acceso	NCIMB 42050
1-4	Indicaciones Adicionales	párrafos 39, 114, 124, 127
1-5	Estados Designados para los que se Hacen Indicaciones	Todas las designaciones
2	Las indicaciones hechas a continuación se refieren a el o los microorganismos u otro material biológico depositados a los que se alude en la descripción en: Número de párrafo	
2-1		8
2-3	Identificación de depósito	
2-3-1	Nombre de la institución depositaria	NCIMBNCIMB Ltd.
2-3-2	Dirección de la institución depositaria	Fergusson Building, Craibstone Estate Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido
2-3-3	Fecha de depósito	24 de septiembre de 2012 (24.09.2012)
2-3-4	Número de Acceso	NCIMB 42051
2-4	Indicaciones Adicionales	párrafos 39, 114, 124, 127
2-5	Estados Designados para los que se Hacen Indicaciones	Todas las designaciones

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA ÚNICAMENTE

0-4	Este formulario fue recibido con la solicitud internacional (si o no)	Sí
0-4-1	Oficial Autorizado	Aoustin, Isabelle

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL ÚNICAMENTE

0-5	Este formulario fue recibido por la Oficina Internacional el:	
0-5-1	Oficial Autorizado	

5

Listado de secuencias

<110> SES

<120> Remolacha azucarera resistente a ALS

<130> SESS0010

10 <160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1995

<212> ADN

15 <213> Beta vulgaris

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1995)

<223> 4D6834 WT all

20 <400> 1

ES 2 684 994 T3

atg gcg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act cca	48
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro	
1 5 10 15	
tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc atc tct tca acc ctc ccc	96
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro	
20 25 30	
ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc	144
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu	
35 40 45	
caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa	192
Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln	
50 55 60	
act caa gca cct tct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct	240
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser	
65 70 75 80	
cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa	288
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu	
85 90 95	
gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt	336
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly	
100 105 110	
gca tct atg gaa atc cac caa gct ctc aca cgc tct aaa acc atc cgc	384
Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg	
115 120 125	
aat gtc ctc cct cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga	432
Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly	
130 135 140	
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt	480
Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly	
145 150 155 160	

ES 2 684 994 T3

cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp 165 170 175	528
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt cca cgc cgt atg att Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile 180 185 190	576
ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gtg aca agg tct Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser 195 200 205	624
att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gta gag gat att cct aga Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg 210 215 220	672
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggt agg cct gga cct Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro 225 230 235 240	720
gtt ttg att gat ctt cct aaa gat att cag cag caa ttg gtt gtt cct Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro 245 250 255	768
gat tgg gat agg cct ttt aag ttg ggt ggg tat atg tct agg ctg cca Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro 260 265 270	816
aag tcc aag ttt tcg acg aat gag gtt gga ctt ctt gag cag att gtg Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val 275 280 285	864
agg ttg atg agt gag tcg aag aag cct gtc ttg tat gtg gga ggt ggg Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly 290 295 300	912
tgt ttg aat tct agt gag gag ttg agg aga ttt gtt gag ttg aca ggg Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly 305 310 315 320	960
att ccg gtg gct agt act ttg atg ggg ttg ggg tct tac cct tgt aat Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn 325 330 335	1008
gat gaa ctg tct ctt cat atg ttg ggg atg cac ggg act gtt tat gcc Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala 340 345 350	1056
aat tat gcg gtg gat aag gcg gat ttg ttg ctt gct ttc ggg gtt agg Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg 355 360 365	1104
ttt gat gat cgt gtg acc ggg aag ctc gag gcg ttt gct agc cgt gct Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala 370 375 380	1152
aag att gtg cat att gat att gac tct gct gag att ggg aag aac aag Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys 385 390 395 400	1200
cag ccc cat gtg tcc att tgt gct gat gtt aaa ttg gca ttg cgg ggt Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly 1248	

ES 2 684 994 T3

405													410				415				
atg	aat	aag	att	ctg	gag	tct	aga	ata	ggg	aag	ctg	aat	ttg	gat	ttc	1296					
Met	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Ser	Arg	Ile	Gly	Lys	Leu	Asn	Leu	Asp	Phe						
			420					425					430								
tcc	aag	tgg	aga	gaa	gaa	tta	ggt	gag	cag	aag	aag	gaa	ttc	cca	ctg	1344					
Ser	Lys	Trp	Arg	Glu	Glu	Leu	Gly	Glu	Gln	Lys	Lys	Glu	Phe	Pro	Leu						
		435					440					445									
agt	ttt	aag	aca	ttt	ggg	gat	gca	att	cct	cca	caa	tat	gcc	att	cag	1392					
Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Asp	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln						
		450				455					460										
gtg	ctt	gat	gag	ttg	acc	aat	ggt	aat	gct	att	ata	agt	act	ggt	gtt	1440					
Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Asn	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val						
	465				470					475					480						
ggg	cag	cac	caa	atg	tgg	gct	gcg	cag	cat	tac	aag	tac	aga	aac	cct	1488					
Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	His	Tyr	Lys	Tyr	Arg	Asn	Pro						
			485					490						495							
cgc	caa	tgg	ctg	acc	tct	ggt	ggg	ttg	ggg	gct	atg	ggg	ttt	ggg	cta	1536					
Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu						
			500					505					510								
cca	gcc	gcc	att	gga	gct	gca	ggt	gct	cga	cca	gat	gca	gtg	gtt	gtc	1584					
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Val						
		515					520					525									
gat	att	gat	ggg	gat	ggc	agt	ttt	att	atg	aat	gtt	caa	gag	ttg	gct	1632					
Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Met	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala						
		530				535					540										
aca	att	agg	gtg	gaa	aat	ctc	cca	ggt	aag	ata	atg	ctg	cta	aac	aat	1680					
Thr	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Ile	Met	Leu	Leu	Asn	Asn						
		545			550					555					560						
caa	cat	tta	ggt	atg	ggt	gtc	caa	tgg	gaa	gat	agg	ttc	tat	aaa	gct	1728					
Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala						
			565					570						575							
aac	cgg	gca	cat	aca	tac	ctt	gga	aac	cct	tcc	aaa	tct	gct	gat	atc	1776					
Asn	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Ser	Lys	Ser	Ala	Asp	Ile						
			580					585					590								
ttc	cct	gat	atg	ctc	aaa	ttc	gct	gag	gca	tgt	gat	att	cct	tct	gcc	1824					
Phe	Pro	Asp	Met	Leu	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Cys	Asp	Ile	Pro	Ser	Ala						
		595				600						605									
cgt	ggt	agc	aac	gtg	gct	gat	ttg	agg	gcc	gcc	att	caa	aca	atg	ttg	1872					
Arg	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Gln	Thr	Met	Leu						
	610					615					620										
gat	act	cca	ggg	cgg	tac	ctg	ctc	gat	gtg	att	gta	cgg	cat	caa	gag	1920					
Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu						
		625			630				635						640						
cat	gtg	ttg	cct	atg	att	cca	agt	ggt	gcc	ggt	ttc	aag	gat	acc	att	1968					
His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ser	Gly	Ala	Gly	Phe	Lys	Asp	Thr	Ile						
			645					650						655							
aca	gag	ggt	gat	gga	aga	acc	tct	taa								1995					
Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Ser														
			660																		

5 <210> 2
 <211> 664
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris
 <400> 2

ES 2 684 994 T3

Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
 20 25 30

Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
 35 40 45

Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
 50 55 60

Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
 65 70 75 80

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

Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly
 100 105 110

Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg
 115 120 125

Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly
 130 135 140

Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp
 165 170 175

Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile
 180 185 190

Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser
 195 200 205

ES 2 684 994 T3

Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg
 210 215 220

Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro
 225 230 235 240

Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro
 245 250 255

Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro
 260 265 270

Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val
 275 280 285

Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly
 290 295 300

Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
 305 310 315 320

Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn
 325 330 335

Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
 340 345 350

Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
 355 360 365

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
 370 375 380

Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
 385 390 395 400

Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly
 405 410 415

Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe
 420 425 430

Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
 435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
 450 455 460

ES 2 684 994 T3

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
465 470 475 480

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
515 520 525

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
530 535 540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
545 550 555 560

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
565 570 575

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
580 585 590

Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
595 600 605

Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
610 615 620

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
625 630 635 640

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
645 650 655

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser
660

<210> 3

<211> 1995

<212> ADN

5 <213> Beta vulgaris

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1994)

<223> 4D6834 W574

10 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1995)

<400> 3

ES 2 684 994 T3

atg gcg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act cca	48
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro	
1 5 10 15	
tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc atc tct tca acc ctc ccc	96
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro	
20 25 30	
ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc	144
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu	
35 40 45	
caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa	192
Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln	
50 55 60	
act caa gca cct tct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct	240
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser	
65 70 75 80	
cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa	288
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu	
85 90 95	
gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt	336
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly	
100 105 110	
gca tct atg gaa atc cac caa gct ctc aca cgc tct aaa acc atc cgc	384
Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg	
115 120 125	
aat gtc ctc cct cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga	432
Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly	
130 135 140	
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt	480
Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly	
145 150 155 160	
cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat	528
Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp	
165 170 175	
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt cca cgc cgt atg att	576
Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile	
180 185 190	
ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gtg aca agg tct	624
Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser	
195 200 205	
att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gta gag gat att cct aga	672
Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg	
210 215 220	
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggt agg cct gga cct	720

ES 2 684 994 T3

Ile	Val	Lys	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro		
225					230					235					240		
ggt	ttg	att	gat	ctt	cct	aaa	gat	att	cag	cag	caa	ttg	ggt	ggt	cct		768
Val	Leu	Ile	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro		
			245						250					255			
gat	tgg	gat	agg	cct	ttt	aag	ttg	ggt	ggg	tat	atg	tct	agg	ctg	cca		816
Asp	Trp	Asp	Arg	Pro	Phe	Lys	Leu	Gly	Gly	Tyr	Met	Ser	Arg	Leu	Pro		
			260					265					270				
aag	tcc	aag	ttt	tcg	acg	aat	gag	ggt	gga	ctt	ctt	gag	cag	att	gtg		864
Lys	Ser	Lys	Phe	Ser	Thr	Asn	Glu	Val	Gly	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Val		
		275					280					285					
agg	ttg	atg	agt	gag	tcg	aag	aag	cct	gtc	ttg	tat	gtg	gga	ggt	ggg		912
Arg	Leu	Met	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly		
	290					295					300						
tgt	ttg	aat	tct	agt	gag	gag	ttg	agg	aga	ttt	ggt	gag	ttg	aca	ggg		960
Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly		
305					310					315					320		
att	ccg	gtg	gct	agt	act	ttg	atg	ggg	ttg	ggg	tct	tac	cct	tgt	aat		1008
Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Cys	Asn		
			325					330						335			
gat	gaa	ctg	tct	ctt	cat	atg	ttg	ggg	atg	cac	ggg	act	ggt	tat	gcc		1056
Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala		
			340					345					350				
aat	tat	gcg	gtg	gat	aag	gcg	gat	ttg	ttg	ctt	gct	ttc	ggg	ggt	agg		1104
Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg		
		355				360						365					
ttt	gat	gat	cgt	gtg	acc	ggg	aag	ctc	gag	gcg	ttt	gct	agc	cgt	gct		1152
Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala		
	370					375					380						
aag	att	gtg	cat	att	gat	att	gac	tct	gct	gag	att	ggg	aag	aac	aag		1200
Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Ser	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys		
385					390					395				400			
cag	ccc	cat	gtg	tcc	att	tgt	gct	gat	ggt	aaa	ttg	gca	ttg	cgg	ggt		1248
Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Ala	Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Arg	Gly		
			405					410						415			
atg	aat	aag	att	ctg	gag	tct	aga	ata	ggg	aag	ctg	aat	ttg	gat	ttc		1296
Met	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Ser	Arg	Ile	Gly	Lys	Leu	Asn	Leu	Asp	Phe		
			420					425					430				
tcc	aag	tgg	aga	gaa	gaa	tta	ggt	gag	cag	aag	aag	gaa	ttc	cca	ctg		1344
Ser	Lys	Trp	Arg	Glu	Glu	Leu	Gly	Glu	Gln	Lys	Lys	Glu	Phe	Pro	Leu		
		435					440					445					
agt	ttt	aag	aca	ttt	ggg	gat	gca	att	cct	cca	caa	tat	gcc	att	cag		1392
Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Asp	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln		
	450					455					460						
gtg	ctt	gat	gag	ttg	acc	aat	ggt	aat	gct	att	ata	agt	act	ggt	ggt		1440
Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Asn	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val		
465					470					475				480			

ES 2 684 994 T3

ggg cag cac caa atg tgg gct gcg cag cat tac aag tac aga aac cct 1488
 Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
 485 490 495
 cgc caa tgg ctg acc tct ggt ggg ttg ggg gct atg ggg ttt ggg cta 1536
 Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
 500 505 510
 cca gcc gcc att gga gct gca gtt gct cga cca gat gca gtg gtt gtc 1584
 Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
 515 520 525
 gat att gat ggg gat ggc agt ttt att atg aat gtt caa gag ttg gct 1632
 Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
 530 535 540
 aca att agg gtg gaa aat ctc cca gtt aag ata atg ctg cta aac aat 1680
 Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
 545 550 555 560
 caa cat tta ggt atg gtt gtc caa ttg gaa gat agg ttc tat aaa gct 1728
 Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
 565 570 575
 aac cgg gca cat aca tac ctt gga aac cct tcc aaa tct gct gat atc 1776
 Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
 580 585 590
 ttc cct gat atg ctc aaa ttc gct gag gca tgt gat att cct tct gcc 1824
 Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
 595 600 605
 cgt gtt agc aac gtg gct gat ttg agg gcc gcc att caa aca atg ttg 1872
 Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
 610 615 620
 gat act cca ggg ccg tac ctg ctc gat gtg att gta ccg cat caa gag 1920
 Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
 625 630 635 640
 cat gtg ttg cct atg att cca agt ggt gcc ggt ttc aag gat acc att 1968
 His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
 645 650 655
 aca gag ggt gat gga aga acc tct taa 1995
 Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser
 660

<210> 4
 <211> 664
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris

5

<400> 4
 Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
 20 25 30

ES 2 684 994 T3

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

ES 2 684 994 T3

Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly
 290 295 300

Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
 305 310 315 320

Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn
 325 330 335

Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
 340 345 350

Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
 355 360 365

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
 370 375 380

Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
 385 390 395 400

Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly
 405 410 415

Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe
 420 425 430

Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
 435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
 450 455 460

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
 465 470 475 480

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
 485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
 500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
 515 520 525

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala

ES 2 684 994 T3

530

535

540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
545 550 555 560

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
565 570 575

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
580 585 590

Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
595 600 605

Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
610 615 620

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
625 630 635 640

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
645 650 655

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser
660

<210> 5

<211> 1995

<212> ADN

5 <213> Beta vulgaris

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1994)

<223> Pro Mutant

10 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1995)

<400> 5

atg gcg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act cca 48
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
1 5 10 15

tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc atc tct tca acc ctc ccc 96
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
20 25 30

ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc 144
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
35 40 45

15

ES 2 684 994 T3

caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln 50 55 60	192
act caa gca cct tct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser 65 70 75 80	240
cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu 85 90 95	288
gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly 100 105 110	336
gca tct atg gaa atc cac caa gct ctc aca cgc tct aaa acc atc cgc Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg 115 120 125	384
aat gtc ctc cct cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly 130 135 140	432
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly 145 150 155 160	480
cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp 165 170 175	528
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt tca cgc cgt atg att Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Ser Arg Arg Met Ile 180 185 190	576
ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gtg aca agg tct Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser 195 200 205	624
att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gta gag gat att cct aga Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg 210 215 220	672
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggt agg cct gga cct Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro 225 230 235 240	720
gtt ttg att gat ctt cct aaa gat att cag cag caa ttg gtt gtt cct Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro 245 250 255	768
gat tgg gat agg cct ttt aag ttg ggt ggg tat atg tct agg ctg cca Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro 260 265 270	816
aag tcc aag ttt tcg acg aat gag gtt gga ctt ctt gag cag att gtg Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val 275 280 285	864
agg ttg atg agt gag tcg aag aag cct gtc ttg tat gtg gga ggt ggg Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly 290 295 300	912

ES 2 684 994 T3

tgt ttg aat tct agt gag gag ttg agg aga ttt gtt gag ttg aca ggg Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly 305 310 315 320	960
att ccg gtg gct agt act ttg atg ggg ttg ggg tct tac cct tgt aat Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn 325 330 335	1008
gat gaa ctg tct ctt cat atg ttg ggg atg cac ggg act gtt tat gcc Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala 340 345 350	1056
aat tat gcg gtg gat aag gcg gat ttg ttg ctt gct ttc ggg gtt agg Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg 355 360 365	1104
ttt gat gat cgt gtg acc ggg aag ctc gag gcg ttt gct agc cgt gct Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala 370 375 380	1152
aag att gtg cat att gat att gac tct gct gag att ggg aag aac aag Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys 385 390 395 400	1200
cag ccc cat gtg tcc att tgt gct gat gtt aaa ttg gca ttg cgg ggt Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly 405 410 415	1248
atg aat aag att ctg gag tct aga ata ggg aag ctg aat ttg gat ttc Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe 420 425 430	1296
tcc aag tgg aga gaa gaa tta ggt gag cag aag aag gaa ttc cca ctg Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu 435 440 445	1344
agt ttt aag aca ttt ggg gat gca att cct cca caa tat gcc att cag Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln 450 455 460	1392
gtg ctt gat gag ttg acc aat ggt aat gct att ata agt act ggt gtt Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val 465 470 475 480	1440
ggg cag cac caa atg tgg gct gcg cag cat tac aag tac aga aac cct Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro 485 490 495	1488
cgc caa tgg ctg acc tct ggt ggg ttg ggg gct atg ggg ttt ggg cta Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu 500 505 510	1536
cca gcc gcc att gga gct gca gtt gct cga cca gat gca gtg gtt gtc Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val 515 520 525	1584
gat att gat ggg gat ggc agt ttt att atg aat gtt caa gag ttg gct Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala 530 535 540	1632
aca att agg gtg gaa aat ctc cca gtt aag ata atg ctg cta aac aat Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn	1680

ES 2 684 994 T3

545		550		555		560	
caa cat tta ggt atg gtt gtc	caa tgg gaa gat agg ttc tat	aaa gct	1728				
Gln His Leu Gly Met Val Val	Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr	Lys Ala					
	565	570	575				
aac cgg gca cat aca tac ctt	gga aac cct tcc aaa tct gct	gat atc	1776				
Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu	Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala	Asp Ile					
	580	585	590				
ttc cct gat atg ctc aaa ttc	gct gag gca tgt gat att cct	tct gcc	1824				
Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe	Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro	Ser Ala					
	595	600	605				
cgt gtt agc aac gtg gct gat	ttg agg gcc gcc att caa aca	atg ttg	1872				
Arg Val Ser Asn Val Ala Asp	Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr	Met Leu					
	610	615	620				
gat act cca ggg ccg tac ctg	ctc gat gtg att gta ccg cat	caa gag	1920				
Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu	Leu Asp Val Ile Val Pro His	Gln Glu					
	625	630	635	640			
cat gtg ttg cct atg att cca	agt ggt gcc ggt ttc aag gat	acc att	1968				
His Val Leu Pro Met Ile Pro	Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp	Thr Ile					
	645	650	655				
aca gag ggt gat gga aga acc	tct taa		1995				
Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr	Ser						
	660						
<210> 6							
<211> 664							
<212> PRT							
5 <213> Beta vulgaris							
<400> 6							
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn	Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser	Thr Pro					
	1	5	10	15			
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser	Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr	Leu Pro					
	20	25	30				
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr	Pro Thr Pro Leu Phe His Arg	Pro Leu					
	35	40	45				
Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser	His Lys Ser Ser Ala Ile Lys	Thr Gln					
	50	55	60				
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro	Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe	Val Ser					
	65	70	75	80			
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro	Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu	Val Glu					
	85	90	95				
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val	Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro	Gly Gly					

ES 2 684 994 T3

	100							105						110	
Ala	Ser	Met	Glu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Lys	Thr	Ile	Arg
	115						120					125			
Asn	Val	Leu	Pro	Arg	His	Glu	Gln	Gly	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly
	130					135					140				
Tyr	Ala	Arg	Ala	Thr	Gly	Lys	Val	Gly	Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly
145					150					155					160
Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp
				165					170					175	
Ser	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Arg	Arg	Met	Ile
			180					185						190	
Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser
		195					200					205			
Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg
	210					215					220				
Ile	Val	Lys	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro
225					230					235					240
Val	Leu	Ile	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro
				245					250					255	
Asp	Trp	Asp	Arg	Pro	Phe	Lys	Leu	Gly	Gly	Tyr	Met	Ser	Arg	Leu	Pro
			260					265					270		
Lys	Ser	Lys	Phe	Ser	Thr	Asn	Glu	Val	Gly	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Val
		275					280					285			
Arg	Leu	Met	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly
	290					295					300				
Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly
305					310					315					320
Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Cys	Asn
				325					330					335	
Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala
			340					345					350		

ES 2 684 994 T3

Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
 355 360 365

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
 370 375 380

Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
 385 390 395 400

Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly
 405 410 415

Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe
 420 425 430

Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
 435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
 450 455 460

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
 465 470 475 480

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
 485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
 500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
 515 520 525

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
 530 535 540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
 545 550 555 560

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
 565 570 575

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
 580 585 590

Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
 595 600 605

ES 2 684 994 T3

Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
610 615 620

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
625 630 635 640

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
645 650 655

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser
660

<210> 7
<211> 1995
<212> ADN
5 <213> Beta vulgaris

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1994)
<223> 4D6834 al2 WT

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1995)

<400> 7
atg gcg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act caa 48
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Gln
1 5 10 15

tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc att tct tca acc ctc ccc 96
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
20 25 30

ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc 144
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
35 40 45

caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa 192
Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
50 55 60

act caa gca cct tct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct 240
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
65 70 75 80

cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa 288
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
85 90 95

gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt 336
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly
100 105 110

gca tct atg gaa atc cac caa gct ctg acg cgc tct aaa acc atc cgc 384
Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg

15

ES 2 684 994 T3

115	120	125	
aat gtc ctc ccc cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly 130 135 140			432
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly 145 150 155 160			480
cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp 165 170 175			528
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt cca cgc cgt atg att Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile 180 185 190			576
ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gta aca agg tct Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser 195 200 205			624
att act aag cat aat tat ttg gtt ttg gat gta gaa gat att cct aga Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg 210 215 220			672
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggc agg cct gga cct Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro 225 230 235 240			720
ggt ttg att gat ctt cct aaa gat att cag cag caa ctg gtt gtt cct Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Leu Val Val Pro 245 250 255			768
gat tgg gat agg cct ttt aag ttg ggt ggg tat atg tct agg ctg cca Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro 260 265 270			816
aag tcc aag ttt tcg acg aat gag gtt gga ctt ctt gag cag att gtg Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val 275 280 285			864
agg ttg atg agt gag tcg aag aag cct gtc ttg tat gtg gga ggt ggg Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly 290 295 300			912
tgt ttg aat tct agt gag gag ttg agg aga ttt gtt gag ttg aca ggg Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly 305 310 315 320			960
att ccg gtg gct agt act ttg atg ggg ttg ggg tct tac cct tgt aat Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn 325 330 335			1008
gat gaa ctg tct ctt cat atg ttg ggg atg cac ggg act gtt tat gcc Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala 340 345 350			1056
aat tat gcg gtg gat aag gcg gat ttg ttg ctt gct ttc ggg gtt agg Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg 355 360 365			1104
ttt gat gat cgt gtg act ggg aag ctc gag gcg ttt gct agc cgt gct			1152

ES 2 684 994 T3

Phe 370	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly 375	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe 380	Ala	Ser	Arg	Ala		
aag 385	att Lys	gtg Ile	cat Val	att His	gat Ile	att Asp	gac Ile	tct Asp	gct Ser	gag Ala	att Glu	ggg Ile	aag Lys	aac Asn	aag Lys	1200	
cag Gln	ccc Pro	cat His	gtg Val	tcc Ser	att Ile	tgt Cys	gct Ala	gat Asp	gtt Val	aaa Lys	ttg Leu	gca Ala	ttg Leu	cgg Arg	ggt Gly	1248	
atg Met	aat Asn	aag Lys	att Ile	ctg Leu	gag Glu	tct Ser	aga Arg	ata Ile	ggg Gly	aag Lys	ctg Leu	aat Asn	ttg Leu	gat Asp	ttc Phe	1296	
tcc Ser	agg Arg	tgg Trp	aga Arg	gaa Glu	gaa Glu	tta Leu	ggt Gly	gag Glu	cag Gln	aag Lys	aag Lys	gaa Glu	ttc Phe	cca Pro	ctg Leu	1344	
agt Ser	ttt Phe	aag Lys	aca Thr	ttt Phe	ggg Gly	gat Asp	gca Ala	atc Ile	cct Pro	cca Pro	caa Gln	tat Tyr	gcc Ala	att Ile	cag Gln	1392	
gtg Val	ctt Leu	gat Asp	gag Glu	ttg Leu	acc Thr	aat Asn	ggt Gly	aat Asn	gct Ala	att Ile	ata Ile	agt Ser	act Thr	ggt Gly	gtt Val	1440	
ggg Gly	cag Gln	cac His	caa Gln	atg Met	tgg Trp	gct Ala	gcg Ala	cag Gln	cat His	tac Tyr	aag Lys	tac Tyr	aga Arg	aac Asn	cct Pro	1488	
cgc Arg	caa Gln	tgg Trp	ctg Leu	acc Thr	tct Ser	ggt Gly	ggg Gly	ttg Leu	ggg Gly	gct Ala	atg Met	ggg Gly	ttt Phe	ggg Gly	cta Leu	1536	
cca Pro	gcc Ala	gcc Ala	att Ile	gga Gly	gct Ala	gca Ala	gtt Val	gct Ala	cga Arg	cca Pro	gat Asp	gca Ala	gtg Val	gtt Val	gtc Val	1584	
gat Asp	att Ile	gat Asp	ggg Gly	gat Asp	ggc Gly	agt Ser	ttt Phe	att Ile	atg Met	aat Asn	gtt Val	caa Gln	gag Glu	ttg Leu	gct Ala	1632	
aca Thr	att Ile	agg Arg	gtg Val	gaa Glu	aat Asn	ctc Leu	cca Pro	gtt Val	aag Lys	ata Ile	atg Met	ctg Leu	cta Leu	aac Asn	aat Asn	1680	
caa Gln	cat His	tta Leu	ggt Gly	atg Met	gtt Val	gtc Val	caa Gln	tgg Trp	gaa Glu	gat Asp	agg Arg	ttc Phe	tat Tyr	aaa Lys	gct Ala	1728	
aat Asn	cgg Arg	gca Ala	cat His	aca Thr	tac Tyr	ctt Leu	gga Gly	aac Asn	cct Pro	tcc Ser	aaa Lys	tct Ser	gct Ala	gat Asp	atc Ile	1776	
ttc Phe	cct Pro	gat Asp	atg Met	ctc Leu	aaa Lys	ttc Phe	gct Ala	gag Glu	gca Ala	tgt Cys	gat Asp	att Ile	cct Pro	tct Ser	gcc Ala	1824	
cg Arg	gtt Val	agc Ser	aac Asn	gtg Val	gct Ala	gat Asp	ttg Leu	agg Arg	gcc Ala	gcc Ala	att Ile	caa Gln	aca Thr	atg Met	ttg Leu	1872	
gat Asp	act Thr	cca Pro	ggg Gly	ccg Pro	tac Tyr	ctg Leu	ctc Leu	gat Asp	gtg Val	att Ile	gta Val	ccg Pro	cat His	caa Gln	gag Glu	1920	
cat His	gtg Val	ttg Leu	cct Pro	atg Met	att Ile	cca Pro	agt Ser	ggt Gly	gcc Ala	ggt Gly	ttc Phe	aag Lys	gat Asp	acc Thr	att Ile	1968	
aca Thr	gag Glu	ggt Gly	gat Asp	gga Gly	aga Arg	acc Thr	tct Ser	taa								1995	

ES 2 684 994 T3

<210> 8
 <211> 664
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris

5 <400> 8
 Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Gln
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
 20 25 30
 Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
 35 40 45
 Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
 50 55 60
 Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
 85 90 95
 Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly
 100 105 110
 Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg
 115 120 125
 Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly
 130 135 140
 Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp
 165 170 175

ES 2 684 994 T3

Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile
 180 185 190

Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser
 195 200 205

Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg
 210 215 220

Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro
 225 230 235 240

Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro
 245 250 255

Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro
 260 265 270

Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val
 275 280 285

Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly
 290 295 300

Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
 305 310 315 320

Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn
 325 330 335

Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
 340 345 350

Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
 355 360 365

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
 370 375 380

Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
 385 390 395 400

Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly
 405 410 415

Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe
 420 425 430

ES 2 684 994 T3

Ser Arg Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
450 455 460

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
465 470 475 480

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
515 520 525

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
530 535 540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
545 550 555 560

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
565 570 575

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
580 585 590

Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
595 600 605

Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
610 615 620

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
625 630 635 640

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
645 650 655

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser
660

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una planta de remolacha azucarera mutante que es resistente a uno o más inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (ALS), que comprende las etapas de:
- 5 - obtener protoplastos a partir de células guardianas en el estoma aisladas de una planta de remolacha azucarera;
 - aplicar a un cultivo *in vitro* de dichos protoplastos una composición que comprende uno o más inhibidores de ALS a una concentración que es letal para más del 99% de las células cultivadas *in vitro*; y
 - regenerar plantas de remolacha azucarera a partir de las células supervivientes de estas células cultivadas *in vitro*,
- 10 en el que dichos protoplastos de células guardianas en el estoma se pre-seleccionan por su capacidad de regenerarse en una planta de remolacha azucarera, en el que dichos protoplastos pre-seleccionados tienen una probabilidad de más de 10% (número de protoplastos en crecimiento:número total de protoplastos en cultivo) de dividirse y regenerarse en un callo viable, en el que callos obtenidos por dichos protoplastos tienen más de 10% (número de brotes productores de callos:número total de callos) de capacidad de desarrollar brotes, y en el que
- 15 dicho o dichos inhibidores de ALS se aplica o aplican a más de 20 000 000 de dichos protoplastos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de seleccionar protoplastos de células guardianas en el estoma, capaces de regenerarse en una planta de remolacha azucarera comprende las sub-etapas de aislar protoplastos de células guardianas en el estoma de plantas de remolacha azucarera de diferentes genotipos y medir para cada uno de los genotipos la proporción de dichos protoplastos que crecen cuando dichos protoplastos se
- 20 ponen en cultivo *in vitro*.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende, además, la etapa de secuenciar el genoma de las plantas regeneradas de las células cultivadas *in vitro* supervivientes, y/o secuenciar el gen ALS para identificar una mutación en el gen ALS.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende, además, la etapa
- 25 de seleccionar plantas de remolacha azucarera que tienen una mutación en el gen ALS.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 precedentes, en el que la planta de remolacha azucarera regenerada tiene una o varias mutaciones en el gen ALS en las posiciones que codifican los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Glicina 112, Alanina 113, Metionina 115, Arginina 133, Valina 187, Arginina 190, Alanina 196, Fenilalanina 197, Lisina 247, Metionina 346, Histidina 347, Arginina 368, Aspartato 370, Aspartato 371, Arginina 372, Metionina 565, Valina 566, Fenilalanina 573, Serina 648 y Glicina 649.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 precedentes, en el que la planta de remolacha azucarera regenerada tiene una mutación en el gen ALS en la posición que codifica Prolina 188 y/o una mutación en el gen ALS en la posición que codifica Triptófano 589.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa preliminar
- 35 de deducir la concentración en la que la composición, que comprende uno o más inhibidores de ALS, es o son letales para al menos 99% de las células cultivadas *in vitro*.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el uno o más inhibidores de ALS se aplica o aplican a un cultivo *in vitro* de más de 50 000 000 de protoplastos de células guardianas en el estoma.
- 40 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición que comprende uno o más inhibidores de ALS comprende foramsulfuron, preferiblemente en el que el foramsulfuron se aplica a una concentración en el intervalo de 10^{-9} mol/l a 10^{-6} mol/l y/o etoxisulfuron.
10. Un método para producir una planta de remolacha azucarera mutante que es resistente a un herbicida, que comprende las etapas de:
- 45 - obtener protoplastos a partir de células guardianas en el estoma aisladas de una planta de remolacha azucarera;
 - aplicar a un cultivo *in vitro* de dichos protoplastos una composición que comprende dicho herbicida a una concentración que es letal para más del 99% de las células cultivadas *in vitro*;
 - regenerar plantas de remolacha azucarera a partir de las células supervivientes de dichas células cultivadas
 - 50 *in vitro*; y
 - seleccionar plantas de remolacha azucarera regeneradas que tienen una mutación en el gen que codifica el

péptido fijado como objetivo por dicho herbicida,

5 en el que dichos protoplastos de células guardianas en el estoma se pre-seleccionan por su capacidad para regenerarse en una planta de remolacha azucarera, en el que dichos protoplastos pre-seleccionados tienen una probabilidad de más de 10% (número de protoplastos en crecimiento:número total de protoplastos en cultivo) de dividirse y regenerarse en un callo viable, en el que callos obtenidos por dichos protoplastos tienen más de 10% (número de brotes productores de callos:número total de callos) de capacidad de desarrollar brotes, y en el que dicho herbicida se aplica a más de 20 000 000 de dichos protoplastos, en el que el herbicida se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de 4-HPPD, inhibidores de la biosíntesis de carotenoides, inhibidores de EPSP sintasa, inhibidores de fosfosistema II, inhibidores de fosfosistema I, inhibidores de la división celular, inhibidores del ensamblaje de microtúbulos, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa, inhibidores de la acetil CoA carboxilasa, inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidor de la glutamina sintetasa y auxina sintética.

10 11. Una planta de remolacha azucarera mutada que comprende SEQ. ID. NO: 3 en un alelo del gen ALS y SEQ. ID. NO: 5 en el segundo alelo del gen ALS, en donde la planta de remolacha azucarera mutada no se obtiene exclusivamente mediante un procesos esencialmente biológico.

15 12. Protoplastos de células guardianas en el estoma, aislados de la planta mutada de la reivindicación 11.

13. Uso de los protoplastos de la reivindicación 12, para la introducción de uno o más rasgos genéticos.

Fig. 1

