



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 235**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05716150 .7**

96 Fecha de presentación : **17.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1730301**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Métodos y composiciones para analizar genes AHASL.**

30 Prioridad: **22.03.2004 US 805973**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2009

73 Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es: **Zhao, Chengyan;**
Singh, Bijay y
Ascenzi, Robert

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 330 235 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

Métodos y composiciones para analizar genes AHASL.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se relaciona con el campo de análisis de gen, particularmente con métodos novedosos para la identificación de alelos tolerantes y naturales de genes AHASL de planta.

10 **Antecedente de la invención**

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS; EC 4.1.3.18, también conocida como acetolactato sintasa o ALS), es la primera enzima que cataliza las síntesis bioquímica de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina y isoleucina (Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine", in Plant Aminoácidos, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. New York, New York, pp. 227-247). El AHAS es el sitio de acción de cuatro familias herbicidas estructuralmente diversas que incluyen las sulfonilureas (LaRossa and Falco (1984) Trends Biotechnol. 2: 158-161), las imidazolinonas (Shaner *et al.* (1984) Plant Physiol. 76: 545-546), las triazolopirimidinas (Subramanian and Gerwick (1989) "Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines", in Biocatalysis in Agricultural Biotechnology, Whitaker, J.R. and Sonnet, P.E. eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 277-288), y los pirimidiloxibenzoatos (Subramanian *et al.* (1990) Plant Physiol. 94: 239-244.). Los herbicidas imidazolinona y sulfonilurea son ampliamente utilizados en la agricultura moderna debido a su efectividad en muy bajos índices de aplicación y la no toxicidad en animales. Al inhibir la actividad AHAS, estas familias de herbicidas previenen el crecimiento y desarrollo adicional de plantas susceptibles que incluyen muchas especies de maleza. Varios ejemplos de herbicidas de imidazolinona disponibles comercialmente son PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imazaquin) y ARSENAL® (imazapir). Ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son clorsulfurón, metsulfurón metilo, sulfometurón metilo, clorimurón etilo, tifensulfurón metilo, tribenurón metilo, bensulfurón metilo, nicosulfurón, etametsulfurón metilo, rimsulfurón, triflursulfurón metilo, triasulfurón, primisulfurón metilo, cinosulfurón, amidosulfurón, fluzasulfurón, imazosulfurón, pirazosulfurón etilo y halosulfurón.

Debido a su alta efectividad y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona son favorables para la aplicación al rociar sobre la parte superior de una amplia zona de vegetación. La capacidad de rociar un herbicida sobre la parte superior de un amplio rango de vegetación disminuye los costos asociados con el establecimiento y mantenimiento de la plantación, y disminuye la necesidad de preparación de sitio antes del uso de tales químicos. El rociado sobre la parte superior de una especie tolerante deseada también resulta en la capacidad de alcanzar el potencial de rendimiento máximo de las especies deseadas debido a la ausencia de las especies competitivas. Sin embargo, la capacidad para utilizar tales técnicas de rociado sobre depende de la presencia de especies resistentes a imidazolinona de la vegetación deseada sobre el área de rociado.

Entre la mayoría de cultivos agrícolas, algunas especies de leguminosas tales como la soya son naturalmente resistentes a los herbicidas de imidazolinona debido a su capacidad para metabolizar rápidamente los compuestos de herbicida (Shaner and Robinson (1985) Weed Sci. 33: 469-471). Otros cultivos tales como el maíz (Newhouse *et al.* (1992) Plant Physiol. 100: 882-886) y arroz (Barrett *et al.* (1989) Crop Safeners for Herbicides, Academic Press, New York, pp. 195-220) son algo susceptibles a los herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial de los herbicidas de imidazolinona es dependiente en la naturaleza química del herbicida particular y el metabolismo diferencial del compuesto de una forma tóxica a no tóxica en cada planta (Shaner *et al.* (1984) Plant Physiol. 76: 545-546; Brown *et al.* (1987) Pestic. Biochem. Physiol. 27: 24-29). Otras diferencias fisiológicas de las plantas tales como la absorción y translocación también juegan un importante papel en la sensibilidad (Shaner and Robinson (1985) Weed Sci. 33: 469-471).

Las plantas resistentes a las imidazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidinas se han producido exitosamente utilizando mutagenia de semillas, microesporas, polen, y callo en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max*, y *Nicotiana tabacum* (Sebastian *et al.* (1989) Crop Sci. 29: 1403-1408; Swanson *et al.* (1989) Theor. Appl. Genet. 78: 525-530; Newhouse *et al.* (1991) Theor. Appl. Genet. 83: 65-70; Sathasivan *et al.* (1991) Plant Physiol. 97: 1044-1050; Mourand *et al.* (1993) J. Heredity 84: 91-96). En todos los casos, un gen nuclear parcialmente dominante, sencillo confiere resistencia. También se aíslan previamente cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona luego de mutagenia de semilla de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse *et al.* (1992) Plant Physiol. 100: 882-886). Los estudios de herencia confirman que un gen parcialmente dominante, sencillo confiere resistencia. Con base en los estudios alélicos, los autores concluyen que las mutaciones en las cuatro líneas identificadas se localizan en el mismo lugar. Se designa uno de los genes resistentes de cultivo Fidel FS-4 (Newhouse *et al.* (1992) Plant Physiol. 100: 882-886). El modelo basado en computador de las tres conformaciones dimensionales del complejo inhibidor AHAS predice varios aminoácidos en el bolsillo de unión de inhibidor propuesto como sitios en donde las mutaciones inducidas conferirían probablemente resistencia selectiva a las imidazolinonas (Ott *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 263: 359-368). Las plantas de trigo producidas con algunas de estas mutaciones diseñadas racionalmente en los sitios de unión propuestos de la enzima AHAS de hecho, han exhibido resistencia específica a una clase única de herbicidas (Ott *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 263: 359-368).

También se han reportado resistencia de plantas a herbicidas de imidazolinona en un número de patentes. Las Patentes U.S. Nos. 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439 y 6,222,100 generalmente describen el uso

de un gen AHAS alterado para provocar resistencia al herbicida en las plantas, y específicamente describe ciertas líneas de maíz resistentes a imidazolinona. La Patente U.S. No. 5,013,659 describe plantas que exhiben resistencia a herbicida debido a las mutaciones en por lo menos un aminoácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas aquí codifican cualquier resistencia cruzada para imidazolinonas y sulfonilureas o resistencia específica a sulfonilurea, pero no se escribe resistencia específica a imidazolinona. Adicionalmente, la Patente U.S. No. 5,731,180 y la Patente U.S. No. 5,767,361 discuten un gen aislado que tiene una sustitución de aminoácido única en una secuencia de aminoácido AHAS de monocotiledónea natural que resulta en resistencia específica a imidazolinona.

En las plantas, como en todos los otros organismos examinados, la enzima AHAS está comprendida de dos subunidades: una subunidad grande (rol catalítico) y una subunidad pequeña (rol regulador) (Duggleby and Pang (2000) J. Biochem. Mol. Biol. 33:1-36). La subunidad grande (denominada AHASL) se puede codificar mediante un gen único como en el caso de Arabidopsis y arroz o mediante miembros de familia de gen múltiple como en maíz, canola, y algodón. Las sustituciones de nucleótido únicas, específicas en la subunidad grande confieren sobre la enzima un grado de insensibilidad a una o más clases de herbicidas (Chang and Duggleby (1998) Biochem J. 333: 765-777).

Las mutaciones en los genes que codifican la subunidad grande AHAS, a las que se hace referencia aquí como genes AHASL, son la base molecular para la tolerancia a herbicida en cultivos CLEARFIELD® que han incrementado la tolerancia a los herbicidas de imidazolinona. Ya que cada una de estas mutaciones resulta en un fenotipo semi-dominante, una mutación en un estado heterocigoto puede ser suficiente para producir un nivel de tolerancia a herbicida que es suficiente para muchos sistemas de producciones de cultivo. Sin embargo, para aplicaciones de herbicida particulares, y en casos en con plantas de cultivo que tienen genes AHASL múltiple s tales como trigo, se desean combinaciones de las mutaciones para alcanzar un nivel incrementado de resistencia a herbicidas.

Por ejemplo, el trigo blando, *Triticum aestivum* L., contienen tres genes de subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa homólogos. Cada uno de los genes exhiben expresión significativa basada en la respuesta herbicida y datos bioquímicos de mutantes en cada uno de los tres genes (Ascenzi *et al.* (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, España, Ref. No. S10-17). Las secuencias de codificación de todos los tres genes comparten homología extensa en el nivel de nucleótido (WO 03/014357). A través de la secuenciación de los genes AHASL de distintas variedades de *Triticum aestivum*, se encuentra que la base molecular de tolerancia a herbicida en más líneas tolerantes (IMI) a imidazolinona es la mutación S653 (At)N, que indica una sustitución serina a asparagina en una posición equivalente a la serina en el aminoácido 653 en Arabidopsis thaliana (WO 03/01436; WO 03/014357). La mutación S653(At)N en cada gen está sombreado en las Figuras 1A, 1B, y 1C. Esta mutación se debe a un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la secuencia de ADN que codifica la proteína AHASL.

Uno de los objetivos de los fitogenetistas es introducir tolerancia a imidazolinona en líneas de trigo existentes al inducir la mutación S653(At)N en las líneas existentes o al cruzar líneas no tolerantes IMI con líneas tolerantes IMI seguido por retrocruzamiento y selección para tolerancia a imidazolinona. Otro objetivo de los fitogenetistas es producir plantas de trigo con niveles incrementados de tolerancia a imidazolinona, más allá de los niveles de tolerancia vistos en las plantas de trigo que poseen una mutación S653(At)N única en un gen AHASL de trigo único. Así, es deseable cultivar plantas de trigo que poseen combinaciones de mutaciones S653(At)N en dos o más de los genes AHASL. En adición, es también deseable cultivar plantas de trigo que son homocigotos para el alelo S653(At)N mutante en uno o más de los genes AHASL. Sin embargo, se necesita desarrollar las plantas de trigo deseadas, métodos rápidos para identificar las plantas deseadas. Los métodos existentes para detectar las plantas de trigo con tolerancia a imidazolinona no son adecuados para uso en el desarrollo de las plantas que poseen alelo S653(At)N único en un gen AHASL único.

Los métodos existentes para identificar plantas con tolerancia a imidazolinona mejorada incluyen pruebas de rociado de herbicida en el campo o invernadero y ensayos bioquímicos para actividad AHAS. Tales métodos consumen mucho tiempo, sin embargo, y generalmente no son adecuados para distinguir, entre un gran número de plantas individuales, los incrementos sutiles en la tolerancia a imidazolinona que puede ocurrir cuando se introduce un segundo alelo S653(At)N en una planta de trigo.

Métodos alternativos para identificar las plantas deseadas incluyen métodos basados en ADN. Por ejemplo, los genes AHASL, o porciones de los mismos, se pueden amplificar a partir de ADN genómico mediante métodos de reacción de cadena de (PCR) y el gen AHASL amplificado resultante o porción de mismo se puede secuenciar para identificar el alelo S653(At)N mutante y el gen AHASL particular que esta presente. Sin embargo, tal un método basado en secuenciación de ADN no es práctico para un gran número de muestras. Otro método involucra tal uso de oligonucleótidos específicos un alelo, no etiquetado isotópicamente o radiomarcado (ASO) como sondas para dot blots de ADN genómico o ADN amplificado por reacción de cadena de polimerasa (PCR) (Connor *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:278-282; Orkin *et al.* (1983) J. Clin. Invest. 71:775-779; Brun *et al.* (1988) Nucl. Acids Res. 16: 352; and Bugawan *et al.* (1988) Biotechnology 6: 943-947. Mientras tal un método es útil para distinguir entre dos alelos en un único lugar, este método no es útil para los genes AHASL de trigo, porque los tres genes AHASL son casi idénticos (Figura 1) en la región alrededor del SNP que da lugar a la proteína S653(At)N mutante.

Así, no se podría desarrollar un conjunto de seis sondas de oligonucleótido que sería capaz de distinguir entre los alelos mutantes y natural en cada uno de los tres genes AHASL de trigo.

Un método que se puede adaptar para detectar rápidamente gran número de individuos para el análisis de un SNP es la sistema de amplificación refractario a la mutación (ARMS) (Newton *et al.* (1989) Nucl. Acids Res. 17:2503-2516). Se puede utilizar este método basado en PCR para distinguir dos alelos de un gen que difiere por un nucleótido único también se puede utilizar para distinguir heterocigotos de homocigotos para cualquier alelo mediante inspección de los productos PCR después de electroforesis con gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio. El método ARMS se basa en la premisa que los oligonucleótidos con un residuo 3' de emparejamiento incorrecto no funcionarán como cebadores en PCR bajo las condiciones apropiadas (Newton *et al.* (1989) Nucl. Acids Res. 17: 2503-2516). Si bien este método ha demostrado ser útil para el análisis de un SNP en un gen único, no se ha reportado que este método, u otros métodos basados en PCR, se pueden utilizar para el análisis del SNP que da lugar a la mutación S653(At)N en cada uno de los tres genes AHASL de trigo.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos para analizar genes AHASL de planta. Se dirigen los métodos para detectar en muestras que comprenden ADN genómico de plantas la presencia del alelo natural y/o un alelo mutante en cada uno de los genes AHASL en un genoma de planta. Los alelos AHASL mutantes de la invención codifican las proteínas AHASL tolerantes a imidazolinona que comprenden la sustitución S653(At)N. En el nivel ADN, el alelo mutante resulta de una transición G-a -A en la posición que corresponde al nucleótido 1958 de la secuencia de nucleótido AHASL e Arabidopsis establecida en el Acceso EMBL No. X51514. Los métodos particularmente se dirigen para analizar los genes AHASL de plantas que comprenden dos o más genes AHASL, que incluyen, pero no se limitan a, *Triticum aestivum* y *Triticum turgidum* ssp. *durum*.

En un cebador aspecto, la invención proporciona un método para detectar un alelo mutante de un gen AHASL que confiere en una planta tolerancia a herbicidas de imidazolinona. El método comprende las etapas de: (a) obtener ADN genómico de una planta, particularmente una planta de trigo; (b) utilizar el ADN como una plantilla para una amplificación PCR que comprende el ADN, polimerasa, trifosfatos desoxiribonucleótidos, un cebador específico a gen AHASL directo, un cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo mutante; y (c) detectar los productos de la amplificación PCR. El cebador específico a alelo mutante comprende una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la secuencia de nucleótido corresponde a la hebra de codificación de un gen AHASL, el nucleótido de extremo 3' corresponde al sitio de la mutación de punto G a C, y el nucleótido de extremo 3' es citidina. En adición el cebador específico a alelo mutante es capaz de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos. En una realización de la invención, el cebador específico a alelo mutante comprende una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la secuencia de nucleótido es capaz de hibridar al complemento de los nucleótidos 3 a 23 de la SEQ ID NO: 12 y tiene una citidina en el extremo 3'.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para análisis de un gen AHASL de planta, particularmente un gen AHASL seleccionado del grupo que consiste de AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A de *Triticum aestivum* y el AHASL1B y AHASL1A de *Triticum turgidum* ssp. *durum*. El método comprende las etapas de: (a) obtener ADN genómico de una planta, particularmente una planta de trigo; (b) utilizar el ADN como una plantilla para una primera amplificación PCR que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos desoxiribonucleótidos, un cebador específico a gen AHASL directo, un cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo natural; y (c) utilizar el ADN como una plantilla para una segunda amplificación PCR que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos desoxiribonucleótidos, el cebador específico a gen AHASL directo, el cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo natural; y (d) detectar los productos de dichas primeras y segundas amplificaciones PCR. El cebador específico a alelo natural comprende una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la secuencia de nucleótido corresponde a la hebra de codificación de un gen AHASL, el nucleótido de extremo 3' corresponde al sitio de la mutación de punto G a A, y el nucleótido de extremo 3' es guanosina. Los cebadores específicos a alelo natural de la invención son capaces de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos. En otra realización de la invención, el cebador específico a alelo natural comprende una primera secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la primera secuencia de nucleótido es capaz de hibridar al complemento de nucleótidos 4 a 23 de la SEQ ID NO: 10 y tiene una guanosina en el extremo 3'.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para análisis de un gen AHASL, que involucra una amplificación PCR inicial de por lo menos un fragmento de cada uno de los genes AHASL en una planta, de tal manera que enriquezca una muestra de ADN genómico para los genes AHASL o fragmentos de los mismos. Las etapas del método comprenden: (a) obtener ADN genómico de una planta, particularmente una planta de trigo; (b) utilizar el ADN como una plantilla en una preamplificación que comprende el ADN, trifosfatos desoxiribonucleótidos, polimerasa, un cebador AHASL directo, y un cebador AHASL inverso, a fin de producir ADN preamplificado; (c) utilizar el ADN preamplificado como una plantilla para una primera amplificación PCR que comprende el ADN preamplificado, polimerasa, trifosfatos desoxiribonucleótidos, un cebador específico a gen AHASL directo, un cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo mutante como se describió anteriormente; (d) utilizar el ADN preamplificado como una plantilla para una segunda amplificación PCR que comprende el ADN preamplificado, polimerasa, trifosfatos desoxiribonucleótidos, dicho cebador específico a gen AHASL directo, el cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo natural como se describió anteriormente; y (e) detectar los productos de dichas primeras y segundas amplificaciones PCR. El cebador específico a alelo mutante y el cebador específico a

ES 2 330 235 T3

alelo natural son capaces de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso. En adición, los cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso se internan entre los sitios de hibridación de los cebadores AHASL directo e inverso.

5 La presente invención proporciona los cebadores de oligonucleótido que se describieron anteriormente. Estos cebadores incluyen, pero no se limitan a, un cebador específico un alelo mutante que comprende la secuencia de nucleótido o establecido en la SEQ ID NO: 3, el cebador específico a alelo natural que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 4, los cebadores específicos a gen AHASL directos que comprenden las secuencias de nucleótido establecidas en la SEQ ID NOS: 5 y 6, los cebadores específicos a gen AHASL inversos que comprenden las secuencias de nucleótido establecidas en la SEQ ID NOS: 7, 8, y 9, el cebador AHASL directo que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 1, y el cebador AHASL inverso que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 2.

15 La presente invención también proporciona equipos para desarrollar los métodos de la invención como se describió anteriormente. Tales equipos comprenden por lo menos un cebador específico a gen AHASL directo, por lo menos un cebador específico a gen AHASL inverso, un cebador específico un alelo mutante, por lo menos una enzima de polimerasa capaz de catalizar la amplificación PCR de un cebador fragmento de un gen AHASL de trigo y un segundo fragmento de un gen AHASL de trigo. Los equipos de la invención pueden comprender adicionalmente cualesquier componentes adicionales que se requieran para la realización de los métodos de la presente invención como se describe aquí.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1A representa las secuencias de nucleótido (SEQ ID NO: 10) y aminoácido (SEQ ID NO: 11) del AHASL1D natural (WT) y secuencias de nucleótido (SEQ ID NO: 12) y aminoácido (SEQ ID NO: 13) AHASL1D del tipo mutante (MUT). La región sombreada indica el sitio de la mutación en las secuencias mutantes.

30 La Figura 1B representa las secuencias de nucleótido (SEQ ID NO: 14) y aminoácido (SEQ ID NO: 15) del AHASL1B natural (WT) y las secuencias nucleótido (SEQ ID NO: 16) y aminoácido (SEQ ID NO: 17) del AHASL1B mutante (MUT). La región sombreada indica el sitio de la mutación en las secuencias mutantes.

35 La Figura 1C representa las secuencias de nucleótido (SEQ ID NO: 18) y aminoácido (SEQ ID NO: 19) del AHASL1A natural (WT) y secuencias de nucleótido (SEQ ID NO: 20) y aminoácido (SEQ ID NO: 21) del AHASL1A mutante (MUT). La región sombreada indica el sitio de la mutación en las secuencias mutantes.

La Figura 2 es una representación esquemática de una realización de la invención.

40 La Figura 3 es una alineación parcial de las tres secuencias cADN AHASL de trigo con los cebadores AHASL directo e inverso (conformado).

La Figura 4 es una alineación parcial de las tres secuencias cADN AHASL de trigo con los cebadores específicos a gen AHASL directo, específicos a gen AHASL inverso, específicos un alelo natural y específicos un alelo mutante. Los cebadores específicos a gen AHASL directo se muestran en gris claro. Los cebadores específicos a gen AHASL inversos se muestran en gris oscuro. Los cebadores específicos un alelo natural y específicos alelo mutante están en tipo negrita y cursiva, respectivamente.

55 La Figura 5 es un negativo de imagen fotográfica de un gel de agarosa tratado con bromuro de etidio, transiluminado con UV. Cuatro genotipos de trigo se analizan por todos los seis ensayos como se describe en el Ejemplo 3. Los genotipos de trigo probados son: Kirschauff (indicado como "natural" en la Figura 5), CV9804, G-208, y K-42. De los cuatro genotipos, el CV9804, G-208, y K-42 poseen el rasgo con tolerancia IML. Por encima de las bandas la reacción se representa por una letra mayúscula (por encima de los paneles) y por una letra minúscula dentro de los paneles. Por ejemplo el par más izquierdo de las bandas dentro de cada panel es el ensayo para AHASL1D (D), el alelo natural (w), mientras que las rutas más derechas son reacciones de alelo mutante (m) AHASL1A (A). El centro de las dos rutas en cada panel representa el resultado de los ensayos del alelo natural (w) y el alelo mutante (m) para AHASL1B (B). En cada ruta, la banda de control es la banda superior (fragmento más largo) y la banda de diagnóstico es la inferior (fragmento más corto).

60 La Figura 6 es una tabla de porcentaje de identidades de secuencia de nucleótido de comparaciones por pares de las secuencias que codifican el gen AHASL de trigo. El Hexaploide L1D, Hexaploide L1B, y Hexaploide L1A denotan los genes AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A, respectivamente, de *Triticum aestivum*. Tetraploide L1 B, y Tetraploide L1A denotan los genes AHASL 1B y AHASL1A, respectivamente, de *T. Turgidum* ssp. *durum*.

Lista de secuencia

65 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido listadas en la lista de secuencia acompañante se muestran utilizando abreviaturas de letra estándar para bases de nucleótido, y código de tres letras para aminoácidos. Las secuencias de ácido nucleico siguen la convención estándar del inicio en el extremo 5' de la secuencia y proceder hacia (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) al extremo 3'. Solo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico,

ES 2 330 235 T3

pero la hebra no codificante se entiende que ha de incluir cualquier referencia a la hebra exhibida. Las secuencias de aminoácido siguen la convención estándar del inicio en el terminal amino de la secuencia y proceden hacia (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) al terminal carboxi.

5 La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de nucleótido del cebador AHASL directo, que también se denomina aquí como CM-F.

La SEQ ID NO: 2 establece la secuencia de nucleótido del cebador AHASL inverso, que también se denomina aquí como CM-R.

10 La SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de nucleótido del cebador específico un alelo mutante, que también se denomina aquí como MU-F.

15 La SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de nucleótido del cebador específico un alelo natural, que también se denomina aquí como WT-F.

La SEQ ID NO: 5 establece la secuencia de nucleótido de un cebador específico a gen AHASL directo, que también se denomina aquí como 1A,D-F.

20 La SEQ ID NO: 6 establece la secuencia de nucleótido de un cebador específico a gen AHASL directo, que también se denomina aquí como 1 B-F.

La SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de nucleótido de un cebador específico a gen AHASL inverso, que también se denomina aquí como 1D-R.

25 La SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de nucleótido de un cebador específico a gen AHASL inverso, que también se denomina aquí como 1B-R.

30 La SEQ ID NO: 9 establece la secuencia de nucleótido de un gen AHASL inverso-specific primer, que también se denomina aquí como 1A-R.

La SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de nucleótido de una porción del alelo natural de AHASL1D que se representa en la Figura 1A.

35 La SEQ ID NO: 11 establece la secuencia de aminoácido codificada por la porción de la secuencia de nucleótido del alelo natural de AHASL1D que se representa en la Figura 1A

La SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de nucleótido de una porción del alelo mutante de AHASL1D que se representa en la Figura 1A.

40 La SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácido codificada por la porción de la secuencia de nucleótido del alelo natural de AHASL1D que se representa en la Figura 1A.

45 La SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de nucleótido de una porción del alelo natural de AHASL1B que se representa en la Figura 1B.

La SEQ ID NO: 15 establece la secuencia de aminoácido codificada por la porción de la secuencia de nucleótido del alelo natural de AHASL1B que se representa en la Figura 1B.

50 La SEQ ID NO: 16 establece la secuencia de nucleótido de una porción del alelo mutante de AHASL1B que se representa en la Figura 1B.

55 La SEQ ID NO: 17 establece la secuencia de aminoácido codificada por la porción de la secuencia de nucleótido del alelo natural de AHASL1B que se representa en la Figura 1B.

La SEQ ID NO: 18 establece la secuencia de nucleótido de una porción del alelo natural de AHASL1A que se representa en la Figura 1C.

60 La SEQ ID NO: 19 establece la secuencia de aminoácido codificada por la porción de la secuencia de nucleótido del alelo natural de AHASL1A que se representa en la Figura 1C.

La SEQ ID NO: 20 establece la secuencia de nucleótido de una porción del alelo mutante de AHASL1A que se representa en la Figura 1C.

65 La SEQ ID NO: 21 establece la secuencia de aminoácido codificada por la porción de la secuencia de nucleótido del alelo natural de AHASL1A que se representa en la Figura 1C.

Descripción detallada de la invención

La invención se dirige a métodos rápidos para analizar los genomas de las plantas, particularmente para analizar los genes AHASL aquí. Los métodos de la invención encuentran uso particular en el análisis de los genes AHASL de plantas con genes AHASL múltiples tales como, por ejemplo, trigo blando, *Triticum aestivum* L., y trigo duro, *T. Turgidum* ssp. *durum*. *T. aestivum* comprenden en su genoma hexaploide tres genes AHASL altamente similares, pero distintos, designados como AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A. En contraste, el *T. turgidum* ssp. *durum* comprende en su genoma tetraploide dos genes AHASL altamente similares, pero distintos, designados como gen AHASL1B, y AHASL1A. Aunque no son idénticos, el AHASL1B y AHASL1A de *T. aestivum* se relacionan cercanamente con AHASL1B y AHASL1A de *T. turgidum* ssp. *durum* como se desprende de las alineaciones de secuencia y cálculos del porcentaje de identidad de secuencia. La Figura 6 proporciona identidades de secuencia de las comparaciones por pares de las secuencias que codifican el AHASL de *T. aestivum* y *T. turgidum* ssp. *durum*.

Los métodos de la invención involucran determinar si un alelo mutante está presente en uno o más de los genes AHASL en el genoma de una planta. Los alelos mutantes comprenden las secuencias de nucleótido que codifican proteínas AHASL tolerantes a imidazolinona que comprende la sustitución S653(At)N. Los métodos involucran adicionalmente determinar si está presente en uno o más de los genes AHASL un alelo AHASL natural. De hecho, los métodos de la invención se permiten para la determinación de la cigosidad de cada uno de los genes AHASL en una planta. Por ejemplo, los métodos de la invención se pueden utilizar para determinar rápidamente cada uno de los tres genes AHASL en una planta de trigo (o dos genes AHASL en el caso de trigo duro)- si una planta de trigo es homocigota para el alelo AHASL mutante, heterocigota, u homocigota para el alelo natural. Así, los métodos de la invención encuentran uso en programas de mejoramiento para la producción de plantas de trigo tolerantes a imidazolinona que tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis alelos AHASL mutantes en sus genomas.

Los siguientes términos utilizados aquí se definen adelante.

Un “cebador” es un oligonucleótido monocatenario, que tiene un extremo 3’ y un extremo 5’, que es capaz de hibridar a un sitio de hibridación en una hebra de ADN objetivo, y el cebador sirve como un punto de iniciación para síntesis de ADN mediante una polimerasa ADN, particularmente en una amplificación PCR. Tal un cebador puede o no puede ser completamente complementario a su sitio de hibridación en el ADN objetivo.

Un sitio de “hibridación” en una hebra de un ADN objetivo es el sitio en el que un cebador es capaz de hibridarse en los métodos de la presente invención.

Generalmente para la amplificación de un fragmento de un gene mediante PCR, se emplean un par de cebadores que hibridan a hebras opuestas de una molécula de ADN bicatenario. Mediante convención estándar, el “cebador directo” alinea a la hebra no codificante del gen y el “cebador inverso” se alinea a la hebra de codificación.

Un “cebador interno” es un cebador que tiene un sitio de hibridación que se encuentra entre una región del ADN que se amplifica por un par particular de cebadores directos e inversos.

Un “PCR interno” es la amplificación de un fragmento más pequeño que es una porción de un fragmento más grande o se amplifica mediante PCR. Generalmente, un cebador PCR se conduce con un par particular de cebadores directos e inversos para producir un cebador fragmento. Luego se produce un segundo PCR se conduce con un cebador directo interno y e inverso interno, utilizando el cebador fragmento como una plantilla tal que un segundo fragmento. Sin embargo, en ciertas realizaciones de la invención un cebador directo, un cebador inverso, y un cebador interno se utilizan en la misma amplificación PCR. El cebador directo y el cebador interno alinean a la misma hebra de ADN y la amplificación de dos fragmentos puede ocurrir durante PCR: un fragmento más grande que resulta de la amplificación de la región de la plantilla de ADN entre los sitios de hibridación del cebador directo y el cebador inverso y un fragmento más pequeño que resulta de la amplificación de la región de la plantilla de ADN entre los sitios de hibridación del cebador interno y el cebador inverso.

A lo largo de la especificación, los términos “alelo mutante”, “alelo AHASL mutante”, o “gen AHASL mutante”. A menos que se indique de otra forma aquí, estos términos se refieren a un polinucleótido que codifica una proteína AHASL tolerante a imidazolinona que comprende la sustitución S653(At)N. Esta sustitución de aminoácido es un resultado de una mutación de punto de G a A en la posición que corresponde al nucleótido 1958 de la secuencia de nucleótido AHASL Arabidopsis establecida en el Acceso EMBL No. X51514. Ver, Sathasivan *et al* (1990) Nucl. Acids Res. 18: 2188.

En contraste, a menos que se indique otra cosa, los términos “alelo natural”, “alelo AHASL natural”, o alelo de “gen AHASL natural” se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína AHASL que carece de la sustitución S653(At)N. Tal un “alelo natural”, “alelo AHASL natural”, o “gen AHASL natural” puede, o no puede, comprender mutaciones, diferentes de la mutación que origina la sustitución S653(At)N.

La invención involucra el uso de un número de cebadores para la amplificación PCR. Estos cebadores se describen en detalle adelante.

ES 2 330 235 T3

Un “cebador específico un alelo mutante” es un cebador que se puede utilizar en los métodos de la invención para la amplificación PCR de un fragmento de un alelo AHASL mutante pero permite relativamente poca o ninguna amplificación de un alelo AHASL natural o porción del mismo.

5 Un “cebador específico a alelo natural” es un cebador que se puede utilizar en los métodos de la invención para la amplificación PCR de un fragmento de un alelo AHASL natural pero permite relativamente poca o ninguna amplificación de un alelo AHASL mutante o porción del mismo.

10 Un “cebador específico a gen AHASL directo” de la invención y un “cebador específico a gen AHASL inverso” de la invención se utilizan como un par cebador en la amplificación de un fragmento de un gen AHASL particular, tal como, por ejemplo, AHASL1D, AHASL1B, y

El AHASL1A de *T. aestivum* y AHASL1B, y AHASL1A de *T. turgidum* ssp. *durum*. El cebador específico a gen AHASL directo de la invención y el cebador específico a gen AHASL inverso de la invención incluyen cualquier par de cebadores que se pueden utilizar para producir un producto de amplificación específico a gen, o fragmento, que incluye el sitio del SNP que da lugar a el alelo AHASL mutante. Por ejemplo, el par cebador de la SEQ ID NO: 6 (cebador específico a AHASL 1B directo) y la SEQ ID NO: 8 (AHASL1B inverso), cuando se utiliza en los métodos de la presente invención, es capaz de amplificar específicamente un fragmento de trigo AHASL1B, un fragmento de trigo AHASL1D o AHASL1A. Así, la invención no depende de un cebador específico a gen AHASL directo particular o un cebador específico a gen AHASL inverso. Más bien, un par cebador que consiste de un cebador específico a gen AHASL directo particular y un cebador específico a gen AHASL inverso particular es capaz de amplificar un fragmento de solo un gen AHASL específico de una planta. Aquellos medianamente expertos en la técnica reconocerán que numerosos cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos se pueden designar para uso en los métodos de la presente invención. Los métodos de la presente invención abarcan el uso de todos los tales cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos.

En adición, un cebador específico a gen AHASL inverso de la invención, cuando se utiliza en una amplificación PCR junto con el cebador específico, un alelo natural de la invención o el cebador específico a alelo mutante de la invención, es capaz de amplificar un fragmento de solo un gen AHASL específico de una planta. Por ejemplo, el par cebador de la SEQ ID NO: 3(cebador específico a alelo mutante) y la SEQ ID NO: 8 (AHASL1B inverso), cuando se utiliza en los métodos de la presente invención, es capaz de amplificar específicamente un fragmento del gen AHASL1B de trigo, pero no un fragmento de los genes AHASL1D o AHASL1A de trigo. Similarmente, el par cebador de la SEQ ID NO: 4 (cebador específico a alelo natural) y la SEQ ID NO: 8 (AHASL1B inverso), cuando se utiliza en los métodos de la presente invención, es capaz de amplificar específicamente un fragmento del gen AHASL1B de trigo, pero no un fragmento de los genes AHASL1D o AHASL1A de trigo.

Para la amplificación de un fragmento del gen AHASL1D de *T. aestivum*, un cebador específico a gen AHASL directo preferido tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 5 y un cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 7.

Para la amplificación de un fragmento de los genes AHASL1B de ambos *T. aestivum* y *T. turgidum* ssp. *durum*, un cebador específico a gen AHASL directo preferido tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 6 y un cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 8.

45 Para la amplificación de un fragmento de los genes AHASL1A de ambos *T. aestivum* y *T. turgidum* ssp. *durum*, un cebador específico a gen AHASL directo preferido tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 5 y un cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 9.

Para las plantas con más de un gen AHASL en sus genomas, un “cebador AHASL directo” de la invención y “cebador AHASL inverso” de la invención se utilizan como un par cebador en la amplificación de un fragmento de cada uno de los genes AHASL de una planta. Esto es, el par del cebador AHASL directo y el cebador AHASL inverso se designan para no discriminar entre los diferentes genes AHASL en una planta y así, son cebadores AHASL genéricos para una especie de planta de interés. El producto o fragmento de amplificación que resulta de una amplificación PCR de ADN genómico con el cebador AHASL directo y el cebador AHASL inverso incluye los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso descrito anteriormente.

La amplificación PCR particular de la invención que involucra el uso del cebador AHASL directo y el cebador AHASL inverso se refieren aquí como la etapa de preamplificación. En ciertas realizaciones de la invención, se emplea la etapa de preamplificación para enriquecer el ADN genómico con fragmentos que comprenden genes AHASL para uso en las amplificaciones PCR posteriores de la invención. El producto de la etapa de preamplificación se refiere aquí como ADN preamplificado.

A menos que se indique otra cosa aquí, la “polimerasa” se refiere a una polimerasa ADN, particularmente una polimerasa ADN que es adecuada para uso en una o más de las amplificaciones PCR de la presente invención.

65 La presente invención involucra tres aspectos. El cebador aspecto de la invención comprende una primera amplificación PCR de ADN genómico o ADN preamplificado, para detectar un alelo AHASL mutante de una planta. El segundo aspecto incluye la primera amplificación PCR del cebador aspecto y agrega una segunda amplificación PCR

de un ADN genómico, o el ADN preamplificado, para detectar el alelo AHASL natural de una planta. El tercer aspecto incluye la primera amplificación PCR del cebador aspecto, la segunda amplificación PCR del segundo aspecto, y agrega una tercera amplificación PCR para amplificar los genes AHASL o fragmentos de los mismos utilizando ADN genómico como la fuente de la plantilla. Esta tercera amplificación PCR, también se refiere aquí como preamplificación, se desarrolla antes de la primera y segunda amplificaciones PCR. El producto de la tercera amplificación PCR, también se refiere aquí como ADN preamplificado, se utiliza como la fuente de plantilla de ADN para la primera y segunda amplificaciones PCR.

El cebador aspecto de la invención es un método para detectar un alelo mutante de un gen AHASL que confiere tolerancia a herbicidas de imidazolinona en una planta. El alelo mutante de la invención codifica una proteína AHASL tolerante a imidazolinona que comprende la sustitución S653(At)N. El método se dirige para determinar si existe es un alelo AHASL mutante presente en un gen AHASL específico de una planta. En una realización de la invención, la planta es *T. aestivum* o *T. turgidum* ssp. *durum* y el gen AHASL se selecciona del grupo que consiste de AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A de *T. aestivum* y el AHASL1B y AHASL1A de *T. turgidum* ssp. *durum*.

Una característica importante del cebador aspecto de la invención es el descubrimiento que el cebador específico a alelo mutante que tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 3, junto con un cebador específico a gen AHASL inverso de la invención, se puede utilizar para amplificar selectivamente mediante PCR una porción del alelo AHASL mutante, mientras que permite relativamente poca o ninguna amplificación de la región correspondiente del alelo AHASL natural. Típicamente, los cebadores que se desarrollan para los métodos PCR para distinguir entre dos alelos que varían mediante una sustitución de nucleótido única se diseñan tal que los cebadores reflejan el mismo polimorfismo en su extremo 3'. La base para este diseño de cebador es la premisa que los oligonucleótidos con un residuo de extremo 3' de emparejamiento incorrecto no funcionarán como los cebadores en PCR bajo las condiciones apropiadas (Newton *et al.* (1989) Nucl. Acids Res. 17: 2503-2516; and Wu *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2757-2760). En contraste, el nucleótido en el extremo 3' del cebador específico a alelo mutante se empareja incorrectamente tanto con los alelos mutantes como con alelos naturales en el sitio del SNP. Los cebadores que se designan por tener un nucleótido de extremo 3' que empareja incorrectamente el alelo AHASL de trigo natural pero que empareja el alelo mutante en el sitio de SNP se encuentran inesperadamente para permitir la amplificación de los alelos mutantes y naturales. Por lo tanto, se prueban otros diseños de cebador. El resultado sorprendente es que un cebador tal como el cebador específico a alelo mutante que tiene las secuencias de nucleótido establecidas en la SEQ ID NO: 3, que tiene un residuo de extremo 3' que empareja los alelos naturales y mutantes en el sitio del SNP, es capaz de permitir la amplificación del alelo AHASL de trigo mutante mientras que permite poca o ninguna no amplificación del alelo AHASL de trigo natural.

Los cebadores específicos a alelo mutante de la invención se diseñan para hibridar a la hebra de no codificación de por lo menos un gen AHASL de interés en la región de la mutación de punto G a A que da a la sustitución S653 (At)N en una proteína AHASL. En particular, los cebadores específicos a alelo mutante de la invención comprenden una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la secuencia de nucleótido corresponde a la hebra de codificación de un gen AHASL, el nucleótido de extremo 3' corresponde al sitio de la mutación de punto G a A, y el nucleótido de extremo 3' es citidina. Así, tal un cebador comprende por lo menos un nucleótido que no es idéntico a la región correspondiente de la hebra de codificación del gen AHASL de interés.

Para analizar los genes AHASL de trigo, la invención proporciona un cebador específico a alelo mutante que es capaz de hibridar a los alelos AHASL mutantes para cada uno de los genes AHASL de trigo. La región de ADN en la vecindad del SNP que resulta en el alelo AHASL mutante de la invención es casi idéntica a través de los tres genes AHASL de *T. aestivum* y los dos genes AHASL *T. turgidum* ssp. *durum*. Así, los cebadores específicos a alelo mutante de la invención son capaces de hibridar a los alelos AHASL mutantes para cada uno de los tres genes AHASL de *T. aestivum* y los dos genes AHASL *T. turgidum* ssp. *durum*. Tales cebadores específicos a alelo mutante de la invención comprenden una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la secuencia de nucleótido es capaz de hibridar al complemento de nucleótidos 3 a 23 de la SEQ ID NO: 12, tiene una citidina en el extremo 3', y es capaz de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso de la invención. Un cebador específico a alelo mutante preferido de la invención tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 3.

La primera amplificación PCR comprende tres cebadores, el cebador específico a alelo mutante y un par de cebadores diseñados para amplificar selectivamente un gen AHASL específico en una planta. El par cebador comprende un cebador específico un gen AHASL directo y un cebador específico a gen AHASL inverso que se diseñan para la amplificación PCR selectiva de un fragmento de solo un gen AHASL específico de una planta.

Utilizando los métodos de la invención, existen dos resultados de la primera amplificación PCR de ADN genómico de una planta. Se pueden detectar los resultados por, por ejemplo, electroforesis de gel de agarosa de los productos PCR seguido por tinte con bromuro de etidio del ADN en el gel y visualización en la presencia de luz UV. Si el gen AHASL específico comprende por lo menos un alelo mutante, la primera amplificación PCR produce dos fragmentos ADN, un fragmento más grande que resulta de la amplificación de la región del gen AHASL unido por los sitios de hibridación de los cebadores específicas un gen AHASL directo e inverso y un fragmento más pequeño que resulta de amplificación de la región del gen AHASL unida por los sitios de hibridación del cebador específico a alelo mutante y el cebador específico a gen AHASL inverso. Si, sin embargo, el gen AHASL específico no comprende por lo menos un alelo mutante, luego la primera amplificación PCR produce solo el fragmento más grande.

ES 2 330 235 T3

El segundo aspecto de la invención es método para análisis de un gen AHASL. La invención se dirige par determinar si existe un alelo natural, un alelo mutante, o ambos están presentes en un gen AHASL específico de una planta. En una realización de la invención, la planta es *T. aestivum* o *T. turgidum* ssp. *durum* y el gen AHASL se selecciona del grupo que consiste de AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A de *T. aestivum* y el AHASL1B y AHASL1A de *T. turgidum* ssp. *durum*.

El segundo aspecto de la invención agrega a la primera amplificación PCR del cebador aspecto una segunda amplificación PCR que involucra la amplificación de una porción de un alelo AHASL natural. La segunda PCR involucra el cebador específico a alelo natural. El segundo aspecto de la invención involucra el uso de un cebador específico a alelo natural de la invención. Un cebador específico a alelo natural de la invención, junto con un cebador específico a gen AHASL inverso de la invención, se puede utilizar para amplificar selectivamente por PCR una porción del alelo AHASL natural, mientras que permite relativamente poca o ninguna amplificación de la región correspondiente de un alelo AHASL mutante.

Los cebadores específicos a alelo natural de la invención se diseñan para alinear a la hebra de no codificación de por lo menos un gen AHASL de interés en la región de la mutación de punto G a A que se da a la sustitución S653(At) N en una proteína AHASL. Los cebadores específicos a alelo natural comprenden una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la secuencia de nucleótido corresponde a la hebra de codificación de un gen AHASL, el nucleótido de extremo 3' corresponde al sitio de la mutación de punto G a A, y el nucleótido de extremo 3' es guanosina.

Para analizar los genes AHASL de trigo, la invención proporciona un cebador específico a alelo natural que es capaz de hibridar a los alelos AHASL natural para cada uno de los genes AHASL de trigo. Similar a los cebadores específicos a alelo mutante de la invención, los cebadores específicos a alelo natural de la invención no se diseñan para distinguir entre los genes AHASL de trigo individuales, y así son capaces de hibridar a los alelos AHASL natural para cada uno de los tres genes AHASL de *T. aestivum* y los dos genes AHASL *T. turgidum* ssp. *durum*. Tales cebadores específicos a alelo natural de la invención comprenden una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde la secuencia de nucleótido es capaz de hibridar al complemento de nucleótidos 4 a 23 de la SEQ ID NO: 10, tiene una guanosina en el extremo 3', y es capaz de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso de la invención. Un cebador específico a alelo natural preferido de la invención tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 4. Típicamente, en el método del segundo aspecto, el ADN genómico utilizado en la segunda amplificación PCR es de la misma planta como el ADN genómico utilizado en la primera amplificación PCR. Preferiblemente, la primera y segunda amplificaciones PCR cada una involucran el uso de una porción de la misma muestra de ADN genómico aislado y que tal una muestra de ADN genómico se puede someter a una etapa de preamplificación como se describe aquí para enriquecer la muestra de ADN genómico para secuencias de gen AHASL o fragmentos de las mismas. Se reconoce, sin embargo, que los métodos del segundo aspecto pueden involucrar el uso de ADN genómico aislado de una primera planta para la primera amplificación PCR y el uso de ADN genómico aislado de una segunda planta de trigo para la segunda amplificación PCR, si la primera y segunda plantas se conocen por ser genéticamente idénticas.

La segunda amplificación PCR comprende tres cebadores, el cebador específico a alelo natural y un par de cebadores diseñados para amplificar selectivamente un gen AHASL específico en una planta. El par cebador comprende un cebador específico un gen AHASL directo y un cebador específico a gen AHASL inverso que se diseñan para la amplificación PCR selectiva de un fragmento de solo un gen AHASL específico de una planta. El gen AHASL específico es el mismo gen AHASL como en la primera amplificación PCR. Preferiblemente, el cebador específico a gen AHASL directo y el cebador específico a gen AHASL inverso para la segunda amplificación PCR son idénticos a aquellos utilizados en la primera amplificación PCR. Los métodos de la invención, sin embargo, no dependen del uso de pares de cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso idénticos en la primera y segunda amplificaciones PCR.

Existen dos resultados de la segunda amplificación PCR de ADN genómico de una planta. Los productos de la segunda amplificación PCR se pueden detectar como se describió anteriormente para la detección de los productos de la primera amplificación PCR o mediante cualquier otro método para detectar productos PCR conocidos en la técnica. Si el gen AHASL específico comprende por lo menos un alelo AHASL natural, la segunda amplificación PCR produce dos fragmentos ADN, un fragmento más grande que resulta de la amplificación de la región del gen AHASL unida por los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso y un fragmento más pequeño que resulta de la amplificación de la región del gen AHASL unida por los sitios de hibridación del cebador específico a alelo natural y el cebador específico a gen AHASL inverso. Si, sin embargo, el gen AHASL específico no comprende por lo menos un alelo AHASL natural, luego la primera amplificación PCR produce solo el fragmento más grande.

En la primera y segunda amplificaciones PCR, se produce el fragmento más grande siempre y cuando se produzca el fragmento más pequeño. Así, el fragmento más grande sirve como un control interno para indicar que existe una primera y segunda amplificación PCR exitosa. Si una primera y/o segunda amplificación PCR falla para producir el fragmento más grande, luego que el PCR no es exitoso y se debe repetir.

Los métodos de la invención no dependen en el desempeño de la primera y segunda amplificaciones PCR simultáneamente y en el mismo termociclador. Típicamente, sin embargo, la primera y segunda amplificaciones PCR del ADN genómico de una planta particular será desarrollada simultáneamente en el mismo termociclador. También, si se

desea el análisis de dos, tres, o más genes AHASL de una planta, la primera y segunda amplificaciones PCR para cada uno de los genes AHASL se puede conducir simultáneamente en el mismo termociclador. Adicionalmente, si se desea el análisis del uno o más genes AHASL de dos o más plantas, la primera y segunda amplificaciones PCR para cada una de las plantas de trigo se pueden desarrollar simultáneamente en el mismo termociclador, que depende de la capacidad del termociclador. En una realización de la invención que es adecuada para el análisis de alto rendimiento de plantas de trigo múltiples, se desarrollan la primera y segunda amplificaciones PCR en un termociclador que acomoda placas PCR de 384 pozos estándar. El uso de tal un termociclador y placa PCR se permite para el desempeño de la primera y segunda amplificaciones PCR para cada uno de los tres genes AHASL para hasta 64 plantas de trigo.

El tercer aspecto de la invención comprende el método del segundo aspecto de la invención y comprende adicionalmente una etapa de preamplificación. La etapa de preamplificación involucra una tercera amplificación PCR que se desarrolla antes de la primera y segunda amplificaciones PCR. La preamplificación permite la amplificación de por lo menos un fragmento de cada uno de los genes AHASL para enriquecer la muestra de ADN genómico para los genes AHASL, o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, en el caso de trigo, la preamplificación permite la amplificación de por lo menos un fragmento de cada uno de los tres genes AHASL (o dos en el caso de trigo duro) para enriquecer la muestra de ADN genómico para los tres genes AHASL, o fragmentos de los mismos. Al enriquecer la muestra de ADN genómico para los genes AHASL, o fragmentos de los mismos, se puede mejorar la cantidad y calidad de los productos producidos por la primera y segunda amplificaciones PCR. Aunque los métodos de la invención no dependen de cualquier mecanismo particular, se presume que la mejora en la primera y segunda amplificaciones PCR de la etapa de preamplificación es el resultado de una cantidad incrementada de plantillas AHASL en el ADN genómico preamplificado.

La etapa de preamplificación involucra el uso de un cebador AHASL directo y un cebador AHASL inverso para la amplificación PCR. Para una planta que tiene dos o más genes AHASL en su genoma, el cebador AHASL directo y el cebador AHASL inverso son cebadores AHASL genéricos que no discriminan entre los dos o más genes AHASL en la planta. Se pueden emplear cualquier par de cebadores AHASL directos e inversos en un método de la invención, en donde tal un par de cebadores es capaz de amplificar mediante PCR un fragmento de la misma región de todos los genes AHASL en una planta y tal un fragmento incluye los sitios de hibridación de los cebadores específicos a gen AHASL directo e inverso descritos anteriormente.

Si se desea, los productos de la etapa de preamplificación se pueden someter a digestión de exonucleasa mediante cualquier método conocido en la técnica para reducir o eliminar ADN monocatenario, particularmente cualesquier cebadores AHASL directo y/o inverso que permanecen después de que se completa la preamplificación. Tal una digestión de exonucleasa del ADN genómico preamplificado, antes de la primera y segunda amplificaciones PCR, puede mejorar adicionalmente la primera y segunda amplificaciones PCR. Por ejemplo, la Exonucleasa T (RNasa T), la nucleasa S1 de *Aspergillus oryzae*, nucleasa de frijol de oro, o se puede utilizar Exonucleasa I de *Escherichia coli* para remover el ADN monocatenario de los productos de preamplificación. Alternativamente, se pueden purificar los productos de la etapa de preamplificación para remover los cebadores AHASL directo e inverso. Se puede utilizar cualquier método para esta etapa de purificación, que incluye, pero no se limita a, métodos de purificación PCR disponibles comercialmente tales como el Sistema Wizard MagneSil PCR Cleanup (Promega Corp., Madison, WI, USA).

En una realización, los métodos de la invención encuentran uso en la determinación de la cigosidad de una planta de trigo individual en uno, dos, o tres de los genes específicos AHASL aquí, a saber AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A. En particular, se pueden determinar los métodos del segundo y tercer aspecto para determinar la cigosidad en uno o más de AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A. Esto se logra al conducir los métodos del segundo y tercer aspectos una, dos, o tres veces, cada vez utilizando un par diferente de cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos para la primera y segunda amplificaciones PCR, en donde cada par cebador se diseña para amplificar selectivamente un fragmento de uno de los tres genes AHASL de trigo.

En una realización preferida de la invención, la cigosidad de la planta de trigo múltiple se determina para AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A. El ADN genómico de una planta de trigo se preamplifica utilizando un cebador AHASL directo que tiene la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1 y un cebador AHASL inverso que tiene la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 2. El ADN genómico preamplificado se digiere con Exo nucleasa I. Luego se conducen tres pares de la primera y segunda amplificaciones PCR. Para el cebador par de amplificaciones PCR, el cebador específico a gen AHASL directo y los cebadores específicos a gen AHAS inversos se diseñan para amplificar selectivamente AHASL1D y tienen las secuencias de nucleótido establecidas en la SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente. Para el segundo par de amplificaciones PCR, el cebador específico a gen AHASL directo y cebadores específicos a gen AHAS inversos se diseñan para amplificar selectivamente AHASL1B y tienen las secuencias de nucleótido establecidas en la SEQ ID NO: 6 y 8, respectivamente. Para el tercer par de amplificaciones PCR, el cebador específico a gen AHASL directo y cebadores específicos a gen AHAS inversos se diseñan para amplificar selectivamente AHASL1A y tienen las secuencias de nucleótido establecidas en la SEQ ID NO: 5 y 9, respectivamente. En cada caso, el cebador específico a alelo mutante es la SEQ ID NO: 3, y el cebador específico a alelo natural es la SEQ ID NO: 4. Los productos de las seis amplificaciones PCR luego se detectan mediante electroforesis de gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio.

La presente invención también proporciona equipos para desarrollar los métodos de la invención como se describe aquí. Tales equipos comprenden por lo menos un cebador específico a gen AHASL directo, por lo menos un cebador

específico a gen AHASL inverso, un cebador específico un alelo mutante, por lo menos una enzima de polimerasa capaz de catalizar la amplificación PCR de un cebador fragmento de un gen AHASL de trigo y un segundo fragmento de un gen AHASL de trigo, en donde el cebador fragmento está entre el sitio de hibridación del cebador específico a gen AHASL directo y el sitio de hibridación del cebador específico a gen AHASL inverso y el segundo fragmento está entre el sitio de hibridación del cebador específico a alelo mutante y el sitio de hibridación del cebador específico a gen AHASL inverso. Los equipos de la invención pueden comprender adicionalmente por lo menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste de cebador específico a alelo natural, un cebador AHASL directo, un cebador AHASL inverso, una enzima de polimerasa adicional, una solución de amortiguador concentrada, una solución de $MgCl_2$, trifosfatos desoxiribonucleótidos, y Exonucleasa I.

Los métodos de la invención involucran el uso de PCR para amplificar ADN. Los cebadores de oligonucleótido se pueden diseñar para uso en reacciones PCR para amplificar las secuencias de ADN genómico correspondientes o cADN extraído de cualquier organismo de interés. Los métodos para diseñar cebadores PCR se conocen generalmente en la técnica y se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York). Ver también, Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York); Dietmaier *et al.*, eds. (2002) *Rapid Cycle Real Time PCR-Methods y Applications*, (Springer Verlag, New York); Theophilus and Raphley, eds. (2002) *PCR Mutation Detection Protocols* (Humana Press, New York); y Bartlett and Stirling, eds. (2003) *PCR Protocols* (Humana Press, New York). Otros métodos conocidos de PCR que se pueden utilizar en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los métodos que utilizan cebadores emparejados, cebadores internos, cebadores específicos únicos, cebadores degenerados, cebadores específicos a gen, cebadores ADN/ARN mezclados, cebadores específicos a vector, cebadores de emparejamiento incorrecto parcial, y similares.

Aunque la invención no depende de cebadores PCR de cualquier número particular de nucleótidos, se reconoce que la porción de un cebador PCR que alinea a su objetivo complementario en la plantilla de ADN generalmente estará entre aproximadamente 10 y 50 nucleótidos contiguos, preferiblemente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más nucleótidos contiguos. Sin embargo, un cebador PCR de la invención puede comprender adicionalmente en su extremo 5' nucleótidos adicionales que no se destinan para alinear al objetivo tal como, por ejemplo, una secuencia de ADN que comprende uno o más sitios de reconocimiento de enzima de restricción.

Los métodos de la invención involucran el uso de polimerasas de ADN para la amplificación PCR del ADN. Cualquier polimerasa de ADN conocida en la técnica que es capaz de amplificar un ADN objetivo mediante PCR se puede utilizar en los métodos de la invención. Los métodos de la invención no dependen de una polimerasa de ADN particular para amplificación PCR del ADN, solo que tales polimerasas son capaces de amplificar uno o más de los genes AHASL de planta o fragmentos de los mismos. Preferiblemente, las polimerasas de ADN de la invención son polimerasas termoestables de ADN, que incluyen pero no se limitan a: polimerasas Tag; polimerasas Pfu; polimerasas termoestables de ADN de *Thermococcus gorgonarius* que también se conocen como polimerasas Tgo de ADN; polimerasas termoestables de ADN de *Thermococcus litoralis* tales como, por ejemplo, aquellas que se conocen como polimerasas Vent® de ADN (Perler, F. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5577), polimerasas termoestables de ADN de especies *Pyrococcus* GB-D tal como, por ejemplo, aquellas que se conocen como polimerasas de ADN Deep Vent® (Xu, M. *et al.* (1993) *Cell* 75, 1371-1377); y versiones modificadas y mezclas de las mismas.

En una realización de la invención, las amplificaciones PCR del cebador y segundo aspectos de la invención descritos anteriormente comprenden PCR “de arranque en caliente”. Tal PCR “de arranque en caliente” involucra métodos que se conocen en la técnica se emplea generalmente para reducir productos de amplificación no específicos. Típicamente, los métodos PCR “de arranque en caliente” involucran combinar la plantilla de ADN, cebadores, y otros componentes de reacción con la excepción de la polimerasa de ADN, luego mantener la mezcla de reacción, durante un periodo antes de la introducción de la polimerasa de ADN, a una temperatura por encima de la temperatura del umbral para unión no específica de los cebadores a la plantilla, luego agregar la polimerasa de ADN a la mezcla de reacción mientras que la mezcla de reacción se mantiene a una temperatura por encima de la temperatura del umbral.

Aunque los métodos de la presente invención no dependen del PCR “de arranque en caliente” o una polimerasa de ADN termoestable particular, la polimerasa de ADN preferida para las amplificaciones PCR del cebador y segundo aspectos de la invención es polimerasa de ADN HotStarTaq (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). La polimerasa de ADN HotStar es una forma modificada de polimerasa de ADN Taq que se suministra por el fabricante en un estado inactivo que no tiene actividad de polimerasa de ADN a temperaturas ambiente. La inactividad a temperaturas ambiente evita la extensión de cebadores específicamente no híbridos y dímeros de cebador formados a temperaturas bajas durante la configuración de las mezclas de reacción PCR y mientras que se calientan los tubos para alcanzar la temperatura de desnaturalización inicial. La polimerasa de ADN HotStarTaq se activa mediante una actividad de unos 15 minutos a 95°C que se puede incorporar en cualquier programa de termociclador existente. Así, la polimerasa de ADN HotStar permite al PCR de arranque en caliente sin la necesidad de separar físicamente la polimerasa de ADN de los otros componentes de la mezcla de reacción durante el tiempo que se calienta la mezcla de reacción a una temperatura por encima de la temperatura del umbral.

En otra realización de la invención, la amplificación PCR del tercer aspecto de la invención, también se refiere aquí como la preamplificación, comprende por lo menos una polimerasa de ADN que hace corrección de prueba, que

comprende actividad de exonucleasas 3' a 5'. Tales polimerasas de ADN que hace corrección de prueba incluyen, pero no se limitan a polimerasas de ADN Tgo, polimerasas de ADN Vent®, y polimerasas de ADN Deep Vent® como se describió anteriormente. En una realización preferida de la invención, la preamplificación comprende el Sistema PCR de Alta Fidelidad Extendida (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). El Sistema PCR de Alta Fidelidad Extendida comprende polimerasa de ADN Taq y una polimerasa de ADN que hace corrección de prueba, polimerasa de ADN Tgo, que minimiza que minimiza las mutaciones que pueden resultar de la pérdida incorporación involuntaria de un nucleótido no complementario. Tales mutaciones inducidas por PCR pueden interferir con la amplificación PCR del cebador y segundo aspectos de la invención como se describe aquí. Por lo tanto, una amplificación de alta fidelidad, tal como aquella que se puede obtener con una amplificación PCR que comprende una polimerasa de ADN que hace corrección de prueba, se desea para la preamplificación.

Los métodos de la invención involucran la amplificación de una secuencia de ADN objetivo mediante PCR. En ciertas realizaciones de la invención, la secuencia de ADN objetivo se amplificará directamente de una muestra que comprende ADN genómico aislado de por lo menos una planta o parte, órgano, tejido, o célula de de los mismos. Aquellos medianamente expertos en la técnica reconocerán que la cantidad o concentración de ADN genómico dependerá de cualquier número de factores que incluyen, pero no se limitan a, las condiciones PCR (por ejemplo temperatura de hibridación, temperatura de desnaturalización, el número de ciclos, concentraciones de cebador, concentraciones dNTP, y similares), la polimerasa de ADN termoestable, la secuencia de los cebadores, y la secuencia del objetivo. Típicamente, en las realizaciones de la invención descritas aquí, la concentración de ADN genómico es por lo menos aproximadamente 5 ng/PL a aproximadamente 100 ng/PL. En adición a la amplificación PCR, los métodos de la invención pueden involucrar varias técnicas de biología molecular que incluyen, por ejemplo, aislamiento de ADN, particularmente aislamiento de ADN genómico, digestión de ADN mediante enzimas de restricción y nucleasas, ligación de ADN, secuenciación de ADN, electroforesis de gel de agarosa, detección de ADN mediante tinte con bromuro de etidio, y similares. Tales técnicas se conocen y describen generalmente en la técnica, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Los métodos de la invención involucran el uso de ADN genómico aislado de una planta. Los métodos de la invención no dependen del ADN genómico aislado mediante cualquier método particular. Cualquier método conocido en la técnica para aislamiento, o purificación, de una planta, el ADN genómico, que puede utilizar una fuente de plantilla de ADN para las amplificaciones PCR descritas anteriormente, se puede emplear en los métodos de la invención. Ver, por ejemplo, Stein *et al.* ((2001) *Plant Breeding*, 12:354-356); Clark, ed. ((1997) *Plant Molecular Biology -A Laboratory Manual*, Springer-Verlag, New York, pp. 3-15); Miller *et al.*, ((1988) *Ácidos nucleicos Research*, 16:1215). Preferiblemente, tales métodos para aislar ADN genómico de planta son adecuados, o se pueden adaptar por una persona medianamente versada en la técnica, para el aislamiento de ADN genómico de un número relativamente grande de muestras de tejido de las plantas. En una realización de la invención, se aísla el ADN genómico de plantas de trigo utilizando un equipo DNeasy® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). En otra realización, se aísla el ADN genómico de plantas de trigo utilizando un equipo MagneSil® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Corp., Madison, WI, USA).

Para los métodos de la presente invención, se puede aislar el ADN genómico de plantas completas o cualquier parte, órgano, tejido, o célula de los mismos. Por ejemplo, se puede aislar el ADN genómico de plántulas, hojas, tallos, raíces, inflorescencias, semillas, embriones, brotes, coleóptilo, anteras, estigmas, células cultivadas, y similares. Adicionalmente, la invención no depende del aislamiento de ADN genómico de plantas o partes, órganos, tejidos, o células de los mismos que son de cualquier etapa de desarrollo particular. Los métodos pueden emplear ADN genómico que se aísla de, por ejemplo, plántulas o plantas maduras, o cualquier parte, órgano, tejido o célula de los mismos. Adicionalmente, la invención no depende de las plantas que se hacen crecer bajo cualesquier condiciones particulares. Se pueden hacer crecer las plantas, por ejemplo, bajo condiciones de campo, en un invernadero, o una cámara de crecimiento, en cultivo, o aún hidropónicamente en un invernadero o cámara de crecimiento. Típicamente, las plantas crecerán en condiciones de luz, temperatura, nutrientes, y humedad que favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los métodos de la invención involucran detectar los productos de las amplificaciones PCR, particularmente la primera y segunda amplificaciones PCR. Típicamente, los productos PCR se detectan al separar primero los productos en un sustrato sobre la base de peso molecular y luego detectar cada uno de los productos PCR separados en el sustrato. En una realización preferida de la invención, los productos PCR se detectan por electroforesis de gel de agarosa de los productos PCR seguido por tinte con bromuro de etidio del ADN en el gel y visualización en el gel mediante fluorescencia en la presencia de luz UV. Sin embargo, se puede utilizar cualquier método de detección adecuado para separar polinucleótidos para detectar los productos PCR de la invención que incluyen, pero no se limitan a, electroforesis de gel, cromatografía líquida de alto desempeño, electroforesis capilar, y similares. Los sustratos para tales métodos incluyen, por ejemplo, agarosa, poliacrilamida, dietilaminoetil celulosa, hidroxialquil celulosa, sefarosa, polioxietileno, y similares. Las amplificaciones PCR de la invención pueden involucrar el uso de uno o más cebadores que se marcan, por ejemplo, radioactivamente, o con un tinte fluorescente, una marca luminescente, una marca paramagnética, o cualquier otra marca adecuada para la detección de ácidos nucleicos. Cuando las amplificaciones PCR involucran uno o más de tales cebadores marcados, la etapa de detección puede incluir la detección de la marca radioactiva, fluorescente, luminescente, paramagnética, u otra marca mediante cualesquier métodos conocidos en la técnica para detectar tal una marca.

ES 2 330 235 T3

Se pueden utilizar los métodos de la invención como se describe aquí para analizar los genes AHASL de cualesquier especie de plantas de interés. Ejemplos de especies de planta de interés incluyen, pero no se limitan a, maíz o maíz común (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquellas especies de *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *sorgo vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), mijo de Italia (*Setaria italica*), mijo africano (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum* ssp. *durum*), soya (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), manís (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), boniato (*Ipomoea batatas*), tapioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles frutales (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), te (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higos (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), marañón (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avena, cebada, vegetales, ornamentales, y coníferas. Preferiblemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, trigo, maíz, arroz, cebada, avena, remolacha, alfalfa, girasol, *Brassica*, soya, algodón, cártamo, maní, sorgo, mijo, tabaco, etc.), más preferiblemente plantas de grano (por ejemplo, trigo, maíz, arroz, cebada, sorgo, centeno, triticale, etc.), aún más preferiblemente plantas de trigo.

Los siguientes ejemplos se ofrecen por vía de ilustración y no por vía de limitación.

Ejemplo 1

Genes AHASL de Trigo

Se identifican tres variantes de secuencia de subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa (AHASL) de secuenciación de cADN de trigo. Los genes que corresponden a estas variantes se mapean a su genoma respectivo y brazo de cromosoma (6L) y se denominan sobre la base del genoma en los que ellos residen (por ejemplo, AHASL en el genoma A = AHASL1A). Se obtienen las secuencias de nucleótido para múltiples variedades de transcripciones de *Triticum aestivum* AHASL1A, AHASL1B y AHASL1D. Estas secuencias comprenden las secuencias de codificación completas para los polipéptidos maduros. Ver, Solicitud U.S. titulada "Polynucleotides Encoding Mature AHASL Proteins For Creating Imidazolinone-Tolerant Plants", presentada concurrentemente adjunta, incorporada aquí en su totalidad como referencia.

Una comparación de variedades tolerantes a imidazolinona (IMI) con progenitores natural revela que el tipo más común de mutación es una transición G a A, que produce una sustitución serina (S) a asparagina (N) en una posición que corresponde a S653 en el taxón modelo, *Arabidopsis thaliana* (Sathasivan *et al.* (1991) Plant Physiol. 97:1044-1050; Hattori *et al.* (1992) Mol. Gen. Genet. 232: 167-173). La mutación semidominante, ahora denominada S653(At) N, también se encuentra en otros cultivos tolerantes a IMI. Ver, por ejemplo, la Patente U.S. No. 5,731,180; y Solicitud U.S. No. De Serie 10/695,089, presentada en Octubre 28, 2003.

Ejemplo 2

Un Método Rápido para Distinguir los Genes AHASL de Trigo y sus Respectivos Alelos

Para facilitar la rápida identificación de mutaciones S653(At)N en trigo, se desarrollan los métodos para ensayos PCR específicos a alelo para mutaciones en cada uno de los tres genes AHASL. Las variedades tolerantes a IMI utilizadas para el desarrollo del ensayo se establecen en la Tabla 1.

TABLA 1

Líneas de Trigo Utilizadas para el Desarrollo del Ensayo de Trigo

Línea de trigo	Gen mutado	Designación antigua
CV9804	TaAHASL1D	ALS1
G-208	TaAHASL1B	ALS2
K-42	TaAHASL1A	ALS3
Krichauff	Ninguno	NA

A partir de las secuencias de nucleótido de los genes AHASL de trigo mutantes y natural, se desarrolla un método que involucra un conjunto de seis ensayos PCR específicos a alelo para genotipificación alto rendimiento de líneas de trigo para pan y duro que contienen la mutación S653(At)N. Se diseñan los ensayos como métodos PCR específicos a alelo utilizando un par de cebadores, en los que un cebador es específico al alelo (mutante o natural) y el segundo específico a gen (AHASL1D vs. AHASL1B vs. AHASL1A). Agregar un segundo cebador específico a gen en dirección 5' del cebador específico a alelo agregado a un refinamiento adicional en el que cada reacción ahora contiene un control interno para la cantidad/calidad de ADN. Cada reacción podría producir ahora dos productos. La banda de "diagnóstico" es el producto del par cebador específico a gen y específico alelo, mientras que una banda de "control" de más alto peso molecular representa el producto de ambos cebadores específicos a gen. La presencia de la banda de control en la ausencia de la banda de diagnóstico indica que la reacción es exitosa y el alelo en cuestión no está presente en la muestra. Finalmente, se agrega una etapa de amplificación de ADN preliminar para incrementar la cantidad y pureza de la plantilla en la etapa PCR específica a alelo, garantizando así la amplificación consistente de muestras de ADN de la cantidad y calidad variada. Ver, la Figura 2 para una descripción general esquemática de esta realización de la invención.

Un importante aspecto del método es el desarrollo del cebador específico a alelo mutante MU-F (SEQ ID NO: 3). Típicamente, se diseñan los cebadores que se desarrollan para los métodos PCR para distinguir entre dos alelos que varían por una sustitución de nucleótido única tal que los cebadores reflejan el mismo polimorfismo en su extremo 3'. La base para este diseño de cebador es la premisa que los oligonucleótidos con un residuo de extremo 3' de emparejamiento incorrecto no funcionarán como cebadores en PCR bajo las condiciones apropiadas (Newton *et al.* (1989) Nucl. Acids Res. 17:2503-2516; y Wu *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2757-2760). En contraste, el nucleótido en el extremo 3' de los MU-F se empareja incorrectamente tanto a los alelos mutantes como a los naturales en el sitio del SNP. Los cebadores que se diseñan para tener un nucleótido de extremo 3' que empareja incorrectamente al alelo natural pero empareja el alelo mutante en el sitio de SNP se encuentran inesperadamente para permitir la amplificación del alelo natural. Por lo tanto, se prueban otros diseños de cebador. El resultado no esperado es que un cebador tal como MU-F, que tiene un residuo de extremo 3' que empareja incorrectamente tanto los alelos naturales como los mutantes en el sitio del SNP, podría permitir la amplificación del alelo mutante pero no la del alelo natural en los métodos de la invención.

Aunque el cebador MU-F es capaz de hibridar a una secuencia de ADN que es exactamente complementaria a MUF, un alelo mutante de un AHASL de trigo que comprende tal una secuencia de ADN se prevé que es muy raro y que no se ha detectado en la naturaleza. Tal un alelo mutante tendría una citidina en el mismo nucleótido que es el sitio del SNP que resulta en la mutación S653(At)N. Comúnmente, se producen las plantas de trigo que tienen la mutación S653(At)N mediante mutagenia de etano metilsulfonato (EMS). La EMS genera principalmente transiciones G-C-a-A-T. La mutación S653(At)N resulta de tal una transición a G-C-to-A-T. Ver, las Figuras 1A, 1B, y 1C.

La Figura 2 es una representación esquemática de una realización de la invención en la que se utilizan dos reacciones PCR para detectar la mutación S653(At)N y determinar la cigosidad del AHASL1B. Cualquier número de reacciones (una a seis) se puede utilizar en forma dependiente de la aplicación. Por ejemplo, si uno solo se interesa en la presencia de la mutación S653(At)N en solo AHASL1A y AHASL1B, pero no si las mutaciones son homocigotas, entonces solo se requieren dos reacciones.

Esta prueba PCR basada en gel consiste de PCR interno con la primera serie que consiste de una reacción única con cebadores comunes (CM-F, CM-R). Una segunda serie consiste de reacciones individuales únicas o múltiples, hasta tres (AHASL1A, AHASL1B, AHASL1D) para el alelo mutante (tolerante IMI) y uno para el alelo natural (susceptible). Cada una de estas reacciones de segunda serie contiene tres cebadores, los cebadores específicos a gen directos e inversos (por ejemplo 1 B-F, 1 BR) más un cebador específico a alelo (es decir, WT-F o MU-F) con la base mutada/natural en su extremo de cebador 3' para la amplificación del sitio resistente/susceptible respectivamente. El producto PCR más grande (que resulta de la amplificación entre los cebadores específicos a gen directos e inversos) se espera que se produzca en todos los casos, y así, este producto PCR sirve como un control positivo para la reacción PCR (banda de control). El producto PCR más pequeño (que resulta de la amplificación entre el cebador específico a alelo y cebador específico a gen inverso) es un producto PCR específico a alelo (banda de diagnóstico). Para cada reacción PCR, se espera que el producto PCR más pequeño se produzca solo cuando el gen AHASL particular de interés comprende por lo menos un alelo AHASL que corresponde al cebador específico a alelo AHASL (es decir, WT-F o MU-F) que se incluye en la mezcla de reacción PCR. Los productos de reacción se separan en 3.5% de un gel de Agarosa-1000. La Agarosa-1000 es agarosa reticulada que se puede obtener de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA.

Ejemplo 3

Análisis de los Genes AHASL de Cuatro Genotipos de Trigo

Una muestra que contiene ADN genómico de trigo se obtiene mediante cualquier método conocido en la técnica para purificar ADN genómico partir de tejidos de planta, particularmente trigo. Sin embargo, cuando se comparan dos o más plantas de trigo, una cantidad equivalente de tejido de cada una de las plantas podría ser utilizada para la purificación del ADN genómico con el fin de asegurar que las muestras de cada una de las plantas contendrán concentraciones similares del ADN genómico.

ES 2 330 235 T3

Típicamente, la concentración ADN de la muestra es aproximadamente 100 ng de ADN por PL. Si la concentración ADN es mayor que este rango uno debería diluir la muestra a aproximadamente 50 ng de ADN por PL. Mientras que el método de la invención no depende de una concentración ADN particular, la concentración ADN de la muestra es preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 ng de ADN por PL.

Se desarrolla la primera serie de la amplificación PCR utilizando el Sistema PCR de Alta Fidelidad Extendida (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Se prepara una primera serie de reacción PCR que comprende los componentes establecidos en la Tabla 2. Se utiliza el Sistema PCR de Alta Fidelidad Extendida ya que este sistema comprende, en adición a polimerasa Taq, una polimerasa de ADN que hace corrección de prueba (polimerasa de ADN Tgo) que minimiza mutaciones que pueden resultar de la incorporación inadvertida a nucleótidos no complementarios. Tales mutaciones inducidas por PCR podrían interferir con la segunda serie de amplificación PCR descrita adelante. Así, una amplificación de alta fidelidad se desea para el PCT de primera serie. Por lo tanto, el uso de un sistema PCR que comprende una polimerasa de ADN que hace corrección de prueba tal como, por ejemplo, se emplea el Sistema PCR de Alta Fidelidad Extendida para la primera serie de amplificación.

TABLA 2

Componentes de la Primera serie de Reacción PCR

Componente	Volumen (PL)	Concentración Final
Cebador CM-F (10 PM)	0.5	0.2 PM
Cebador CM-R (10 PM)	0.5	0.2 PM
10 X amortiguador PCR	2.5	1 X
Mg ²⁺ , 25 mM	2.5	2.5 mM
Mezcla de enzima de Alta Fidelidad Extendida ² (3.3u/PL)	0.5	1.7U/reacción
dNTPs (25 mM)	0.2	0.2 mM
ADN Genómico	1	
H ₂ O	17.3	

¹ Amortiguador de Alta Fidelidad Extendido, concentración 10X sin MgCl₂.

² La mezcla de enzima de Alta Fidelidad Extendida contiene polimerasa de ADN Taq y polimerasa de ADN Tgo, una polimerasa de ADN termoestable con actividad que hace corrección de pruebas.

La primera serie de amplificación PCR (también denominada aquí anteriormente como la "preamplificación") se desarrolla bajo un Termociclador TGradient (Biometra GmbH, Goettingen, Alemania). Se emplean secuencialmente las siguientes condiciones de termociclización: (1) 94°C durante 3 minutos; (2) 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 1 minuto; y 72°C durante 45 segundos; y (3) 72°C durante 7 minutos.

Después de terminación de la primera serie de amplificación PCR, una alícuota de la solución del producto PCR se somete a digestión con Exonucleasa I (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) como sigue. A 2 PL de una alícuota de la solución de producto PCR, se agregan 0.05P L de Exol (10 unidades/PL) y 4.95 PL de H₂O. La mezcla resultante se incuba a 37°C durante 1 hora seguida por la incubación a 72°C durante 15 minutos. Luego de la segunda incubación, la mezcla de reacción Exol se diluye secuencialmente. Primero, se agrega 100 PL de H₂O a la mezcla de reacción Exol y luego se mezcla. Después, una alícuota de 10 PL se remueve de la reacción de Exol diluida y se diluye adicionalmente al agregar a 190 PL de H₂O. Un alícuota de 1 PL de la solución diluida resultante se utiliza como la muestra que contiene ADN para cada segunda serie PCR.

La segunda serie de amplificación PCR se puede utilizar para detectar la presencia de los alelos mutante y natural para cada uno de los tres genes AHASL, AHASL1D, AHASL1B, y AHASL1A, si se desea. Alternativamente, se puede determinar la presencia de un alelo natural o mutante en un gen AHASL único o dos genes AHASL. Dependiendo del resultado deseado, la segunda serie de amplificaciones PCR puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, o 6 amplificaciones separadas empleando las seis combinaciones de cebadores que se establecen en la Tabla 3.

ES 2 330 235 T3

TABLA 3

Segunda serie de cebador PCR para la Detección de Alelos Naturales y Mutantes de genes AHASL

AHASL	Alelo	Cebador directo 1	Cebador directo 2	Cebador directo 2
AHASL1D	natural	1A,D-F (SEQ ID NO: 5)	WT-F (SEQ ID NO: 4)	1 D-R (SEQ ID NO: 7)
AHASL1D	mutante	1A,D-F (SEQ ID NO: 5)	MU-F (SEQ ID NO: 3)	1 D-R (SEQ ID NO: 7)
AHASL1B	natural	1B-F (SEQ ID NO: 6)	WT-F (SEQ ID NO: 4)	1B-R (SEQ ID NO: 8)
AHASL1B	mutante	1B-F (SEQ ID NO: 6)	MU-F (SEQ ID NO: 3)	1 B-R (SEQ ID NO: 8)
AHASL1A	natural	1A,D-F (SEQ ID NO: 5)	WT-F (SEQ ID NO: 4)	1-AR (SEQ ID NO: 9)
AHASL1A	mutante	1A,D-F (SEQ ID NO: 5)	MU-F (SEQ ID NO: 3)	1A-R (SEQ ID NO: 9)

Se desarrolla la segunda serie de amplificaciones PCR utilizando polimerasa de ADN HotStar Taq (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Se prepara una segunda serie de reacción PCR que comprende los componentes establecidos en la Tabla 4 para cada grupo de tres cebadores. Una polimerasa de ADN "tipo de arranque en caliente" se selecciona para la segunda serie de PCR para mejorar la probabilidad de amplificar solo las secuencias objetivo deseadas.

TABLA 4

Componentes de la segunda serie de Reacción PCR

Componente	Volumen (PL)	concentración Final
Cebador directo 1 (10 PM)	0.4	0.16 PM
Cebador directo 2 (10 PM)	0.5	0.2 PM
Cebador inverso (10 PM)	0.5	0.2 PM
dNTPs (25 mM)	0.2	0.2 mM
10X de amortiguador	2.5	1 X
polimerasa de ADN Hot Star Taq (5 u/PI)	0.125	0.625U/reacción
solución de ADN	1	
H ₂ O	19.8	

Se desarrolla la segunda serie de amplificación PCR bajo un Termociclador TGradient (Biometra GmbH, Goettingen, Alemania). Se emplean las siguientes condiciones de termociclización secuencialmente: (1) 95°C durante 15 minutos; (2) ocho ciclos de toma de contacto con la temperatura de hibridación disminuida a 1°C con cada ciclo sucesivo con el cebador ciclo de 94°C durante 1 minuto, 68°C (temperatura de hibridación) durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto, y en los ciclos 2-8, la temperatura de hibridación es 67°C, 66°C, 65°C, 64°C, 63°C, 62°C, y 61°C, respectivamente (tiempo de hibridación de 1 minuto para cada ciclo); (3) 26 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, y 72°C, durante 1 minuto; y (4) una extensión final en 72°C durante 10 minutos.

Luego de la segunda serie de amplificación PCR, se someten los productos de segunda serie a electrofóresis de gel de agarosa en un aparato horizontal mediante métodos conocidos por aquellos medianamente expertos en la técnica. Luego de la electrofóresis, se somete al gel a tñido con bromuro de etidio, y los productos PCR se detectan por fluorescencia en la presencia de luz UV.

ES 2 330 235 T3

La Figura 5 proporciona un ejemplo de estos resultados que se obtienen utilizando los métodos de la invención con cuatro genotipos de trigo, “natural”, CV9804, G-208, y K-42. Para cada genotipo, se desarrollan seis amplificaciones PCR de segunda serie para permitir la determinación de la cigosidad en cada uno de los tres alelos AHASL. Por ejemplo el par más izquierdo de las bandas dentro de cada panel es el ensayo para el alelo natural, AHASL1D, mientras que el par más derecho de las bandas dentro de cada panel es el ensayo para el alelo mutante AHASL1A.

En cada ruta, la banda de control es la banda superior (aproximadamente 750 bp para AHASL1D y AHASL1A, y aproximadamente 580 bp para AHASL1B) y la banda de diagnóstico es la banda inferior (aproximadamente 270 bp para AHASL1D y AHASL1A, y aproximadamente 150 bp para AHASL1B). Se produce la banda de control resultante mediante amplificación entre el cebador directo 1 y el cebador inverso (ver Tabla 3). La banda de diagnóstico se produce mediante amplificación entre el cebador directo 2 (WT-F o MUF). A partir de la Figura 5, uno puede concluir que el CV9804 es homocigoto para el alelo mutante de AHASL1D, G-208, homocigoto para el alelo mutante de AHASL1B, y K-42, homocigoto para el alelo mutante de AHASL1A.

Estos resultados están de acuerdo con los genotipos determinados a partir de análisis genéticos estándar (datos no mostrados).

Los métodos descritos aquí anteriormente se han probado con plantas de trigo que son conocidas por ser homocigotas para el alelo mutante, heterocigotas, y homocigotas para el alelo natural en cada uno de los genes AHASL de trigo. Los resultados de estas pruebas confirman (datos no mostrados) que los métodos descritos aquí se pueden utilizar para analizar rápidamente el genoma de las plantas de trigo. Así, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para determinar rápidamente si una planta de trigo particular es homocigota para el alelo AHASL mutante, heterocigota, u homocigota para el alelo natural para cada uno de los genes AHASL de la planta. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona métodos que se pueden emplear por fitogenetistas en la producción de plantas de trigo tolerantes a imidazolinona que tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis alelos AHASL mutantes en sus genomas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para análisis de un gen de subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa (AHASL) de trigo que confiere tolerancia a los herbicidas de imidazolinona en una planta de trigo, dicho método comprende las etapas de:

- (a) obtener ADN genómico de una planta de trigo;
- (b) utilizar dicho ADN como una plantilla para una primera amplificación PCR que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos de desoxiribonucleótido, un cebador específico a gen AHASL directo, un cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo mutante que comprende una primer secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde dicha primera secuencia de nucleótido es capaz de hibridar al complemento de nucleótidos 3 a 23 de la SEQ ID NO: 12 y en donde el nucleótido de extremo 3' de dicha primer secuencia de nucleótido es citidina y está en la posición que corresponde al sitio de la mutación de punto G-a-A que da lugar a la sustitución S653(At)N en una proteína AHASL;

y

- (c) detectar los productos de dicha primera amplificación PCR;

en donde dicho cebador específico a alelo mutante es capaz de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de dichos cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos.

2. El método de la reivindicación 1, en donde:

la etapa (b) comprende adicionalmente utilizar dicho ADN como una plantilla para una segunda amplificación PCR que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos desoxiribonucleótidos, dicho cebador específico a gen AHASL directo, dicho cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo natural que comprende una segundo secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde dicha segundo secuencia de nucleótido es capaz de hibridar al complemento del nucleótidos 4 a 23 de la SEQ ID NO: 10 y en donde el nucleótido de extremo 3' de dicha segunda secuencia de nucleótido es guanosina y está en la posición que corresponde al sitio de la mutación de punto G-a -A que da lugar a la sustitución S653(At)N ie una proteína AHASL; y

la etapa (c) comprende adicionalmente detectar los productos de dicha segunda amplificación PCR;

en donde dicho cebador específico a alelo natural es capaz de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de dichos cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho ADN se ha sometido a una preamplificación antes de la etapa (b), dicha preamplificación que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos desoxiribonucleótidos, un cebador AHASL directo, y un cebador AHASL inverso, en donde dichos cebadores específicos a gen directos e inversos son capaces de hibridar a la regiones de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de dichos cebadores AHASL directos e inversos.

4. El método de la reivindicación 3, en donde dicho ADN se digiere con exonucleasa luego de dicha preamplificación y antes de la etapa (b).

5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde dicho cebador AHASL directo y dicho cebador AHASL inverso se diseñan para alinear a AHASL1A, AHASL1B, y AHASL1D.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde dicho cebador AHASL directo comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 1.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en donde dicho cebador AHASL inverso comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 2.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho cebador específico a alelo mutante comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 3.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde dicho cebador específico a alelo natural comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 4.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho gen AHASL es AHASL1D.

11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho cebador específico a gen AHASL directo tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 y dicho cebador específico gen AHASL inverso tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

ES 2 330 235 T3

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho gen AHASL es AMASL1B.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicho cebador específico a gen AHASL directo tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 y dicho cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho gen AHASL es AHASL1A.

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho cebador específico a gen AHASL directo tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 y dicho cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde dicho detectar comprende gel electrophoresis y teñido con bromuro de etidio.

17. Un cebador de oligonucleótido para amplificación PCR de un fragmento de un alelo de un gen AHASL, dicho cebador que tiene la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 3.

18. Un equipo para determinar sin una planta de trigo comprende en su genoma un alelo mutante de un gen AHASL de trigo que confiere tolerancia a herbicidas de imidazolinona en una planta de trigo, dicho equipo comprende:

(a) un cebador específico a gen AHASL directo, un cebador específico a gen AHASL inverso, y un cebador específico a alelo mutante que comprende una secuencia de nucleótido con un extremo 5' y un extremo 3', en donde dicha secuencia de nucleótido es capaz de hibridar al complemento de nucleótidos 3 a 23 de la SEQ ID NO: 12, el nucleótido de extremo 3' de dicha secuencia de nucleótido es citidina y está en la posición que corresponde al sitio de la mutación de punto G a A que da lugar a la sustitución S653 (At)N en una proteína AHASL, y dicho cebador específico a alelo mutante es capaz de hibridar a una región de un gen AHASL que se interna entre los sitios de hibridación de said cebadores específicos a gen AHASL directos e inversos;

(b) una enzima de polimerasa capaz de catalizar la amplificación PCR de un cebador fragmento de un gen AHASL de trigo y un segundo fragmento de un gen AHASL de trigo, en donde el cebador fragmento está entre dicho sitio de hibridación de dicho cebador específico a gen AHASL directo y dicho sitio de hibridación de dicho cebador específico a gen AHASL inverso y el segundo fragmento está entre el sitio de hibridación de dicho cebador específico a alelo mutante y dicho sitio de hibridación de dicho cebador específico a gen AHASL inverso.

19. El equipo de la reivindicación 18, en donde dicho cebador específico a alelo mutante comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 3.

20. El equipo de la reivindicación 18 o 19, en donde dicho gen AHASL es AHASLID.

21. El equipo de la reivindicación 20, en donde dicho cebador específico a gen AHASL directo tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 y dicho cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

22. El equipo de la reivindicación 18 o 19, en donde dicho gen AHASL es AHASL1B.

23. El equipo de la reivindicación 22, en donde dicho cebador específico a gen AHASL directo tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 y dicho cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

24. El equipo de la reivindicación 18 o 19, en donde dicho gen AHASL es AHASL1A.

25. El equipo de la reivindicación 24, en donde dicho cebador específico a gen AHASL directo tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 y dicho cebador específico a gen AHASL inverso tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

26. El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 18-25, que comprende adicionalmente un cebador AHASL directo y un cebador AHASL inverso.

FIG.1

A

AHASL1D

WT	CACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGAC
	H V L P M I P S G G A F K D
MUT	CACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGAC
	H V L P M I P <u>N</u> G G A F K D

B

AHASL1B

WT	CACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGAC
	H V L P M I P S G G A F K D
MUT	CACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGAC
	H V L P M I P <u>N</u> G G A F K D

C

AHASL1A

WT	CACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGAC
	H V L P M I P S G G A F K D
MUT	CACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGAC
	H V L P M I P <u>N</u> G G A F K D

FIG.2

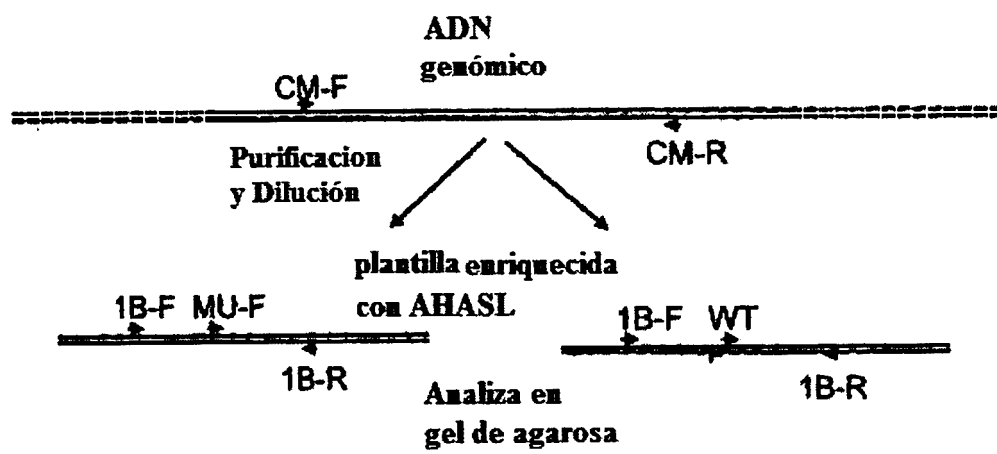


FIG.3.1

```

> AHASL1B (1251) TTTGGTCCATGGCACAAGGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCT
> AHASL1D (945) TTTGGTCCATGGCACAAGGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCT
> AHASL1A (1058) TTTGGTCCATGGCACAAGGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCT
(1251)

> CM-F (1) CCGCCGCAATATGCTATCCA>
> AHASL1B (1301) AGGATTCAAGACTTTTGGTGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGG
> AHASL1D (995) AGGATTCAAGACTTTTGGTGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGG
> AHASL1A (1108) AGGATTCAAGACTTTTGGTGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGG
(1301) +

> AHASL1B (1351) TACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCGATCATTTGCCACCGGTGTTGGG
> AHASL1D (1045) TACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCGATCATTTGCCACCGGTGTTGGG
> AHASL1A (1158) TACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCGATCATTTGCTACTGTTGTTGGG
(1351) + +

> AHASL1B (1401) CAGCATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCA
> AHASL1D (1095) CAGCACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCA
> AHASL1A (1208) CAGCACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCA
(1401) +

> AHASL1B (1451) GTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGATTTGGGTGCCAGCTG
> AHASL1D (1145) GTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGATTTGGGTTACCAGCTG
> AHASL1A (1258) GTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGATTTGGGTTACCAGCTG
(1451) + + + +

> AHASL1B (1501) CAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAOCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGAT
> AHASL1D (1195) CAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAOCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGAT
> AHASL1A (1308) CAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAOCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGAT
(1501)

> AHASL1B (1551) GGGGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTCAAGAGTTGGCGTTGATCCGTAT
> AHASL1D (1245) GGTGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTCAAGAGTTGGCGTTGATCCGTAT
> AHASL1A (1358) GGAGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTCAAGAGTTGGCGTTGATCCGTAT
(1551) + + +

> AHASL1B (1601) TGAGAACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAAGCATCTGGGAA
> AHASL1D (1295) TGAGAACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAAGCATCTGGGAA
> AHASL1A (1408) TGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAAGCATCTGGGAA
(1601) +

```

FIG.3.2

```

> AHASL1B (1651) TGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCCAACCGGGCCACACA
> AHASL1D (1345) TGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCCAATCGGGCCACACA
> AHASL1A (1458) TGGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCCAATCGGGCCACACA
(1651) + +

> AHASL1B (1701) TACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC
> AHASL1D (1395) TACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC
> AHASL1A (1508) TACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC
(1701)

> AHASL1B (1751) GATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCG
> AHASL1D (1445) GATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCG
> AHASL1A (1558) GATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCG
(1751) + +

> AHASL1B (1801) AAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTG
> AHASL1D (1495) AAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTG
> AHASL1A (1608) AAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTG
(1801)

> AHASL1B (1851) TTGGATATCATTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAG
> AHASL1D (1545) TTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAG
> AHASL1A (1658) TTGGATATCATGCTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAG
(1851) +

> AHASL1B (1901) CGGTGGTGCTTTTCAAGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGT
> AHASL1D (1595) CGGTGGTGCTTTTCAAGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGT
> AHASL1A (1708) CGGTGGTGCTTTTCAAGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGT
(1901) +

> AHASL1B (1951) ACTGAAATTTGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCA
> AHASL1D (1645) ACTGAAATTTGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCA
> AHASL1A (1758) ACTGAAATTTGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCA
(1951)

> AHASL1B (2001) TGATACCTGGGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAACCATGC
> AHASL1D (1695) TGATGCCCGGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGARCCATGC
> AHASL1A (1808) TGGTGCCCGGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGC
(2001) + + + +

> AHASL1B (2051) GTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCC
> AHASL1D (1745) GTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCC
> AHASL1A (1858) GTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCC
(2051) +

```

FIG.3.3

```

> AHASL1B (2101) GAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCTGTTCTCTTTTGTAGGGAYGTGCTGTC
> AHASL1D (1795) GAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTC
> AHASL1A (1908) GAACCGTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTATCTTTTGTAGGGATGTGCTGTC
(2101)          +      +      +      +      +

> AHASL1B (2151) ATAARATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGCACTTC
> AHASL1D (1845) ATAARATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGTACTTC
> AHASL1A (1958) ATAAATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGTACTTC
< CM-R (1)      <<CATGCAAGTTTCTTGTCTA>
(2151)          +      +

> AHASL1B (2201) CATGGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
> AHASL1D (1895) CATGCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
> AHASL1A (2008) CATGGAIAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
(2201)          +  ++

```

FIG.4.1

```

> AHASL1B (1301) AGGATTCAAGACTTTTGGTGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGG
> AHASL1D (995) AGGATTCAAGACTTTTGGCGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGG
> AHASL1A (1108) AGGATTCAAGACTTTTGGCGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGG
(1301)
+

> 1AD-F (1)
> AHASL1B (1351) TACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCGATCATTGCCACGGGTGTTGGG
> AHASL1D (1045) TACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCGATCATTGCCACTGGTGTGTTGGG
> AHASL1A (1158) TACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCGATCATTGCTACTGGTGTGTTGGG
(1351)
+ +

> 1B-F (1)
> AHASL1B (1401) CAGCATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCA
> AHASL1D (1095) CAGCACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCA
> AHASL1A (1208) CAGCACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCA
(1401)
+

> 1B-F (6)
> AHASL1B (1451) GTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGATTTGGGTTGCCAGCTG
> AHASL1D (1145) GTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGATTTGGGTTACCAAGCTG
> AHASL1A (1258) GTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGATTTGGGTTACCAAGCTG
(1451)
+ + + +

> AHASL1B (1501) CAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGAT
> AHASL1D (1195) CAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGAT
> AHASL1A (1308) CAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGAT
(1501)

> AHASL1B (1551) GGGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTACAGGAGTTGGCGTTGATCCGTAT
> AHASL1D (1245) GGTGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTACAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAT
> AHASL1A (1358) GGAGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTACAGGAGTTGGCATTGATCCGTAT
(1551)
+ + +

> AHASL1B (1601) TGAGAACCTCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCCAGCATCTGGGAA
> AHASL1D (1295) TGAGAACCTCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCCAGCATCTGGGAA
> AHASL1A (1408) TGAGAACCTCCGTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCCAGCATCTGGGAA
(1601)
+

< 1A-R (1)
> AHASL1B (1651) TGGTGGTGCAAGTGGGAGGATAGGTTTACAAAGGCCAACCGGGCGCACACA
> AHASL1D (1345) TGGTGGTGCAAGTGGGAGGATAGGTTTACAAAGGCCAATCGGGCGCACACA
> AHASL1A (1458) TGGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTACAAAGGCCAATCGGGCGCACACA
(1651)
+ +

```

FIG.4.2

```

> AHASL1B (1701) TACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC
> AHASL1D (1395) TACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC
> AHASL1A (1504) TACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC
(1701)

> AHASL1B (1751) GATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCGGCAGTTGTTGTGACGAAGAAGAGCG
> AHASL1D (1445) GATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCAGCAGTTGAGTGACGAAGAAGAGCG
> AHASL1A (1558) GATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCGGCAGTTGTTGTGACGAAGAAGAGCG
(1751) + +

> AHASL1B (1801) AAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTG
> AHASL1D (1495) AAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTG
> AHASL1A (1608) AAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTG
(1801)

> WT-F (1) GTGCTGCCTATGATCCGAAG
> MU-F (1) GGTGCTGCCTATGATCCGAAC
> AHASL1B (1851) TTGGATATCATTTGTCCTCATCAGGAGCAAGTGTGCTGCTATGATCCGAAG
> AHASL1D (1545) TTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCAAGTGTGCTGCTATGATCCGAAG
> AHASL1A (1658) TTGGATATCATGTTCCCGCATCAGGAGCAAGTGTGCTGCTATGATCCGAAG
(1851) + + +

> AHASL1B (1901) CCGTGGTGCTTTTAAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGT
> AHASL1D (1595) CCGTGGTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGT
> AHASL1A (1708) CCGTGGTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGT
(1901) +

> AHASL1B (1951) ACTGAAATTTGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGGGCAATCAGCA
> AHASL1D (1645) ACTGAAATTTGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGGGCAATCAGCA
> AHASL1A (1758) ACTGAAATTTGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGGGCAATCAGCA
Contig 1 (1951) ACTGAAATTTGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGGGCAATCAGCA
(1951)

> AHASL1B (2001) TGATACCTGCGTGTGTTATCAACTACTGGGGTTCAACTGTGAACCATGC
> AHASL1D (1695) TGATGCCCCGGTGTGTTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGARCCATGC
> AHASL1A (1808) TGATGCCCCGGTGTGTTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGC
< 1B-R (1) <<ACCTGCGTGTGTTATCAACTACT
(2001) + + + +

> AHASL1B (2051) GTTTTCTAGTTTGTCTGTTTCATTTCATATAAGCTTGTGTTACTTGTGTTCC
> AHASL1D (1745) GTTTTCTAGTTTGTCTGTTTCATTTCATATAAGCTTGTGTTACTTGTGTTCC
> AHASL1A (1858) GTTTTCTAGTTTGTCTGTTTCATTTCATATAAGCTTGTGTTACTTGTGTTCC
(2051) +

```

FIG.4.3

```

> AHASL1B (2101) GAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCTGTCTCTCTTTGTAGGGAYGTGCTGTC
> AHASL1D (1795) GAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTGTAGGGATGTGCTGTC
> AHASL1A (1908) GAACCGTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTATCTTTGTAGGGATGTGCTGTC
  < 1D-R (1) <AGTTCTCTTTGTAGGGATGTC
  < 1A-R (1) <GATCTTTGTAGGGATGCTGT
(2101) + + + ++ +

> AHASL1B (2151) ATAARATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGCACTTC
> AHASL1D (1845) ATAARATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGTACTTC
> AHASL1A (1958) ATAARATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGTACTTC
(2151) + + +

> AHASL1B (2201) CATGGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
> AHASL1D (1895) CATGCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
> AHASL1A (2008) CATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Contig 1 (2201) CATGSARHAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

FIG.5

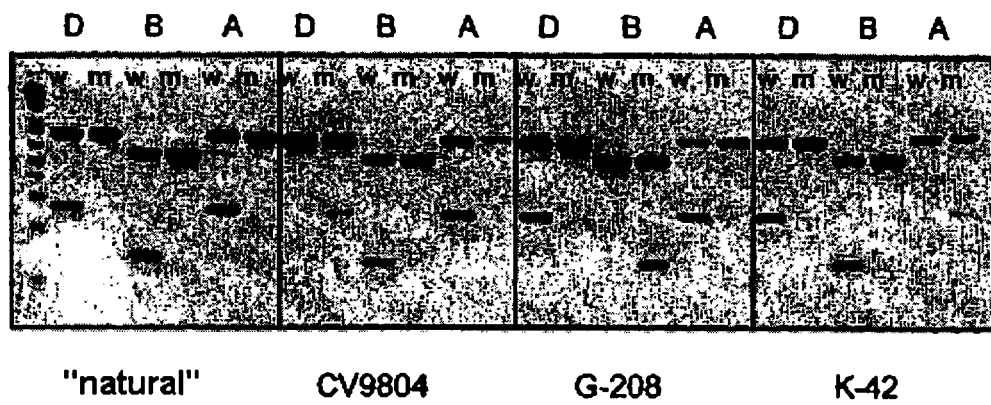


FIG.6

	Hexaploide L1D	Hexaploide L1B	Hexaploide L1A	Hexaploide L1B	Hexaploide L1A
Hexaploide L1D	100%	97,8%	98,2%	97,4%	97,8%
Hexaploide L1B		100%	97,7%	99,4%	97,3%
Hexaploide L1A			100%	97,3%	99,6%
Hexaploide L1B				100%	97,6%
Hexaploide L1A					100%

ES 2 330 235 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> BASF AG Zhao, Chengyan Ascenzi, Robert Singh, Bijay K.	
	<120> Métodos y Composiciones para Analizar Genes AHASL	
	<130> AM200128	
10	<150> 10/805,973	
	<151> 2004-03-22	
	<160> 21	
15	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
	<210> 1	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador CM-F	
25	<400> 1	
	ccgccgcaat atgctatcca g	21
30	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador CM-R	
40	<400> 2	
	gtaggacaag aaacttgcat g	21
45	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador MU-F	
55	<400> 3	
	cgtgctgcct atgatccgaa c	21
60	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador WT-F	

ES 2 330 235 T3

	<400> 4	
	gtgctgccta tgatccgaag	20
5	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 1A, D-F	
15	<400> 5	
	gggaggcgat cattgccact	20
20	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador 1B-F	
30	<400> 6	
	ggcagtggtgt gtcttcaccc	20
35	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador 1D-R	
	<400> 7	
45	gcacatccct acaaaagaga agat	24
	<210> 8	
50	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador 1B-R	
	<400> 8	
60	cagtagttga tacaacacgc aggt	24
	<210> 9	
	<211> 25	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 330 235 T3

<220>

<223> Cebador 1A-R

5 <400> 9

gacagcacat ccctacaaaa gatag

25

10 <210> 10

<211> 42

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> AHASL1D natural

20

<221> CDS

<222> (1)...(42)

25 <400> 10

cac gtg ctg cct atg atc cca agc ggt ggt gct ttc aag gac
His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp
1 5 10

42

30

<210> 11

<211> 14

35 <212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

<400> 11

40

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp
1 5 10

45 <210> 12

<211> 42

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

50

<220>

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> AHASL1D mutante

55

<221> CDS

<222> (1)...(42)

60 <400> 12

cac gtg ctg cct atg atc cca aac ggt ggt gct ttc aag gac
His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp
1 5 10

65

42

ES 2 330 235 T3

```

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
5 <213> Triticum aestivum

<400> 13

10      His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp
      1          5          10

15 <210> 14
<211> 42
<212> ADN
<213> Triticum aestivum
20 <220>
<221> misc_feature
<222> (0)...(0)
25 <223> AHASL1B natural
<221> CDS
<222> (1)...(42)

30 <400> 14

      cac gtg ctg cct atg atc cca agc ggt ggt gct ttt aag gac
      His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp
35      1          5          10
                                     42

<210> 15
40 <211> 14
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

45 <400> 15

      His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp
50      1          5          10

<210> 16
55 <211> 42
<212> ADN
<213> Triticum aestivum
<220>
60 <221> misc_feature
<222> (0)...(0)
<223> AHASL1B mutante
65 <221> CDS
<222> (1)...(42)

```

ES 2 330 235 T3

<400> 16

5 cac gtg ctg cct atg atc cca aac ggt ggt gct ttt aag gac 42
His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp
 1 5 10

<210> 17

10 <211> 14

<212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

15 <400> 17

His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp
1 5 10

20

<210> 18

<211> 42

25 <212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

 $\langle 220 \rangle$

<221> misc_feature

30 $\langle 222 \rangle$ (0)...(0)

<223> AHASL1A natural

<221> CDS

<222> (1)...(42)

<400> 18

40 cac gtg ctg cct atg atc oca agc ggt ggt gct ttc aag gac 42
His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp

45 **1** **5** **10**

<210> 19

<211> 14

50 <212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

55 <400> 19

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp
1 5 10

60

 $\langle 210 \rangle$ 20

<211> 42

<212> ADN

65 <213> *Triticum aestivum*

 $\langle 220 \rangle$

<221> misc_feature

ES 2 330 235 T3

<222> (0)..(0)
<223> AHASL1A mutante
<221> CDS
5 <222> (1)...(42)

<400> 20

10 cac gtg ctg cct atg atc cca aac ggt ggt gct ttc aag gac 42
 His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp
 1 5 10

15 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
20 <213> *Triticum aestivum*

 <400> 21

25 His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp
 1 5 10

30

35

40

45

50

55

60

65