

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 226**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)

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: **13.10.2011 PCT/EP2011/067925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2011 E 11768029 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 2627168**

54 Título: **Mutantes de Beta vulgaris tolerantes a herbicidas inhibidores de ALS**

30 Prioridad:

19.10.2010 US 394463 P

15.10.2010 EP 10187751

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2021

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(50.0%)**

**Alfred-Nobel-Str., 10
40789 Monheim am Rhein, DE y
KWS SAAT SE & CO. KGAA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HAIN, RUEDIGER;
BENTING, JUERGEN;
DONN, GUENTER;
KNITTEL-OTTLEBEN, NATHALIE;
HOLTSCHULTE, BERND;
LOCK, ANDREAS;
SPRINGMANN, CLEMENS y
JANSEN, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 874 226 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

Mutantes de *Beta vulgaris* tolerantes a herbicidas inhibidores de ALS

La presente invención se refiere a procedimientos para la fabricación de plantas de *Beta vulgaris* tolerantes a herbicidas inhibidores de ALS y partes de las mismas.

5 Las formas cultivadas de *Beta vulgaris* (como se define en Ford-Lloyd (2005) Sources of genetic variation, Genus Beta. En: Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M (eds) Genetics and Breeding of Sugar Beet. Science Publishers, Enfield (NH), EE.UU., pág. 25-33) son importantes cultivos agrícolas en regiones de clima templado y subtropicales. Por ejemplo, aproximadamente el 20 % de la producción mundial de azúcar se basa en la remolacha azucarera. Dado que los plantones y las plantas jóvenes de remolacha durante las primeras 6-8 semanas de su vida son vulnerables por la fuerte competencia causada por el rápido crecimiento de malas hierbas, que compiten con las plantas jóvenes del cultivo, es imperativo disponer de medidas fiables de control de las malas hierbas en estas zonas de cultivo.

10 Desde hace más de 40 años, los herbicidas son las herramientas preferidas para controlar las malas hierbas en cultivos de remolacha. Los productos usados para este fin, como fenmedifam, desmedifán y metamitrón, permiten suprimir el crecimiento de malas hierbas en los campos de remolacha sin dañar el cultivo. No obstante, en condiciones ambientales adversas, la eficacia de estos productos da margen a mejoras, especialmente si las malas hierbas nocivas como *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus* y *Tripleurospermum inodorata* germinan durante un periodo de tiempo prolongado.

15 Son altamente convenientes principios activos herbicidas innovadores para mejorar las opciones de control de malas hierbas en la remolacha. Dichos compuestos deberían actuar contra un amplio espectro de malas hierbas, preferentemente desde la germinación de las malas hierbas hasta su completo desarrollo, sin que ello afecte al cultivo de remolacha con independencia de su fase de desarrollo. A través del clásico enfoque de cribado de herbicidas, ningún principio activo herbicida selectivo inhibía la actividad de la ALS, estas familias de herbicidas previenen el crecimiento y el desarrollo adicional de plantas susceptibles, incluidas muchas especies de malas hierbas. Para proporcionar plantas con una tolerancia aumentada a incluso concentraciones altas de herbicidas inhibidores de ALS que pueden ser necesarias para un control suficiente de las malas hierbas, se necesitan otras líneas de reproducción y variedades de plantas de cultivo resistentes a herbicidas inhibidores de ALS, así como procedimientos y composiciones para la producción y el uso de líneas de reproducción y variedades resistentes a herbicidas inhibidores de ALS.

20 Una amplia variedad de herbicidas inhibidores de ALS permiten al agricultor controlar una amplia gama de especies de malas hierbas de forma independiente de sus fases de crecimiento, pero estos herbicidas muy eficaces no se pueden usar en remolacha porque las plantas convencionales de remolacha/variedades de remolacha comerciales son muy vulnerables frente a estos herbicidas inhibidores de ALS. No obstante, estos herbicidas inhibidores de ALS muestran una excelente actividad herbicida contra las especies de malas hierbas de hoja ancha y de gramíneas. Los primeros herbicidas que tenían como modo de acción la inhibición de la ALS, se desarrollaron para su uso en agricultura ya hace 30 años. Hoy en día, los principios activos de esta clase de herbicidas presentan un fuerte control de las malas hierbas y son ampliamente usados en maíz y cereales, así como en cultivos de dicotiledóneas, excepto de remolacha.

25 El único herbicida inhibidor de ALS que se sabe hoy en día que se aplica en esquemas de aplicación posemergencia en remolacha es Debut®. Este herbicida (que contiene triflusalurónmetilo como principio activo más compuestos de formulación específicos) es degradado por la remolacha antes de que pueda inhibir la enzima ALS endógena de la remolacha, pero presenta graves deficiencias en el control de las malas hierbas que crecen en zonas de cultivo de remolacha.

30 Desde la introducción en la agricultura de los herbicidas inhibidores de ALS se ha observado que las especies vegetales susceptibles, incluidas las malas hierbas de origen natural, en ocasiones desarrollan una tolerancia espontánea a esta clase de herbicidas. Las sustituciones de pares de bases únicas en sitios específicos del gen de ALS normalmente conducen a variantes más o menos resistentes de la enzima ALS que muestran distintos niveles de inhibición por los herbicidas inhibidores de ALS.

35 Por lo tanto, las plantas que confieren alelos de ALS mutantes, muestran diferentes niveles de tolerancia a los herbicidas inhibidores de ALS, dependiendo de la estructura química del herbicida inhibidor de ALS y el sitio de la mutación puntual en el gen de ALS. Por ejemplo, Hattori y col. (1995) Mol. Gen. Genet. 246: 419-425, describen una única mutación en el codón Trp 557 en una línea celular de *Brassica napus* (de acuerdo con la numeración de la secuencia de *Arabidopsis thaliana* que se usa en la bibliografía para comparar todos los mutantes de ALS/AHAS, esto se refiere a la posición "574"), lo que equivale a la posición 569 de la secuencia de la ALS de remolacha. Estos autores han observado resistencia a varios miembros de subclases de herbicidas inhibidores de ALS, como sulfonilureas, imidazolinonas y triazolopirimidinas.

40 Se han descrito mutantes de remolacha que confieren una mutación puntual en el codón Ala 122 que condujo a cierta tolerancia a la subclase herbicidas inhibidores de ALS de las imidazolinonas (documento WO 98/02526) pero que no

es suficiente para controlar las malas hierbas en esquemas de aplicación agrícola. No se ha descrito tolerancia cruzada a otras clases de herbicidas inhibidores de ALS empleando este mutante. Además, las plantas de remolacha que confieren una segunda mutación puntual en el codón Pro 197 mostraron una tolerancia moderada a herbicidas inhibidores de ALS pertenecientes a miembros de la subclase de herbicidas de sulfonilurea. Además, se describieron

5 dobles mutantes de estos dos (documento WO 98/02527). Sin embargo, ninguno de estos mutantes se usó para la introducción en el mercado de variedades de remolacha debido a que el nivel de tolerancia a herbicidas para los herbicidas inhibidores de ALS no era suficientemente alto en estos mutantes como para explotarlos agrónomicamente.

Stougaard y col., (1990), J. Cell Biochem., Supl. 14E, 310 describen el aislamiento de mutantes de ALS en un cultivo de células de remolacha azucarera tetraploides. Se aislaron dos genes distintos de ALS (ALS I y ALS II) que diferían

10 únicamente en la posición 37 de aminoácidos. El mutante 1 contenía en su gen de ALS I 2 mutaciones, mientras que el mutante 2 contenía 3 mutaciones en su gen de ALS II. Una vez que las mutaciones se separaron para resolver qué mutación conferiría resistencia contra un inhibidor de ALS, se reveló que la ALS sintetizada a partir de una *E. coli* recombinante era resistente al herbicida si contenía una mutación puntual en el codón Trp 574 (de acuerdo con la numeración de la secuencia de *Arabidopsis thaliana* que se usa en la bibliografía para comparar todos los mutantes

15 de ALS), lo que equivale a la posición 569 de la secuencia de la ALS de remolacha, conduciendo a una sustitución del aminoácido "Trp" por el aminoácido "Leu". Stougaard y col. no mostraron en la remolacha azucarera que la mutación en la posición 569 de cualquiera de los genes de ALS de remolacha azucarera es suficiente para obtener un nivel aceptable de tolerancia a herbicidas inhibidores de ALS. Además, Stougaard y col. no regeneraron ni manipularon plantas de remolacha azucarera que comprendan una mutación, incluida la mutación Trp -> Leu en la posición 569 de

20 la ALS de remolacha azucarera.

Sabiendo esto, Stougaard y col. construyeron vectores de transformación vegetal que contienen distintos genes de ALS para su uso en transformación vegetal. Sin embargo, hasta ahora, estos ni otros autores han desvelado datos

25 adicionales, especialmente los concernientes a los efectos de la aplicación de herbicidas inhibidores de ALS a plantas y/o áreas agrícolas que comprendan esta mutación en plantas de *Beta vulgaris*, ni plantas sometidas a ingeniería genética o mutantes durante más de 20 años a partir de entonces.

El documento WO 99/57965 describe, en general, plantas de remolacha azucarera resistentes a sulfonilurea y procedimientos para obtenerlas mediante mutagénesis con EMS (etilmetanosulfonato). Sin embargo, aparte de la investigación necesaria para obtener tales mutantes, esta publicación no proporciona tales plantas ni describe ninguna

30 localización específica en el gen de ALS que pueda ser importante para obtener mutantes tolerantes al herbicida inhibidor de la ALS, ni desvela ningún uso agronómico relacionado de los mismos. Además, existe una fuerte probabilidad de que, usando compuestos mutagénicos fuertes como EMS, se pueden producir diversas mutaciones adicionales en otros lugares en el genoma y que podrían conducir a desventajas de hasta falta de fertilidad y/o retraso del crecimiento de plantas obtenidas de esta manera. Además, debido a su interacción química con el ADN, la aplicación de EMS puede tener deficiencias en la inducción de mutaciones específicas, como convertir el triplete TGG en TTG, dado que el EMS siempre convierte una guanosina en una adenosina.

35

En algunas especies de malas hierbas, como *Amaranthus*, la mutación Trp 574 Leu podría detectarse en poblaciones de plantas repetidamente expuestas a herbicidas inhibidores de ALS. Estos mutantes Trp 574 Leu muestran un nivel

40 elevado de tolerancia a varias clases químicas de herbicidas inhibidores de ALS, como los seleccionados del grupo que consiste en sulfonilureas y sulfonilaminocarboniltriaolinonas.

El documento WO 2008/124495 desvela mutantes dobles y triples de ALS. De acuerdo con el documento WO 2009/046334 se proporcionaron mutaciones específicas en el gen de ALS. Sin embargo, hasta ahora no se han

45 obtenido mutantes de *Beta vulgaris* tolerantes a herbicidas agrónomicamente explotables que contengan tales mutaciones de acuerdo con el documento WO 2009/046334.

Además, en vista del hecho de que, por ejemplo, la remolacha azucarera representa aproximadamente el 20 % de la producción mundial de azúcar, sería también muy conveniente disponer de plantas de remolacha azucarera que

50 tengan una ventaja de crecimiento frente a las malas hierbas muy potentes. Por tanto, sería muy conveniente disponer, con respecto al gen de ALS, de plantas de *Beta vulgaris* no transgénicas, incluidas plantas de remolacha azucarera que sean tolerantes a los herbicidas inhibidores de ALS. Por lo tanto, existe la necesidad de tales plantas de *Beta vulgaris* no transgénicas, en particular, plantas de remolacha azucarera que sean tolerantes a herbicidas inhibidores de ALS a un nivel agrónomicamente explotable de herbicidas inhibidores de ALS.

Por tanto, el problema técnico es satisfacer esta necesidad.

La presente invención aborda esta necesidad y, por tanto, proporciona como solución al problema técnico una planta de *Beta vulgaris* y partes de la misma, tolerante a herbicidas inhibidores de ALS, que comprende una mutación de un

55 gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno, en la que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene un aminoácido distinto del triptófano en la posición 569 del polipéptido de ALS.

Las semillas de acuerdo con la presente invención se han depositado en el NCIMB, Aberdeen, RU, con el Número NCIMB 41705 el 12 de marzo de 2010.

Aplicando diversos procedimientos de mejoramiento genético, se pueden desarrollar posteriormente variedades

comerciales con altos rendimientos, altamente competitivas, en todos los mercados específicos, con la adición de una sólida tolerancia a herbicidas inhibidores de ALS, usando las plantas mutantes obtenidas originalmente.

5 Cabe destacar que, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un, una", "uno, una" y "el, la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, el documento WO 2008/124495 desvela mutantes dobles y triples de ALS. De acuerdo con el documento WO 2009/046334, se proporcionaron mutaciones específicas en el gen de ALS. Sin embargo, hasta ahora no se han obtenido mutantes *Beta vulgaris* tolerantes a herbicidas agrónomicamente explotables que contengan tales mutaciones de acuerdo con el documento WO 2009/046334.

10 Además, en vista del hecho de que, por ejemplo, la remolacha azucarera representa aproximadamente el 20 % de la producción mundial de azúcar, sería también muy conveniente disponer de plantas de remolacha azucarera que tengan una ventaja de crecimiento frente a las malas hierbas muy potentes. Por tanto, sería muy conveniente disponer, con respecto al gen de ALS, de plantas de *Beta vulgaris* no transgénicas, incluidas plantas de remolacha azucarera que sean tolerantes a los herbicidas inhibidores de ALS. Por lo tanto, existe la necesidad de tales plantas de *Beta vulgaris* no transgénicas, en particular, plantas de remolacha azucarera que sean tolerantes a herbicidas inhibidores de ALS a un nivel agrónomicamente explotable de herbicidas inhibidores de ALS.

15 Por tanto, el problema técnico es satisfacer esta necesidad.

La presente invención aborda esta necesidad y, por tanto, proporciona como solución al problema técnico un procedimiento para fabricar una planta de *Beta vulgaris*, y partes de la misma, tolerante a herbicidas inhibidores de ALS que comprende una mutación en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de un gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno mostrado en la secuencia de nucleótidos de referencia SEQ ID NO: 1, en el que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene un aminoácido distinto del triptófano en una posición 569 del polipéptido de ALS, y que es homocigótica para la mutación del gen ALS, en la que la planta de *Beta vulgaris* no es transgénica con respecto a dicho gen ALS endógeno, y el codón en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 es TTG, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- 25 (a) exponer callos de *B. vulgaris*, a aproximadamente 10^{-7} M - 10^{-9} M de un herbicida inhibidor de ALS;
- (b) seleccionar colonias celulares que puedan crecer en presencia de hasta 3×10^{-6} M de un herbicida inhibidor de ALS;
- (c) regenerar brotes en presencia de un herbicida inhibidor de ALS;
- (d) seleccionar plántulas regeneradas con un herbicida inhibidor de ALS,

30 en las que las plántulas comprenden una mutación en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de un gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno mostrado en la secuencia de nucleótidos de referencia SEQ ID NO: 1, en el que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene el aminoácido leucina en una posición 569 del polipéptido de ALS.

35 Las semillas obtenidas mediante los procedimientos de acuerdo con la presente invención se han depositado en el NCIMB, Aberdeen, RU, con el Número NCIMB 41705 el 12 de marzo de 2010.

Aplicando diversos procedimientos de mejoramiento genético, se pueden desarrollar posteriormente variedades comerciales con altos rendimientos, altamente competitivas, en todos los mercados específicos, con la adición de una sólida tolerancia a herbicidas inhibidores de ALS, usando las plantas mutantes obtenidas originalmente.

40 Cabe destacar que, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un, una", "uno, una" y "el, la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos distintos y la referencia al "procedimiento" incluye una referencia a etapas y procedimientos equivalentes conocidos por los expertos en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los procedimientos descritos en el presente documento.

45 A menos que se indique lo contrario, la expresión "al menos", precediendo a una serie de elementos, debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento.

50 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto precise otra cosa, el término "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero indicado o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. La palabra "comprender" y sus variaciones por un lado y "contener" y sus variaciones análogas por otro se pueden usar indistintamente sin una preferencia por ninguno de ellos.

Se obtuvieron plantas de remolacha que comprenden un gen de ALS endógeno alterado (también denominado gen

de "AHAS"), que porta una mutación puntual en el codón Trp 569 (en relación con la secuencia de referencia de aminoácidos de la ALS de *Beta vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 2; esto equivale a la posición 574 de la secuencia a la que se hace referencia de *Arabidopsis thaliana* como se muestra en la SEQ ID NO: 6) y cuya la mutación puntual se obtuvo mediante varios círculos de selección en herbicidas inhibidores de ALS específicamente seleccionados.

5 Debido al hecho de que las plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento se obtuvieron aislando células vegetales mutantes espontáneas que se regeneraron directamente hasta plantas de remolacha completamente fértiles que tenían una mutación puntual, como se describe con más detalle en el presente documento. Estas plantas son no transgénicas en cuanto al gen de ALS. Además, las plantas descritas en el presente documento, así como su descendencia, son fértiles y, por tanto, útiles para fines de mejoramiento genético, sin ninguna otra manipulación que
10 pueda nuevas alteraciones adicionales del acervo genético inducidas por estrés. Dichas plantas obtenidas de acuerdo con el procedimiento de selección aplicado en el presente documento se pueden emplear directamente para generar variedades de remolacha y/o híbridos que confieren niveles agrónomicamente útiles de tolerancia a herbicidas inhibidores de ALS, permitiendo así medidas innovadoras de control de malas hierbas en zonas de cultivo de remolacha.

15 Cuando se usa en el presente documento, el término "transgénico" significa que un gen, que puede ser de la misma especie o de una distinta, se ha introducido mediante un vehículo biológico apropiado, como *Agrobacterium tumefaciens*, o por cualquier otro medio físico, como transformación de protoplastos o bombardeo de partículas, en una planta, y cuyo gen se puede expresar en el entorno del nuevo hospedador, es decir el organismo modificado genéticamente (OMG).

20 En conformidad con la definición anterior, la expresión "no transgénico" significa exactamente lo contrario, es decir, que no se ha producido introducción del respectivo gen a través de un vehículo biológico apropiado o por cualquier otro medio físico. Sin embargo, un gen mutado se puede transferir mediante polinización, bien natural o mediante un procedimiento de mejoramiento genético para producir otra planta no transgénica con respecto a este gen específico.

25 Un gen "endógeno" significa un gen de una planta que no se ha introducido en la planta mediante técnicas de ingeniería genética.

El término "secuencia", cuando se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia (o secuencias) de nucleótidos, a un polinucleótido (o polinucleótidos), a una secuencia (o secuencias) de ácido nucleico, a un ácido nucleico (o ácidos nucleicos), a una molécula de ácido nucleico, a péptidos, polipéptidos y proteínas, dependiendo del contexto en el que se use el término "secuencia".

30 Las expresiones "secuencia (o secuencias) de nucleótidos", "polinucleótido (o polinucleótidos)", "secuencia (o secuencias) de ácido nucleico", "ácido nucleico (o ácidos nucleicos)", "molécula de ácido nucleico", se usan en el presente documento indistintamente y hacen referencia a nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o a una combinación de ambos, en una forma no ramificada polimérica de cualquier longitud. Las secuencias de ácido nucleico incluyen ADN, ADNc, ADN genómico, ARN, formas sintéticas y polímeros mixtos, de cadenas tanto sentido
35 como antisentido, o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas, como los expertos en la materia apreciarán fácilmente.

40 Cuando se usa en el presente documento, el término "polipéptido" o "proteína" (ambos términos se usan indistintamente en el presente documento) significa un péptido, una proteína o un polipéptido que abarca cadenas de aminoácidos de una longitud dada, en las que los restos aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes. Sin embargo, también pueden utilizarse peptidomiméticos de tales proteínas/polipéptidos en los que el aminoácido (o aminoácidos) y/o el enlace peptídico (o enlaces peptídicos) se ha sustituido por análogos funcionales, así como otros aminoácidos distintos de los 20 codificados por genes, tal como la selenocisteína. Los péptidos, oligopéptidos y proteínas pueden denominarse polipéptidos. El término polipéptido también se refiere a, y no excluye, modificaciones del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Dichas modificaciones de describen bien en los textos básicos y en monografías más detalladas, así como en la bibliografía de investigación. El polipéptido
45 (o proteína) al que se alude preferentemente en el presente documento es el polipéptido de ALS (o proteína ALS) de *B. vulgaris* [SEQ ID NO: 2].

50 Las sustituciones de aminoácidos abarcan alteraciones de aminoácidos en que un aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido de origen natural distinto. Dichas sustituciones se pueden clasificar como "conservativas", en las que un resto de aminoácido contenido en la proteína ALS de tipo silvestre se sustituye por otro aminoácido de origen natural de carácter similar, por ejemplo, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln o Phe↔Trp↔Tyr. Las sustituciones también pueden ser "no conservativas", en las que un resto de aminoácido que está presente en la proteína ALS de tipo silvestre se sustituye por un aminoácido con propiedades distintas, tal como un aminoácido de origen natural de un grupo distinto (por ejemplo, sustitución de un aminoácido cargado o hidrófobo por alanina).
55 "Aminoácidos similares", como se usa

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "*Beta vulgaris*" se abrevia como "*B. vulgaris*". Además, en el presente documento se usa el término "remolacha". Dichas tres expresiones se usan indistintamente y debe entenderse que comprenden completamente las formas cultivadas de *Beta vulgaris* como se define en Ford-Lloyd (2005) Sources of genetic variation, Genus Beta. En: Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M (eds)

Genetics and Breeding of Sugar Beet. Science Publishers, Enfield (NH), EE.UU., pág. 25-33. De un modo similar, por ejemplo, la expresión "*Arabidopsis thaliana*" se abrevia a "*A. thaliana*". Ambas expresiones se usan indistintamente en el presente documento.

5 El término "posición", cuando se usa en el presente documento, significa la posición de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento o la posición de un nucleótido dentro de una secuencia de nucleótidos representada en el presente documento. El término "correspondiente", como se usa en el presente documento, también incluye que una posición no solo está determinada por el número de aminoácidos/nucleótidos precedentes. La posición de un nucleótido dado como se usa en el presente documento, que puede estar sustituido, puede variar debido a las deleciones o nucleótidos adicionales en otros lugares en la región no traducida (UTR, forma siglada de *untranslated region*) en 5' de ALS, incluido el promotor y/o cualquier otra secuencia reguladora o gen (incluidos exones e intrones). De un modo similar, la posición de un aminoácido dado como se usa en el presente documento, que puede estar sustituido, puede variar debido a una delección o adición de aminoácidos en el polipéptido de ALS.

10 Por tanto, con "posición correspondiente" cuando se usa en el presente documento se entiende que los nucleótidos/aminoácidos pueden diferir en el número indicado, pero todavía pueden tener aminoácidos/nucleótidos vecinos similares. Dichos aminoácidos/nucleótidos que pueden intercambiarse, deleccionarse o añadirse también están comprendidos en la expresión "posición correspondiente".

20 Para determinar si un resto nucleotídico o un resto aminoacídico en una secuencia de aminoácidos/nucleótidos de ALS dada corresponde a una determinada posición en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, el experto en la materia puede usar medios y procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo alineamientos manuales o mediante el uso programas informáticos tales como BLAST (Altschul y col., (1990), Journal of Molecular Biology, 215, 403-410), que significa Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local) o ClustalW (Thompson y col., (1994), Nucleic Acid Res., 22, 4673-4680) o cualquier otro programa adecuado para generar alineamientos de secuencias.

25 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos que codifica la ALS de tipo silvestre de *Beta vulgaris*. La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de *Beta vulgaris* procedente de la SEQ ID NO: 1. Por consiguiente, el codón en la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 codifica el aminoácido en la posición 569 (es decir, el aminoácido "Trp", de acuerdo con el código de tres letras, o "W", de acuerdo con el código de una letra) de la SEQ ID NO: 2.

30 En la alternativa para determinar si un resto nucleotídico o un resto aminoacídico en una secuencia de aminoácidos/nucleótidos de ALS dada corresponde a una determinada posición en la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO: 1, se puede usar la secuencia de nucleótidos que codifica la ALS de tipo silvestre de *A. thaliana* mostrada en la SEQ ID NO: 5. La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de *A. thaliana* procedente de la SEQ ID NO: 5.

35 Por consiguiente, el codón en la posición 1720-1722 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 codifica el aminoácido de la posición 574 (es decir, el aminoácido "Trp", de acuerdo con el código de tres letras, o "W", de acuerdo con el código de una letra) de la SEQ ID NO: 6.

40 Si la secuencia de nucleótidos de la ALS de tipo silvestre de *A. thaliana* mostrada en la SEQ ID NO: 5 se usa como secuencia de referencia (como se realiza en la mayoría de la bibliografía pertinente y, por lo tanto, se utiliza para permitir una comparación más fácil con tales secuencias conocidas), el codón que codifica un aminoácido distinto de triptófano está en una posición correspondiente a la posición 1720-1722 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *A. thaliana* mostrada en la SEQ ID NO: 5.

Sin embargo, la SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de referencia y la SEQ ID NO: 2 se prefiere como secuencia de aminoácidos de referencia en todas las divulgaciones posteriores.

45 La tabla siguiente proporciona una visión general de las secuencias de referencia usadas en el presente documento cuando se determina la posición de la mutación puntual en una secuencia de nucleótidos o la sustitución en una secuencia de aminoácidos.

SEQ ID NO:	Tipo de secuencia	Especie
1	secuencia de nucleótidos	<i>B. vulgaris</i>
2	secuencia de aminoácidos	<i>B. vulgaris</i>
3	secuencia de nucleótidos (mutada)	<i>B. vulgaris</i>
4	secuencia de aminoácidos (mutada)	<i>B. vulgaris</i>
5	secuencia de nucleótidos	<i>A. thaliana</i>
6	secuencia de aminoácidos	<i>A. thaliana</i>

Por tanto, en cualquier caso, la posición equivalente todavía se puede determinar mediante alineamiento con una secuencia de referencia, tal como la SEQ ID NO: 1 o 5, (secuencia de nucleótidos), o la SEQ ID NO: 2 o 6 (secuencia de aminoácidos).

- 5 En vista de la diferencia entre el gen de ALS de tipo silvestre de *B. vulgaris* y el gen de ALS comprendido por una planta de *B. vulgaris* descrita en el presente documento, el gen de ALS (o secuencia de polinucleótidos o de nucleótidos) comprendido por una planta de *B. vulgaris* descrita en el presente documento también se puede considerar un "gen mutante de ALS", "alelo mutante de ALS", "polinucleótido mutante de ALS" o similares. Por tanto, a lo largo de la memoria descriptiva, las expresiones "alelo mutante", "alelo mutante de ALS", "gen mutante de ALS" o "polinucleótido mutante de ALS" se usan indistintamente.
- 10 A menos que se indique lo contrario en el presente documento, estas expresiones se refieren a una secuencia de nucleótidos que comprende un codón que codifica un aminoácido distinto de triptófano en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *B. vulgaris* mostrado en la SEQ ID NO: 1. Cuando se establece en relación con la secuencia de referencia de *A. thaliana* mostrada en la SEQ ID NO: 5, la posición de los codones es 1720-1722.
- 15 Asimismo, estas expresiones se refieren a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ALS que tiene en una posición correspondiente a la posición 569 de la secuencia de aminoácidos de la proteína ALS de *Beta vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 2 un aminoácido distinto de triptófano. Cuando se establece en relación con la secuencia de referencia de *A. thaliana* mostrada en la SEQ ID NO: 6, la posición es 574.
- 20 En contraste, a menos que se indique lo contrario, las expresiones "alelo silvestre", "alelo de ALS de tipo silvestre", "gen de ALS de tipo silvestre" o "polinucleótido de ALS de tipo silvestre" se refieren a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ALS que carece de la sustitución W569 en relación con la SEQ ID NO: 2 (o sustitución W574 en relación con la SEQ ID NO: 6). Estas expresiones también se refieren a una secuencia de nucleótidos que comprenden en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *B. vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 1 un codón que codifica leucina.
- 25 Dicho "alelo de tipo silvestre", "alelo de ALS de tipo silvestre", "gen de ALS de tipo silvestre" o "polinucleótido de ALS de tipo silvestre" puede o no comprender mutaciones, distintas de la mutación que provoca la sustitución W569

En esencia, en lo que se refiere al gen de ALS, la única diferencia entre una planta de *B. vulgaris* de tipo silvestre y la planta de *B. vulgaris* descrita en el presente documento es que en una posición como se especifica en el presente documento (en particular en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *B. vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 1), la planta de *B. vulgaris* comprende un codón que codifica leucina en lugar de triptófano. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, pueden estar presentes diferencias adicionales tales como mutaciones adicionales entre el alelo de ALS de tipo silvestre y el mutante como se especifica en el presente documento. Sin embargo, estas diferencias adicionales no son importantes siempre que la diferencia explicada anteriormente esté presente.

- 30 En consecuencia, la sustitución W569 (o sustitución W574 cuando la secuencia de aminoácidos de ALS de *A. thaliana* de la SEQ ID NO: 6 se usa como referencia) es el resultado de una alteración del codón en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (o en una posición correspondiente a la posición 1720-1722 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, respectivamente). La sustitución en la posición 569 es una sustitución W→L, en la que "L" está codificado por "TTG".
- 35 En particular, la sustitución en la posición 569 es una sustitución W → L, debido a una transversión del nucleótido "G" en la posición correspondiente a la posición 1706 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (o en la posición correspondiente a la posición 1721 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, respectivamente) a un nucleótido "T". Por consiguiente, el codón en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (o en una posición correspondiente a la posición 1720-1722 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, respectivamente) se cambia de "TGG" a "TTG". Mientras que el codón "TGG" codifica triptófano, el codón "TTG" codifica leucina.

Por lo tanto, una planta de *Beta vulgaris* como se describe en el presente documento comprende en la secuencia de nucleótidos del gen de ALS endógeno, el codón TTG (que codifica leucina) en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos del gen mutante de ALS de *B. vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos (o, menos preferentemente, consistiendo en) la SEQ ID NO: 3.

Las plantas de *B. vulgaris* que codifican un polipéptido de ALS que tiene en una posición correspondiente a la posición 569 de la secuencia de aminoácidos de la proteína ALS de *Beta vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 2 un aminoácido leucina en lugar de triptófano, comprenden en la secuencia de nucleótidos del gen de ALS endógeno un codón TTG que codifica leucina en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *B. vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 1.

El término gen de "ALS" o "AHAS" de *B. vulgaris* también incluye secuencias de nucleótidos de *B. vulgaris* que son al menos el 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas a la secuencia de nucleótidos de ALS de *B. vulgaris* de la SEQ ID NO: 1 o 3, en las que estás secuencias de nucleótidos el 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas comprenden en una posición

correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 un codón TTG que codifica leucina.

Asimismo, estas secuencias nucleotídicas al menos el 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas codifican un polipéptido de ALS que comprende leucina en una posición correspondiente a la posición 569 de la SEQ ID NO: 2. Dichas secuencias de nucleótidos idénticas codifican una proteína ALS que conserva la actividad como se describe en el presente documento, más preferentemente, el polipéptido de ALS así codificado es tolerante a uno o más herbicidas inhibidores de ALS, como se describe en el presente documento. Dicho término también incluye variantes alélicas y homólogos que codifican un polipéptido de ALS que, preferentemente, es tolerante a uno o más herbicidas inhibidores de ALS como se describe en el presente documento. Para determinar si una secuencia de ácido nucleico tiene un determinado grado de identidad con las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento, el experto en la materia puede usar medios y procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, alineamientos, manuales o mediante programas informáticos tales como los mencionados más adelante en relación con la definición del término "hibridación" y grados de homología.

Por ejemplo, para buscar alineamientos locales de secuencias se puede utilizar BLAST, que significa Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local) (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410). BLAST produce alineamientos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para determinar la similitud de secuencia. Dada la naturaleza local de los alineamientos, BLAST es especialmente útil en la determinación de coincidencias exactas o en la identificación de secuencias similares. La unidad fundamental del resultado del algoritmo BLAST es el Highscoring Segment Pair (HSP), par de segmentos de alta puntuación. Un HSP consiste en dos fragmentos de secuencia de longitudes arbitrarias pero iguales cuyo alineamiento es localmente máximo y para los que la puntuación del alineamiento cumple o supera un umbral o puntuación de corte fijada por el usuario. La estrategia con BLAST es buscar los HSP entre una secuencia de consulta y una secuencia de la base de datos para evaluar la significación estadística de las coincidencias encontradas e informar solo sobre las coincidencias que satisfacen el umbral de significación seleccionado por el usuario. El parámetro E establece el umbral estadísticamente significativo para el informe de coincidencias de secuencias de la base de datos. E se interpreta como el límite superior de la frecuencia esperada de aparición al azar de un HSP (o conjunto de HSP) dentro del contexto de la búsqueda en toda la base de datos. Cualquier secuencia de la base de datos cuya coincidencia satisfaga E se informa en los resultados del programa.

Para buscar moléculas relacionadas o idénticas en bases de datos de nucleótidos tales como GenBank o EMBL se utilizan técnicas informáticas análogas que utilizan BLAST (Altschul (1997), *loc. cit.*; Altschul (1993), *loc. cit.*; Altschul (1990), *loc. cit.*). Este análisis es mucho más rápido que las hibridaciones múltiples basadas en membrana. Además, la sensibilidad de la búsqueda por ordenador se puede modificar para determinar si se categoriza cualquier coincidencia particular como exacta o similar. La base de la búsqueda es la puntuación producto, que se define como:

$$\frac{\% \text{ de identidad de secuencia} \times \% \text{ de máxima puntuación de BLAST}}{100}$$

y tiene en cuenta tanto el grado de similitud entre dos secuencias como la longitud de la coincidencia de secuencia. Por ejemplo, con una puntuación producto de 40, la coincidencia será exacta dentro de un error del 1-2 % y a 70, la coincidencia será exacta. Las moléculas similares se identifican habitualmente seleccionando las que muestran puntuaciones producto entre 15 y 40, aunque puntuaciones menores pueden identificar moléculas relacionadas.

El término polipéptido de "ALS" o "AHAS" de *B. vulgaris* también incluye secuencias de aminoácidos que son al menos el 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de ALS de la SEQ ID NO: 2 o 4, en las que estás secuencias de aminoácidos al menos el 90, 95, 97, 98 o 99 % idénticas comprenden en una posición correspondiente a la posición 569 de la SEQ ID NO: 2 un aminoácido distinto de triptófano. Dichas secuencias de aminoácidos idénticas conservan la actividad de ALS como se describe en el presente documento, más preferentemente, el polipéptido de ALS es tolerante a herbicidas inhibidores de ALS, como se describe en el presente documento.

La actividad de ALS, si es necesario, se puede medir en conformidad con el ensayo descrito en Singh (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4572-4576.

Sin embargo, las secuencias de nucleótidos de ALS a las que se hace referencia en el presente documento que codifican un polipéptido de ALS preferentemente confieren tolerancia a uno o más herbicidas inhibidores de ALS (o, al contrario, menos sensibilidad a un herbicida inhibidor de ALS) como se describe en el presente documento. Esto es debido a la mutación puntual que conduce a una sustitución de aminoácido como se describe en el presente documento.

Por consiguiente, la tolerancia a un herbicida inhibidor de ALS (o, al contrario, menos sensibilidad a un herbicida inhibidor de ALS) se puede medir por comparación de la actividad de ALS obtenida de extractos celulares de plantas que contienen la secuencia mutada de ALS y de plantas que carecen de la secuencia mutada de ALS en presencia de un herbicida inhibidor de ALS, como se describe en Singh y col. (1988) [J. Chromatogr., 444, 251-261].

Sin embargo, un ensayo de actividad más preferido para el polipéptido de ALS codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende un codón TTG que codifica leucina en una posición correspondiente a la posición 1705-

1707 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *B. vulgaris* mostrado en la SEQ ID NO: 1 se puede realizar del siguiente modo:

La secuencia codificante de una planta de tipo silvestre y una mutante de *Beta vulgaris* se clona en, por ejemplo, vectores pET-32a(+) de Novagen y los vectores se transforman en, por ejemplo, *Escherichia coli* AD494, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bacterias se cultivan preferentemente a 37 °C en medio con una presión de selección, tal como en medio LB con 100 mg/l de carbenicilina y 25 mg/l de kanamicina, se inducen con, por ejemplo, isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM a una DO₆₀₀ de, preferentemente, aproximadamente 0,6, se cultivan durante aproximadamente 16 horas a, preferentemente 18 °C y se recogen mediante centrifugación. Los sedimentos bacterianos se resuspenden en tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 7,0, que contenía tiamina-pirofosfato 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM y FAD 1 μM a una concentración de 1 gramo en peso húmedo por 25 ml de tampón y se rompen mediante tratamiento con ultrasonidos. El extracto de proteína bruta obtenida tras la centrifugación se usa para las mediciones de la actividad de ALS.

Después, se llevan a cabo ensayos de ALS en, por ejemplo, placas de microtitulación de 96 pocillos usando una modificación del procedimiento descrito por Ray (1984), *Plant Physiol.*, 75, 827-831. La mezcla de reacción contiene, preferentemente, tampón de fosfato potásico 20 mM, pH 7,0, piruvato sódico 20 mM, tiamina-pirofosfato 0,45 mM, MgCl₂, 0,45 mM, FAD 9 μM, enzima ALS y diversas concentraciones de inhibidores de ALS en un volumen final de aproximadamente 90 μl.

Los ensayos se inician añadiendo enzima y se terminan tras, preferentemente, 75 minutos de incubación a 30 °C mediante la adición de 40 μl de H₂SO₄ 0,5 M. Después de aproximadamente 60 min a temperatura ambiente, se añaden aproximadamente 80 μl de una solución de α-naftol al 1,4 % y creatina al 0,14 % en NaOH 0,7 M y después de una incubación adicional de aproximadamente 45 min a temperatura ambiente, se determina la absorbancia a 540 nm. Los valores de pI50 para la inhibición de la ALS se determinaron como describe Ray (1984), *Plant Physiol.*, 75, 827-831, utilizando la adición del programa de ajuste a la curva XLFit Excel-in versión 4.3.1 de ID Business Solutions Limited, Guildford, RU.

Cuando las plantas se usan, la actividad de ALS se determina preferentemente en extractos celulares o extractos foliares de *B. vulgaris* de tipo silvestre y en extractos celulares o extractos foliares del mutante obtenido en presencia de diversas concentraciones de herbicidas inhibidores de ALS, preferentemente herbicidas de sulfonilurea o herbicidas de sulfonilamino-carboniltriaolinona, más preferentemente en presencia de diversas concentraciones del herbicida inhibidor de ALS "foramsulfurón". Por tanto, preferentemente se extrae la ALS de hojas de remolacha azucarera o cultivos de tejidos de remolacha azucarera como describe Ray (1984) en *Plant Physiol* 75:827-831

Se prefiere que las plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento sean menos sensibles a un inhibidor de ALS, más preferentemente sea al menos 100 veces menos sensible, más preferentemente, 500 veces, incluso más preferentemente 1000 veces y muy preferentemente menos de 2000 veces. Menos sensibles, cuando se usa en el presente documento, pueden, al contrario, verse como "más tolerables" o "más resistentes". De un modo similar, "más tolerables" o "más resistentes" pueden, al contrario, verse como "menos sensibles".

Por ejemplo, la planta de *B. vulgaris* descritas en el presente documento y, en particular, la planta de *B. vulgaris* descrita en los Ejemplos adjuntos son/es al menos 2000 veces menos sensibles al herbicida inhibidor de ALS foramsulfurón (un miembro de la subclase de "herbicidas de sulfonilurea" de los inhibidores de ALS) en comparación con la enzima de tipo silvestre.

Preferentemente, las plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento son menos sensibles a diversos miembros de herbicidas inhibidores de ALS, como los herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de sulfonilamino-carboniltriaolinona y herbicidas de imidazolinona. Preferentemente se seleccionan los herbicidas de sulfonilurea y los herbicidas de sulfonilamino-carboniltriaolinona, contra los que dichas plantas son menos sensibles. En una realización particular preferida, las plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento son menos sensibles al herbicida inhibidor de ALS foramsulfurón (herbicida de sulfonilurea), solo o en combinación con uno o más herbicidas inhibidores de ALS adicionales, ya sea de la subclase de los herbicidas de sulfonilurea o de otra subclase de herbicidas inhibidores de ALS.

Por lo tanto, las plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento que son, preferentemente, menos sensibles a un herbicida inhibidor de ALS pueden, asimismo, caracterizarse por ser "más tolerantes" a un "inhibidor de ALS" (es decir, una planta tolerante al inhibidor de ALS).

Por tanto, una planta "tolerante al inhibidor de ALS" se refiere a una planta, en particular a una planta de *B. vulgaris* que es más tolerante a al menos un herbicida inhibidor de ALS a un nivel que normalmente inhibiría el crecimiento de una planta normal o de tipo silvestre, preferentemente el herbicida inhibidor de ALS controla una planta normal o de tipo silvestre. Dicha planta normal o de tipo silvestre no comprende en la secuencia de nucleótidos de cualquier alelo del gen de ALS endógeno, un codón TTG que codifica leucina en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *B. vulgaris* mostrado en la SEQ ID NO: 1.

Dicha secuencia de nucleótidos puede, en general, caracterizarse también por ser una secuencia de nucleótidos "tolerante al herbicida inhibidor de ALS". Por "secuencia de nucleótidos tolerante al herbicida inhibidor de ALS" se entiende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos la

mutación que da como resultado un codón TTG que codifica leucina con respecto a una proteína ALS que no tiene leucina en una posición correspondiente a la posición 569 de la secuencia de aminoácidos de la proteína ALS de *B. vulgaris* mostrada en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha al menos una mutación da como resultado la expresión de una proteína ALS menos sensible a un herbicida inhibidor de ALS.

5 Por "proteína ALS tolerante a herbicidas" se entiende que tal proteína ALS presenta mayor actividad de ALS, con respecto a la actividad de ALS de una proteína ALS de tipo silvestre, en presencia de al menos un herbicida inhibidor de ALS que se sabe que interfiere con la actividad de ALS y a una concentración o nivel de dicho herbicida que se sabe que inhibe la actividad de ALS de la proteína ALS de tipo silvestre.

10 De un modo similar, las expresiones "herbicida (o herbicidas) inhibidor de ALS" o simplemente "inhibidor (o inhibidores) de ALS" se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, un "herbicida inhibidor de ALS" o un "inhibidor de ALS" no pretende limitarse a un único herbicida que interfiera con la actividad de la enzima ALS. Por tanto, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente a partir del contexto, un "herbicida inhibidor de ALS" o un "inhibidor de ALS" puede ser un herbicida o una mezcla de dos, tres o cuatro, o más, herbicidas conocidos en la técnica, preferentemente como se especifica en el presente documento, cada uno de los cuales interfiere con la actividad de la enzima ALS.

15 Sorprendentemente, se descubrió que incluso la mutación puntual única descrita en el presente documento confiere niveles agrónomicamente útiles y estables de tolerancia a herbicidas inhibidores de ALS en plantas de *B. vulgaris*, así como en sus descendencias, en particular si se establece homocigosidad. En comparación con las plantas de *Beta vulgaris* tolerantes a herbicida del mismo acervo genético en que tal mutación solo está presente de forma heterocigótica, las plantas de *Beta vulgaris* tolerantes a herbicida que son homocigóticas para la mutación revelaron un nivel mejor desde el punto de vista agrónomico de tolerancia a herbicida inhibidor de ALS.

20 Por lo tanto, se prescribe una planta de *Beta vulgaris* tolerante a herbicidas inhibidores de ALS que tiene una mutación del gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno, en la que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene un aminoácido distinto de triptófano en la posición 569 del polipéptido de ALS. La mutación respectiva puede ser la única mutación del gen de ALS. La mutación respectiva puede estar presente de forma homocigótica y la mutación respectiva está presente de forma homocigótica como la única mutación del gen de ALS endógeno.

25 Tampoco se podría esperar que solo una mutación de un gen de ALS en *Beta vulgaris* fuera suficiente, ya que, por ejemplo, el documento WO 2010/037061 muestra que son necesarios mutantes dobles o triples en el gen de ALS para conferir la tolerancia agrónomicamente útil a herbicidas inhibidores de ALS.

30 También se describen en el presente documento plantas que contienen al menos un alelo del gen de ALS endógeno, un codón TTG que codifica leucina en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de la secuencia de nucleótidos del gen de ALS de *B. vulgaris* mostrado en la SEQ ID NO: 1, y que contiene uno (en caso de diploidía) o más alelos adicionales (en caso de poliploidía) que tienen una o más mutaciones adicionales en el gen de ALS endógeno.

35 Por consiguiente, cuando se usa en el presente documento el término "heterocigótico" o "de forma heterocigótica" significa que una planta descrita en el presente documento tiene distintos alelos en un locus particular, en particular en el locus del gen de ALS.

"Homocigótico" o "de forma homocigótica" indica que una planta descrita en el presente documento tiene dos copias del mismo alelo en distintas cadenas de ADN, en particular en el locus del gen de ALS.

40 Como se usa en el presente documento, a menos que claramente se indique lo contrario, el término "planta" significa una planta en cualquier fase de desarrollo.

Se prefiere que la planta de *Beta vulgaris* descrita en el presente documento sea euploide o aneuploide. Una planta euploide puede ser, preferentemente, haploide, diploide, tetraploide, hexaploide, octaploide, decaploide o dodecaploide, mientras que una planta aneuploide puede ser, preferentemente, triploide o pentaploide.

45 Las partes de plantas pueden estar unidas o separadas de una planta entera intacta. Dichas partes de planta incluyen, pero sin limitación, órganos, tejidos y células de una planta, y, preferentemente, semillas.

50 Por consiguiente, la planta de *B. vulgaris* descrita en el presente documento es no transgénica con respecto a un gen de ALS endógeno. Por supuesto, los genes extraños se pueden transferir a la planta mediante ingeniería genética o por procedimientos convencionales tales como cruzamiento. Dichos genes pueden ser genes que confieren tolerancias a herbicidas, preferentemente que confieren tolerancias a herbicidas distintas de tolerancias a herbicidas inhibidores de ALS, genes que mejoran el rendimiento, genes que mejoran las resistencias a los organismos biológicos y/o genes relacionados con modificaciones del contenido.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de la planta de *Beta vulgaris* y partes de la misma como se describe en el presente documento, que comprende siguientes las etapas:

55 (a) exponer callos, preferentemente de remolacha azucarera, a aproximadamente 10^{-7} M - 10^{-9} M de un herbicida

inhibidor de ALS, preferentemente foramsulfurón;

(b) seleccionar colonias celulares que puedan crecer en presencia de hasta 3×10^{-6} M de un herbicida inhibidor de ALS, preferentemente foramsulfurón [CAS RN 173159-57-4];

(c) regenerar brotes en presencia de un herbicida inhibidor de ALS, preferentemente foramsulfurón;

- 5 (d) seleccionar plántulas regeneradas con un herbicida inhibidor de ALS, preferentemente foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio [CAS RN 144550-36-7] y/o una mezcla de ambos, en la que la dosis de foramsulfurón es, preferentemente, equivalente a 7-70 g p.a./ha y la dosis de yodosulfurón-metil-sodio es, preferentemente, equivalente a 1-10 g p.a./ha.

10 Las plántulas regeneradas obtenidas de acuerdo con los procedimientos (a) a (d) anteriores se pueden emplear para la fabricación adicional de plantas de *Beta vulgaris* aplicando las etapas (e) a (m) siguientes:

(e) micropropagación vegetativa de las plántulas individuales de la etapa (d) para rescatar distintas variantes positivas estableciendo una línea celular (clon) de cada plántula tolerante a herbicida inhibidor de ALS;

(f) almacenamiento prolongado de cada clon establecido en el estado vegetativo;

- 15 (g) transferencia de plantas clonadas de cada clon del almacenamiento prolongado al invernadero;

(h) vernalización y adaptación en cámaras de vernalización para inducir la floración;

(i) transferencia de las plantas vernalizadas a recintos de crecimiento (con temperatura y luz controladas);

(j) selección de las mejores plantas que desprenden polen de los mejores clones con floración para el cruzamiento con plantas emasculadas de una línea de élite, pero sensible al herbicida inhibidor de ALS para superar el impacto negativo de la variación somaclonal sobre la fertilidad generativa (macho y hembra) de las plántulas de la etapa (d);

- 20 (k) retrocruzamiento con la línea de élite hasta restablecer la fertilidad y, por último, autofecundar plantas heterocigóticas para alcanzar el estado homocigótico;

(l) producir cruzamientos de prueba con una pareja sensible al herbicida inhibidor de ALS y semillas autofecundadas de cada línea retrocruzada para evaluaciones de campo;

- 25 (m) aplicar tasas de dosis agrónomicamente procedentes de distintos herbicidas inhibidores de ALS para seleccionar la línea con el mejor rendimiento, preferentemente en su estado homocigótico.

Las líneas obtenidas de acuerdo con las etapas (a) a (m) anteriores sientan la base para el desarrollo de variedades comerciales siguiendo procedimientos conocidos en la comunidad de mejoradores, sustentados por técnicas moleculares de mejoramiento genético (como el mejoramiento genético asistido por marcadores o la selección asistida por marcadores) para acelerar los procedimientos y garantizar la selección correcta de plantas para obtener la mutación en su forma homocigótica o, en caso de contener una o más mutaciones en diversas ubicaciones del gen endógeno que codifica la ALS, para realizar la selección correcta de plantas heterocigóticas que contienen al menos uno de los alelos de la mutación W569 como se describe en el presente documento. (Para una revisión, véase Bertrand C.Y. y col. (2008), Phil. Trans. R. Soc. B., 363, 557-572)

- 35 Los callos se obtienen por los medios y procedimientos conocidos comúnmente en la técnica, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos adjuntos.

Las semillas obtenidas en la etapa (m) anterior se han depositado en el NCIMB, Aberdeen, RU, con el Número NCIMB 41705.

- 40 Además, se describe un procedimiento para la producción de una planta de *Beta vulgaris*, y partes de la misma, tolerante a herbicidas que comprende (i) una mutación de un gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno, en el que el gen de la ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene leucina en una posición 569 del polipéptido de ALS, y (ii) una mutación adicional en el gen de ALS endógeno, que comprende las siguientes etapas:

(a) producir una planta de *Beta vulgaris* tolerante al herbicida inhibidor de ALS que comprende una mutación de un gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno, en el que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene leucina en una posición 569 del polipéptido de ALS (parental A);

- 45 (b) cruzar el parental A con una planta de *Beta vulgaris* (parental B) que contiene una o más mutaciones adicionales en el gen de ALS endógeno, en posiciones que difieren de la posición de aminoácido 569;

(c) obtener una progenie de *Beta vulgaris* que es heterocigótica para la mutación del gen de ALS de la posición de aminoácido 569 y para una o más de cualquiera de las mutaciones del gen de ALS adicionales codificadas por el parental B;

- 50 (d) en el que el procedimiento de mejoramiento genético está controlado por

(i) la aplicación de mejoramiento genético asistido por marcador y/o técnicas de microsecuenciación, y /o

(ii) la aplicación de dosis agrónomicamente procedentes de uno o más herbicidas inhibidores de ALS a los que la progenie generada de acuerdo con la etapa (c) es tolerante.

- 55 En un ejemplo no limitante, las plantas de remolacha azucarera descritas en el presente documento se obtuvieron realizando el siguiente protocolo no limitante. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se puede usar el mismo protocolo para la obtención de plantas de *B. vulgaris* distintas de remolacha azucarera.

Se iniciaron cultivos celulares de remolacha azucarera a partir de plantones de un genotipo 7T9044 diploide de

remolacha azucarera (como, por ejemplo, describe Alexander Dovzhenko, Tesis Doctoral, Título: "Hacia la transformación de plastidios en colza (*Brassica napus* L.) y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.)", Ludwig-Maximilians-Universität, Múnich, Alemania, 2001).

5 Se sumergieron semillas de remolacha azucarera durante 60 segundos en etanol al 70 %, después se aclararon dos veces en agua estéril con detergente al 0,01 %, y después se incubaron durante 1-4 horas en blanqueador de NaOCl al 1 %. Después de eso, las semillas se lavaron 3 veces con H₂O estéril y las semillas se almacenaron en agua estéril durante una noche a 4 °C. Los embriones se aislaron después usando pinzas y bisturí.

10 Los embriones recién preparados se sumergieron en NaOCl al 0,5 % durante 30 min y después se lavaron 3 veces en agua estéril. Tras la última etapa de lavado se colocaron en medio agar MS sin hormonas (Murashige y Skoog (1962), *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497). Los embriones que se desarrollaron en plantones estériles se usaron para el inicio de cultivos celulares regenerables de remolacha azucarera.

15 Los cotiledones y los hipocótilos se cortaron en segmentos de 2-5 mm de longitud y después se cultivaron en medio MS solidificado con agar (al 0,8 %) que contenía 1 mg/l de bencilaminopurina (BAP) o 0,25 mg/l de tidiazurón (TDZ). Cuatro semanas más tarde, los cultivos de brotes en desarrollo se transfirieron a medio agar recién preparado de la misma composición y después se subcultivaron a intervalos mensuales. Los cultivos se mantuvieron a 25 °C con luz tenue con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h.

20 Tras 7-10 subcultivos, los cultivos de brotes que se cultivaron en el medio que contenía tidiazurón formaron un tipo de callo distinto, que era de crecimiento rápido, blando y friable. El color de este tipo de callo era amarillento o verde claro. Algunos de estos callos friables producían consistentemente primordios de brotes que contenían clorofila a partir de estructuras similares a embriones. Estos callos regenerables de crecimiento rápido se usaron para la selección de mutantes de remolacha azucarera tolerantes a herbicida inhibidor de ALS.

25 Cuando este tipo de callo se expuso a 10⁻⁹ M de la sulfonilurea foramsulfurón (CAS RN 173159-57-4), las células sobrevivieron, pero produjeron menos del 50 % de la biomasa de sus hermanas en medio desprovisto del inhibidor. En medio que contenía foramsulfurón 3 x 10⁻⁸ M no se detectó crecimiento. Para los experimentos de selección de mutantes a gran escala se escogió foramsulfurón 10⁻⁷ M. Las colonias celulares supervivientes y en crecimiento se numeraron y transfirieron tras 4-6 semanas a medio recién preparado que contenía 3 x 10⁻⁷ M del inhibidor. Una de estas colonias celulares pudo crecer no solo a esta concentración del inhibidor sino incluso en presencia de 3 x 10⁻⁶ M de foramsulfurón. A partir de este clon (SB574TL) se regeneraron brotes en presencia del herbicida inhibidor de ALS y, después, los brotes se transfirieron a medio MS que contenía 0,05 mg/l de ácido naftalenacético (NAA).

30 Al cabo de 4-12 semanas los brotes formaron raíces y después se transfirieron a recipientes estériles para plantas llenos de perlita húmeda esterilizada, se regaron con ingredientes inorgánicos de MS a la mitad de la concentración. Como alternativa, las plántulas se transfirieron directamente desde el medio solidificado con agar a una mezcla de suelo que contenía perlita en el invernadero. Durante los primeros 10-15 días tras la transferencia al sustrato que contenía suelo, las plantas se mantuvieron en un ambiente con alta humedad en el aire. Durante y después de llevarlas a los regímenes normales de humedad en el aire de invernadero, las plantas se mantuvieron en el invernadero con luz artificial (12 h) a temperaturas de día/noche de 20 +/-3 °C/ 15 +/-2 °C.

35 3-5 semanas más tarde, las plantas regeneradas a partir del cultivo de células (SB574TL) tolerantes a foramsulfurón obtenidas anteriormente, así como de los cultivos de células de tipo silvestre se trataron con foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio (CAS RN 144550-3-7) y una mezcla de ambos principios activos. Las dosis de herbicida analizadas fueron equivalentes a 7-70 g p.a./ha para foramsulfurón y 1-10 g p.a./ha para yodosulfurón-metil-sodio. Las plantas regeneradas a partir de esta línea celular tolerante toleraron incluso las dosis más altas de herbicida (foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio y sus mezclas en la relación de 7:1, mientras que incluso las dosis más bajas mataban a las plantas de tipo silvestres.

Las descendencias se analizaron del siguiente modo (de un modo no limitante):

45 Basándose en SB574TL, las semillas F2 y F3 de híbridos experimentales que confieren el alelo de resistencia en el estado heterocigótico, así como semillas F4-F6 que confieren el alelo mutante en el estado homocigótico, se sembraron en el campo y se trataron con foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio, así como con mezclas de ambos herbicidas inhibidores de ALS cuando las plantas desarrollaron 3-5 hojas de roseta. Los plantones homocigóticos toleraron mezclas de 35 g de foramsulfurón/ha + 7 g de yodosulfurón-metil-sodio/ha sin retraso del crecimiento ni signos de daño visible. En varios casos, las líneas heterocigóticas mostraron signos de crecimiento retardado y algo de clorosis foliar a estas tasas, pero se recuperaron al cabo de 3-5 semanas, mientras que los plantones convencionales de remolacha azucarera murieron con los herbicidas inhibidores de ALS.

55 Los mutantes de ALS se caracterizaron del siguiente modo:
LGC Genomics GmbH, Berlín, Alemania realizó extracción y análisis de secuencias de ácidos nucleicos del mutante obtenido, de acuerdo con protocolos convencionales modificados.

La secuencia de ácido nucleico obtenida del mutante de remolacha azucarera SB574TL se muestra en la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 4 representa la correspondiente secuencia de aminoácidos, mientras que la SEQ ID NO: 1 se obtuvo tras secuenciar la planta de remolacha azucarera de tipo silvestre que se tomó como material de partida. La SEQ ID

ES 2 874 226 T3

NO: 2 representa la correspondiente secuencia de aminoácidos de la remolacha azucarera de tipo silvestre. La comparación de todas estas secuencias muestra que solo existe la mutación en la posición 574, pero no tuvo lugar ningún otro cambio en ninguna otra parte de este gen de ALS endógeno.

5 SEQ ID NO: 1
 (1) ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCAACATTTTCCCCTTCTCAACTCCATTAACCAAAACC
 SEQ ID NO: 3
 (1) ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCAACATTTTCCCCTTCTCAACTCCATTAACCAAAACC
 SEQ ID NO: 1
 (61) CTAAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCTCCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA
 10 SEQ ID NO: 3
 (61) CTAAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCTCCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA
 SEQ ID NO: 1
 (121) ACTCCACTCTTTCACCGTCCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCACAAATCATCCGCC
 SEQ ID NO: 3
 (121) ACTCCACTCTTTCACCGTCCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCACAAATCATCCGCC
 15 SEQ ID NO: 1
 (181) ATTA AAACACAAACTCAAGCACCTTCTTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTCGTTTCT
 SEQ ID NO: 3
 (181) ATTA AAACACAAACTCAAGCACCTTCTTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTCGTTTCT
 20 SEQ ID NO: 1
 (241) CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT
 SEQ ID NO: 3
 (241) CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT
 25 SEQ ID NO: 1
 (301) GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGCTTACCCTGGTGGTGCATCTATGGAAATCCACCAAGCT
 SEQ ID NO: 3
 (301) GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGCTTACCCTGGTGGTGCATCTATGGAAATCCACCAAGCT
 SEQ ID NO: 1
 (361) CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTTC
 30 SEQ ID NO: 3
 (361) CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTTC
 SEQ ID NO: 1
 (421) GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT
 SEQ ID NO: 3
 (421) GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT
 35 SEQ ID NO: 1
 (481) CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT
 SEQ ID NO: 3
 (481) CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT
 40 SEQ ID NO: 1
 (541) GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT
 SEQ ID NO: 3
 (541) GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT
 SEQ ID NO: 1
 (601) CCAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG
 45 SEQ ID NO: 3
 (601) CCAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG
 SEQ ID NO: 1
 (661) GATATTCTAGAAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT
 50 SEQ ID NO: 3
 (661) GATATTCTAGAAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT
 SEQ ID NO: 1
 (721) GTTTTGATTGATCTTCTAAAGATATTCAGCAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG
 SEQ ID NO: 3
 (721) GTTTTGATTGATCTTCTAAAGATATTCAGCAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG
 55 SEQ ID NO: 1
 (781) CCTTTTAAGTTGGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTTCGACGAATGAG
 SEQ ID NO: 3
 (781) CCTTTTAAGTTGGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTTCGACGAATGAG
 60 SEQ ID NO: 1
 (841) GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGTAT
 SEQ ID NO: 3
 (841) GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGTAT
 SEQ ID NO: 1
 (901) GTGGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG

ES 2 874 226 T3

SEQ ID NO: 3
(901) GTGGGAGGTGGGTGTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG
SEQ ID NO: 1
5 (961) ATTCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGGTCTTACCCTTGTAATGATGAACTGTCT
SEQ ID NO: 3
(961) ATTCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGGTCTTACCCTTGTAATGATGAACTGTCT
SEQ ID NO: 1
(1021) CTTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAAGCGGAT
SEQ ID NO: 3
10 (1021) CTTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAAGCGGAT
SEQ ID NO: 1
(1081) TTGTTGCTTGTCTTCGGGGTTAGGTTTGATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT
SEQ ID NO: 3
(1081) TTGTTGCTTGTCTTCGGGGTTAGGTTTGATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT
SEQ ID NO: 1
15 (1141) GCTAGCCGTGCTAAGATTGTGCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG
SEQ ID NO: 3
(1141) GCTAGCCGTGCTAAGATTGTGCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG
SEQ ID NO: 1 (1201)
20 CAGCCCCATGTGTCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT
SEQ ID NO: 3 (1201)
CAGCCCCATGTGTCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT
SEQ ID NO: 1
25 (1261) CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT
SEQ ID NO: 3
(1261) CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT
SEQ ID NO: 1
(1321) GAGCAGAAGAAGGAATTCCTACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA
SEQ ID NO: 3
30 (1321) GAGCAGAAGAAGGAATTCCTACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA
SEQ ID NO: 1 (1381)
TATGCCATTCAGGTGCTTGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGTT
SEQ ID NO: 3 (1381)
TATGCCATTCAGGTGCTTGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGTT
SEQ ID NO: 1
35 (1441) GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCCTCGCCAATGGCTG
SEQ ID NO: 3
(1441) GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCCTCGCCAATGGCTG
SEQ ID NO: 1
40 (1501) ACCTCTGGTGGGTTGGGGGCTATGGGGTTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAGTT
SEQ ID NO: 3
(1501) ACCTCTGGTGGGTTGGGGGCTATGGGGTTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAGTT
SEQ ID NO: 1
45 (1561) GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTATGAATGTT
SEQ ID NO: 3
(1561) GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTATGAATGTT
SEQ ID NO: 1
(1621) CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGGAAAATCTCCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT
SEQ ID NO: 3
50 (1621) CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGGAAAATCTCCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT
SEQ ID NO: 1
(1681) CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATGGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGCACAT
SEQ ID NO: 3
(1681) CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGCACAT
SEQ ID NO: 1
55 (1741) ACATACCTTGAAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT
SEQ ID NO: 3
(1741) ACATACCTTGAAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT
SEQ ID NO: 1
60 (1801) GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCGTGTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT
SEQ ID NO: 3
(1801) GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCGTGTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT
SEQ ID NO: 1
65 (1861) CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG
SEQ ID NO: 3
(1861) CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG

SEQ ID NO: 1
 (1921) CATGTGTTGCCTATGATTCCAAGTGGTGCCGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT
 SEQ ID NO: 3
 (1921) CATGTGTTGCCTATGATTCCAAGTGGTGCCGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT
 5 SEQ ID NO: 1
 (1981) GGAAGAACCTCTTATTGA
 SEQ ID NO: 3
 (1981) GGAAGAACCTCTTATTGA
 SEQ ID NO: 2
 10 (1) MAATFTNPTFSPSSTPLTKLKSQSSISSTLPFSTPPKTPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA
 SEQ ID NO: 4
 (1) MAATFTNPTFSPSSTPLTKLKSQSSISSTLPFSTPPKTPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA
 SEQ ID NO: 2
 15 (61) IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQA
 SEQ ID NO: 4
 (61) IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQA
 SEQ ID NO: 2
 (121) LTRSKTIRNVLPRHEQGGVFAAEGYARATGKVGVCATSGPGATNLVSGLADALLDSVPL
 SEQ ID NO: 4
 20 (121) LTRSKTIRNVLPRHEQGGVFAAEGYARATGKVGVCATSGPGATNLVSGLADALLDSVPL
 SEQ ID NO: 2
 (181) VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSRPGP
 SEQ ID NO: 4
 (181) VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSRPGP
 25 SEQ ID NO: 2
 (241) VLIDLPKDIQQQLVVPDWRPFKLGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSESKKPVLY
 SEQ ID NO: 4
 (241) VLIDLPKDIQQQLVVPDWRPFKLGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSESKKPVLY
 SEQ ID NO: 2
 30 (301) VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLGSPCNDLSLHMLGMHGTVYANYAVDKAD
 SEQ ID NO: 4
 (301) VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLGSPCNDLSLHMLGMHGTVYANYAVDKAD
 SEQ ID NO: 2
 35 (361) LLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSICADVKLALRGMNKI
 SEQ ID NO: 4
 (361) LLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSICADVKLALRGMNKI
 SEQ ID NO: 2
 (421) LESRIGKLNLDLDFSKWREELGEQKKEFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVDELDTNGNAIISTGV
 SEQ ID NO: 4
 40 (421) LESRIGKLNLDLDFSKWREELGEQKKEFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVDELDTNGNAIISTGV
 SEQ ID NO: 2
 (481) GQHQMWAAQHYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AVARPD AVVV DIDGDGSFIMNV
 SEQ ID NO: 4
 (481) GQHQMWAAQHYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AVARPD AVVV DIDGDGSFIMNV
 45 SEQ ID NO: 2
 (541) QELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNP SKSADIFPDMLKFA
 SEQ ID NO: 4
 (541) QELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNP SKSADIFPDMLKFA
 SEQ ID NO: 2
 50 (601) EACDIP SARVSNVADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVPMIPSGAGFKDTITEGD
 SEQ ID NO: 4
 (601) EACDIP SARVSNVADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVPMIPSGAGFKDTITEGD
 SEQ ID NO: 2
 (661) GRTSY-
 55 SEQ ID NO: 4
 (661) GRTSY-

Sin embargo, generalmente se prefiere que las plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento y partes de las mismas sean agronómicamente explotables. "Agronómicamente explotables" significa que las plantas de *B. vulgaris* y partes de las mismas son útiles para fines agronómicos. Por ejemplo, las plantas de *B. vulgaris* deberían servir para el fin de ser útiles en la producción de azúcar, producción de biocombustible (tal como biogás, biobutanol), producción de etanol, producción de betaína y/o uridina. La expresión "agronómicamente explotable", cuando se usa en el presente documento, también incluye que las plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento son preferentemente menos sensibles contra un herbicida inhibidor de ALS, más preferentemente es al menos 100 veces menos sensibles, más preferentemente, 500 veces, incluso más preferentemente 1000 veces y muy preferentemente menos de 2000 veces. El herbicida inhibidor de ALS es uno o más descritos en el presente documento,

preferentemente es foramsulfurón solo o en combinación con uno o más herbicidas inhibidores de ALS adicionales de la subclase de los herbicidas de sulfonilurea o cualquier otra subclase de los herbicidas inhibidores de ALS, muy preferentemente es foramsulfurón en combinación con un herbicida de sulfonilurea adicional y/o un inhibidor de ALS de la subclase de herbicidas de sulfonilaminocarboniltriazolinona.

- 5 Preferentemente, las plantas de *B. vulgaris* agrónomicamente explotables, muy preferentemente plantas de remolacha azucarera, descritas en el presente documento, son completamente fértiles, más preferentemente tienen fertilidad de tipo silvestre. La fertilidad es de suma importancia para que una planta de *B. vulgaris* sea explotable agrónomicamente.

10 Un ejemplo de una planta de *B. vulgaris* agrónomicamente explotable es la remolacha azucarera. Una planta de remolacha azucarera descrita en el presente documento, cuando se cultiva en un área de rendimiento de una hectárea (aproximadamente 80.000 a 90.000 remolachas azucareras) debería servir preferentemente para la producción de al menos 4 toneladas de azúcar.

15 Como alternativa, una planta de remolacha azucarera descrita en el presente documento debería contener, preferentemente, un contenido de azúcar de entre el 15-20 %, preferentemente al menos el 17 % para que sea agrónomicamente explotable. Por tanto, se describen plantas de remolacha azucarera que contienen un contenido de azúcar de entre el 15-20 %, preferentemente al menos el 17 %.

20 Las plantas descritas en el presente documento se pueden identificar usando cualquier procedimiento de análisis genotípico. La evaluación genotípica de las plantas incluye el uso de técnicas tales como electroforesis con isozima, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (los RFLP), ADN polimórficos amplificados aleatoriamente (los RAPD), reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR), PCR específica de alelo (AS-PCR), identificación genética por amplificación de ADN (DAF), regiones amplificadas caracterizadas por secuencia (SCAR), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (los AFLP), repeticiones simples de secuencia (las SSR) que también se denominan "Microsatélites". Composiciones y procedimientos adicionales para el análisis del genotipo de las plantas proporcionadas en el presente documento incluyen los procedimientos desvelados en la publicación de EE.UU. N.º 2004/0171027, la publicación de EE.UU. N.º 2005/02080506 y la publicación de EE.UU. N.º 2005/0283858.

25 La planta de *Beta vulgaris* descrita en el presente documento y/o las partes cosechables o material de propagación descritos en el presente documento pueden usarse para la fabricación/mejoramiento genético de plantas de *Beta vulgaris*. Los procedimientos para la fabricación/mejoramiento genético de plantas de *B. vulgaris* se describen en otro lugar en el presente documento. Dichos procedimientos para la fabricación/mejoramiento genético se pueden usar para generar plantas de *B. vulgaris* descritas en el presente documento que además comprenden nuevos rasgos de plantas tales como resistencia al estrés, como, pero sin limitación, estrés por sequía, calor, frío o salino, y similares.

30 Además, se describe el uso de la planta de *Beta vulgaris* tolerante a herbicidas descrita en el presente documento y/o partes cosechables o material de propagación derivado de la misma en un procedimiento de cribado para la selección de herbicidas inhibidores de ALS.

35 Una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas se obtendrá a partir de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Aislamiento de mutantes

40 Se iniciaron cultivos celulares de remolacha azucarera a partir de plántones de un genotipo 7T9044 diploide de remolacha azucarera (como, por ejemplo, describe Alexander Dovzhenko, Tesis Doctoral, Título: "Hacia la transformación de plastidios en colza (*Brassica napus* L.) y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.)", Ludwig-Maximilians-Universität, Múnich, Alemania, 2001).

45 Se sumergieron semillas de remolacha azucarera durante 60 segundos en etanol al 70 %, después se aclararon dos veces en agua estéril con detergente al 0,01 %, y después se incubaron durante 1-4 horas en blanqueador de NaOCl al 1 %. Después de eso, las semillas se lavaron 3 veces con H₂O estéril y las semillas se almacenaron en agua estéril durante una noche a 4 °C. Los embriones se aislaron después usando pinzas y bisturí.

Los embriones recién preparados se sumergieron en NaOCl al 0,5 % durante 30 min y después se lavaron 3 veces en H₂O estéril. Tras la última etapa de lavado se colocaron en medio agar MS sin hormonas (Murashige y Skoog (1962), *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497). Los embriones que se desarrollaron en plántones estériles se usaron para el inicio de cultivos celulares regenerables de remolacha azucarera.

50 Los cotiledones y los hipocótilos se cortaron en segmentos de 2-5 mm de longitud y después se cultivaron en medio agar MS solidificado con agar (al 0,8 %) que contenía 1 mg/l de bencilaminopurina (BAP) o 0,25 mg/l de tidiazurón (TDZ). Cuatro semanas más tarde, los cultivos de brotes en desarrollo se transfirieron a medio agar MS recién preparado de la misma composición y después se subcultivaron a intervalos mensuales. Los cultivos se mantuvieron a 25 °C con luz tenue con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h.

55 Tras 7-10 días, los subcultivos de los cultivos de brotes que se cultivaron en el medio que contenía tidiazurón formaron un tipo de callo distinto, que era de crecimiento rápido, blando y friable. El color de este tipo de callo era amarillento o verde claro. Algunos de estos callos friables producían consistentemente primordios de brotes que contenían clorofila a partir de estructuras similares a embriones. Estos callos regenerables de crecimiento rápido se usaron para la

selección de mutantes de remolacha azucarera tolerantes a herbicida inhibidor de ALS.

5 Cuando este tipo de callo se expuso a 10^{-9} M del herbicida inhibidor de ALS foramsulfurón (que pertenece a la subclase de sulfonilureas, véase anteriormente), las células sobrevivieron, pero produjeron menos del 50 % de la biomasa de sus hermanas en medio desprovisto del inhibidor. En medio que contenía foramsulfurón 3×10^{-8} M no se detectó
 10 crecimiento. Para los experimentos de selección de mutantes a gran escala se escogió foramsulfurón 10^{-7} M. Las colonias celulares supervivientes y en crecimiento se numeraron y transfirieron tras 4-6 semanas a medio recién preparado que contenía 3×10^{-7} M del inhibidor. Una de estas colonias celulares pudo crecer no solo a esta concentración del inhibidor sino incluso en presencia de 3×10^{-6} M de foramsulfurón. A partir de este clon (SB574TL), se regeneraron brotes en presencia del herbicida inhibidor de ALS y, después, los brotes se transfirieron a medio MS que contenía 0,05 mg/l de ácido naftalenacético (NAA).

15 Al cabo de 4-12 semanas los brotes formaron raíces y después se transfirieron a recipientes estériles para plantas llenos de perlita húmeda esterilizada, se regaron con ingredientes inorgánicos de MS a la mitad de la concentración. Como alternativa, las plántulas se transfirieron directamente desde el medio solidificado con agar a una mezcla de suelo que contenía perlita en el invernadero. Durante los primeros 10-15 días tras la transferencia al sustrato que
 20 contenía suelo, las plantas se mantuvieron en un ambiente con alta humedad en el aire. Durante y después de llevarlas a los regímenes normales de humedad en el aire de invernadero, las plantas se mantuvieron en el invernadero con luz artificial (12 h) a temperaturas de día/noche de 20 ± 3 °C/ 15 ± 2 °C.

25 3-5 semanas más tarde, las plantas regeneradas a partir del cultivo de células (SB574TL) tolerantes a foramsulfurón obtenidas anteriormente, así como de los cultivos de células de tipo silvestre se trataron con foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio (CAS RN 144550-3-7) y una mezcla de ambos principios activos. Las dosis de herbicida analizadas fueron equivalentes a 7-70 g p.a./ha para foramsulfurón y 1-10 g p.a./ha para yodosulfurón-metil-sodio. Las plantas regeneradas a partir de esta línea celular tolerante toleraron incluso las dosis más altas de herbicida (foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio y sus mezclas en la relación de 7:1, mientras que incluso las dosis más bajas mataban a las plantas de tipo silvestres.

25 **Ejemplo 2: Prueba de descendencias (solo para referencia)**

Basándose en SB574TL, las semillas F2 y F3 de híbridos experimentales que confieren el alelo de resistencia en el estado heterocigótico, así como semillas F4-F6 que confieren el alelo mutante en estado homocigótico se sembraron en el campo y se trataron con foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio, así como con mezclas de ambos herbicidas inhibidores de ALS cuando las plantas desarrollaron 3-5 hojas de roseta. Los plantones homocigóticos toleraron
 30 mezclas de 35 g de foramsulfurón/ha + 7 g de yodosulfurón-metil-sodio/ha sin retraso del crecimiento ni signos de daño visible. Las líneas heterocigóticas mostraron signos de crecimiento retardado y algo de clorosis foliar a estas tasas, pero se recuperaron al cabo de 3-5 semanas, mientras que los plantones convencionales de remolacha azucarera murieron con los herbicidas inhibidores de ALS.

35 **Ejemplo 3: Caracterización molecular del mutante de remolacha azucarera (SB574TL) obtenido (solo para referencia)**

LGC Genomics GmbH, Berlín, Alemania realizó extracción y análisis de secuencias de ácidos nucleicos del mutante obtenido, de acuerdo con protocolos convencionales modificados.

La secuencia de ácido nucleico obtenida del mutante de remolacha azucarera SB574TL se muestra bajo la SEQ ID NO: 3, representando la SEQ ID NO: 4 la correspondiente secuencia de aminoácidos, mientras que la SEQ ID NO: 1 se obtuvo tras secuenciar la planta de remolacha azucarera de tipo silvestre que se tomó como material de partida. La SEQ ID NO: 2 representa la correspondiente secuencia de aminoácidos de la remolacha azucarera de tipo silvestre.

La comparación de todas estas secuencias muestra claramente que solo hay una mutación en la posición 569, pero no tuvo lugar ningún otro cambio en ninguna otra parte de este gen de ALS endógeno de este material vegetal de remolacha azucarera.

45 **Ejemplo 4: Mediciones de la actividad enzimática (solo para referencia)**

Se clonaron las secuencias codificantes del gen de ALS de *Beta vulgaris* de tipo silvestre y mutante W574L (SB574TL) en vectores pET-32a(+) de Novagen y los vectores se transformaron en *Escherichia coli* AD494, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en medio LB (medio Luria-Broth) que contenía 100 mg/l de carbenicilina y 25 mg/l de kanamicina, se indujeron con isopropil-b-D-tiogalato piranósido 1 mM a una DO_{600} de 0,6, se cultivaron durante 16 horas a 18 °C y se recogieron mediante centrifugación. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 7,0, que contenía tiamina-pirofosfato 0,1 mM, $MgCl_2$ 1 mM y FAD 1 μ M a una concentración de 1 gramo en peso húmedo por 25 ml de tampón y se rompieron mediante
 50 tratamiento con ultrasonidos. El extracto de proteína bruta obtenida tras la centrifugación se usó para las mediciones de actividad de ALS.

55 Los ensayos de ALS se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos usando una modificación del procedimiento descrito por Ray (1984). La mezcla de reacción contenía tampón de fosfato potásico 20 mM, pH 7,0, piruvato sódico 20 mM, tiamina-pirofosfato 0,45 mM, $MgCl_2$ 0,45 mM, FAD 9 μ M, enzima ALS y diversas

5 concentraciones de inhibidores de ALS en un volumen final de 90 µl. Los ensayos se iniciaron añadiendo enzima y se terminaron tras 75 min de incubación a 30 °C mediante la adición de 40 µl de H₂SO₄ 0,5 M. Tras 60 min a temperatura ambiente, se añadieron 80 µl de una solución de a-naftol al 1,4 % y creatina al 0,14 % en NaOH 0,7 M y después de una incubación adicional de 45 min a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 540 nm. Los valores de pI50 para inhibición de la ALS se determinaron como describe Ray (1984), utilizando la adición del programa de ajuste a la curva XLFit Excel-in versión 4.3.1 de ID Business Solutions Limited.

En total, la enzima mutante era al menos 2000 veces menos sensible contra el inhibidor de ALS foramsulfurón que la enzima de tipo silvestre.

Ejemplo 5: Mediciones de la actividad enzimática (de plantas) (solo para referencia)

10 Se extrajo ALS de hojas de remolacha azucarera o de cultivos tisulares de remolacha azucarera como describe Ray (1984), Plant Physiol 75:827-831.

La actividad de ALS se determinó en extractos foliares de tipo silvestre y de remolacha azucarera y extractos foliares del SB574TL obtenido, en presencia de diversas concentraciones de foramsulfurón como se describe en el Ejemplo 4.

15 En total, la enzima mutante era al menos 2000 veces menos sensible contra el inhibidor de ALS foramsulfurón que la enzima de tipo silvestre.

Ejemplo 6 Ensayos de campo empleando plantas de remolacha azucarera tolerantes a herbicida inhibidor de ALS homocigóticas (solo para referencia)

20 Basándose en SB574TL, se aplicaron para el análisis adicional semillas F4-F6 que confieren al alelo mutante del gen de ALS endógeno en estado homocigótico

Se sembraron en el campo semillas de plantas mutantes SB574TL homocigóticas y las de la variedad tradicional KLARINA (variedades de remolacha azucarera de referencia sensibles a inhibidor de ALS comúnmente disponibles, que no tienen la mutación respectiva en la posición 569 en su proteína ALS) y cultivaron hasta diversas fases de crecimiento de acuerdo con el patrón BBCH (como se define en la monografía "Entwicklungsstadien mono- und dikotylar Pflanzen", 2ª edición, 2001, ed. Uwe Meier, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft).

25 Posteriormente, las plantas se trataron con los respectivos herbicidas inhibidores de ALS como se especifica a continuación en las Tablas 1 y que son idénticos a los empleados durante el procedimiento de selección.

La cantidad de agua aplicada en las diversas aplicaciones fue de 200 l/ha.

30 A los 8, 14 y 28 días (como se indica en la Tabla 1) después de la aplicación (DDA) del respectivo herbicida (o herbicidas) inhibidor de ALS, los daños (fitotoxicidad/fito) sobre las distintas plantas de remolacha azucarera se puntuaron de acuerdo con la escala del 0 % al 100 %. En este contexto, "0 %" significa "sin fototoxicidad/fito" y "100 %" significa que las plantas habían muerto completamente.

Tabla 1

Características de la variedad	KLARINA	Remolacha azucarera basada en SB574TL	KLARINA	Remolacha azucarera basada en SB574TL	KLARINA	Remolacha azucarera basada en SB574TL	
Fase de aplicación	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	
Clasificación	% de fito	% de fito	% de fito	% de fito	% de fito	% de fito	
Intervalo de aplicación-evaluación	8 días	8 días	14 días	14 días	28 días	28 días	
Sustancia activa	g p.i./ha						
Foramsulfurón	25 g/ha	85	0	83	0	86	0
Foramsulfurón	50 g/ha	90	0	92	0	94	0
Yodosulfurónmetil-sodio	7 g/ha	90	0	97	0	100	0

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de una planta de *Beta vulgaris* tolerante a herbicidas inhibidores de ALS y partes de la misma que comprende una mutación en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de un gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno mostrado en la secuencia de nucleótidos de referencia SEQ ID NO: 1, en el que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene el aminoácido leucina en una posición 569 del polipéptido de ALS, y que son homocigóticas para la mutación del gen de ALS, en la que la planta de *Beta vulgaris* no es transgénica con respecto a dicho gen de ALS endógeno, y el codón en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 es TTG, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
- (a) exponer callos de *B. vulgaris*, a aproximadamente 10^{-7} M - 10^{-9} M de un herbicida inhibidor de ALS;
 - (b) seleccionar colonias de células que puedan crecer en presencia de hasta 3×10^{-6} M de un herbicida inhibidor de ALS;
 - (c) regenerar brotes en presencia de un herbicida inhibidor de ALS;
 - (d) seleccionar plántulas regeneradas con un herbicida inhibidor de ALS,
- en el que las plántulas comprenden una mutación en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de un gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno mostrado en la secuencia de nucleótidos de referencia SEQ ID NO: 1, en el que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene el aminoácido leucina en una posición 569 del polipéptido de ALS.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el herbicida inhibidor de ALS de las etapas (a), (b) y/o (c) es foramsulfurón.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los herbicidas inhibidores de ALS de la etapa (d) son foramsulfurón, yodosulfurón-metil-sodio y/o una mezcla de ambos.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que en la etapa (d) la dosis de foramsulfurón es equivalente a 7-70 g p.i./ha y la dosis de yodosulfurón-metil-sodio es equivalente a 1-10 g p.i./ha.
5. Uso de una planta de *Beta vulgaris* tolerante a herbicidas inhibidores de ALS y partes de la misma que comprende una mutación en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 de un gen de acetolactato sintasa (ALS) endógeno mostrado en la secuencia de nucleótidos de referencia SEQ ID NO: 1, en la que el gen de ALS codifica un polipéptido de ALS que contiene el aminoácido leucina en una posición 569 del polipéptido de ALS, y que son homocigóticas para la mutación del gen de ALS, en la que la planta de *Beta vulgaris* es no transgénica con respecto a dicho gen de ALS endógeno, y el codón en una posición correspondiente a la posición 1705-1707 es TTG, para la producción de azúcar, la producción de biocombustible, la producción de etanol, la producción de betaína y/o uridina.