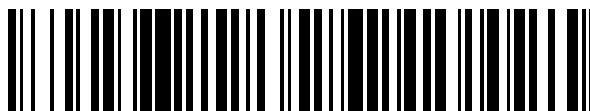


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 273**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2015 PCT/DE2015/000170**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15154741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2015 E 15738237 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3129394**

54 Título: **Proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias y su uso para incrementar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de plantas**

30 Prioridad:

11.04.2014 DE 102014005337

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

10.08.2020

73 Titular/es:

**KWS SAAT SE & CO. KGAA (50.0%)
Grimsehlstrsse 31
37574 Einbeck, DE y
SÜDZUCKER AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOCH, WOLFGANG;
SAUER, NORBERT;
WIRSCHING, PETRA;
POMMERRENIG, BENJAMIN;
NEUHAUS, EKKEHARD;
JUNG, BENJAMIN;
FLÜGGE, ULF-INGO;
LUDEWIG, FRANK;
WÖSTEFELD, NICOLE;
MARTEN, IRENE;
HEDRICH, RAINER y
SCHULZ, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 778 273 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

Proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias y su uso para incrementar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de plantas

La presente invención se encuentra en el campo de la producción industrial de azúcar de plantas útiles y se refiere al incremento del rendimiento de sacarosa en el cultivo agrícola de plantas útiles. En particular, la invención se refiere a proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias, en particular a proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias, y a los ácidos nucleicos que las codifican así como a su uso para elevar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de plantas útiles.

Azúcar es por una parte el término general para todos los mono- y disacáridos de sabor dulce, y por otra parte también la designación usual en el comercio para el disacárido sacarosa. Sacarosa es el azúcar común para el hogar o cristalina, y también se denomina sucrosa. La sacarosa es un dímero de respectivamente una molécula de α -D-glucosa y β -D-fructosa, las cuales están enlazadas una con otra por vía de un enlace α,β -1,2-glucósido.

La sacarosa es formada en las plantas por medio de la fotosíntesis. La biosíntesis de la sacarosa se efectúa en el citoplasma de las células vegetales. Para este propósito, los dos fosfatos de triosa gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetofosfato que resultan como beneficio neto en la asimilación de carbono de la fotosíntesis (ciclo Calvin) se exportan del cloroplasto al citosol. En el citosol de la célula vegetal se forman a partir de los fosfatos de triosa los monosacáridos UDP-glucosa y fructosa-6-fosfato. Para este propósito primero se forma fructosa-1,6-bifosfato mediante una reacción de condensación entre gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetofosfato. Luego fructosa-1,6-bifosfato se transforma en fructosa-6-fosfato mediante desfosforilado. A partir de fructosa-6-fosfato es posible mediante isomerización también formar glucosa-6-fosfato, que después de una re-isomerización previa a glucosa-1-fosfato reacciona con uridintrifosfato (UTP) en uridindifosfato-glucosa (UDP-glucosa). La siguiente condensación de UDP-glucosa y fructosa-6-fosfato en sacarosa-6-fosfato es catalizada por la enzima sacarosa-fosfato-sintasa. La energía necesaria para esto se proporciona mediante la escisión de uridindifosfato (UDP). Finalmente el residuo de fosfato de sacarosa-6-fosfato es escindido en una reacción irreversible mediante la enzima sacarosa-fosfato-fosfatasa, de manera que se produce sacarosa.

La sacarosa es un disacárido no reductor y por este motivo el azúcar de transporte más importante en las plantas. La sacarosa se sintetiza nuevamente en las hojas de las plantas y se transporta por vía del floema a sus órganos de acopio, en donde se acumula como nutriente y fuente de energía en las vacuolas de las células vegetales existentes allí.

Para la producción industrial de sacarosa tienen importancia ante todo la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* subesp. *vulgaris*), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y la palma sacarina (*Arenga pinnata*, sin.: *Arenga saccharifera* Labil., predominantemente en Indonesia). En menores cantidades la sacarosa también se obtiene de la savia del arce sacarino (*Acer saccharum*). Estas plantas se usan para la producción de sacarosa debido a su contenido extraordinariamente elevado de sacarosa.

En la caña de azúcar se encuentran azúcares - predominantemente sacarosa - con una proporción de por lo general 10 a 20 % en la médula de la planta (su órgano acopiador de sacarosa). El azúcar de caña se produce mediante cristalización y refinación de la savia vegetal obtenida mediante estrujado.

La remolacha azucarera es una planta bienal, la cual en el primer año acopia una reserva de azúcar en el cuerpo de la remolacha, la cual en el segundo año le sirve de nutriente a la planta floreciente. La producción de azúcar por lo general se efectúa de trozos de la remolacha azucarera en un proceso de extracción con agua. Después de esto el extracto se puede mezclar con óxido de calcio, para precipitar los ácidos vegetales como el ácido oxálico y el ácido tartárico y las albúminas. El excedente de cal se segrega mediante la introducción de dióxido de carbono. Mediante la siguiente evaporación al vacío del agua de la solución de azúcar se obtiene una solución espesa. El azúcar que cristaliza se separa del jarabe de color ocre remanente mediante centrifugado. El residuo, la melaza, se usa como forraje o se usa para la fermentación alcohólica. Una purificación del azúcar (refinación) se efectúa mediante recristalización, filtrado y mediante la concentración por evaporación al vacío.

Mediante décadas de esfuerzos en el cultivo de plantas acopiadoras de azúcar fue posible lograr considerables incrementos en el rendimiento del órgano acopiador de sacarosa y en la concentración de sacarosa. Por ejemplo, en el caso de los tipos de remolacha que se cultivan actualmente para la producción de azúcar, la concentración de sacarosa del cuerpo de la remolacha se encuentra en 15 a 20 % en peso con relación al peso fresco del cuerpo de la remolacha. No obstante, las concentraciones de sacarosa logradas todavía no son satisfactorias.

Por lo tanto, la presente invención tuvo por objeto proporcionar plantas con una mayor concentración de sacarosa, y encontrar procedimientos con los que se puede incrementar la concentración de sacarosa de las plantas, en particular de caña de azúcar y remolachas azucareras.

En la solicitud internacional publicada con el n.º WO 2010/072210 A1 se revela un procedimiento para elevar el

rendimiento de sacarosa en el cultivo agrícola de remolachas azucareras. En el procedimiento se usan plantas de remolacha azucarera o caña de azúcar cuya dotación genética se dirige a la reducción de la actividad enzimática de una invertasa. Para este propósito, un ácido nucleico que es adecuado para reducir la actividad enzimática de una invertasa en una célula vegetal se usa para formar un órgano de acopio de sacarosa de una planta en el cual se incrementa la concentración de sacarosa en comparación con un órgano de acopio de sacarosa de control no modificado del mismo genotipo en un estado de desarrollo similar.

Las vacuolas vegetales desempeñan un papel central en el acopio a largo y corto plazo de los azúcares, puesto que como orgánulo, la vacuola ocupa un volumen de aproximadamente 90% en una célula vegetal fotosintéticamente activa (Martinola, E. et al. (2007) "Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism", J. Exp. Bot. 58: 83-102). Por este motivo, ya en virtud de su tamaño las vacuolas son de enorme importancia para el acopio de azúcares (Neuhaus, H.E. (2007) "Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane", FEBS Lett. 581: 2223-2226). Los tejidos de acopio como la raíz principal de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y la médula de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) concentran grandes cantidades de sacarosa en las vacuolas de las células de sus órganos de acopio, para poderlas usar como fuente de energía para su metabolismo vegetal.

En diferentes plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas como *Nedicago* (n.º de identificación AC131026), *Vitis vinifera* (n.º de identificación AAX47312) y arroz (*Oryza sativa*; n.º de identificación Os02g13560) se descubrieron proteínas que son responsables del transporte de azúcar del citoplasma de la célula vegetal a sus vacuolas. En la planta *Arabidopsis* se identificó un gen, cuyo producto de proteína es un transportador de azúcar que se localiza en la membrana de la vacuola de células fotosintéticamente activas y puede importar glucosa del citosol a la vacuola (Wormit, A. et al. (2006) "Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport", Plant Cell 18: 3476-3490). Esta proteína transportadora calificada como Transportador de Monosacárido Tonoplastidario (TMT) se localiza en la membrana de la vacuola, el tonoplasto. La proteína Transportadora de Monosacárido Tonoplastidaria (TMT) comprende tres isoformas en *Arabidopsis thaliana*, las cuales se designan como AfTMT1, AfTMT2 y AfTMT3. Los genes para AfTMT1 y AfTMT2 tienen un patrón de expresión específico del tipo histológico y celular, mientras que el gen AfTMT3 solo se expresa muy débilmente. A través de eliminaciones de gen TMT se pudo demostrar que las plantas así modificadas acopian en sus vacuolas notablemente menos glucosa y fructosa en comparación con las plantas de tipo salvaje. Sin embargo, en lo referente al acopio de sacarosa no fue posible comprobar diferencias entre las plantas de tipo salvaje y las eliminaciones de gen TMT.

El Transportador de Monosacárido Tonoplastidario (TMT) de *Arabidopsis thaliana* se caracterizó en forma electrofisiológica como antiporter de glucosa y sacarosa estimulado por protones, el cual transporta glucosa y sacarosa con especificidad aproximadamente igual a través de la membrana de la vacuola (Schulz, A. et al. (2011) "Proton-driven sucrose symport and antiporter are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2", The Plant Journal 68: 129-136). En el mismo artículo también la proteína transportadora de sacarosa SUC4 de *Arabidopsis thaliana* se caracteriza como simporter de protones/sacarosa, el cual igualmente se supone esta localizado en la membrana de la vacuola.

En la solicitud internacional publicada con el número WO 2011/120549 A1 se revela que la sobreexpresión del Transportador de Monosacárido Tonoplastidario AfTMT1 incrementa en plantas la producción de semillas o se incrementa el contenido de proteína y aceite de las semillas o se puede promover el crecimiento prematuro de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas. Sin embargo no se revela una concentración de sacarosa en un órgano acopiador.

Ante este trasfondo, el problema en que se basa la presente invención se solucionó mediante la identificación de las proteínas responsables de la importación de azúcar a la vacuola de células de la raíz pivotante de remolachas azucareras, en particular de la proteína responsable de la importación de sacarosa a las vacuolas de las células de raíz pivotante que es específica para la sacarosa. Con la identificación de estas proteínas, en particular con la identificación de esta primera proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria específica para sacarosa y de las secuencias de nucleótido que codifican para estas proteínas se proporcionan procedimientos de cultivo y/o genética molecular para aumentar la concentración de sacarosa en plantas y por consiguiente se proporcionan también plantas con una mayor concentración de sacarosa.

De acuerdo con un primer aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico la cual codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria. Preferiblemente la molécula de ácido nucleico codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria que es específica para sacarosa. A continuación, una proteína antiporter de protones/azúcar que se especifica para sacarosa también se denomina como proteína antiporter de protones/sacarosa.

De acuerdo con un segundo aspecto, se desvela un gen recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto o una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, preferible para una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria. La molécula de ácido nucleico se puede unir operativamente con al menos un elemento regulador.

De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a un vector o un elemento genético móvil que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto

5 Se desvela también un vector que contiene un gen recombinante de acuerdo con el segundo aspecto.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped eucariótica o una célula huésped procariótica la cual comprende un vector o elemento genético móvil de acuerdo con el tercer aspecto.

10 Una célula huésped eucariótica o una célula huésped procariótica, que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto, preferentemente como transgén o un gen recombinante de acuerdo con el segundo aspecto, se describen asimismo.

15 En otro aspecto se describe una proteína que funciona como antiporter de protones/azúcar tonoplastidario, que preferiblemente es específico para sacarosa, o preferiblemente funciona como antiporter de protones/sacarosa tonoplastidario.

20 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto como transgén o un vector del elemento genético móvil de acuerdo con el tercer aspecto, así como a una planta transgénica o partes de la misma, que comprenden al menos una célula vegetal transgénica.

25 Una célula vegetal transgénica que contiene un gen recombinante de acuerdo con el segundo aspecto como transgén se describe asimismo.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a semillas de una planta transgénica de acuerdo con el aspecto precedente, presentando la semilla una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto como transgén, un vector o elemento genético móvil de acuerdo con el tercer aspecto.

30 Semillas de una planta transgénica, que presentan un gen recombinante de acuerdo con el segundo aspecto como transgén, se desvelan asimismo.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir plantas transgénicas.

35 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para incrementar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta.

40 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar una planta que es adecuada para producir una mayor concentración de sacarosa en un órgano acopiador de sacarosa de la planta.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a oligonucleótidos que son adecuados para ser usados como marcadores moleculares para la verificación diagnóstica de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto.

45 Se desvelan también anticuerpos que son diagnósticos para una proteína que funciona como antiporter de protones/azúcar tonoplastidario, el cual preferiblemente es específico para sacarosa, o bien que funciona preferiblemente como antiporter de protones/sacarosa tonoplastidario.

50 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere al uso de proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias para incrementar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta.

55 La Figura 1 muestra una tabla de la cual se desprenden las identidades y las similitudes de las secuencias de aminoácido de las tres proteínas transportadoras de monosacárido tonoplastidarias (TMT) paralogenas de *Arabidopsis thaliana* con las cuatro proteínas transportadoras de azúcar tonoplastidarias (TST) paralogenas de *Beta vulgaris*.

60 La Figura 2 muestra un cladograma en el que se representan las relaciones filogenéticas de las tres proteínas transportadoras de monosacárido tonoplastidarias (TMT) paralogenas de *Arabidopsis thaliana* y las cuatro proteínas transportadoras de azúcar tonoplastidarias (TST) paralogenas de *Beta vulgaris*.

La Figura 3 muestra un diagrama de columnas que ilustra la concentración de sacarosa en raíces pivotantes de diferente edad de dos variedades de remolachas azucareras.

65 La Figura 4 muestra un diagrama de columnas del cual se desprenden las cantidades de mRNA relativas de los cuatro genes TST paralogos de *Beta vulgaris* en dos diferentes variedades de remolacha azucarera en diferentes momentos del desarrollo.

La Figura 5 muestra un diagrama de columnas que representa la concentración foliar de diferentes azúcares en la variedad de remolacha azucarera "Belladonna KWS" en diferentes momentos del desarrollo.

5 La Figura 6 muestra un diagrama de columnas del cual se desprenden las cantidades de mRNA relativas para los cuatro genes *BvTST* paralogos en las hojas de la variedad de remolacha azucarera "Belladonna KWS" en diferentes momentos del desarrollo.

10 La Figura 7 es un diagrama de columnas que muestra el cambio inducido de la densidad de corriente por diferentes azúcares (sacáridos) en vacuolas de células mesófilas transitoriamente transformadas.

Los inventores identificaron la proteína designada en este documento como *BvTST2.1* como una de las proteínas más frecuentemente existentes con relación a la cantidad en la membrana de vacuola de células de raíz pivotante de la remolacha azucarera, y comprobaron inesperadamente que la proteína *BvTST2.1* puede importar del citosol al interior de las vacuolas de las células vegetales específicamente la sacarosa como transportador de azúcar tonoplastidario. Por este motivo, esta proteína así como las proteínas con función igual no solo constituyen transportadores de azúcar tonoplastidarios (TST) sino que a continuación también se designan como transportadores de sacarosa tonoplastidarios o antiporter de protones/sacarosa tonoplastidarios o proteínas antiporter de protones/sacarosa tonoplastidarias, siendo que "*Bv*" en la abreviación que se usa en este documento representa *Beta vulgaris*, el organismo en el cual se identificó originalmente esta proteína. La proteína *BvTST2.1* fue identificada por los inventores como una proteína antiporter de protones/azúcar altamente específica para la sacarosa y constituye el primer representante conocido de esta familia de proteínas transportadoras de azúcar vegetales. Adicionalmente también se logró también la identificación de tres otras isoformas paralogas, *BvTST1*, *BvTST2.2* y *BvTST3*, las cuales probablemente se deben asociar funcionalmente a las proteínas TMT conocidas de *Arabidopsis*.

A partir de la identificación de este antiporter novedoso específico para sacarosa, los inventores también identificaron las secuencias de nucleótido que codifican para la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria así como para las otras isoformas.

30 Por lo tanto, se desvelan moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, preferiblemente una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria.

35 De acuerdo con el tercer aspecto, la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria comprende una molécula de ácido nucleico que se selecciona del grupo:

- a) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, o una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que presenta una identidad de al menos 80% a la secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2;
- 40 b) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que es complementaria a una de las secuencias de nucleótido según a); y
- c) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácido tiene una identidad de al menos 80% a la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 d).

Se desvela además una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria, que comprende una molécula de ácido nucleico, que se selecciona del grupo:

- 50 e) una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con a) o b); y
- f) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un análogo o un ortólogo del polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

55 Se divulga también una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria que comprende una molécula de ácido nucleico que se selecciona del grupo:

- a) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, o una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que presenta una identidad de al menos 80% a la secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2;
- 60 b) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que es complementaria a una de las secuencias de nucleótido según a);
- c) una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico según a) o b);
- d) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácido tiene una identidad de al menos 80% a la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; y
- 65

e) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un análogo o un ortólogo del polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

El concepto "molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido" no abarca solamente moléculas de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótido consta de la secuencia de nucleótido caracterizada después más específicamente, sino también moléculas de ácido nucleico que además de la secuencia de nucleótido caracterizada después más específicamente comprenden adicionalmente al menos un nucleótido o secuencias de nucleótido.

De acuerdo con una forma de realización alternativa y/o adicional, la molécula de ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. Pero la molécula de ácido nucleico también puede codificar para una secuencia de aminoácido en la que el al menos un resto de aminoácido de la secuencia de aminoácido se intercambia por un aminoácido que tiene propiedades químicas similares (cambio de aminoácido conservativo o semiconservativo). En el caso de un cambio de aminoácido conservativo se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tiene características químicas similares. En el caso de un cambio de aminoácido semiconservativo se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tiene conformación estérica similar. El cambio preferiblemente no tiene consecuencias para la función proteínica. Los ejemplos para los cambios de aminoácido son Asp y Glu, Leu e Ile, Ala y Val, Arg y Lys, así como Phe y Trp.

De acuerdo con una forma de realización alternativa y/o adicional, las secuencias de nucleótido de los ácidos nucleicos y/o las secuencias de aminoácido, que son codificadas por las secuencias de ácido nucleótido, tienen una identidad de al menos 80%, al menos 85%, de preferencia de al menos 90%, de manera particularmente preferida de al menos 95%, al menos 96%, al menos 97% o al menos 98%, y de manera muy particularmente preferida de al menos 90% a la secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 o bien la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7.

El concepto "hibridar" que se usa en este documento significa hibridación en condiciones usuales, como se describe en Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), preferiblemente en condiciones astringentes. Las condiciones de hibridación astringente son por ejemplo: hibridación en 4 x SSC a 65 °C y subsiguiente lavado múltiple en 0,1 x SSC a 65 °C durante un total de aproximadamente 1 hora. Las condiciones de hibridación poco astringentes son por ejemplo: hibridación en 4 x SSC a 37 °C y subsiguiente lavado repetido en 1 x SSC a la temperatura ambiente. "Condiciones de hibridación astringente" también puede significar: hibridación a 68 °C en fosfato de sodio 0,25 M, pH 7,2, 7% de SDS, 1 mM de EDTA y 1% de BSA durante 16 horas y a continuación lavar dos veces con 2 x SSC y 0,1% de SDS a 68 °C.

Por "específico para sacarosa" o "altamente específico para sacarosa" o "transporte específico de sacarosa" o "transporte altamente específico de sacarosa" o "especificidad para sacarosa" o "especificidad de sacarosa", se entiende que la especificidad de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria para la sacarosa es al menos 5 veces, 10 veces o 15 veces, preferiblemente al menos 18 veces, 20 veces, 22 veces, 24 veces, 26 veces o 28 veces, de manera particularmente preferida al menos 30 veces, al menos 31 veces, al menos 32 veces, al menos 33 veces, al menos 34 veces, al menos 35 veces, al menos 36 veces, al menos 37 veces, al menos 38 veces o al menos 39 veces, y de manera muy particularmente preferida al menos 40 veces mayor que para otro azúcar. En el sentido de la invención se entiende por "específico para sacarosa" que la especificidad de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria para sacarosa es al menos 5 veces mayor que para otro azúcar. Además, esto también puede significar, que la especificidad de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria para la sacarosa es al menos 5 veces, 10 veces o 15 veces, preferiblemente al menos 18 veces, 20 veces, 22 veces, 24 veces, 26 veces o 28 veces, de manera particularmente preferida al menos 30 veces, al menos 31 veces, al menos 32 veces, al menos 33 veces, al menos 34 veces, al menos 35 veces, al menos 36 veces, al menos 37 veces, al menos 38 veces o al menos 39 veces, y de manera muy particularmente preferida al menos 40 veces mayor que para un monosacárido como glucosa o fructosa.

En el sentido de la invención se entiende por un "homólogo" una proteína del mismo origen filogenético, por un "análogo" se entiende una proteína que ejerce la misma función, pero sin embargo tiene un origen filogenético diferente, y por un "ortólogo" una proteína de otra especie, que ejerce la misma función.

Se desvela también un gen recombinante, que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto o una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido, que preferiblemente codifica para una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria. La molécula de ácido nucleico puede estar conectada operativamente con al menos un elemento regulador.

Por un "elemento regulador" se entienden secuencias de nucleótido, que no son parte de la secuencia de nucleótido que codifica la proteína, pero intervienen en la expresión de la secuencia de nucleótido que codifica la proteína. Los elementos reguladores son por ejemplo promotores, elementos cis-reguladores, intensificadores, intrones o terminadores. En función del tipo de elemento regulador, este se dispone sobre la molécula de ácido nucleico delante (o sea en sentido 5' de) o detrás (o sea en sentido 3' de) la secuencia de nucleótido que codifica la proteína. Los elementos reguladores son capaces de funcionar en una célula vegetal viva.

El concepto “conectado operativamente” significa que un elemento regulador se conecta de esta manera con la secuencia de nucleótido que codifica la proteína, o sea de manera que con relación a la secuencia de nucleótido que codifica la proteína se localiza por ejemplo sobre una molécula de ácido nucleico de manera que puede tener lugar una expresión de la secuencia de nucleótido que codifica la proteína bajo control del elemento regulador en una célula viva.

En el sentido de la presente invención, un “promotor” es una secuencia de nucleótido que regula la expresión de un gen, la cual usualmente se encuentra en el extremo 5' de un gen y que por vía de la interacción con determinadas proteínas enlazadoras de DNA interviene en el inicio de la transcripción mediante RNA-polimerasa. Los ejemplos de promotores que son funcionales en células vegetales comprenden los promotores constitutivos como promotores virales, por ejemplo el promotor CaM35S, un promotor CaM35S doble, o como promotores vegetales, por ejemplo promotores de ubiquitina, como los descritos en el documento EP 0 305 668 y el documento US 6.528.701. Además, también es posible usar promotores que tienen por ejemplo una actividad específica respecto a determinadas fases de desarrollo o de inducción mediante factores del entorno, como tensión biótica o abiótica, o una especificidad histológica. En particular es posible usar aquellos promotores que muestra una mayor especificidad para el órgano acopiador de sacarosa o partes de este, o sea que en particular son activos en este órgano acopiador de sacarosa o partes de este. Para la remolacha azucarera el promotor puede ser por ejemplo un promotor específico de la raíz o bien específico de la raíz pivotante. Estos los conoce suficientemente el experto por el estado de la técnica: WO 02/40687, Oltmanns, H. et al. (2006) “Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet”, *Planta* 224: 485-495, Noh, Seol Ah, et al. (2012) “A sweetpotato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in *Arabidopsis*, carrot and potato”, *Transgenic research* 21: 265-278. Para la caña de azúcar se pueden usar preferiblemente promotores específicos del tallo, como se conocen por ejemplo de Goshu Abraha, Tsion. “Isolation and characterisation of a culm-specific promoter element from sugarcane”, Diss. Stellenbosch: University of Stellenbosch, 2005; Govender, C. “Stem specific promoters from sorghum and maize for use in sugarcane”, Diss. Stellenbosch: Stellenbosch University, 2008; y Mudge, S.R. et al. (2013) “Mature-stem expression of silencing-resistant sucrose isomerase gene drives isomaltulose accumulation to high levels in sugarcane”, *Plant Biotechnology Journal* 1: 502-509).

Como promotores adecuados también se han evidenciado además los promotores sintéticos. En este aspecto se trata de promotores producidos mediante técnicas de trabajo molecular-biológicas que no se encuentran de este tipo en la naturaleza. Un promotor sintético es un promotor minimalista el cual, además de un promotor mínimo ya solo contiene uno o varios elementos cis definidos, seleccionados. Estos elementos cis son puntos de enlace para proteínas enlazadoras de DNA como factores de transcripción y se aíslan de promotores naturales, se derivan de elementos cis ya aislados o se producen técnicamente mediante técnicas de recombinación aleatorias y se seleccionan mediante procesos adecuados, en comparación con un promotor natural, un promotor sintético solo se activa mediante pocos factores exógenos y endógenos debido a su estructura menos compleja y por consiguiente esta regulado de manera más específica.

El “promotor mínimo” o promotor “core” es una secuencia de nucleótido que contiene los puntos de enlace para el complejo de factor de transcripción basal y permite el inicio exacto de la transcripción mediante la RNA polimerasa II. Los motivos de secuencia característicos del promotor mínimo son la secuencia llamada TATA Box, el elemento iniciador (Inr), el “elemento de reconocimiento TFBII” (BRE) y el “elemento promotor central corriente abajo” (DPE). Estos elementos pueden estar presentes en el promotor mínimo de manera individual o en combinación. El promotor mínimo o sus motivos de secuencia se pueden obtener por ejemplo de cualquier gen vegetal, bacterial, micótico o viral.

Los “elementos cis” son secuencias de nucleótido que se encuentran sobre la misma molécula de ácido nucleico que la secuencia de nucleótido a ser expresada que codifica para la proteína. Los elementos cis que se encuentran corriente arriba de una secuencia de nucleótido a ser expresada que codifica la proteína constituyen frecuentemente motivos de enlace necesarios para en particular factores de transcripción, los cuales en este caso *elementos trans-activos* (del latín trans “del otro lado”) vistos molecularmente intervienen desde otro lado en la regulación de la transcripción en este gen. Sí además estos elementos cis conducen a una inhibición de la transcripción, se denominan silenciadores. Los elementos cis que conducen a un refuerzo de la transcripción se denominan intensificadores. La totalidad de las actividades cis/trans en el promotor determina finalmente la intensidad con la que la RNA-polimerasa lleva a cabo la transcripción.

Además es posible que en el caso de un promotor se trate también de un promotor químérico y/o de un promotor que fue modificado mediante elemento cis. La modificación de un promotor puede en este aspecto también significar la introducción adicional de un elemento cis en el promotor, el cual por ejemplo naturalmente ya tiene un elemento cis. Adicionalmente, la modificación comprende también una multimerización de un elemento cis, en particular una multimerización de un elemento cis naturalmente existente. Un promotor de estos modificado puede, en comparación con la versión nativa, tener propiedades modificadas en lo referente de por ejemplo especificidad, nivel de expresión o actividad de fondo.

Los terminadores son secuencias de nucleótido sobre el DNA que generalmente marcan el final de un gen y conducen a la terminación de la transcripción.

5 De acuerdo con una forma de realización alternativa y/o adicional, la secuencia de nucleótido que codifica para la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, en particular la secuencia de nucleótido que codifica para la proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria, y la secuencia de nucleótido del al menos un elemento regulador son heterólogas. Esto significa que provienen de diferentes especies o que no están presentes naturalmente en una especie en la combinación prevista.

10 De acuerdo con un tercer aspecto la invención se refiere a un vector o un elemento genético móvil, que comprende una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido según el primer aspecto o un gen recombinante según el segundo aspecto.

15 En este sentido se entiende por un vector un vehículo de transporte para una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto o un gen recombinante de acuerdo con el segundo aspecto, en particular para la transferencia de un ácido nucleico extraño en una célula receptora viva. En el caso de la célula receptora viva se puede tratar de una célula eucariótica o de una célula procariótica. Entre los vectores se cuentan por ejemplo plásmidos, cósmidos, cromosomas de levadura sintéticos (YACs), cromosomas de bacterias sintéticos (BACs) o cromosomas P1 sintéticos (PACs), pero también virus modificados como adenovirus, retrovirus y fagos.

20 Los elementos genéticos móviles son secuencias de nucleótido cuya posición en el genoma de un organismo es variable. Entre los elementos genéticos móviles se cuentan por ejemplo secuencias de nucleótido codiciosas como transposones, retroelementos, secuencias de inserción e inteínas, pero también intrones del grupo II, plásmidos de inserción y algunos bacteriófagos como el fago Mu.

25 De acuerdo con otro aspecto la invención se refiere a una célula huésped eucariótica o una célula huésped procariótica, que comprende un vector o elemento genético móvil de acuerdo con el tercer aspecto como transgén. Esto significa que el vector o el elemento genético móvil se introdujo en la célula huésped, por ejemplo mediante transformación o transfección. Los ejemplos de células huésped procarióticas son las bacterias de la especie *A. tumefaciens*, *E. coli* y *B. subtilis*. Los ejemplos para las células huésped eucarióticas son células de levadura como *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, pero también células de origen animal o vegetal.

30 Se desvelan también proteínas que funcionan como antiporter de protones/sacarosa tonoplastidario. Este antiporter es específico para sacarosa. Preferiblemente la proteína es codificada mediante una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto.

35 De acuerdo con una forma de realización, la proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria se selecciona del grupo de proteínas que

- 40 a) presentan una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1;
- b) presentan una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos 80% a la secuencia de aminoácido de acuerdo SEQ ID NO: 1;
- c) son un homólogo, un análogo o un ortólogo de la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

45 La proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, también designada *BvTST2.1*, tiene una secuencia de aminoácido con una longitud de 735 aminoácidos. Un análisis de capacidad hidrofóbica indica que *BvTST2.1* evidentemente comprende 12 dominios transmembranosos hidrófobos y un bucle hidrófilo grande que se localiza central, el cual conecta uno con otro el sexto y el séptimo dominio transmembranosos. La mayor identidad de secuencia la tiene *BvTST2.1* con relación a la proteína transportadora de monosacárido tonoplastidaria 2 de *Arabidopsis thaliana* (*AfTMT2*). La identidad de estas dos secuencias de aminoácido se encuentra en 68%, y considerando los cambios de aminoácido conservadores y semiconservadores tiene una similitud de secuencia de 84% (figura 1).

50 Se desvelan también proteínas que funcionan como antiporter de protones/azúcar tonoplastidario. Preferiblemente la proteína es codificada mediante una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto.

55 De acuerdo con una forma de realización, la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria se selecciona del grupo de proteínas que

- 60 a) tienen una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, 5 o 7;
- b) tienen una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos 80% con relación a la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, 5 o 7;
- c) son un homólogo, un análogo o un ortólogo de la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, 5 o 7.

65 La proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 también se designa como *BvTST1*, de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 también como *BvTST2.2* y de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 también como *BvTST3*.

En virtud de que la proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria *BvTST2.1* identificada en *Beta vulgaris* así como también las otras proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria *BvTST1*, *BvTST2.2* y *BvTST3* también tienen identidades de secuencia a las proteínas de transporte de otras plantas, las proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias, en particular las proteínas antiporter de protones/sacarosa tonoplastidarias comprenden también proteínas cuya secuencia de aminoácido tiene una identidad de al menos 80% con respecto a la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7, preferiblemente de al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, así como homólogos, análogos u ortólogos de estas. En este aspecto no importa en qué especie se encuentran naturalmente estas proteínas o si se trata de proteínas que no se encuentran naturalmente, las cuales se producen por ejemplo mediante métodos moleculares genéticos.

De acuerdo con otro aspecto la invención se refiere a una célula vegetal transgénica, la cual comprende una molécula de ácido nucleico según el primer aspecto como transgén, o un vector o elemento genético móvil de acuerdo con el tercer aspecto como transgén, así como también se refiere a una planta transgénica o partes de esta que comprenden al menos una célula vegetal de este tipo. En cuanto a esto también la planta transgénica o partes de esta comprenden una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto como transgén, o un vector o elemento genético móvil de acuerdo con el tercer aspecto como transgén.

De acuerdo con otro aspecto la invención se refiere a semillas de una planta transgénica de acuerdo con el aspecto precedente, siendo que las semillas y en particular al menos una célula embrional de la semilla comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto como transgén, o un vector o elemento genético móvil de acuerdo con el tercer aspecto.

En una forma de realización, en el caso de la célula vegetal se trata de una célula de una planta monocotiledónea, en otra forma de realización se trata en el caso de la célula vegetal de una célula de una planta dicotiledónea. De acuerdo con otra forma de realización y/o forma de realización adicional se trata en el caso de la célula vegetal de células de una planta que se selecciona del grupo de los géneros o las especies superordenadas que comprende *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* y *Sorghum sp.* Según esto, de acuerdo con otra forma de realización, la planta transgénica se selecciona del grupo que comprende *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* y *Sorghum sp.* De acuerdo con otra forma de realización, las partes de una planta transgénica o las partes de las semillas de una planta transgénica provienen del grupo de plantas que comprende *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* y *Sorghum sp.*

En una forma de realización adicional y/o alternativa, la célula de planta transgénica, la planta transgénica o las partes de la planta transgénica, en las que preferiblemente se trata del órgano acopiador de sacarosa de la planta, comprende una mayor concentración de sacarosa que la célula de planta o planta isógena cultivada en condiciones idénticas. Además es posible que las partes de una planta estén conectadas con o estén separadas de la planta intacta total. Estas partes incluyen por ejemplo órganos, tejidos, células y semillas de la planta.

Preferiblemente la mayor concentración de sacarosa se funda en una mayor concentración de sacarosa en la vacuola vegetal, en particular en la vacuola de al menos una célula del órgano acopiador de sacarosa de la planta. Preferiblemente una planta que tiene una mayor concentración de sacarosa también tiene una producción de sacarosa elevada. Producción significa en este sentido el rendimiento de sacarosa del órgano acopiador de sacarosa con relación a una superficie de cultivo definida (por ejemplo, una hectárea) o con relación al peso de un órgano acopiador de sacarosa teniendo en cuenta la proporción de agua en el órgano acopiador de sacarosa (preferiblemente la normatividad se basa en peso fresco o peso seco).

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de plantas transgénicas, siendo que el procedimiento comprende al menos las etapas siguientes:

- (a) la introducción de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto, y/o de un vector o de los elementos genéticos móviles de acuerdo con el tercer aspecto en al menos una célula de una planta; y
- (b) la regeneración de la planta transgénica de la célula vegetal obtenida en la etapa (a).

De acuerdo con una forma de realización, la planta transgénica que resulta del procedimiento está en condiciones de efectuar una mayor concentración de sacarosa en las vacuolas de sus células, preferiblemente en la vacuolas de las células de su órgano acopiador de sacarosa que una planta de control isógena cultivada bajo condiciones idénticas.

En el sentido de la presente invención, por "plantas isógenas o plantas de control" o "células vegetales isógenas" se entienden aquellas plantas o

células vegetales que se usaron como material inicial para producir las plantas transgénicas o células vegetales transgénicas. Por consiguiente, el genoma de las plantas y/o células vegetales transgénicas, en cuanto se trata de plantas o células vegetales modificadas con técnica genética solo difieren una de otra por los genes transferidos y/o

secuencias de nucleótido introducidas con técnica genética.

De acuerdo con una forma de realización adicional y/o alternativa, la planta transgénica expresa o sobreexpresa en al menos una célula la secuencia de nucleótido que codifica para al menos una proteína antiporter de protones/azúcar.

La introducción de la molécula de ácido nucleico, por ejemplo por vía de la transformación se puede efectuar con técnicas que son fundamentalmente conocidas por el experto. Por ejemplo es posible que la molécula de ácido nucleico se introduzca en las células vegetales mediante la infección de un tejido vegetal o una célula vegetal con *Agrobacterium tumefaciens*, la cual contiene la secuencia de ácido nucleico a ser transferida en su plásmido que se puede integrar en el genoma vegetal. También es posible una introducción mediante transferencia biolística, en la que el ácido nucleico a ser introducido en la célula vegetal se aplica sobre partículas de oro o partículas de tungsteno, las cuales a continuación se dispara con alta velocidad al interior de las células. Otra posibilidad conocida por el experto de introducir ácido nucleico en una célula vegetal consiste en la transformación de protoplastos, en la cual a los protoplastos o bien se les adiciona polietilenglicol en presencia de las moléculas de ácido nucleico a ser introducidas o los protoplastos se exponen a una corta aplicación de corriente, de manera que la membrana del protoplasto se torna transitoriamente permeable para las moléculas de ácido nucleico. Los procedimientos para la regeneración de plantas completas de tejido o células transformados los conoce igualmente el experto por el estado de la técnica.

De preferencia la molécula de ácido nucleico según el primer aspecto, el gen recombinante según el segundo aspecto y/o el vector o el elemento genético móvil según el tercer aspecto se introduce de manera estable en el genoma de la célula de la planta. Esto significa que después de la regeneración de una planta la secuencia de ácido nucleico transferida puede ser heredada de manera estable por esta planta a una planta descendiente.

Preferiblemente la transformación y la regeneración de remolachas azucareras se efectúa de acuerdo con el método descrito por Lindsey (Lindsey K. (1991) "Regeration and transformation of sugar beet by *Agrobacterium tumefaciens*". Plant Tissue Culture Manual B7: 1-13, Kluwer Academic Publisher).

La transgenidad de las plantas se puede verificar mediante reacción en cadena de polimerasa con el uso de oligonucleótidos cebadores adecuados. Después de la regeneración es posible que los transformados se cultiven y se reproduzcan a sí mismos en el invernadero para la obtención de semillas.

En una forma de realización se trata en el caso de las células vegetales a ser transformadas de células de plantas monocotiledóneas. En otra forma de realización se trata en el caso de las células vegetales a ser transformadas de células de plantas dicotiledóneas. De acuerdo con otra forma de realización y/o forma de realización adicional se trata en el caso de las células vegetales a ser transformadas de células de una planta que se selecciona del grupo de los tipos o especies superordenadas que comprende *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* y *Sorghum sp.*

De acuerdo con otro aspecto la invención se refiere a un procedimiento para aumentar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta mediante la expresión o sobreexpresión de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, en particular una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria, en al menos una célula de la planta. La expresión o sobreexpresión se puede efectuar mediante modificación genética de al menos una célula de la planta y comprende

(1) la introducción de una molécula de ácido nucleico según el primer aspecto, de un gen recombinante según el segundo aspecto y/o de un vector o elemento genético móvil según el tercer aspecto en al menos una célula de una planta, mediante lo que se efectúa una expresión adicional o una sobreexpresión de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, o

(2) la modificación genética de un elemento regulador endógeno como un promotor, el cual regula la expresión de un gen endógeno que codifica una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, por ejemplo mediante la introducción de elementos cis o intensificadores adicionales, mediante la cual se efectúa una expresión aumentada de la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria regulada.

Mediante la sobreexpresión de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, en particular de una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria, en al menos una célula de la planta se mejora la importación de sacarosa en las vacuolas de la célula genéticamente modificada. Mediante esto también se aumenta la concentración de sacarosa en las vacuolas de esta célula, en comparación con una célula vegetal isógena.

Un "aumento de la concentración de sacarosa" o una "concentración de sacarosa incrementada" o una "mayor concentración de sacarosa de un órgano de acopio de sacarosa de una planta" significa un incremento de la concentración promedio de sacarosa, con relación al peso fresco del órgano acopiador de sacarosa en comparación con una planta de control (isógena) no transgénica cultivada en condiciones idénticas, de al menos 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% o 1%, preferiblemente de al menos 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8% o 2%, de manera particularmente preferida de al menos 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 6%, 7%, 8%, o 10%, y de manera muy particularmente preferida de al

menos 15%.

En el sentido de la invención se entiende por el concepto "sobreexpresión" que la cantidad de proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria en una planta, célula vegetal o sus tonoplastos es mayor que en la planta isógena, la célula vegetal isógena o sus tonoplastos.

De acuerdo con una forma de realización, el procedimiento para aumentar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta comprende la expresión y/o sobreexpresión de una secuencia de nucleótido que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Para este propósito se produce una planta transgénica de acuerdo con el procedimiento precedentemente descrito, siendo que la expresión y/o sobreexpresión de la(s) proteína(s) antiporter de protones/azúcar en la planta transgénica se puede posibilitar mediante diversas modificaciones genéticas como se describió en lo precedente.

Así es posible además introducir un constructo de un promotor fuerte y una secuencia de nucleótido de acuerdo con el primer aspecto de la invención en una célula vegetal a ser transformada. Alternativamente es posible modificar el promotor endógeno de un gen que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, en particular de un gen que codifica para una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria de manera que es más intensamente activo en la planta transgénica que en la planta de control isógena. Los medios para la modificación de un promotor endógeno pueden ser por ejemplo TALENs o nucleasas de dedo de cinc. De acuerdo con otra alternativa es posible introducir en la célula vegetal copias de gen adicionales del gen endógeno que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, en particular del gen endógeno que codifica para una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria, incluido su promotor natural.

En una forma de realización alternativa y/o adicional, la proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria se selecciona del grupo que comprende proteínas *BvTST2.1*, homólogos, análogos y ortólogos de estas.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar una planta que es adecuada para producir una concentración de sacarosa más elevada en su órgano acopiador de sacarosa.

De acuerdo con una forma de realización es posible que las plantas a ser identificadas se sometan a una identificación apoyada por marcadores. Para esto se aísla el DNA de cada planta a ser investigada y o bien se somete a una reacción en cadena de polimerasa (PCR) con oligonucleótidos cebadores adecuados, de manera que del análisis de los productos de reacción de la PCR, ya sea por vía de cromatografía de gel o mediante identificación por fluorescencia como en la RT-PCR, se pueden identificar aquellas plantas que en virtud de su dotación genética son adecuadas para producir una concentración de sacarosa más elevada en su órgano acopiador de sacarosa. De acuerdo con una forma de realización adicional y/o alternativa, la dotación genética de las plantas a ser identificadas también se puede efectuar mediante un polimorfismo de longitud de restricción, en el cual el DNA aislado se hidroliza con diferentes endonucleasas de restricción, los fragmentos de restricción se separan mediante cromatografía de gel, se transfieren por elusión y se hibridan con una sonda adecuada. Los ejemplos de oligonucleótidos adecuados para una identificación de plantas transgénicas que son adecuadas para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa debido a que expresan o sobre-expresan la secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 se pueden tomar del grupo de oligonucleótidos que abarca SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO. 26. El experto sabe como puede proporcionar oligonucleótidos adecuados también para homólogos, análogos u ortólogos de la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con una forma de realización adicional y/o alternativa, la identificación de las plantas que son adecuadas para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa no se efectúa en base a su dotación genética sino mediante la expresión de sus proteínas antiporter de protones/sacarosa tonoplastidarias. Esto puede tener lugar por ejemplo a nivel de los mRNA, al determinar la cantidad de mRNA de las secuencias de desoxirribonucleótido que codifican para las proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias, en particular de las secuencias de desoxirribonucleótido que codifican para las proteínas antiporter de protones/sacarosa tonoplastidarias, por ejemplo mediante "PCR cuantitativa en tiempo real". La determinación de una cantidad mayor de mRNA, que codifica para al menos una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria precedentemente descrita en una planta, en un tejido vegetal o una célula vegetal, en particular en un tejido o en una célula del órgano acopiador de sacarosa de la planta, con relación a otro tejido vegetal o una célula vegetal de la misma planta, que no son parte del órgano acopiador de sacarosa de la planta, vale como comprobación de la adecuación de una planta para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa.

Una identificación de las plantas que son adecuadas para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa también se puede efectuar mediante identificación cuantitativa de la cantidad de proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, en particular de proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria en una parte de la planta. Para este propósito se usa la llamada transferencia Western, en la cual las proteínas divididas mediante electroforesis de la parte de planta, preferiblemente de las vacuolas, de manera particularmente preferida de la membrana de vacuola de esta parte se incuban con un anticuerpo específico para

una o varias de las proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias precedentemente descritas. Por medio de un anticuerpo secundario que liga el anticuerpo específico para una o varias de las proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias precedentemente descritas, y que tiene una marcación identificable, es posible determinar la cantidad de proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, en particular de proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria en la parte de la planta e identificar las plantas que son adecuadas para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa. La determinación de una cantidad mayor de al menos una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria en una planta, en una parte de planta o en una célula vegetal, en particular en un tejido o en una célula del órgano acopiador de la planta, con relación a una planta comparativa de la misma especie o una parte de esta o con relación a otro tejido vegetal o una célula vegetal de la misma planta, que no son parte del órgano acopiador de sacarosa de la planta, vale como comprobación de la adecuación de una planta para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa.

Se desvelan también a las plantas identificadas con el procedimiento precedentemente mencionado, que son adecuadas para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a oligonucleótidos que son adecuados para ser usados como marcadores moleculares para la identificación diagnóstica de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto.

De acuerdo con una forma de realización, al menos uno de los oligonucleótidos adecuados se elige del grupo que comprende los oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. Estos se pueden usar como marcadores moleculares para la identificación diagnóstica de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

Además se desvela un anticuerpo que es diagnóstico para una proteína que funciona como antiporter de protones/azúcar tonoplastidario, preferiblemente como antiporter de protones/sacarosa tonoplastidario.

En una forma de realización el anticuerpo diagnóstico es un anticuerpo monoclonal. En una forma de realización alternativa el anticuerpo diagnóstico es parte de un antisuero policlonal.

En una forma de realización adicional y/o alternativa el anticuerpo diagnóstico o bien el antisuero policlonal es específico para una determinada proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria como una proteína antiporter de protones/sacarosa tonoplastidaria. Preferiblemente el anticuerpo diagnóstico identifica y liga un epítipo en el bucle entre el sexto y el séptimo dominio transmembranoso de una proteína antiporter de protones/sacarosa.

De acuerdo con otro aspecto la invención se refiere al uso de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria para aumentar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta.

De acuerdo con una forma de realización, el uso de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria para aumentar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta comprende el aumento de la concentración de sacarosa mediante la expresión o sobreexpresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria. Preferiblemente la molécula de ácido nucleico comprende

- i. una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, o con una secuencia de nucleótido que tiene una identidad de al menos 80% con respecto a una de las secuencias de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14;
- ii. una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que es complementaria a una de las secuencias de nucleótido según i.;
- iii. una molécula de ácido nucleico que hidroliza con una de las moléculas de ácido nucleico según i. o ii.; o
- iv. una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13, o que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que presenta una identidad de al menos 80% con respecto a una de las secuencias de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 codifica para el antiporter de protones/azúcar tonoplastidario TST2.1 de *Beta vulgaris* con la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 codifica para el antiporter de protones/azúcar tonoplastidario TST1 de *Beta vulgaris* con la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 codifica para el antiporter de protones/azúcar tonoplastidario TST2.2 de *Beta vulgaris* con la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 codifica para el antiporter de protones/azúcar tonoplastidario TST3 de *Beta vulgaris* con la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 7.

5 La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 codifica para el antiporter de protones/azúcar tonoplastidario TMT1 de *Arabidopsis thaliana* con la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 codifica para el antiporter de protones/azúcar tonoplastidario TMT2 de *Arabidopsis thaliana* con la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 11.

10 La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 14 codifica para el antiporter de protones/azúcar tonoplastidario TMT3 de *Arabidopsis thaliana* con la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 13.

15 Mediante la expresión y/o sobreexpresión de al menos una de las secuencias de nucleótido mencionadas bajo i. a iv. en una planta después de introducir las en al menos una célula de la planta es posible aumentar la cantidad de proteína antiporter de protones/azúcar en la membrana de vacuola de esta planta, en particular en las membranas de las vacuolas de los órganos acopiadores de sacarosa de esta planta, de manera que es posible transportar más sacarosa a las vacuolas de la planta y se incrementa la concentración de sacarosa en el órgano acopiador de sacarosa de la planta en comparación con una planta de control isógena cultivada en condiciones idénticas. Mediante esto es posible aumentar el rendimiento de sacarosa por planta, por órgano acopiador de sacarosa y/o por superficie cultivada.

20 La presente invención se explicará a continuación mediante ejemplos de realización, siendo que los ejemplos de realización solamente sirven para explicar, pero no limitan la presente invención. La presente invención se define exclusivamente mediante las reivindicaciones. La expresión "un" o "una" no se debe entender en el sentido de que especifica el número/cantidad.

25 Los ejemplos de realización muestran claramente que la TST2.1 de *Beta vulgaris* es la proteína de membrana tonoplastidaria que como antiporter de protones/azúcar puede importar de manera altamente específica la sacarosa en la vacuola de una célula vegetal.

30 Ejemplo 1: Material vegetal y condiciones de crecimiento

35 Para las pruebas siguientes se usaron remolachas azucareras de los tipos "Belladonna KWS" y "Brigadier". La simiente para la variedad "Belladonna KWS" fue proporcionada por la KWS Saat AG, Einbeck, DE, la simiente para remolachas de la variedad "Brigadier" se adquirió comprando en el comercio de simientes local.

40 Además se usaron plantas y células vegetales de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*. Las plantas crecieron en cámaras de crecimiento sobre el sustrato estándar ED-73 de la firma Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co. KG con un ciclo de claro-oscuro de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad, 22 °C y 125 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

45 El mutante de doble gen knockout *Arabidopsis Atst1-2* T-DNA se describió en el estado de la técnica (Wormit, A. et al. (2006) "Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport", *Plant Cell* 18, 3476-3490). Para las pruebas de crecimiento con 2-desoxiglucosa se cultivaron semillas de *Arabidopsis* con superficie esterilizada sobre placas de agar Murashige und Skoog medio concentradas (1/2MS) como se describió, (Reiser, J. et al. (2004) "Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*", *Plant Physiol.* 136: 3524-3536). La selección de las plantas que sobre-expresan pUBQ:BvTST2.1-GFP y 35S:BvTST1 se efectuó sobre placas de agar 1/2MS, las cuales contenían o bien 50 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina o 40 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina.

50 Ejemplo 2: Determinación cuantitativa de azúcares en tejidos de la remolacha azucarera

55 Tejido de raíz pivotante de remolachas azucareras se cosechó con una cortadora de verduras, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó hasta la determinación cuantitativa de azúcar a -80 °C. Para la determinación el contenido de azúcar el tejido vegetal se machacó en nitrógeno líquido y 50 μg del tejido molido se extrajeron dos veces durante 20 minutos a 80 °C con etanol al 80%. Los sobrantes se reunieron y se concentraron por evaporación con una SpedVac (Firma Eppendorf, Hamburgo, DE). Los azúcares secos se disolvieron en agua y mediante un análisis enzimático acoplado a NADP se cuantificaron como se describe en un aparato lector de placas de micro-titulación (Bergmeyer, H. U. y Bernt, E. (1974) "Methods of Enzymatic Analysis", Vol. 3, Bergmeyer, H.U. editores, Editorial Chemie Nueva York, páginas 1176-117; Lee, Y.C. (1972) " α -Mannosidase, β -glucosidase, and β -galactosidase from sweet almond emulsion". *Methods Enzymol.* 28: 699-702).

60 Ejemplo 3: Análisis de expresión de gen

65 La acumulación relativa de mRNA se efectuó mediante análisis de transferencia Northern como se describe (Jung, B. et al. (2011) "Arabidopsis nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines".

Plant J. 65: 703-711). La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo como se describió anteriormente (Leroch M. et al. (2005) "Identification and characterization of a novel plastid adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*". J. Biol. Chem. 280: 17992-18000). Los cebadores específicos del gen que se usaron se enumeran en la tabla 1.

- 5 Tabla 1: Cebadores específicos del gen para la amplificación de las secuencias de nucleótido que codifican para BvTST1 y BvTST2.1 así como para la PCR cuantitativa para el análisis de expresión de los 4 genes TST parálogos de *Beta vulgaris*.

Designación	Secuencia de nucleótido	SEQ ID NO:
BvTST1 GWfw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTAATGAAGGGTGCTGTGCTT	15
BvTST1GW rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTA CTCCGCCTTAGCGGCTTC	16
BvTST2.1fw_XhoI	CTCGAGATGAGTGCAGCAGTATTAG	17
BvTST2.1 rev_XbaI	TCTAGAGTGGCTTGCTTGTCTTGCACC	18
qPCRfwTST1	GCTGTTGCTATGAGGCTCATGGA	19
qPCRrevTST1	CCTTAGCGGCTTCTAACTGTTTAGG	20
qPCRfwTST2.1	AAAGATGAACACCACTGTGTATG	21
qPCRrevTST2.1	GTCATCAGTGGCTTGCTTGTCTTG	22
qPCRfwTST2.2	AAAGATGAGCACTACTGTGCACG	23
qPCRrevTST2.2	TCAGTTGTCCTTGTCTTCAGAAGG	24
qPCRfwTST3	TCTACTTCTGCTGCTTTGTCATGG	25
qPCRrevTST3	TCAGCTTCAGCTTGCCTTGCA C	26
Bvef1 α _fw	CCACATTGCTGTCAAGTTTGTCTG	27
Bvef1 α _rev	TGGTAACCTTGGCACCGGTTG	28

- 10 Ejemplo 4: Aislamiento de vacuolas y membrana de tonoplasto de tejido de raíz pivotante

Los aislamientos de vacuolas se efectuaron de acuerdo con el procedimiento según Leigh y Branton (Leigh, R.A. and Branton, D. (1976). "Isolation of Vacuoles from Root Storage Tissue of *Beta vulgaris*", L. Plant Physiol. 58: 656-662) con las modificaciones siguientes: El tejido de raíz pivotante se cortó con el cuchillo de verduras en rebanadas de 0,1 a 0,2 mm de espesor, las cuales se incubaron inmediatamente en un medio colector (1 M de Sorbitol, 1 mM de DTT, 5 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCL, pH 7,6) a la temperatura ambiente. A continuación las rebanadas delgadas se desmenuzaron con una navaja de rasurar en el medio colector (1 M de Sorbitol, 1 mM de DTT, 5 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCL, pH 7,6), se filtraron a través de un tamiz de acero inoxidable (100 μ m de apertura de malla) y se sedimentaron mediante centrifugado (2,000 x g, 20 min. 4 °C). El sedimento se resuspendió en medio colector con 30% de Nycodenz (Axis-Shield GmbH, Heidelberg, DE) y se transfirió a tubitos de centrifugado de 17 ml (Beckmann UltraClear). En el siguiente centrifugado vibratorio (1,500 x g, 15 min., 8 °C) el Nycodenz formó un gradiente de densidad y las vacuolas flotaron sobre la fase superior del gradiente de densidad.

Las membranas de las vacuolas se aislaron como se describe en el estado de la técnica (Schulze W.X. et al. (2012) "Cold acclimation induces changes in Arabidopsis tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters", *Plant J.* 69: 529-541). La actividad de α -manosidasa en las vacuolas tratadas con ultrasonido se efectuó como se describió en otro punto (Boller, T. y Kendle, H. (1979) "Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells". *Plant Physiol.* 63: 1123-1132; Lee, Y.C. (1972) " α -Mannosidase, β -glucosidase, and β -galactosidase from sweet almond emulsion". *Methods Enzymol.* 28: 699-702).

- 30 Ejemplo 5: Cromatografía líquida y espectrometría de masa en tándem

Los sedimentos de las membranas de tonoplastos de plantas de 2 o 5 meses de edad se absorbieron en tampón (SDS al 4%, 50 mM de NH_4HCO_3) en una concentración de 1 μ g/ml). Las proteínas absorbidas se precipitaron durante la noche en acetona al 80% a 20 °C y se siguieron procesando como lo describe Mühlhaus (Mühlhaus, T. et al. (2011) "Quantitative shotgun proteomics using a uniform ^{15}N -labeled standard to monitor proteome dynamics in

time course experiments reveals new insights into the heat stress response of *Chlamydomonas reinhardtii*", Mol. Cell. Proteomics 10: M110 004739). Los péptidos extraídos se resuspendieron en 200 μ l de tampón (acetonitrilo al 2%, ácido acético al 0,4%).

5 Muestras de respectivamente 3 μ l de los péptidos extraídos se alimentaron a la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (Análisis LC-MS/MS). La separación cromatográfica se efectuó sobre una nanoAquity UPLC (Waters, Eschborn, DE) mediante una "Symmetry C18 trap column (tamaño de partícula 5 mm, dimensión de columna 180 μ m x 20 mm) y una columna BEH 130 C18 (tamaño de partícula 1,7 μ m, dimensión de columna 75 mm x 150 mm). Se lixivió con un gradiente doble, primero de 100% de tampón A (ácido acético al 0,4%, 2-propanol al 1%, acetonitrilo al 2%) a 40% de tampón B (ácido acético al 0,4%, 2-propanol al 1%, acetonitrilo al 90%) dentro de 2 o 3 horas, a continuación sobre 90% de tampón B dentro de 5 minutos y para finalizar 15 minutos con 90% de tampón B. Al final la columna se equilibró nuevamente durante 15 minutos con 100% de tampón A. El espectrómetro de masas LTQ XL-Orbitrap híbrido (ThermoScientific, Hamburgo DE) trabajo en el modo dependiente de datos con una ciclo de una exploración completa del espectro de masa 300 - 1550 m/z (Orbitrap) con una resolución ajustada de 60.000 a 400 m/z, seguido de siete exploraciones de MS² dependientes de datos sucesivas (LTQ) de los iones más intensivos. Los iones cargados individuales se excluyeron del análisis MS² y los iones de salida para el análisis MS² se pusieron durante 20 s en una lista de exclusión. Cada muestra se analizó tres veces.

20 Las proteínas se identificaron con la ayuda del software MaxQuant y de la máquina buscadora Andromeda (Cox, J. y Mann, M. (2008) "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification". Nat. Biotechnol. 26: 1367-72) en un banco de datos para proteínas de remolacha azucarera elaborado en la casa de uno de los inventores.

25 Ejemplo 6: Constructos de ácido nucleico

Se produjo DNA (cDNA) de *Beta vulgaris* complementario mediante transcripción inversa de RNA aislado de las raíces pivotantes u hojas. Todas las reacciones en cadena de polimerasa (PCR) se efectuaron con DNA polimerasa Phusion-HF (Thermo Scientific).

30 El constructo de fusión pUBQ:BvTST1-GFP se produjo con el uso del vector pUBC-GFP-Dest (Grefen et al. (2010) "A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies", Plant J. 64: 355-365). Para este propósito se amplificó el cDNA de BvTST1 y el codón de terminación se eliminó mediante PCR con el uso de los cebadores BvTST1 que contienen los sitios attB1 y attB2. El producto de la amplificación se clonó por vía de una reacción BP en pDONRZEO (Invitrogen, Heidelberg, DE), seguido de una reacción LR en pUBC-GFP-Dest.

35 El constructo pUBQ:BvTST2.1-GFP se produjo como sigue: Todo el marco de lectura abierto del gen BvTST2.1 se amplificó con los cebadores BvTST2.1fw_XhoI/BvTST2.1rev_XbaI. El producto de PCR obtenido se digirió con XhoI y XbaI y se ligó en el vector pUBC-cGFP-Dest (Grefen et al. (2010)) abierto con XhoI y SpeI. El constructo producido así contiene el gen bar que en las plantas transformadas conduce a una resistencia contra Basta. A continuación la secuencia de nucleótido completa que codifica para BvTST2.1-GFP se cortó con XhoI/PstI fuera de este constructo y se insertó en un vector pUBN-nYFP-Dest correspondientemente abierto con XhoI y PstI, el cual transmite una resistencia a la higromicina en las plantas transformadas. Una digestión de pUBN-nYFP-Dest con XhoI/PstI llevó a una eliminación completa de la secuencia nYFP y de las propiedades de "puerta de paso" de la proteína diana, de manera que este es adecuado para la transformación de los mutantes de doble gen knockout Attst1-2 mediante agrobacterias (Clough S.J., Bent, A.F. (1998) "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*". Plant J. 16: 735-743). Las secuencias de nucleótido de todos los constructos de gen se revisaron mediante análisis de secuencia.

50 Ejemplo 7: Investigaciones Patch-Clamp de vacuolas de plantas *Nicotiana benthamiana* transformadas

Para la sobreexpresión transitoria de las proteínas transportadoras de azúcar (BvTST1-GFP y BvTST2.1-GFP) en sus extremos terminales C con la proteína fluorescente verde (GFP) o solo con GFP bajo el control del promotor ubiquitina (pUBQ10) en células mesofilas de *N. benthamiana* se usó el procedimiento descrito por Latz et al. (2007) de la agroinfiltración en plantas de 5 a 7 semanas de edad (Latz et al. (2007) "In planta AKT2 subunits constitute a pH- and Ca²⁺-sensitive inward rectifying K⁺ channel", Planta, 225: 1179-1191). Discrepando del procedimiento descrito en el estado de la técnica se usó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* como soporte de la secuencia de nucleótido que codifica para el gen 19K así como para los constructos de proteína transportadora de azúcar/GFP correspondientes. Las bacterias se cultivaron durante la noche en 5 ml de medio YEB, se centrifugaron a 8.000 x g durante 1 minuto a la temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con Agromix (Latz et al. (2007)). las células bacterianas se resuspendieron en 3 ml de Agromix y se mantuvieron en la oscuridad durante 2 a 3 horas a 28 °C. Para la infiltración, 1 ml de la suspensión con las agrobacterias que contenían 19K se mezcló con 1 ml de la suspensión de agrobacterias que contienen pUBQ:BvTST1-GFP, pUBQ:BvTST2.1-GFP o pUBQ:GFP y se mezcló con 2 ml de Agromix.

65 Dos días después de la agroinfiltración se aislaron los protoplastos de las células mesofilas, sustancialmente como

se describe por Beyhl et al. (Beyhl, D. et al. (2009) "The fou2 mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium", *Plant j.* 58: 715-723). Tras la incubación enzimática de discos foliares durante 1 hora, los protoplastos liberados se lavaron con 500 mM de sorbitol y 1 mM de CaCl₂. Las vacuolas se liberaron de los protoplastos directamente en las cámaras de patch-clamp al ser expuestas a un cebador lisis con una capacidad osmótica de 280 mOsmol x kg⁻¹ (10 mM EGTA, 10 mM Hepes/Tris, pH 7,4; capacidad osmótica ajustada con D-sorbitol). Se midieron corrientes macroscópicas en la configuración "whole-vacuolar" (Beyhl, D. et al. (2009) "The fou2 mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium", *Plant j.* 58: 715-723); y se filtraron a 100Hz con filtro de paso bajo. El baño y la solución de la pipeta eran idénticas con relación a su formulación con excepción del pH (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 450-500 Osmol x kg⁻¹, ajustadas con D-sorbitol). El valor pH del baño se ajustó en 7,4 (Hepes/Tris) y el valor pH de la solución de la pipeta en 5,5 (Mes/Tris). Para medir un flujo de protones inducido por azúcar se aplicaron glucosa o sacarosa en el lado citoplasmático de la membrana vacuolar, en cada caso en una concentración final de 50 mM.

Ejemplo 8: Análisis del proteoma membranoso de las vacuolas de células de la raíz pivotante de la remolacha azucarera

Para analizar la dotación proteínica de la membrana vacuolar de las células de raíz pivotante de la remolacha azucarera se aislaron las vacuolas de las células de raíz pivotante de remolachas azucareras (*Beta vulgaris*) de cinco meses de edad de la variedad "Belladonna KWS" y la membrana vacuolar se concentró mediante centrifugado de alta velocidad. Las proteínas de membrana hidrófobas se precipitaron con acetona de la fracción de tonoplasto repetidamente lavada, a continuación se resuspendieron en una solución de urea (8 M urea) y se sometieron a una digestión triptica previamente al análisis LC-MS/MS.

En total se identificaron aproximadamente 400 proteínas diferentes en cada una de las preparaciones de tonoplasto concentradas. Una de estas proteínas, denominada a continuación *BvTST2.1* (SEQ ID NO.: 1), estuvo presente en gran cantidad en todas las preparaciones efectuadas independientemente una de otra, tenía la signatura de un transportador de azúcar ([LIVMSTAG]-[LIVMFSAG]-[SH])-(RDE)-[LIVMSA]-[DE]-[TD]-[LIVMFYWA]-G-R-[RK]-X(4.6)-[GSTA]; Prosite Pattern PS00216, <http://prosite.expasy.org/>) y tuvo la mayor similitud al transportador de monosacárido vacuolar TMT2 de *Arabidopsis thaliana* (Figura 1)

Ejemplo 9: Genes para proteínas transportadoras de azúcar tonoplastidarias en el genoma de la remolacha azucarera

Al reconocer el genoma de *B. vulgaris* fue posible identificar 4 genes paralogos que codifican para proteínas transportadoras de azúcar tonoplastidarias. El análisis filogenético (Figura 2) mostró que los transportadores de azúcar *BvTST1* y *BvTST3* son los más semejantes a los genes ortólogos *AtTMT1* y *AtTMT3* de *Arabidopsis*, en tanto que *BvTST2.1* y *BvTST2.2*, un par de genes muy similar, tienen la mayor similitud de secuencia al ortólogo *AtTMT2* de *Arabidopsis* (Figura 1). La secuencia de aminoácido de *BvTST2.1* coincide en aproximadamente 68% con la de *AtTMT2* y la similitud se encuentra en 84% (Figura 1).

Ejemplo 10: Localización subcelular de *BvTST2.1*

La localización subcelular de *BvTST2.1* se investigó en estabilidad con mutantes de doble gen knockout *Attst1-2* transformados con pUBQ:*BvTST2.1*-GFP.

El aislamiento de protoplastos de células mesófilas foliares y la liberación de vacuolas se efectuó de acuerdo con un procedimiento conocido (Yoo, S.D. et al (2007) "Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis", *Nat Protocol* 1565-1572).

Un microscopio de exploración láser confocal (Leica TCS, Leica Microsystems, Wetzlar, DE) se usó para las tomas microscópicas fluorescentes. Todas las tomas se hicieron con un objetivo Leica HCX PLAPO 63X/1.20w motCORR CS. El procesamiento de las imágenes se efectuó con el Kit de Aplicación Leica "Advanced Fluorescence Lite Software".

Tras la clonación del *BvTST2.1*mRNA completo se determinó la localización subcelular de la proteína expresando una proteína de fusión *BvTST2.1*-GFP estable en *Arabidopsis*. La fluorescencia verde que se observó en las células mesófilas foliares de mutantes de *Arabidopsis* que expresan estable *BvTST2.1*-GFP indicó que la proteína de fusión se localizaba en la membrana de las vacuolas que rodean estrechamente los cloroplastos.

Una digestión enzimática del tejido mesófilo de plantas que expresan *BvTST2.1*-GFP condujo a protoplastos intactos individuales. El siguiente tratamiento hiposomático de estos protoplastos llevó a la liberación de vacuolas estables de fosforescencia verde, mediante lo cual se confirmó la localización de *BvTST2.1*-GFP en el tonoplasto.

Ejemplo 11: Correlación de la expresión de *BvTST2.1* y la concentración de sacarosa en las raíces pivotantes de la remolacha azucarera

Para investigar sobre una posible correlación entre la expresión de *BvTST2.1* en las raíces pivotantes de la

remolacha azucarera y la concentración de sacarosa de la remolacha azucarera, se determinó la expresión del gen *BvTST2.1* en las variedades de remolacha azucarera “Belladonna KWS” y “Brigadier”.

La variedad “Belladonna KWS” es conocida como una variedad de remolacha azucarera que tiene una elevada concentración de sacarosa y ya a los dos meses de haber sido plantada tiene en las raíces pivotantes una concentración de sacarosa de aproximadamente $160 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ de peso fresco (Figura 3). Esta elevada concentración de sacarosa aumentó durante los siguientes tres meses de desarrollo alcanzó aproximadamente los $450 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ de peso fresco. Esto corresponde, con relación a las raíces pivotantes de dos meses de edad, un incremento del triple.

A diferencia de esto, las raíces pivotantes de la variedad “Brigadier” contenían menos de $70 \mu\text{mol}$ de sacarosa por peso fresco tras dos meses de crecimiento, y solamente acumularon aproximadamente $195 \mu\text{mol}$ de sacarosa por g de peso fresco en los tres meses siguientes (Figura 3).

En la comparación de la concentración de sacarosa en hojas y raíces pivotantes se pudo comprobar un contenido de sacarosa aproximadamente 30 veces más alto en las raíces pivotantes en comparación con las hojas, en tanto que la concentración de glucosa en las hojas se encontró por arriba del de las raíces pivotantes aproximadamente por el factor 80.

Las diferencias en la acumulación de sacarosa entre las diferentes variedades de remolachas azucareras también se reflejaron en la cantidad de los mRNA que codifican para *BvTST2.1* (Figura 4). Tanto en las raíces pivotantes de la variedad “Belladonna KWS” como también en la variedad “Brigadier” las cantidades de mRNA para todos los cuatro transportadores de azúcar parálogos eran bajas tras dos meses de crecimiento.

Después de otro mes de crecimiento y desarrollo, la cantidad de mRNA para *BvTST2.1* fue notablemente mayor en ambas variedades que las cantidades de mRNAs que codifican para *BvTMT1*, *BvTMT2.2* y *BvTMT3*. Además, la cantidad de mRNA *BvTST2.1* en las raíces pivotantes de la variedad “Belladonna KWS” fue aproximadamente 2,6 veces más alta que en las raíces pivotantes de la variedad “Brigadier” (Figura 4).

Durante otros dos meses de crecimiento no varió sustancialmente la cantidad de mRNA *BvTST2.1* en ambas variedades, en comparación con la cantidad después de 3 meses de crecimiento, de manera que también después de una fase de crecimiento y desarrollo de cinco meses la cantidad de mRNA para *BvTST2.1* en las raíces pivotantes de la variedad “Belladonna KWS” seguía siendo aproximadamente 2,6 veces más alta que en las raíces pivotantes de la variedad “Brigadier”.

Para obtener otras indicaciones sobre la importancia de la proteína *BvTST2.1* para el acopio de sacarosa se determinaron las concentraciones foliares de glucosa, fructosa y sacarosa en remolachas azucareras de tres y cinco meses de edad de la variedad “Belladonna KWS” (Figura 5), y se compararon con las cantidades de mRNA de los cuatro parálogos TST (Figura 6). A diferencia de las raíces pivotantes en las cuales el contenido de glucosa y fructosa fue muy bajo, estos dos monosacáridos se acumularon en las hojas. En las hojas de las remolachas azucareras de tres meses de edad, la concentración de glucosa y fructosa fue de entre 33 y $35 \mu\text{mol/g}$ de peso fresco, en tanto que la concentración de sacarosa se encontró por debajo de $15 \mu\text{mol/g}$ de peso fresco. Después de cinco meses de crecimiento, la concentración de cada uno de los tres azúcares fue de entre 6 y $9 \mu\text{mol/g}$ de peso fresco (Figura 5).

Fue notable que la cantidad de mRNA para *BvTST2.1* en las hojas fue sin excepción generalmente menor que la cantidad de mRNA para *BvTMT1*, *BvTMT2.2* y *BvTMT3*, en tanto que la cantidad de mRNA para *BvTST2.1* en la raíz pivotante siempre fue más alta que la cantidad de mRNA para las otras isoformas (Figura 6).

Ejemplo 12: Transporte tonoplastidario de sacarosa mediado por *BvTST2.1*

Para comprobar la función de transporte de *BvTST2.1* se usó la tecnología “Patch-Clamp” en vacuolas aisladas. Para este propósito se expresó transitoriamente una proteína de fusión *BvTST2.1*-GFP en células misófilas de *Nicotiana benthaminana*. Las vacuolas intactas de protoplastos transformados se pudieron identificar mediante su coloración verde tras una moderada lisis hipoosmótica.

Para reproducir el gradiente de protones fisiológico sobre el tonoplasto de las vacuolas aisladas, el medio que representa el contenido luminoso de la vacuola se reguló en la pipeta a un valor pH de 5,5, en tanto que el medio en la cámara (= baño), el cual representa el citosol, se ajustó en pH 7,5. Cuando se adicionó sacarosa al medio “citósólico” las vacuolas reaccionaron con una declinación del flujo de corriente dirigido fuertemente hacia abajo. La adición de sacarosa en el medio que rodea las vacuolas aisladas condujo a una corriente dirigida hacia dentro, que indica un antiporte de protones del transporte de sacarosa.

En ausencia de *BvTST2.1* las vacuolas aisladas de *N. benthaminana* no mostraron una actividad de transporte de sacarosa/protones importante. A diferencia de esto, la adición de sacarosa en el medio de la cámara en el caso de

vacuolas que comprenden *BvTST2.1* condujo a un flujo de corriente dirigido hacia dentro en una magnitud de casi -1 pA/pF (Figura 7). Estas corrientes representan la huella digital biológica de un importe de sacarosa impulsado por protones a través de la membrana vacuolar que contiene *BvTST2.1-GFP* y es una clara señal de que *BvTST2.1* acopla la exportación de protones a lo largo del gradiente de protones sobre la membrana con una importación de sacarosa contra el gradiente de sacarosa existente. La función mencionada al último es un requisito bioquímico indispensable para que la remolacha azucarera pueda acumular grandes cantidades de sacarosa en las vacuolas de sus raíces pivotantes.

Es digno de notar que *BvTST2.1* no hace posible una exportación de protones mediada por glucosa. A diferencia de *BvTST2.1*, la isoforma *BvTST1* media tanto un flujo de corriente condicionado por sacarosa como también un flujo de corriente condicionado por glucosa en el orden de magnitud de aproximadamente -03, pA/pF (Figura 7; tabla 2).

Tabla 2:

	Densidad de corriente [Δ I/Cm (pA/pF)]		Relación neta sac/gluc
	Sacarosa	Glucosa	
<i>BvTST1-GFP</i>	-0,28 \pm 0,06	-0,29 \pm 0,04	0,81
<i>BvTST2.1-GFP</i>	-1,03 \pm 0,29	-0,018 \pm 0,005	∞
<i>GFP</i> (control)	-0,11 \pm 0,04	-0,08 \pm 0,03	

Cambios inducidos por azúcar en la densidad de corriente de vacuolas individuales.

Estos datos aclaran la especificidad de *BvTST2.1* para sacarosa.

Ejemplo 13: Especificidad para sacarosa de *BvTST2.1 in vivo*

Para analizar la alta especificidad del sustrato de *BvTST2.1* en células vegetales vivas, los mutantes de doble gen knockout *AtTMT* que no tienen ninguna de las proteínas de transporte tonoplastidario de monosacáridos esenciales se transformaron o bien con un constructo *PUBQ:BvTST2.1-GFP* o un constructo *pUBQ: BvTST1*. Los transformados crecieron en presencia del tóxico análogo de glucosa 2-desoxiglucosa. En los ensayos de control sin 2-desoxiglucosa todas las líneas de plantas tuvieron un crecimiento comparable. En presencia de 2-desoxiglucosa los mutantes de doble gen knockout *tst1-2* no se desarrollaron correctamente, en tanto que las plantas de tipo salvaje y las líneas que expresaban *BvTST1* mostraron un crecimiento sustancialmente mejor. Las plantas de tipo salvaje y el mutante de doble gen knockout que expresa *BvTST1* crecieron mejor en presencia de 2-desoxiglucosa probablemente debido a que la 2-desoxiglucosa se pudo transportar al interior de las vacuolas para la desintoxicación. El mutante de doble gen knockout no tiene la capacidad para hacer esto. Aquellas plantas de doble gen knockout de gen que expresan *BvTST2.1* no pudieron compensar la detención de crecimiento del mutante de doble gen knockout *Atst1-2* en presencia de 2-desoxiglucosa a pesar de que la proteína de fusión *BvTST2.1-GFP* estaba presente en las membranas vacuolares.

La notable sensibilidad de las plantas *Atst1-2::BvTST2.1-GFP* frente a la 2-desoxiglucosa *in vivo* coincide con los datos electrofisiológicos y la especificidad para sacarosa de *BvTST2.1*, que se obtuvo en las vacuolas aisladas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KWS SAAT AG
Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Technische Universität Kaiserslautern
Universität zu Köln
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

<120> Proteínas antiporter de protones/azúcar tonoplastidarias y su uso para incrementar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de plantas

<130> KWS0218PCT

<150> DE102014005337
<151> 11-04-2014

<160> 28

<170> Patentin Versión 3.5

<210> 1
<211> 735

ES 2 778 273 T3

<212> PRT

<213> *Beta vulgaris*

<400> 1

5

```

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

```

ES 2 778 273 T3

Pro Ser Trp Arg Leu Met Leu Gly Ile Leu Phe Val Pro Ser Thr Val
 165 170 175
 Tyr Phe Leu Leu Thr Val Phe Phe Leu Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu
 180 185 190
 Val Ser Lys Gly Arg Met Asn Glu Ala Lys Lys Val Leu Gln Trp Leu
 195 200 205
 Arg Gly Arg Glu Asp Val Phe Ala Glu Met Ala Leu Leu Val Glu Gly
 210 215 220
 Leu Arg Val Gly Gly Asp Thr Ser Ile Glu Glu Tyr Leu Ile Glu Pro
 225 230 235 240
 Asp Ala Gly Leu Ala Glu Asp Gln Asp Pro Met Thr Val Lys Asp Gln
 245 250 255
 Val Arg Leu Tyr Gly Ser Glu Ala Gly Cys Ser Trp Val Ala Arg Pro
 260 265 270
 Val Thr Gly Gln Ser Met Leu Gly Ile Ala Ser Arg Gln Gly Ser Met
 275 280 285
 Gln Ser Pro Ser Val Pro Leu Met Asp Pro Leu Val Thr Leu Phe Gly
 290 295 300
 Ser Val His Glu Lys Leu Pro Glu Gln Gly Ser Met Leu Ser Val Ile
 305 310 315 320
 Phe Pro Thr Phe Gly Ser Met Phe Ser Met Gly Gly Lys Glu Pro Lys
 325 330 335
 Asn Glu Glu Trp Asp Asp Glu Asn Thr Ile Gly Asp Asp Asp Tyr
 340 345 350
 Gly His Asp Asp Glu Asp Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Glu Asp Asp Asn
 355 360 365
 Leu Arg Ser Ser Leu Ile Ser Arg Gln Asp Thr Gly Pro Asp Lys Ala
 370 375 380
 Met Val Ala Pro Thr Ser Gly Ser Met Phe Ser Met Lys His Ser Ser
 385 390 395 400
 Trp Leu Gln Gly Ser Glu Ala Ser Gly Ile Gly Gly Gly Trp Gln Leu
 405 410 415
 Ala Trp Lys Trp Ser Glu Arg Glu Gly Leu Asp Gly Thr Lys Glu Gly
 420 425 430

ES 2 778 273 T3

Gly Phe Lys Arg Leu Tyr Leu His Gln Glu Gly Asp Ala Gly Ser Lys
 435 440 445
 Arg Gly Ser Val Ile Ser Leu Ala Gly Gly Glu Val Ile Gly Asp Asn
 450 455 460
 Glu Tyr Val Lys Ala Ala Ala Leu Val Ser Gln Pro Ala Leu Tyr Ser
 465 470 475 480
 Arg Asp Phe Met Asp Arg Asp Ser Ile Gly Pro Ala Met Val His Pro
 485 490 495
 Ser Glu Ala Ser Ala Lys Arg Pro Ser Trp Arg Asp Phe Leu Glu Pro
 500 505 510
 Gly Val Arg Arg Ala Leu Val Val Gly Val Gly Leu Gln Leu Leu Gln
 515 520 525
 Gln Phe Ala Gly Ile Asn Gly Val Leu Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Leu
 530 535 540
 Glu Gln Ala Gly Val Gly Asp Leu Leu Ser His Met Gly Ile Gly Ala
 545 550 555 560
 Ser Ser Ala Leu Leu Leu Ile Ser Ala Leu Thr Thr Leu Leu Met Leu
 565 570 575
 Pro Ala Ile Ala Val Ala Met Arg Leu Met Asp Leu Ser Gly Arg Arg
 580 585 590
 Thr Leu Leu Leu Thr Thr Ile Pro Val Leu Phe Leu Ser Leu Val Val
 595 600 605
 Leu Ile Leu Ala Asn Val Ile Lys Met Asn Thr Thr Val Tyr Ala Val
 610 615 620
 Val Ser Thr Val Ala Val Val Leu Tyr Phe Cys Phe Phe Val Met Gly
 625 630 635 640
 Phe Gly Pro Ile Pro Asn Ile Leu Cys Ala Glu Ile Phe Pro Thr Lys
 645 650 655
 Ile Arg Gly Val Cys Ile Ala Ile Cys Ala Leu Thr Phe Trp Ile Cys
 660 665 670
 Asp Ile Ile Val Thr Tyr Thr Leu Pro Met Met Leu Lys Ala Val Gly
 675 680 685
 Leu Ala Gly Leu Phe Gly Phe Tyr Ala Val Val Ile Leu Ile Ala Trp
 690 695 700

ES 2 778 273 T3

Ile Phe Ile Phe Leu Lys Val Pro Glu Thr Lys Gly Met Pro Leu Glu
705 710 715 720

Val Ile Thr Glu Phe Phe Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Ser His
725 730 735

- 5
<210> 2
<211> 2208
<212> ADN
<213> *Beta vulgaris*

<400> 2

ES 2 778 273 T3

atgagtgcag cagtattagt tgcaattgct gcaacagttg gagatttgct gtatggatgg 60
 gataatgcta ctattgctgg ggctgtatta tatattaaga aagagttcaa cttggagagt 120
 tctccaacct tgggaagggtt aattgtggcc acatcaataa ttggagccac tcttattaca 180
 acatgttctg gaccgattgc agatcgtctt ggctcgtcgc ctatgatgat aatttcctca 240
 gtttgtttct ttgttagtgc ctttaataatg ttgtggcttc ccaatgttta tgttttactc 300
 ttcggtcggc tattagatgg atttggaagt ggtttggcag tcactcttgg tcctctttat 360
 atatcagaga ccgctccaac tgatataaga ggctcactga acacacttcc tcagtttact 420
 ggttctgggtg gaatgttccet cgcatactgc atggttttcg ggatgtcatt gatggaaaca 480
 cctagctgga gattaatgct tgggattctt tttgttccat ctactgttta ttttctatta 540
 actgtattct tcttacctga gtctcctcgc tggcttgta gcaaaggacg gatgaatgag 600
 gctaaaaagg ttcttcaatg gttgcgaggc aggggaagatg tctttgctga gatggctctc 660
 cttgttgagg gtcttagagt tggaggatg acatcaatag aggaatactt gattgagcca 720
 gatgctggac tcgctgagga tcaagatccg atgactgtca aagatcaggt taggctgtat 780
 gggtcgaag caggctgctc ctgggttgcc agaccagtca ctggtcagag tatgctgggt 840
 attgcatctc ggcaggggaag catgcagagt cctagtgttc ctttaatgga tccccttgta 900
 actctttttg gtagtgta ca tgaaaaagctt ccagaacaag gaagtatgct tagtgtcata 960
 ttcccaactt ttggtagtat gtttagtatg ggaggggaaag agcccaaaaa tgaagagtgg 1020
 gatgatgaaa atactattgg ggatgatgat gattatggctc atgacgatga agattatgca 1080
 ggtgatgctg atgaagatga caatttacgt agttcactta tatctcgtca ggatacaggt 1140
 ccagacaaag ccatggttgc tcctacttca ggtagcatgt tcagcatgaa gcatagtagt 1200
 tggttacaag gaagcgaagc tagtggattt ggtggtggtt ggcagttagc ttggaaatgg 1260
 agcgagagag aaggcttggg tggtagcgaag gaaggaggat tcaaaagact ttatctacat 1320
 caggaagggtg atgctggatc taaacgaggc tctgttattt ctcttgctgg tggtagggtt 1380
 attggcgaca atgagtatgt gaaggctgct gcaactagta gtcaacctgc cctttattcg 1440
 agggatttca tggatcggga tagtattggt ccagctatgg ttcacccttc cgaggcttct 1500
 gcaaaaaggc ctagttggag ggatttttta gagcctgggtg tcaggcgtgc attagttggt 1560
 ggtgtcggac ttcaacttct tcaacagttc gctgggataa atggcgttct gtattatact 1620

ES 2 778 273 T3

cctcaaatac tagagcaagc tgggggtgggt gatcttcttt cgcataatggg tataggcgct 1680
 tcctctgcat tgttactcat cagtgcactc acaactcttt tgatgcttcc tgctatagct 1740
 gttgcaatga ggcttatgga tctttctggg agaaggactt tgctactaac cacaattccg 1800
 gtgttgttct tategctcgt tgtcttaata ctcgcaaagtg tcataaagat gaacaccact 1860
 gtgtatgcag tggctctccac agtcgcgga gttctctact tctgcttctt tgtgatgggg 1920
 tttgggccta tcccaaatat cctatgtgca gaaattttcc caaccaagat tcgtggagtc 1980
 tgtattgcta tttgtgcact tactttctgg atctgtgata tcatagtcac ctacacactc 2040
 cctatgatgc ttaaagctgt tggacttget ggtctctttg gcttctatgc tgttgtgatt 2100
 ttaattgcat ggatatttat atttttgaag gttctgaaa ccaagggcat gcccttgag 2160
 gtaatcactg agttctttgc tctcgggtgca agacaagcaa gccactga 2208

<210> 3
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> *Beta vulgaris*
 <400> 3

5

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

10

ES 2 778 273 T3

Trp Arg Ile Met Leu Gly Val Leu Gly Ile Pro Ser Val Phe Tyr Leu
 165 170 175
 Leu Phe Ala Phe Phe Tyr Leu Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Val Ser
 180 185 190
 Lys Gly Arg Met Ser Glu Ala Lys Lys Val Leu Lys Arg Leu Arg Gly
 195 200 205
 Thr Glu Asp Val Ser Gly Glu Leu Ser Leu Leu Val Glu Gly Leu Gly
 210 215 220
 Val Gly Gly Glu Thr Ser Ile Glu Glu Tyr Ile Val Glu Pro Ala Glu
 225 230 235 240
 Glu Leu Ala Gly Gly Thr Glu Lys Gly Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ala
 245 250 255
 Ala Glu Gly Leu Ser Trp Ile Ala Lys Pro Val Thr Gly Gln Ser Ala
 260 265 270
 Val Gly Leu Val Ser Arg His Gly Ser Met Val Gly Leu Val Asp Pro
 275 280 285
 Leu Val Thr Leu Phe Gly Ser Val His Glu Lys Leu Pro Glu Gln Gly
 290 295 300
 Asn Met Arg Ser Ala Leu Phe Pro Ser Ile Gly Ser Met Leu Ser Thr
 305 310 315 320
 Ala Asp Ala His Val His Arg Asp Gln Trp Asp Glu Glu Asn Gln Asp
 325 330 335
 Val Asp Glu Asp Asp Glu Pro Ile Ala Asp Pro Ala Gly Gly Glu Asp
 340 345 350
 Phe Asp Asp Asn Asp Leu His Ala Pro Leu Ile Ser Arg Gln Thr Thr
 355 360 365
 Ser Met Glu Lys Asp Met Gly Leu Pro Pro Val Ser His Gly Thr Val
 370 375 380
 Met Ser Met Gly Tyr His Gly Ser Leu Phe Gln Gly Ala Gly Glu Thr
 385 390 395 400
 Ile Thr Thr Thr Gly Ile Gly Gly Gly Trp Gln Leu Ala Trp Thr Leu
 405 410 415
 Asp Glu Lys Glu Ala Glu Asp Gly Lys Lys Ser Lys Asp Phe Lys Arg
 420 425 430 435

ES 2 778 273 T3

Ile Tyr Leu His Gln Asp Gly Gly Pro Ala Ser Met Arg Gly Ser Leu
435 440 445

Leu Ser Leu Pro Gly Gly Asp Phe Pro Gly Asp Gly Asp Cys Val Gln
450 455 460

Ala Ser Ala Leu Val Ser Asn Pro Ala Leu Tyr Ser Lys Glu Val Leu
465 470 475 480

Gly Gln Ser Pro Ile Gly Pro Ala Met Val His Pro Ala Glu Ile Ala
485 490 495

Ser Gln Gly Pro Thr Trp Lys Ala Leu Leu Asp Pro Gly Val Lys Arg
500 505 510

Ala Leu Ile Val Gly Val Gly Ile Gln Met Leu Gln Gln Phe Ala Gly
515 520 525

Ile Asn Gly Val Leu Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Leu Glu Glu Ala Gly
530 535 540

Val Glu Val Leu Leu Ser Asp Leu Gly Ile Ser Ser Thr Ser Ala Ser
545 550 555 560

Phe Leu Ile Ser Ala Leu Thr Thr Phe Leu Met Leu Pro Cys Ile Ala
565 570 575

Val Ala Met Arg Leu Met Asp Ile Ser Gly Arg Arg Ser Leu Leu Leu
580 585 590

Ala Thr Ile Pro Val Leu Ile Ala Ser Leu Val Ile Leu Val Ile Ser
595 600 605

Cys Thr Val Ser Met Gly Ser Val Ile His Ala Val Ile Ser Ile Ile
610 615 620

Cys Val Ile Val Tyr Phe Cys Thr Phe Val Met Ala Tyr Gly Pro Ile
625 630 635 640

Pro Asn Ile Leu Cys Ser Glu Ile Phe Pro Thr Arg Val Arg Gly Val
645 650 655

Cys Ile Ala Ile Cys Gly Leu Val Phe Trp Ile Cys Asp Ile Ile Val
660 665 670

Thr Tyr Ser Leu Pro Val Met Leu Asn Ser Ile Gly Leu Gly Gly Ile
675 680 685

Phe Ala Ile Tyr Ala Val Val Cys Val Ile Ser Leu Val Phe Val Tyr
690 695 700

ES 2 778 273 T3

Leu Lys Val Pro Glu Thr Lys Gly Met Pro Leu Glu Val Ile Thr Glu
705 710 715 720

Phe Phe Ser Val Asp Pro Lys Gln Leu Glu Ala Ala Lys Ala Glu
725 730 735

- <210> 4
- <211> 2208
- 5 <212> ADN
- <213> *Beta vulgaris*

- <400> 4

ES 2 778 273 T3

atgaagggtg ctgtgcttgt ggctttggct gctacaattg gtaattttct acagggttgg	60
gacaatgcaa caattgctgg gtctattctc tacatcaaga aagaacttga actatccacc	120
gccatggagg gacttgtcgt ggcaatgtca cttattggag ctacggttat cacaacgtgc	180
tcgggggccg tatcagatgc tgttggtcga cgtcctttgc tgatgctctc ggccctactc	240
tactttattg gcagtttggg gatgttatgg tcacctaatg tctatatttt gcttttagcc	300
aggttgttgg atggttttgg aatagggctg gctgtgacct ttgttctgt ttatatatca	360
gagacttccc ctccagagat taggggatta ctaaatacac ttcctcaatt cactggctct	420
ggtggaatgt tcttatcata ctgcatgac tttggaatgt cactcatggc atctcctagc	480
tggagaataa tgcttgggtg tcttgggac ccttctgttt tttatctttt atttgcattc	540
ttctacttgc ctgaatcccc gcggtggctt gtgagcaaag gaaggatgtc tgaagcaaag	600
aaggttttga aaagattacg tggcactgaa gatgtctcag gtgaattgtc tttgctagtt	660
gaagggcttg gtgtcggggg tgaaacttca atagaagagt acattgtaga accagcagaa	720
gagctagcag gtggtactga gaaaggcaaa gtaaagctat acggagcagc agaaggcctt	780
tcttggattg caaaacctgt cactggacag agtgctgttg gtcttgtatc ccgtcatgga	840
agcatggtgg gcctagtga tctctctgtg actctgtttg gaagcgtcca tgaaaagctt	900
cctgaacaag gaaacatgag aagtgcgctt tccccagta ttggcagcat gttaagcacg	960
gcagatgctc atgttcacag agatcaatgg gatgaagaaa accaggatgt tgatgaagac	1020
gatgagccaa tcgctgatcc tgcaggaggg gaggattttg atgataatga cttgcatgct	1080
ccattgattt cacgtcaaac aacaagcatg gagaaagaca tgggtcttcc tctgtctct	1140
catggtactg ttatgagcat gggataccat ggcagtcttt ttcaagggtc tggggaaact	1200
attactacta caggaattgg cgggtggttg caattggcgt ggactttaga tgagaaagaa	1260
gctgaagatg gaaagaaatc taaagacttc aaaaggattt acttgcata ggatggcggg	1320
ccggcttcta tgcgtggatc acttctatca cttcctgggt gtgatttccc tggagatgga	1380
gattgtgttc aggcttctgc tcttgaagt aatcctgcac tttattcgaa ggaggttctg	1440
ggtcaaagtc ctattggtcc tgcgatggtt catccagctg aaattgcttc ccaaggacca	1500
acctggaagg ctctccttga tccaggagtc aagcgtgcat tgattgttgg agttggaatt	1560
cagatgcttc aacagttcgc tggataaat ggcgttctct actatacccc acaaattcta	1620

gaagaggcag gagtagaagt tcttctatct gatctagggga tcagctctac atctgcctca 1680
 tttcttatca gtgcattaac gaccttctta atgctgcctt gtatcgctgt tgctatgagg 1740
 ctcatggata tctctggtag aaggctactg ttgcttgcta caattcctgt gttgatcgcc 1800
 tcattggtta tcttagtaat cagctgcact gttagcatgg gtagtgtaat tcatgctgtc 1860
 atctcaatca tctgtgttat tgtctacttc tgcacatttg ttatggctta cggaccata 1920
 ccgaatattt tatgttccga gatcttccct actcgagtcc gtgggtgttg tattgctata 1980
 tgtggcttgg ttttctggat atgcgacatt attgtcactt actccttgcc cgtcatgctc 2040
 aattctattg gtttgggagg catcttcgca atatatgctg tggtttgtgt catctctttg 2100
 gtgtttgtct acctcaaagt cccagaaaca aagggtatgc ccttagaagt tatcacagag 2160
 ttcttttcag ttgatcctaa acagttagaa gccgctaagg cggagtag 2208

<210> 5
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> *Beta vulgaris*
 <400> 5

5

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

10

ES 2 778 273 T3

Pro Ser Trp Arg Leu Met Leu Gly Ile Leu Val Val Pro Ser Ala Leu
 165 170 175
 Tyr Phe Ala Leu Thr Val Phe Phe Leu Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu
 180 185 190
 Val Ser Lys Gly Arg Met Asn Glu Ala Lys Lys Val Leu Gln Arg Leu
 195 200 205
 Arg Gly Arg Glu Asp Val Ser Ala Glu Met Ala Leu Leu Val Glu Gly
 210 215 220
 Leu Gly Val Gly Gly Asp Ile Ser Ile Glu Glu Tyr Leu Ile Glu Pro
 225 230 235 240
 Asp Val Gly Ile Ser Glu Glu Tyr Asp Pro Met Ala Ala Lys Asp Gln
 245 250 255
 Ile Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gly His Ser Trp Val Ala Arg Pro
 260 265 270
 Val Thr Gly Gln Ser Met Leu Gly Leu Ala Ser Arg Gln Gly Ser Ile
 275 280 285
 Gln Asn Pro Ser Val Pro Leu Met Asp Pro Leu Val Thr Leu Phe Gly
 290 295 300
 Ser Val His Glu Lys Leu Pro Glu Gln Gly Ser Met Arg Ser Ile Ile
 305 310 315 320
 Phe Pro Thr Phe Gly Ser Met Phe Ser Met Gly Gly Lys Asp Pro Arg
 325 330 335
 Asn Glu Glu Trp Asp Glu Glu Asn Leu His Gly Asp Asp Asp Tyr
 340 345 350
 Ala His Asn Asp Asp Asp Asn Asp Asp Tyr Ala Glu Asp Asp Asp Asn
 355 360 365
 Leu His Ser Pro Leu Ile Ser Arg Gln Ala Thr Gly Thr Asp Lys Ala
 370 375 380
 Met Val Ala Pro Val Ser Gly Ser Met Phe Ser Met Lys Pro Ser Gly
 385 390 395 400
 Leu Ile Gln Gly Thr Glu Ala Ser Gly Ile Gly Gly Gly Trp Gln Leu
 405 410 415
 Ala Trp Gln Trp Ser Glu Lys Glu Gly Ala Asp Gly Arg Lys Glu Gly
 420 425 430

ES 2 778 273 T3

Gly Phe Lys Arg Leu Tyr Leu His Gln Glu Gly Asp Met Val Ser Lys
 435 440 445
 Arg Gly Ser Val Ile Ser Leu Pro Gly Gly Asp Val Thr Gly Glu Thr
 450 455 460
 Glu Tyr Met Lys Ala Ala Ala Leu Val Ser Gln Pro Ala Leu Tyr Ser
 465 470 475 480
 Arg Glu Leu Met Asn Gln His Thr Ile Gly Pro Ala Met Val His Pro
 485 490 495
 Ser Glu Thr Ala Ala Lys Gly Ser Ser Trp Arg Asp Leu Leu Glu Pro
 500 505 510
 Gly Val Arg Arg Ala Leu Ile Val Gly Val Gly Leu Gln Leu Leu Gln
 515 520 525
 Gln Phe Ser Gly Ile Asn Gly Val Leu Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Leu
 530 535 540
 Glu Gln Ala Gly Val Gly Asp Leu Leu Ser Asn Met Gly Ile Gly Ala
 545 550 555 560
 Ser Ser Ala Ser Leu Leu Ile Ser Ala Leu Thr Thr Leu Leu Met Leu
 565 570 575
 Pro Ser Ile Ala Val Ala Met Arg Leu Met Asp Ile Ser Gly Arg Arg
 580 585 590
 Thr Leu Leu Leu Thr Thr Ile Pro Val Leu Phe Leu Ser Leu Val Val
 595 600 605
 Leu Ile Leu Gly Asn Ile Ile Lys Met Ser Thr Thr Val His Ala Val
 610 615 620
 Ile Ser Thr Val Ser Val Val Leu Tyr Phe Cys Phe Phe Val Met Gly
 625 630 635 640
 Phe Gly Pro Ile Pro Asn Ile Leu Cys Ala Glu Ile Phe Pro Thr Arg
 645 650 655
 Ile Arg Gly Val Cys Ile Ala Ile Cys Ala Leu Thr Phe Trp Ile Gly
 660 665 670
 Asp Ile Ile Val Thr Asp Thr Leu Pro Ile Met Leu Asn Ala Val Gly
 675 680 685
 Leu Ala Gly Val Phe Gly Phe Tyr Ala Val Val Ser Val Ile Ala Trp
 690 695 700

ES 2 778 273 T3

Ile Phe Ile Phe Leu Lys Val Pro Glu Thr Lys Gly Met Pro Leu Glu
705 710 715 720

Val Ile Thr Glu Phe Phe Ala Leu Gly Ala Arg Gln Pro Ser Glu Asp
725 730 735

Lys Asp Asn

- <210> 6
- <211> 2220
- 5 <212> ADN
- <213> *Beta vulgaris*
- <400> 6

ES 2 778 273 T3

atgagtggag cggtattagt tgcaattgct gcggcagttg ggaatttact acaaggatgg 60
 gataatgcta ctattgctgg ggctgtggtg tatattaaga aagaattcaa cttggagggc 120
 gcgccaacca tgggaaggctt aattgtggcc atgtcactta ttggagccac tattatcaca 180
 acatgctctg gaccagtttc agatcgcttt gggcgtcgcc ctatgatgat aatctcctct 240
 atatgtttct ttttagtgc cctaataatg ttgtggtctc ccaatgttta tgcctactc 300
 ttgggtcgat tattagatgg atttggaagt ggtttggtctg tcaactcttgt tctctttat 360
 atatcagaga cagctccaac tgatataagg ggttcattga atacacttcc tcaatttact 420
 ggttcgggtg gaatgtttgt tgcgtactgt atggtgtttg ggatgtcttt aatggaaaaa 480
 cctagctgga gattgatgct tgggattcct gttgttccat ctgctcttta ttttgatta 540
 actgtattct tcttaccgga gtctcctcga tggcttgta gtaaaggacg aatgaatgag 600
 gccaaaaagg ttcttcaacg attgcggggc agggaagatg tctctgctga gatggctctg 660
 cttgttgagg gtcttggagt tggaggtgac atatcaatag aagaatactt aattgagcca 720
 gatgttggca tcagcgagga atatgatccg atggctgcca aagatcagat taaattatat 780
 gggtcagatg caggccactc ttgggttgcc agaccagtca ccggccagag tatgctgggc 840
 cttgcatctc gtcagggaaag cattcagaac cctagtgttc ccttaatgga ccccctggtc 900
 acgcttttcg gtagtgta ca tgagaagctt ccagaacaag gaagcatgcg aagtattatt 960
 ttcccgaactt ttggtagtat gtttagtatg ggaggcaaag accctagaaa tgaagagtgg 1020
 gatgaggaga atcttcatgg ggatgatgat gattatgccc ataatgatga tgacaatgat 1080
 gattatgctg aagatgatga caatttacat agtccactta tatctcgtca ggctacaggt 1140
 acagacaaag ctatggttgc tccagtttca ggtagcatgt tcagcatgaa acctagtggg 1200
 ttaatacaag gaactgaagc tagtggaaatt ggtggtggtt ggcagctggc ttggcaatgg 1260
 agtgagaaag aaggtgcaga tgggaggaag gagggaggat tcaaaagact ttacttacat 1320
 caggaaggtg atatggtatc taaacgagga tctgtaactc ctcttcctgg cggatgatgt 1380
 actggagaga cagagtatat gaaggctgct gcactagtga gtcaacctgc cctctattcg 1440
 agggagtga tgaatcagca tactattgga ccagctatgg ttcactcttc tgagactgct 1500

ES 2 778 273 T3

gcaaaagggg ctagctggag ggacctttta gaacctgggt tcaggcgtgc attgattggt 1560
 ggtgtcgggc tccaacttct tcagcagttt tctgggataa atggggttct gtattacact 1620
 cctcaaatac tagagcaagc tggggtttgg gatcttcttt caaacatggg tattggcgct 1680
 tcctctgcat cattgctcat cagtgcactc acaactcttt tgatgcttcc ttccatagct 1740
 gttgcaatga ggcttatgga tatttccggg aggaggactt tgctgcttac cacaattccg 1800
 gtgttgttcc tttcgctcgt cgtcctaata ctcggaaata tcataaagat gagcactact 1860
 gtgcacgcag tgatctcaac agtctccgta gttctctact tctgcttctt tgtgatgggc 1920
 tttggcccaa tcccaaatat cctatgcgcg gaaattttcc caaccaggat tcgtgggtgct 1980
 tgcattgcta tttgtgact taccttttgg atcggagata ttatagttac tgacacactt 2040
 cctataatgc tcaatgctgt tggacttgct ggtgtctttg gcttctatgc tgtcgttagt 2100
 gtaattgctt ggatttttat ctttctaaag gttcccgaag ccaagggcat gcctctcgag 2160
 gtcattactg agttctttgc tctcggggca agacaacctt ctgaagacaa ggacaactga 2220

<210> 7
 <211> 728
 <212> PRT
 <213> *Beta vulgaris*
 <400> 7

5

ES 2 778 273 T3

Met Arg Gly Ala Val Phe Ala Ala Leu Ala Ala Thr Met Gly Asn Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Trp Asp Asn Ala Thr Ile Ala Gly Ala Val Ile Tyr Ile
 20 25 30

Lys Arg Glu Phe Ser Leu Glu Thr Gln Pro Thr Leu Glu Gly Leu Ile
 35 40 45

Val Ala Met Ser Leu Ile Gly Ala Thr Val Ile Thr Thr Phe Ser Gly
 50 55 60

Pro Val Ser Asp Ser Val Gly Arg Arg Pro Met Leu Ile Ile Ser Ser
 65 70 75 80

Ile Leu Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Val Met Leu Trp Ser Pro Asn Val
 85 90 95

Tyr Val Leu Leu Leu Gly Arg Leu Leu Asp Gly Phe Gly Val Gly Leu
 100 105 110

Ala Val Thr Leu Val Pro Val Tyr Ile Ser Glu Thr Ala Pro Pro Glu
 115 120 125

Ile Arg Gly Gln Leu Asn Thr Leu Pro Gln Phe Thr Gly Ser Gly Gly
 130 135 140

ES 2 778 273 T3

Met Phe Leu Ser Tyr Cys Met Val Phe Gly Met Ser Leu Met Glu Ala
 145 150 155 160

Pro Arg Trp Arg Leu Met Leu Gly Val Ile Ser Ile Pro Ser Leu Leu
 165 170 175

Tyr Leu Gly Leu Met Val Phe Tyr Leu Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu
 180 185 190

Val Ser Lys Gly Lys Met His Glu Ala Lys Lys Val Leu Gln Lys Leu
 195 200 205

Arg Gly Arg Glu Asp Val Thr Gly Glu Met Ala Leu Leu Ile Glu Gly
 210 215 220

Leu Gly Thr Gly Lys Asn Thr Ser Ile Glu Glu Tyr Val Ile Gly Pro
 225 230 235 240

Ala Asn Asp Glu Glu Ala Thr Thr Asp Lys Asp Gln Ile Lys Leu Tyr
 245 250 255

Gly Ala Glu Gln Gly Gln Ser Trp Ile Ala Lys Pro Val Arg Gly Gln
 260 265 270

Ser Thr Leu Gly Met Val Ser Arg Tyr Gly Ser Met Ala Gln Gln Gly
 275 280 285

Ser Met Ala Asn Met Met Asp Pro Leu Val Thr Leu Phe Gly Ser Val
 290 295 300

His Glu Lys Leu Pro Gln Ser Gly Ser Met Arg Ser Ala Ile Phe Pro
 305 310 315 320

Asn Phe Gly Ser Met Phe Ser Thr Ala Ala Asp Asp His Val Lys His
 325 330 335

Val Asn Trp Glu Val Glu Ser Arg Asp Glu Asp Ser Ser Ser Asp Val
 340 345 350

Gly His Asp Asp Ser Asp Asp Asn Leu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Pro
 355 360 365

His Ala Pro Gly Ala Glu Lys Asp Ala Val Pro Pro Leu Asn Gly Asn
 370 375 380

Ser Met Leu Met Gln Ser Gly Glu Leu Val Asn Ser Thr Gly Ile Gly
 385 390 395 400

Gly Gly Trp Gln Leu Ala Tyr Lys Lys Ala Glu Asp Gly Gly Glu Leu
 405 410 415

ES 2 778 273 T3

Lys Arg Val Tyr Leu His Gln Glu Pro Gly Met Gly Ser Met Arg Gly
 420 425 430
 Ser Met Arg Gly Ser Met Arg Gly Ser Val Leu Ser Leu His Pro Ser
 435 440 445
 Asp Ile Pro Glu Gly Gln Leu Val Pro Ala Ala Gly Leu Val Ser Gln
 450 455 460
 Ser Thr Leu Gln Ile Lys Asp Phe Lys Gly Glu Ser Pro Phe Glu Gly
 465 470 475 480
 Gly Asp Ile Arg Pro Ser Ala Ala Ala Thr Lys Gly Pro Ser Trp Arg
 485 490 495
 Glu Leu Leu Glu Pro Gly Val Lys Arg Ala Leu Leu Val Gly Met Gly
 500 505 510
 Met Gln Ile Leu Gln Gln Phe Ser Gly Ile Asn Gly Val Leu Tyr Tyr
 515 520 525
 Thr Pro Gln Ile Leu Ser Gln Ala Gly Val Asp Val Leu Leu Ser Glu
 530 535 540
 Leu Gly Ile Gly Ser Asp Ser Ala Ser Leu Leu Ile Ser Gly Leu Thr
 545 550 555 560
 Thr Leu Leu Met Leu Pro Ser Ile Gly Leu Ala Met Arg Leu Met Asp
 565 570 575
 Ile Ser Gly Arg Arg Phe Leu Leu Leu Asn Thr Leu Pro Val Leu Ile
 580 585 590
 Gly Ser Leu Ile Ile Leu Val Leu Ser Asn Val Ile Glu Met Gly Thr
 595 600 605
 Val Leu His Ala Thr Leu Ser Thr Ile Ser Val Val Val Tyr Phe Cys
 610 615 620
 Cys Phe Val Met Gly Phe Gly Pro Ile Pro Asn Ile Leu Cys Ser Glu
 625 630 635 640
 Ile Phe Pro Thr Arg Val Arg Gly Leu Cys Ile Ala Ile Cys Ser Leu
 645 650 655
 Thr Phe Trp Phe Gly Asp Ile Ile Val Thr Tyr Ser Leu Pro Ala Leu
 660 665 670
 Leu Ser Ser Ile Gly Leu Ala Gly Val Phe Gly Ile Tyr Ala Val Val
 675 680 685

ES 2 778 273 T3

Cys Ile Val Ser Trp Phe Phe Val Tyr Phe Met Val Pro Glu Thr Lys
690 695 700

Gly Met Pro Leu Glu Val Ile Ser Glu Phe Phe Asn Val Gly Ala Arg
705 710 715 720

Gln Ala Glu Ala Glu Lys Asn Met
725

- <210> 8
- <211> 2187
- <212> ADN
- <213> *Beta vulgaris*
- <400> 8

ES 2 778 273 T3

atgagaggag ctgtatattgc agcacttgct gccacaatgg gtaacttggt gcaagggtagg 60
 gataatgcca ccatagcagg agctgttata tacatcaaga ggggaattcag cctcgaaca 120
 caaccaacct tggaggggct aattgtggcc atgtcgctta ttggggccac agtgatcaca 180
 accttctcag gtcccgtttc agattcagtt gggcgctgct caatgctaata catctcatca 240
 atattatact ttcttggtgg cttgggtatg ctatggcttc ctaatgtata tgtcttgctc 300
 ttgggaaggc ttttggtggg ttttggtggt ggtctagcag ttactcttgt gccagtatat 360
 atatcagaga ctgcaccccc agaaatcaga ggacagttga atacctccc acagttcact 420
 ggctcaggag ggatgttctt gtcttactgt atggatattg gcatgtcttt gatggaagca 480
 cctagatgga gattgatgct cgggtgttatt tcaatcccgt cacttttgta tcttgattg 540
 atgggtgttt atttgcctga gtctcctagg tggctcgca gcaaaggaaa gatgcatgag 600
 gctaagaaag tcttacaana attgctcggc agggaagatg tcaactggta gatggcattg 660
 cttatagaag ggcttggaac tgggaaaaat acatccatcg aagagtatgt gataggccca 720
 gcaaatgatg aagaagccac cacagataaa gatcaaatca agctatatgg tgctgagcaa 780
 ggccaatctt ggatagccaa accagtcaga ggtcaaagca cgcttggcat ggtttctcgt 840
 tatggaagca tggctcagca ggggaagtat gcaaacatga tggatcctct cgtcactttg 900
 tttggtagtg ttcatgaaaa gcttcccaaa tcagggagca tgcggagtgc aatattccct 960
 aactttggga gcatgttcag tactgctgct gatgaccatg ttaaactatgt aaattgggag 1020
 gtggagagcc gagatgagga ctctcatct gatgttggcc atgatgactc tgatgataat 1080
 ctgaggagt cactgctttc acctcatgcc cctggagcag aaaaggatgc agttcctcca 1140
 ttaaattggca acagcatgct gatgcaaagt ggtgaattag tcaatagtac aggtataggt 1200
 ggaggttggc agttagcgta caagaaagca gaagatgggt gtgaaactaaa aagggtttat 1260
 ctccatcaag aaccaggaat ggggtctatg cgtggatcta tgcgtgggtc tatgctggg 1320
 tctgtccttt cactgcatcc ttctgatatt cctgaaggct agcttgttcc agctgctggt 1380
 cttgtaagcc agtccaccct tcaaatcaag gatttcaagg gagaatctcc ttttgaggg 1440
 ggtgatatac gaccttctgc agctgctaca aaaggccaa gctggagaga gcttctttaa 1500

ccagggggtta agcgtgcatt gttggttgga atgggaatgc agatacttca acagttctct 1560
 gggatcaatg gagttctcta ctacaccctt caaattcttt cacaagcagg agtggacgtt 1620
 ctctatcag aattagggat tggttcagac tccgcttctc ttcttataag tggtttgacg 1680
 acattggtga tgcttcttag cataggcctt gcaatgaggc tgatggatat ctctgggaga 1740
 aggtttcttt tactaaacac acttcccgtc ttgataggat ctctcattat acttgtactt 1800
 tccaatgta tcgagatggg aaccgtctta cacgcgacat tatctactat cagtgttgta 1860
 gtctacttct gctgctttgt catgggtttt ggccccattc caaatatcct ctgctctgaa 1920
 atcttcccta ctcggtgccg tggcctttgc attgccatat gttctcttac cttctggttt 1980
 ggagatatca ttgtcacgta ctctctccca gctttgctct cctctatagg gctcgccgga 2040
 gtatttgcca tctatgccgt ggtttgcatc gtctcttggg tctttgttta tttcatggta 2100
 cctgaaacaa agggcatgcc ccttgaagtt atcagtgagt tcttcaatgt gggtgcaagg 2160
 caagctgaag ctgagaaaaa tatgtga 2187

<210> 9
 <211> 734
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 9

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

10

ES 2 778 273 T3

Leu Ser Tyr Cys Met Val Phe Thr Met Ser Leu Ser Asp Ser Pro Ser
 145 150 155 160
 Trp Arg Ala Met Leu Gly Val Leu Ser Ile Pro Ser Leu Leu Tyr Leu
 165 170 175
 Phe Leu Thr Val Phe Tyr Leu Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Val Ser
 180 185 190
 Lys Gly Arg Met Asp Glu Ala Lys Arg Val Leu Gln Gln Leu Cys Gly
 195 200 205
 Arg Glu Asp Val Thr Asp Glu Met Ala Leu Leu Val Glu Gly Leu Asp
 210 215 220
 Ile Gly Gly Glu Lys Thr Met Glu Asp Leu Leu Val Thr Leu Glu Asp
 225 230 235 240
 His Glu Gly Asp Asp Thr Leu Glu Thr Val Asp Glu Asp Gly Gln Met
 245 250 255
 Arg Leu Tyr Gly Thr His Glu Asn Gln Ser Tyr Leu Ala Arg Pro Val
 260 265 270
 Pro Glu Gln Asn Ser Ser Leu Gly Leu Arg Ser Arg His Gly Ser Leu
 275 280 285
 Ala Asn Gln Ser Met Ile Leu Lys Asp Pro Leu Val Asn Leu Phe Gly
 290 295 300
 Ser Leu His Glu Lys Met Pro Glu Ala Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly
 305 310 315 320
 Ile Phe Pro His Phe Gly Ser Met Phe Ser Thr Thr Ala Asp Ala Pro
 325 330 335
 His Gly Lys Pro Ala His Trp Glu Lys Asp Ile Glu Ser His Tyr Asn
 340 345 350
 Lys Asp Asn Asp Asp Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Ala Gly Asp Asp Asp
 355 360 365
 Asp Ser Asp Asn Asp Leu Arg Ser Pro Leu Met Ser Arg Gln Thr Thr
 370 375 380
 Ser Met Asp Lys Asp Met Ile Pro His Pro Thr Ser Gly Ser Thr Leu
 385 390 395 400
 Ser Met Arg Arg His Ser Thr Leu Met Gln Gly Asn Gly Glu Ser Ser
 405 410 415

ES 2 778 273 T3

Met Gly Ile Gly Gly Gly Trp His Met Gly Tyr Arg Tyr Glu Asn Asp
 420 425 430

Glu Tyr Lys Arg Tyr Tyr Leu Lys Glu Asp Gly Ala Glu Ser Arg Arg
 435 440 445

Gly Ser Ile Ile Ser Ile Pro Gly Gly Pro Asp Gly Gly Gly Ser Tyr
 450 455 460

Ile His Ala Ser Ala Leu Val Ser Arg Ser Val Leu Gly Pro Lys Ser
 465 470 475 480

Val His Gly Ser Ala Met Val Pro Pro Glu Lys Ile Ala Ala Ser Gly
 485 490 495

Pro Leu Trp Ser Ala Leu Leu Glu Pro Gly Val Lys Arg Ala Leu Val
 500 510

Val Gly Val Gly Ile Gln Ile Leu Gln Gln Phe Ser Gly Ile Asn Gly
 515 520 525

Val Leu Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Leu Glu Arg Ala Gly Val Asp Ile
 530 535 540

Leu Leu Ser Ser Leu Gly Leu Ser Ser Ile Ser Ala Ser Phe Leu Ile
 545 550 555 560

Ser Gly Leu Thr Thr Leu Leu Met Leu Pro Ala Ile Val Val Ala Met
 565 570 575

Arg Leu Met Asp Val Ser Gly Arg Arg Ser Leu Leu Leu Trp Thr Ile
 580 585 590

Pro Val Leu Ile Val Ser Leu Val Val Leu Val Ile Ser Glu Leu Ile
 595 600 605

His Ile Ser Lys Val Val Asn Ala Ala Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
 610 615 620

Leu Tyr Phe Cys Phe Phe Val Met Gly Tyr Gly Pro Ile Pro Asn Ile
 625 630 635 640

Leu Cys Ser Glu Ile Phe Pro Thr Arg Val Arg Gly Leu Cys Ile Ala
 645 650 655

Ile Cys Ala Met Val Phe Trp Ile Gly Asp Ile Ile Val Thr Tyr Ser
 660 665 670

Leu Pro Val Leu Leu Ser Ser Ile Gly Leu Val Gly Val Phe Ser Ile
 675 680 685

ES 2 778 273 T3

Tyr Ala Ala Val Cys Val Ile Ser Trp Ile Phe Val Tyr Met Lys Val
690 695 700

Pro Glu Thr Lys Gly Met Pro Leu Glu Val Ile Thr Asp Tyr Phe Ala
705 710 715 720

Phe Gly Ala Gln Ala Gln Ala Ser Ala Pro Ser Lys Asp Ile
725 730

- 5
<210> 10
<211> 1698
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 10

ES 2 778 273 T3

atggcgggta agcacggcgt cgacggcgac ggcagcgaaa tcgaatcgag aactctggcg 60
 gtagatcgaa aaagcggttt ctgcgaatca acatcgatat tctacagcaa acgtgagcca 120
 atggctctcc cgccaaacca atttctcgac gtcacgtctt tcattgcatc acagcctcat 180
 cgcggcaaaa ccgtattcgt cgacgccgta accggtcgtc gactaagctt ccctgagctc 240
 tggctcggtg tcgaaagagt cgcggggtgt ctttacgcat taggtgtacg caaaggaaat 300
 gtcgtcatta tactctctcc aaactcaatc ctcttcccga tcgtctccct ctccgtaatg 360
 tcaactggcg caatcataac caccgctaac ccgatcaaca cgtccgacga aatctccaaa 420
 cagataggcg attcgcgtcc tgttctcgcc ttcaccacat gcaaactcgt ctccaaactc 480
 gccgcccgt cgaattttaa tctcccgggtg gttctcatgg acgactacca cgttccctcg 540
 caaagttacg gtgaccgcgt gaaactagtc gggagggttag agacgatgat tgaacagaa 600
 ccgagtgagt cacgagttaa gcaacgagtc aaccaggacg acacggcggc tctgttatac 660
 tcacaggtta cgacggggac gagtaaagga gtaatgctga gtcaccgtaa cctaactcga 720
 ttggtacaag cataccgggc ccggttcggt ttagagcagc gaaccatttg cacaatccca 780
 atgtgtcaca tcttcggatt cgggtggttc gcgacggggc taatcgcggt aggatggaca 840
 atcgttgttc ttcctaaatt cgacatggct aagcttctct cggcgggtgga gactcatcgt 900
 tcttcgtacc tttctcttgt accgccgatt gtagtagcta tggttaacgg agcaaatgag 960
 attaattcca agtatgatct gagctcgttg cacactgtgg tggctggagg agctccgttg 1020
 agtagagagg tgacggagaa gttcgttgag aattatccca aggttaagat cctacaaggg 1080
 tatggtttga ctgagtcaac ggctatagct gcttctatgt ttaataaaga ggagactaag 1140
 aggtatggag cttctggctt actggctccg aatgtggaag gtaagattgt ggatccggat 1200
 acgggtcggg ttttgggtgt gaatcaaacg ggtgagctgt ggattcgaag tcctactgtg 1260
 atgaaagggtt atttcaagaa taaagaagct actgcttcta ccattgattc agaaggatgg 1320
 ttgaaaactg gagatttgtg ttacattgac ggtgatgggt ttgtctttgt tgttgataga 1380
 ttaaaggagc tcatcaaatg caatggttat caggttgctc cagctgaact agaggcattg 1440
 ttgcttgctc atccagagat tgctgatgca gcagtaatac ccatecctga catgaaagct 1500

 gggcaatatc caatggcata tatcgtaaga aaagttggaa gtaacttatc cgagagcgaa 1560
 atcatgggat ttgtcgcaaa acaggatca ccgtacaaga agattcgsaa agtcacattt 1620
 ttgcttcaa tccccaaaa tccttcgggc aagattttaa gaagagaact tacaagctc 1680
 acaacttcaa aactctag 1698

<210> 11
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 11

ES 2 778 273 T3

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

ES 2 778 273 T3

Arg Gly Arg Glu Asp Val Ser Gly Glu Met Ala Leu Leu Val Glu Gly
 210 215 220

Leu Gly Ile Gly Gly Glu Thr Thr Ile Glu Glu Tyr Ile Ile Gly Pro
 225 230 235 240

Ala Asp Glu Val Thr Asp Asp His Asp Ile Ala Val Asp Lys Asp Gln
 245 250 255

Ile Lys Leu Tyr Gly Ala Glu Glu Gly Leu Ser Trp Val Ala Arg Pro
 260 265 270

Val Lys Gly Gly Ser Thr Met Ser Val Leu Ser Arg His Gly Ser Thr
 275 280 285

Met Ser Arg Arg Gln Gly Ser Leu Ile Asp Pro Leu Val Thr Leu Phe
 290 295 300

Gly Ser Val His Glu Lys Met Pro Asp Thr Gly Ser Met Arg Ser Ala
 305 310 315 320

Leu Phe Pro His Phe Gly Ser Met Phe Ser Val Gly Gly Asn Gln Pro
 325 330 335

Arg His Glu Asp Trp Asp Glu Glu Asn Leu Val Gly Glu Gly Glu Asp
 340 345 350

Tyr Pro Ser Asp His Gly Asp Asp Ser Glu Asp Asp Leu His Ser Pro
 355 360 365

Leu Ile Ser Arg Gln Thr Thr Ser Met Glu Lys Asp Met Pro His Thr
 370 375 380

Ala His Gly Thr Leu Ser Thr Phe Arg His Gly Ser Gln Val Gln Gly
 385 390 395 400

Ala Gln Gly Glu Gly Ala Gly Ser Met Gly Ile Gly Gly Gly Trp Gln
 405 410 415

Val Ala Trp Lys Trp Thr Glu Arg Glu Asp Glu Ser Gly Gln Lys Glu
 420 425 430

Gly Gly Phe Lys Arg Ile Tyr Leu His Gln Glu Gly Phe Pro Gly Ser
 435 440 445

Arg Arg Gly Ser Ile Val Ser Leu Pro Gly Gly Asp Gly Thr Gly Glu
 450 455 460

Ala Asp Phe Val Gln Ala Ser Ala Leu Val Ser Gln Pro Ala Leu Tyr
 465 470 475 480

ES 2 778 273 T3

Ser Lys Asp Leu Leu Lys Glu His Thr Ile Gly Pro Ala Met Val His
485 490 495

Pro Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ser Ile Trp His Asp Leu His Asp Pro
500 505 510

Gly Val Lys Arg Ala Leu Val Val Gly Val Gly Leu Gln Ile Leu Gln
515 520 525

Gln Phe Ser Gly Ile Asn Gly Val Leu Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Leu
530 535 540

Glu Gln Ala Gly Val Gly Ile Leu Leu Ser Asn Met Gly Ile Ser Ser
545 550 555 560

Ser Ser Ala Ser Leu Leu Ile Ser Ala Leu Thr Thr Phe Val Met Leu
565 570 575

Pro Ala Ile Ala Val Ala Met Arg Leu Met Asp Leu Ser Gly Arg Arg
580 585 590

Thr Leu Leu Leu Thr Thr Ile Pro Ile Leu Ile Ala Ser Leu Leu Val
595 600 605

Leu Val Ile Ser Asn Leu Val His Met Asn Ser Ile Val His Ala Val
610 615 620

Leu Ser Thr Val Ser Val Val Leu Tyr Phe Cys Phe Phe Val Met Gly
625 630 635 640

Phe Gly Pro Ala Pro Asn Ile Leu Cys Ser Glu Ile Phe Pro Thr Arg
645 650 655

Val Arg Gly Ile Cys Ile Ala Ile Cys Ala Leu Thr Phe Trp Ile Cys
660 665 670

Asp Ile Ile Val Thr Tyr Ser Leu Pro Val Leu Leu Lys Ser Ile Gly
675 680 685

Leu Ala Gly Val Phe Gly Met Tyr Ala Ile Val Cys Cys Ile Ser Trp
690 695 700

Val Phe Val Phe Ile Lys Val Pro Glu Thr Lys Gly Met Pro Leu Glu
705 710 715 720

Val Ile Thr Glu Phe Phe Ser Val Gly Ala Arg Gln Ala Glu Ala Ala
725 730 735

Lys Asn Glu

ES 2 778 273 T3

<211> 2220
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5 <400> 12

```

atgagtggag ctgtgcttgt tgctattgct gctgctgttg gcaacttggt acaaggatgg      60
gataacgcaa ctattgcagg agctgtgttg tacataaaaa aggagtttaa tttggagagt      120
aatccatcag tgggaaggct aattgtggcg atgtcactta ttggtgctac tctgattaca      180
acatgctctg gaggggtagc tgattggctt ggtcgccgtc ccatgctaata attgtcctca      240
attctctact ttgttggttc tctagtaatg ctatggcttc cgaatgttta tgtgttgctc      300
ttaggaaggt tgtagatgg atttgggggtt ggtcttgtgg tcacacttgt tcctatttat      360
atatctgaga ctgcaccacc tgagattagg ggactgttga atacgctacc gcagttcact      420
ggctctggag ggatgttctt atcttactgt atggttttcg gaatgtcgtt gatgccatca      480
cctagctgga gattgatgct tgggtgcctt ttcattcctt cccttgtctt tttcttctc      540
acggtcttct tcttgcccga gtccccaagg tggctcgtga gcaaaggctg aatgcttgaa      600
gcaaagcggg ttcttcagag actgctgtgt cgcgaagatg tgtctggtga gatggctttg      660
ttggttgagg gtcttggaaat tggagggtgaa acaaccatag aggaatatat aattggtccc      720
gcggatgaag ttactgatga tcatgatata gctgtggata aggatcaaat taagttatat      780
ggtgcagaag aagggtctgag ttgggttgcct aggccagtca aaggaggaag cactatgagt      840
gttttgtctc gccatggaag tacaatgagc aggaggcaag gctcattgat tgatcctctt      900
gtcacactgt ttgggagcgt tcacgagaag atgccggaca ctggaagcat gaggagtgcc      960
ttgttcccac attttgggag tatgttcagt gttggagggg atcaaccaag acatgaagat     1020
tgggatgaag agaatcttgt tggagaaggt gaggattatc catccgacca tggagatgat     1080
tctgaagatg atcttcattc tccgttgatc tcacgtcaaa cgacaagcat ggagaaagac     1140
atgcctcaca ctgctcatgg aactctttct accttcagac atggaagtca agtgcagggg     1200
gctcaagggg aaggagcggg tagtatgggg attggagggt gatggcaagt ggcattgaaa     1260
tggacggaaa gagaagatga atcgggacag aaagaagggt ggtttaaacg gatatacttg     1320
catcaagaag gtttcccagg atctcgacgt ggctcaattg tttcattgcc tggtygtgat     1380
ggaaccggtg aggcagattt tgtacaagcg tctgctttgg ttagccaacc agctctttat     1440
tccaaagacc ttctcaaaga acatacaatt ggtcctgcta tggtagatcc atccgaaaca     1500
actaaagggt caatttggca tgatcttcat gatcctggag tcaagcgtgc attagtcgta     1560
ggagttggac ttcaaatact tcagcagttc tcaggcatca acggagttct ttactacaca     1620
ccgcaaatcc ttgagcaggc ggggtgctggg atcctactat cgaacatggg gattagttct     1680
tcctcagcat cttacttat aagtgcattg acaacctttg tgatgttacc tgcaatagct     1740
gttgcaatga ggctcatgga tctttctggt cgaaggacct tgcttctcac cacgatacca     1800
atcctgatag catctctatt ggttttagta atctcaaate ttgttcacat gaacagcatt     1860
    
```


ES 2 778 273 T3

gtgcacg^{cg}g tcttatcaac cgtaagcg^{tt} gtgctctact tctgcttctt cgtgatgg^{gt} 1920
 ttcgg^tcctg ctccaaacat cctctgttca gagatttttc caactcgag^t ccg^cggaatc 1980
 tgcategcca tctg^cgcaact caccttctg^g atctgtgaca taatcg^tcac ttacagtctc 2040
 cccg^tgctgc tcaa^atccat tggactagct ggtgtgtttg gaatgtac^gc aatcg^tatgt 2100
 tgcatttcat ggg^ttctttgt gttcattaaa gtccc^ggaaa ctaaag^gcat gccact^tgaa 2160
 gtc^atacacag ag^ttcttttc tgttggagct agacaag^ctg aagctg^ctaa aaacgag^tga 2220

<210> 13
 <211> 737
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 13

5

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

10

ES 2 778 273 T3

Val Ser Lys Gly Arg Met Asp Glu Ala Arg Gln Val Leu Gln Arg Leu
 195 200 205
 Arg Gly Arg Glu Asp Val Ser Gly Glu Leu Ala Leu Leu Val Glu Gly
 210 215 220
 Leu Gly Val Gly Lys Asp Thr Ser Ile Glu Glu Tyr Val Ile Gly Pro
 225 230 240
 Asp Asn Glu Glu Asn Glu Gly Gly Asn Glu Leu Pro Arg Lys Asp Gln
 245 250 255
 Ile Lys Leu Tyr Gly Pro Glu Asp Gly Gln Ser Trp Met Ala Lys Pro
 260 265 270
 Val Lys Gly Gln Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Arg Gln Gly Ser Met
 275 280 285
 Leu Pro Arg Gly Gly Ser Leu Met Asp Pro Leu Val Thr Leu Phe Gly
 290 295 300
 Ser Ile His Glu Asn Leu Pro Ser Glu Asn Met Asn Ala Ser Ser Arg
 305 310 315 320
 Ser Met Leu Phe Pro Asn Met Gly Ser Ile Leu Gly Met Met Gly Arg
 325 330 335
 Gln Glu Ser Gln Trp Asp Pro Glu Arg Asn Asn Glu Asp Ser Ser Asp
 340 345 350
 Gln Asp Glu Asn Leu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Pro Gln Thr Thr Glu
 355 360 365
 Pro Asp Asp Tyr His Gln Arg Thr Val Gly Thr Met His Arg Arg Gln
 370 375 380
 Ser Ser Leu Phe Met Ala Asn Val Gly Glu Thr Ala Thr Ala Thr Ser
 385 390 395 400
 Ile Gly Gly Gly Trp Gln Leu Ala Trp Lys Tyr Asn Asp Lys Val Gly
 405 410 415
 Ala Asp Gly Lys Arg Val Asn Gly Gly Leu Gln Arg Met Tyr Ile His
 420 425 430
 Glu Glu Thr Ala Asn Asn Asn Thr Asn Asn Ile Pro Phe Ser Arg Arg
 435 440 445
 Gly Ser Leu Leu Ser Phe His Pro Glu Gly Asp Gly His Asp Gln Val
 450 455 460

ES 2 778 273 T3

Asn Gly Tyr Val Gln Ala Ala Ala Leu Val Ser Gln Ala Ser Met Met
 465 470 475 480
 Pro Gly Gly Lys Gly Glu Thr Ala Met Leu Pro Lys Glu Val Lys Asp
 485 490 495
 Gly Pro Gly Trp Arg Glu Leu Lys Glu Pro Gly Val Lys Arg Ala Leu
 500 505 510
 Met Val Gly Val Gly Leu Gln Ile Leu Gln Gln Phe Ala Gly Ile Asn
 515 520 525
 Gly Val Met Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Leu Glu Glu Thr Gly Val Ser
 530 535 540
 Ser Leu Leu Thr Asn Leu Gly Ile Ser Ala Glu Ser Ala Ser Leu Leu
 545 550 555 560
 Ile Ser Ala Leu Thr Thr Leu Leu Met Leu Pro Cys Ile Leu Val Ser
 565 570 575
 Met Arg Leu Met Asp Val Thr Gly Arg Arg Ser Leu Met Leu Ser Thr
 580 585 590
 Ile Pro Ile Leu Ile Leu Ser Leu Val Thr Leu Val Ile Gly Ser Leu
 595 600 605
 Val Asn Leu Gly Gly Ser Ile Asn Ala Leu Ile Ser Thr Ala Ser Val
 610 615 620
 Thr Val Tyr Leu Ser Cys Phe Val Met Gly Phe Gly Ala Ile Pro Asn
 625 630 635 640
 Ile Leu Cys Ser Glu Ile Phe Pro Thr Ser Val Arg Gly Leu Cys Ile
 645 650 655
 Thr Ile Cys Ala Leu Thr Phe Trp Ile Cys Asp Ile Ile Val Thr Tyr
 660 665 670
 Thr Leu Pro Val Met Leu Lys Ser Ile Gly Ile Ala Gly Val Phe Gly
 675 680 685
 Ile Tyr Ala Ile Val Cys Ala Val Ala Trp Val Phe Val Tyr Leu Lys
 690 695 700
 Val Pro Glu Thr Lys Gly Met Pro Leu Glu Val Ile Ser Glu Phe Phe
 705 710 715 720
 Ser Val Gly Ala Lys Gln Gln Asp Ala Ala Ala Ser Phe Leu Ser Asp
 725 730 735

gly

<210> 14
 <211> 2190
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 14

5

```

atgaggagtg tagtgcttgt tgcttttagcc gctgcgatag ggaatatggt gcagggctgg      60
gacaatgccca ccattgcagg agctgtaatt tacattaaga aagaatttca tttggagaaa      120
gaaccaaaga tagaaggact gatcgtggca atgtctctca ttggagccac tttgatcaca      180
actttctctg gtccctgtctc tgacaaagta ggaaggcgat caatgcttat actctcctct      240
gttctctatt ttctgagtag cattgttatg ttttgggtctc ccaatgtcta cgttctcctt      300
ttcgcaaggc ttcttgatgg ttttgggatc ggttttagctg tcaactctcg cccaatctac      360
atctctgaga ccgcaccttc tgagatcaga ggattactca acactttccc gcagttttgt      420
ggatccggty ggatgttttt gtcgtattgt cttgtgtttg ggatgtcgct tcaagaatca      480
ccaagctgga ggctgatgct tgggtgtttg tcaattccgt ccattgccta ctttgtactt      540
gcggtcttct tcttgccctga atctccaagg tggcttgcca gcaaaggccg tatggatgaa      600
gctagacagg ttctgcagag actccgtggc agagaagatg tttcaggcga gcttgctctg      660
ctggttgaag ggcttggggg gggaaaagac acgtcgatag aagaatatgt gattggacca      720
gacaacgagg aaaacgaggg tggaaatgaa ctgccgagga aagatcagat aaaactatat      780
ggtccagagg atggacagtc atggatggct aagccagtga aaggacagag ttctctcgca      840
ttggcttccc gacaaggcag catgttaccg cgtggcggat ccctcatgga cccacttgtc      900
actctctttg gtagcattca tgagaatctc ccttccgaga acatgaacgc atcatcccgc      960
agcatgctct tccccaatat gggaaagtata ctgggaatga tgggaaggca ggagtcccag     1020
tgggatccag agagaaacaa tgaagatagt tctgaccaag atgaaaactt aaacagtcct     1080
ctgctttctc cgcaaaccac tgagccggat gactaccacc agcggaccgt tggtagcatg     1140
cataggcgac agagcagctt gtttatggca aacgtgggtg agacagcgac ggctacaagc     1200
ataggcggty gatggcaatt ggcgtggaag tataatgaca aggttggtgc agatggtaag     1260
agagtcaatg gagggttaca gagaatgtat attcacgagg aaaccgcca caacaacacc     1320
aacaacattc ctttttcgcy acgtggatca cttctctcct tccaccaga gggatgatgg     1380
catgatcagg tgaatggata cgttcaggct gctgcacttg tgagccaagc ttcgatgatg     1440
ccaggaggta aaggcgagac cgcaatgttg ccaaaggagg ttaaggatgg tccaggctgg     1500
agggagctga aagaaccagg ggttaagaga gctttgatgg ttggagttgg gcttcagata     1560
ctgcaacagt ttgcaggaat aaatggagtg atgtattata cacctcaaat attggaagaa     1620
acaggtgtgt caagtctttt gacaaacctt ggaataagtg cagagtctgc atcgcttctc     1680
ataagcgcct taaccacact cttgatgctt ccctgcattc ttgtctccat gaggtctctg     1740
    
```

10

ES 2 778 273 T3

atgctttcga ctatccccat tctaatactg tcgctggtaa cactggatgat aggaagctta 1800
 gtgaatcttg gaggttcaat aaacgcgttg atatcgacag caagtgttac ggtgtaccta 1860
 agctgtttcg tgatggggtt tggggcaatt ccaaacatcc tctgctcaga gatattccct 1920
 acttctgtgc gcggctctctg catcaccata tgtgccctca ctttctggat ctgtgacata 1980
 atcgtcactt acaactctccc agtcatgctc aaatccattg gcacgcagg agtctttggc 2040
 atttatgcaa tcgtctgtgc tgtcgcgttg gtttttgtgt acctcaagggt accagagaca 2100
 aagggaatgc cccttgaagt tatctctgag ttcttctccg tcggtgcaaa acagcaagac 2160
 gctgcagctt catttctctc tgatggatga 2190

5 <210> 15
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador 5' para la amplificación por PCR de la secuencia de nucleótido que codifica para la proteína transportadora 1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

15 <400> 15
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt aatgaagggt gctgtgctt 49

20 <210> 16
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador 3' para la amplificación por PCR de la secuencia de nucleótido que codifica para la proteína transportadora 1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

30 <400> 16
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta ctccgcctta gcggcttc 48

35 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador 5' para la amplificación por de la secuencia de nucleótido que codifica para la proteína transportadora 2.1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

45 <400> 17
 ctcgagatga gtcagcagct attag 25

50 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador 3' para la amplificación por PCR de la secuencia de nucleótido que codifica para la proteína transportadora 2.1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

60 <400> 18
 tctagagtgg cttgctgtc ttgcacc 27

65 <210> 19

ES 2 778 273 T3

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador 5' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

10

<400> 19
 gctgttgcta tgaggctcat gga 23

<210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador 3' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

20

<400> 20
 ccttagcggc ttctaactgt ttagg 25

25

<210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Cebador 5' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 2.1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

35

<400> 21
 aaagatgaac accactgtgt atg 23

40

<210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador 3' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 2.1 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

50

<400> 22
 gtcacagtg gcttgcttgt ctg 24

<210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Cebador 5' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 2.2 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

60

<400> 23
 aaagatgagc actactgtgc acg 23

65

<210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 3' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de

ES 2 778 273 T3

ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 2.2 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

5 <400> 24
tcagttgtcc ttgtcttcag aagg 24

<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador 5' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 3 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

15 <400> 25
tctactctg ctgctttgct atgg 24

<210> 26
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador 3' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para la proteína transportadora 3 de azúcar tonoplastidaria de *Beta vulgaris*

25 <400> 26
tcagcttcag ctgccttgc ac 22

30 <210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador 5' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para el factor de elongación 1 de *Beta vulgaris*

40 <400> 27
ccacattgct gtcaagttg ctg 23

<210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador 3' para la reacción PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica para el factor de elongación 1 de *Beta vulgaris*

50 <400> 28
tggtaacctt ggcaccggtt g 21

REIVINDICACIONES

1. Un vector o elemento genético móvil, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, caracterizado porque la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria es específica para sacarosa, en el que la especificidad de la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria para sacarosa es 5 veces mayor con respecto a un monosacárido y en el que la molécula de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo:
- a) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, o una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que presenta una identidad de al menos 80% a la secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2;
 - b) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que es complementaria a una de las secuencias de nucleótido de acuerdo con a);
 - c) una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácido presenta una identidad de al menos 80% a la SEQ ID NO: 1.
2. Una célula huésped eucariótica o procariótica, que comprende el vector o el elemento genético móvil de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Una célula vegetal transgénica, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria tal como se define en la reivindicación 1, como transgén, o el vector o el elemento genético móvil de acuerdo con la reivindicación 1.
4. Una planta transgénica o una parte de la misma, que comprende al menos una célula vegetal transgénica de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Una semilla de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 4, presentando la semilla una molécula de ácido nucleico, que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria tal como se define en la reivindicación 1, como transgén o el vector o el elemento genético móvil de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Un procedimiento para producir una planta transgénica, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- (a) introducir una molécula de ácido nucleico, que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria tal como se define en la reivindicación 1, o del vector o del elemento genético móvil de acuerdo con la reivindicación 1 en al menos una célula de una planta, y
 - (b) regenerar una planta transgénica de la célula vegetal obtenida en la etapa a).
7. Un procedimiento para elevar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta mediante sobreexpresión de una molécula de ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 1, que codifica para la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria en al menos una célula de la planta.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la sobreexpresión se consigue mediante modificación genética de un elemento regulador endógeno, estando el elemento regulador endógeno enlazado operativamente con el ácido nucleico que codifica para la proteína.
9. Un procedimiento para identificar una planta que es adecuada para producir una mayor concentración de sacarosa en su órgano acopiador de sacarosa, que comprende identificar una molécula de ácido nucleico, que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, tal como se define en la reivindicación 1.
10. Un oligonucleótido adecuado para el uso como marcador molecular, que es diagnóstico para la identificación de una molécula de ácido nucleico, que codifica para una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, tal como se define en la reivindicación 1, seleccionándose el oligonucleótido del siguiente grupo: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26.
11. El uso de una proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria para elevar la concentración de sacarosa de un órgano acopiador de sacarosa de una planta mediante sobreexpresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína antiporter de protones/azúcar tonoplastidaria, y comprendiendo la molécula de ácido nucleico lo siguiente:
- i. una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, o con una secuencia de nucleótido que presenta una identidad de al menos 80% con respecto a una de las secuencias de nucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14;

- ii. una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótido que es complementaria a una de las secuencias de nucleótido según i.; o
- iii. una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13, o que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácido que presenta una identidad de al menos 80% con respecto a una de las secuencias de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13.

5

12. El uso según la reivindicación 1, en el que la sobreexpresión se consigue mediante modificación genética de un elemento regulador endógeno.

10

	BvTST 1	AfTMT2	BvTST2.1	BvTST2.2	AfTMT 3	BvTST 3	
AfTMT1	62% 77%	61% 75%	56% 73%	57% 74%	52% 68%	58% 72%	Similitud de identidad
BvTST1		65% 80%	58% 76%	61% 77%	57% 71%	60% 74%	Similitud de identidad
AfTMT2			68% 84%	70% 84%	60% 75%	64% 77%	Similitud de identidad
BvTST2.1				84% 92%	56% 73%	61% 75%	Similitud de identidad
BvTST2.2					58% 75%	63% 76%	Similitud de identidad
AfTMT3						60% 75%	Similitud de identidad

FIG. 1

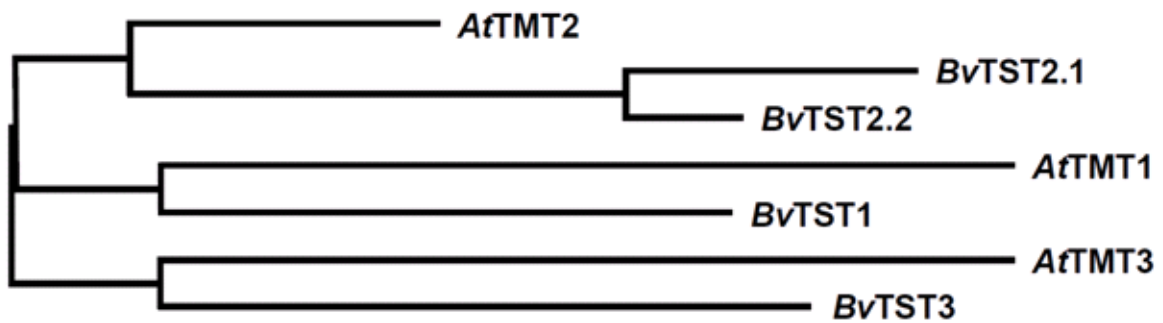


FIG. 2

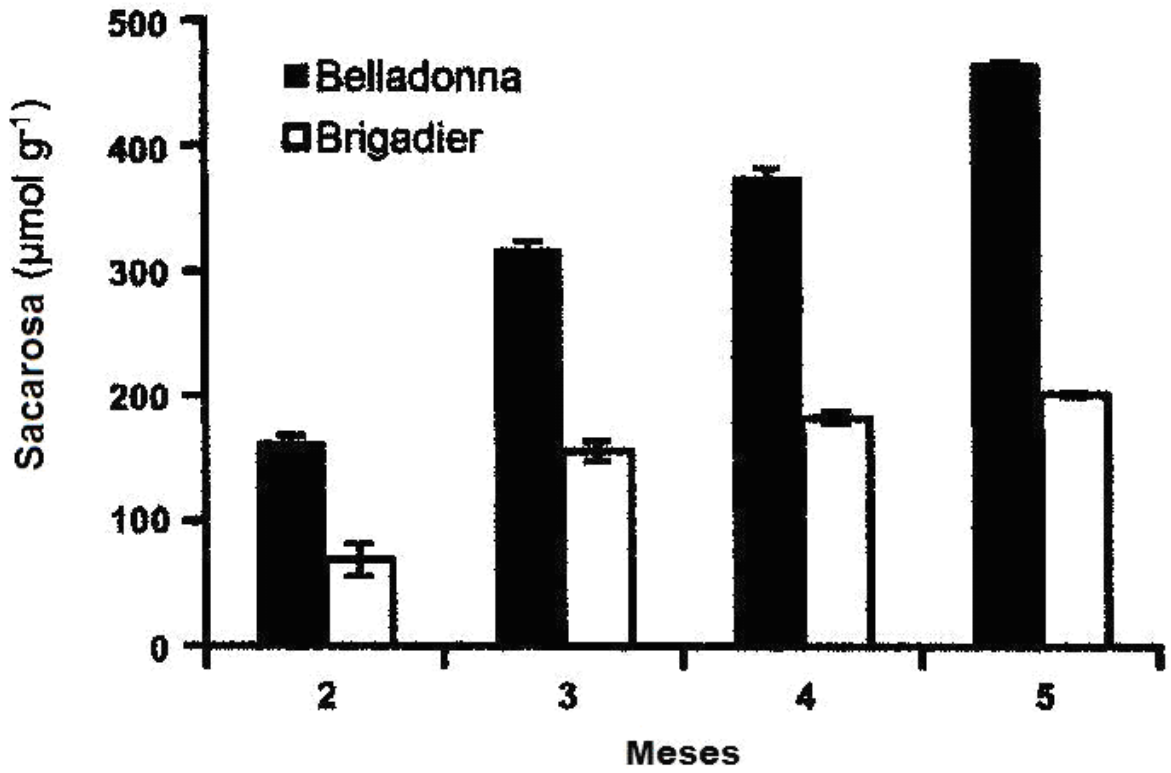


FIG. 3

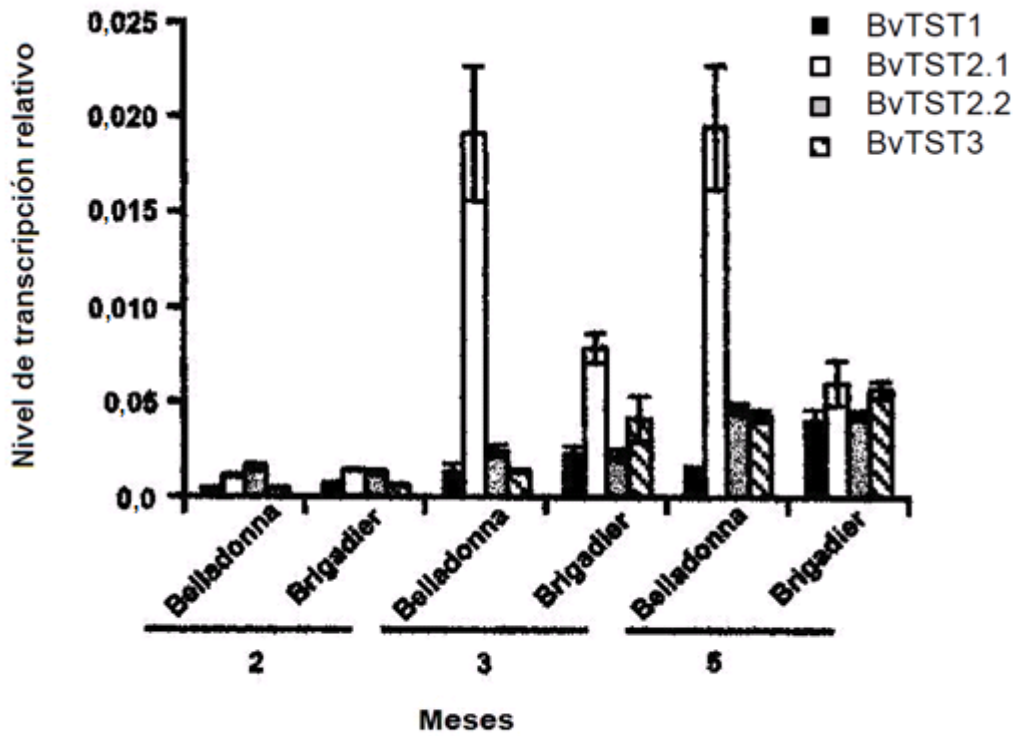


FIG. 4

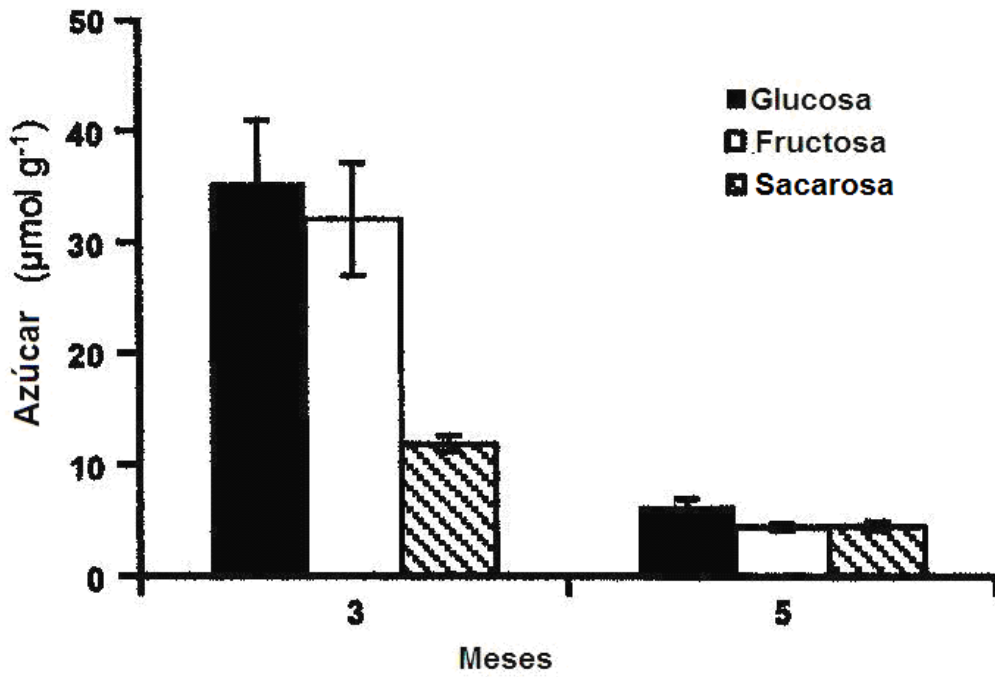


FIG. 5

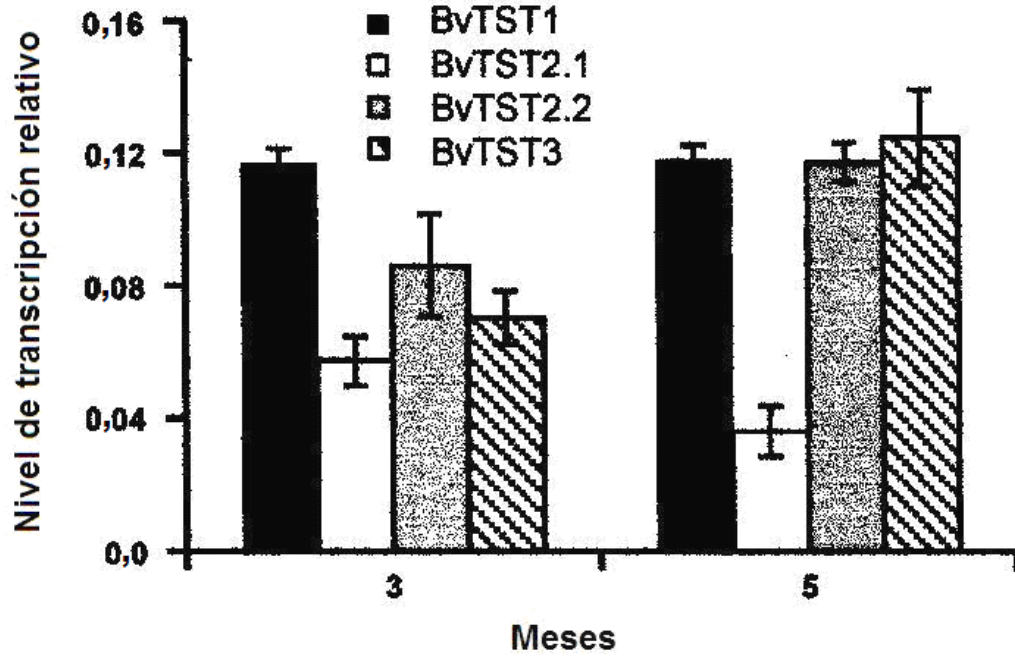


FIG. 6

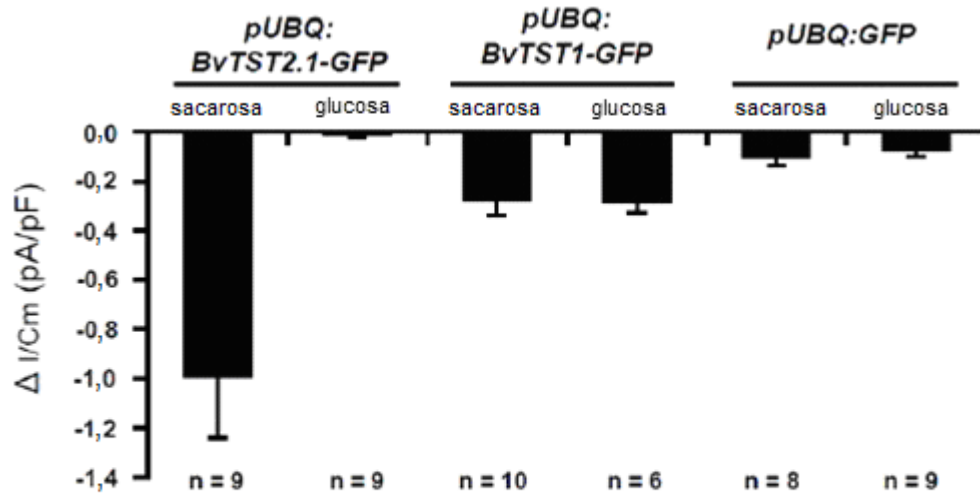


FIG. 7