

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 902**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2018** **E 18169122 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2022** **EP 3560330**

54 Título: **Plantas con digestibilidad mejorada y haplotipos marcadores**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.09.2022

73 Titular/es:

KWS SAAT SE & CO. KGAA (100.0%)
Grimsehlstraße 31
37574 Einbeck, DE

72 Inventor/es:

KLOIBER-MAITZ, MONIKA;
BOLDUAN, THERESE;
OUZUNOVA, MILENA;
MEYER, NINA y
LOPEZ-DURAN, CAROLINA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 922 902 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Plantas con digestibilidad mejorada y haplotipos marcadores

Campo de la invención

5 La invención se refiere a loci de rasgos cuantitativos (QTL) y marcadores asociados implicados y/o asociados con una digestibilidad mejorada de plantas y partes de plantas, como el maíz. La invención se refiere además a los usos de tales QTL o marcadores para propósitos de identificación y/o selección, así como plantas transgénicas o no transgénicas.

Antecedentes de la invención

10 El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo forrajero anual más importante del mundo. Cada año se ensilan más de 3 millones de hectáreas de maíz, principalmente en el norte de Europa. Debido al alto contenido energético y a la eficiencia de conversión alimenticia, el maíz forrajero es un cultivo alimenticio importante para el ganado lechero y de carne, y está afectando significativamente la producción de leche y carne. Existe una amplia variación genética en las características del forraje tanto para la planta entera de maíz como para el rastrojo (Geiger et al., 1992; Barrière et al., 2003).

15 Por lo tanto, mejorar la digestibilidad es un objetivo importante para los programas de mejoramiento de maíz forrajero. La energía suministrada por el forraje a la dieta de un animal rumiante o herbívoro está relacionada con la ingestibilidad y digestibilidad del forraje. La digestibilidad de cualquier componente del forraje (materia seca, materia orgánica o pared celular) se mide como porcentaje de ensilaje absorbido en el tracto digestivo del animal (Barrière et al., 2003). La digestibilidad general del maíz forrajero se ve afectada por la fracción altamente digestible del grano y el rastrojo. La composición y la digestibilidad del rastrojo limitan la calidad del maíz forrajero. Las principales fracciones de
20 rastrojos son las hemicelulosas, la celulosa y las ligninas. Los cultivares modernos de maíz forrajero combinan un alto rendimiento de materia seca con una alta digestibilidad del rastrojo.

Es demasiado costoso realizar mediciones de digestibilidad con animales, especialmente cuando se realiza una evaluación a gran escala de germoplasma en programas de fitomejoramiento. Se han desarrollado métodos biológicos y químicos para evaluar la digestibilidad del maíz y otros cultivos forrajeros (Van Soest et al., 1963). La fibra detergente
25 neutra (NDF), el residuo después de eliminar el contenido soluble de las células, es un indicador importante de la pared celular y la celulosa de las plantas. La digestibilidad *in vitro* de la NDF (IVNDFD) de los forrajes es una estimación de la digestibilidad de la pared celular asumiendo que la parte del material vegetal que no es de NDF es completamente digerible (Méchin et al. 2000). Además, se ha informado que el uso de NIRS mide con precisión las características de digestibilidad en muchos cultivos forrajeros, incluido el maíz (Lübberstedt et al., 1997a, b; Zimmer et al., 1990).

30 Lübberstedt et al. (1997a, b) publicaron por primera vez QTL relacionados con las características agronómicas y de calidad del maíz forrajero, y QTL para la digestibilidad de toda la planta. La explotación de la variación genética disponible para la digestibilidad del rastrojo mediante la selección asistida por marcadores (MAS) parece ser una forma prometedora de mejorar la digestibilidad del forraje. Además de la variación genética, la variación ambiental podría ser la razón de esos rasgos inconsistentes. Los análisis de QTL de las características del forraje en cuatro poblaciones de maíz diferentes revelaron solo unos pocos QTL que mostraban interacciones epistáticas o interacciones con el
35 medio ambiente (Lübberstedt et al., 1998). Se detectaron siete QTL para DNDF mediante el uso de 242 RIL derivados del cruce F838 x F286 que se evaluaron en experimentos de valor propio de por sí valiosos en seis entornos, y se encontraron dos QTL principales (Barrière et al., 2010). Se realizaron análisis de QTL adicionales mediante el uso de progenie RIL derivada de un cruce entre una línea antigua dentada y una línea dentada moderna, y se informaron por primera vez nuevos QTL en los contenedores 2.06 y 5.04 para ADL/NDF y DNDF (Barrière et al. 2012).

40 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención abordar una o más de las deficiencias de la técnica anterior. Existe una necesidad persistente de mejorar la digestibilidad de los cultivos forrajeros, así como la identificación de plantas, incluidas partes o derivados de plantas particulares que tengan una mayor digestibilidad. En particular, es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevos QTL principales para la digestibilidad y el gen o genes causantes y la
45 provisión de marcadores que permitan el uso económico de estos QTL en el desarrollo y mejoramiento del maíz.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la identificación de un QTL principal para la digestibilidad de las plantas, así como en la identificación de un gen F35H enlazado y responsable del QTL para la digestibilidad de las plantas y la descripción de un haplotipo marcador único para mejorar la digestibilidad.

50 Se han identificado marcadores moleculares que están asociados con la digestibilidad de las plantas y se describen alelos marcadores asociados con una digestibilidad mejorada. Uno de los alelos marcadores descritos es un gen F35H mutado.

La invención en particular se refiere a métodos para detectar el alelo de QTL identificado asociado con una digestibilidad mejorada, así como a la detección de cualquiera de los alelos marcadores descritos. La invención se
55 refiere además a los alelos marcadores y ácidos polinucleicos descritos útiles para la detección de los alelos

- marcadores, tales como cebadores y sondas, y kits que los comprenden. La invención se refiere además a métodos para mejorar la digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz, en particular mediante la introducción artificial en las plantas y/o la selección de plantas que comprenden los alelos marcadores descritos en el presente documento, como en particular la inducción de mutaciones de F35H, preferiblemente mutaciones que alteran expresión de F35H o la actividad enzimática de F35H, por ejemplo, reducir o eliminar la expresión de F35H o la actividad de F35H o bien reducir la expresión de F35H o la actividad de F35H, o aumentar la actividad de F35H. La invención se refiere además a plantas de maíz con digestibilidad mejorada, así como partes de plantas, en particular rastrojo, con digestibilidad mejorada, en la que la planta de maíz o parte de una planta de maíz no se obtiene exclusivamente mediante un proceso esencialmente biológico.
- 5 La presente invención está capturada en particular por una cualquiera o cualquier combinación de uno o más de los siguientes elementos numerados [01] a [25], con cualquier otro elemento y/o realizaciones.
- Un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada que comprende
- (i) opcionalmente, aislar material genético, preferiblemente material genético, de al menos una célula de la planta o
- 15 parte de la planta;
- (ii) a) detección de la presencia de un alelo de QTL, tal como un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una
- 20 proteína F35H no funcional (p. proteína F35H) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, o
- (ii) b) detección de la expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H o una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H con actividad enzimática reducida, o
- 25 (ii) c) detección de la presencia de una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H (como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción;
- (iii) opcionalmente, seleccionar la planta o parte de la planta en la que está presente el QTL o la mutación o en la que se reduce o elimina la expresión del ARNm y/o la proteína F35H o se reduce la actividad enzimática de F35H;
- 30 en el que la digestibilidad mejorada se refiere a una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b) o c) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica; y
- en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:
- 35 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- 40 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3;
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.
- El método de acuerdo con el punto [01], en el que el método comprende la detección de la presencia del alelo marcador molecular ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.
- 50
- Una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada que comprende un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a la expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida
- 55

tras la traducción; o una planta de maíz o parte de una planta de maíz que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción; o una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H o que tiene actividad enzimática reducida; o una planta de maíz o parte de una planta de maíz que comprende una molécula de ARNi, tal como ARNbc, ARNpi, ARNph o miARN, dirigida contra, que se dirige o que hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F35H, o que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica (y expresa o es capaz de expresar) una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F35H; o una planta de maíz o parte de una planta de maíz que comprende un sistema CRISPR/Cas específico de ARN, tal como un sistema CRISPR/Cas13a, dirigido contra o que se dirige a una secuencia de nucleótidos que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 o una o más secuencias de polinucleótidos que codifican (y expresan o son capaces de expresar) dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN;

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas;

en el que la planta de maíz o parte de la planta de maíz no se obtiene exclusivamente mediante un proceso esencialmente biológico.

La planta de maíz o parte de una planta de maíz de acuerdo con el punto [03] que comprende el alelo marcador de ma61134xxx.

La planta de maíz o parte de una planta de maíz de acuerdo con el punto [03] o [04], en la que dicha planta comprende dicho alelo de QTL, dicho alelo marcador, dicha secuencia de nucleótidos del gen que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene la mutación, codificando dicha molécula de ARNi o dicha secuencia de polinucleótidos (y expresando o siendo capaz de expresar) la molécula de ARNi, dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN y/o dichas una o más secuencias de polinucleótidos que codifican (y que expresan o son capaces de expresar) el sistema CRISPR/Cas específico de ARN como transgén o como (gen) endógeno editado.

Un método para mejorar la digestibilidad de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, que comprende la introducción a través de una integración estable o transitoria por medio de transformación, inserción usando tecnología de edición de genes o modificación usando mutagénesis aleatoria o dirigida en el genoma de la planta o parte de la planta

(a) una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción.

Un método para mejorar la digestibilidad de una planta o parte de una planta, que comprende reducir la expresión del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H, reduciendo la actividad enzimática de un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450;

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a) o b) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;

(iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;

(v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y

5 (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

El método de acuerdo con el punto [07], que comprende

10 (a) introducir en una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 (en el genoma de la planta o de la parte de la planta) una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción, o

15 (b) introducir en la planta o en la parte de la planta una molécula de ARNi, tal como ARNbc, ARNpi, ARNph o miARN, dirigida contra, que se dirige a, o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una secuencia de polinucleótidos que codifica (y expresa o es capaz de expresar) una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a, o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o

20 (c) introducir en la planta o la parte de la planta un sistema CRISPR/Cas específico de ARN, tal como un sistema CRISPR/Cas13a, dirigido contra o que se dirige a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una o más secuencias de polinucleótidos que codifican (y expresan o son capaces de expresar) dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN, o

(d) introducir en la planta o parte de la planta un compuesto químico o un anticuerpo que reduzca (o sea capaz de reducir) la actividad enzimática de la proteína F35H o inhiba (o sea capaz de inhibir) la actividad enzimática de la proteína F35H tras la interacción con dicho F35H.

25 Un método para producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, que comprende

30 (a) introducir mediante integración estable o transitoria mediante transformación, inserción usando tecnología de edición de genes o modificación mediante mutagénesis aleatoria o dirigida en el genoma de una planta o parte de una planta una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, o

35 (b) introducir mediante modificación utilizando mutagénesis aleatoria o dirigida en una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 (en el genoma de la planta o una parte de la planta) una mutación que conduce a la expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción, o

40 (c) introducir a través de integración estable o transitoria por medio de transformación o inserción utilizando tecnología de edición de genes en la planta o la parte de la planta una molécula de ARNi, tal como ARNbc, ARNpi, ARNph o miARN, dirigida contra, que se dirige a, o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una secuencia de polinucleótidos que codifica (y que expresa o es capaz de expresar) una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a, o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o

45 (d) introducir mediante integración estable o transitoria por medio de transformación o inserción utilizando tecnología de edición de genes en la planta o la parte de la planta un sistema CRISPR/Cas específico de ARN, tal como un sistema CRISPR/Cas13a, dirigido contra, o que se dirige a, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una o más secuencias de polinucleótidos que codifican (y expresan o son capaces de expresar) dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN, o

(e) introducir en la planta o parte de la planta un compuesto químico o un anticuerpo que reduzca (o sea capaz de reducir) la actividad enzimática de la proteína F35H tras la interacción con dicha F35H; y

50 (f) opcionalmente, regenerar una planta a partir de la parte de la planta de cualquiera de (a) a (e);

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;
- 5 (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y
- 10 (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

Una planta o parte de una planta producida por el método de acuerdo con el punto [9].

Una progenie de la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos [03] a [05] o [10].

- 15 El método, planta o parte de la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha planta es una planta de maíz, el QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende y/o está flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01.

- 20 El método, la planta o la parte de la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que ma61134xxx es una inserción de uno o más nucleótidos entre las posiciones 134254381 y 134254382 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, preferiblemente una inserción como se establece en la SEQ ID NO: 12; y/o ma61070s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 121588825 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en la que dicho nucleótido es A o T, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 13; y/o ma30168s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 139452428 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en la que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 14; y/o ma50827s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 127454426 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en la que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 15; y/o ma16983s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 137363784 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en la que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 16; y/o ma17117s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 132038900 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en la que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 17; y/o ma61125s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 135947973 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en la que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 18

- 35 El método, la planta o la parte de la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que la mutación es una mutación de marco de lectura o una mutación no sentido, da como resultado una expresión alterada de la secuencia de nucleótidos o una actividad enzimática alterada de la proteína codificada, preferiblemente en una expresión reducida o ausente de la secuencia de nucleótidos o una actividad enzimática reducida de la proteína codificada o una actividad enzimática aumentada de la proteína codificada, da como resultado una secuencia de proteína alterada codificada por la secuencia de nucleótidos, o es una inserción, eliminación o sustitución de al menos un nucleótido en una región codificante, en una señal de empalme o en un elemento regulador de dicha secuencia de nucleótidos.

- 45 El método, planta o parte de la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que la mutación es una inserción, preferiblemente en un exón, preferiblemente una inserción en el primer exón, de uno o más nucleótidos, preferiblemente una inserción de cambio de marco, más preferiblemente la inserción es de 187 nucleótidos o aproximadamente 187 nucleótidos y/o la inserción está entre la posición 97 y 98 del gen F35H representado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En una realización preferida particular, el F35H mutado comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11

- 50 El método, planta o parte de planta de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha parte de planta no es material de propagación.

El método, planta o parte de planta de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha parte de la planta es rastrojo.

El método, la planta o la parte de la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que la planta es o la parte de la planta es de maíz.

- 55 Un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), que se hibrida específicamente con cualquiera de las secuencias de la SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, o el complemento o el complemento inverso de las mismas.

- Uso del ácido polinucleico de acuerdo con el punto [19] o ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), para la identificación de una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada o para la selección de una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [03] a [05], preferiblemente en el método de acuerdo con el punto [01] o [02], en el que preferiblemente el ácido polinucleico es adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso para un locus en un intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada, en el que el intervalo cromosómico está en el cromosoma 9 y flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01.
- Un método para producir un material vegetal ensilado o alimento para animales que tiene una digestibilidad mejorada, que comprende
- (a) cultivar la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos [03] a [05] u [11] o una planta identificada o identificable por el método de las reivindicaciones 1 o 2,
- (b) cosechar la planta o una parte de ella,
- (c) opcionalmente, trocear y/o triturar la planta o una parte de ella, y
- (d) ensilar la planta o una parte de la misma de (b) o (c), opcionalmente añadiendo un estimulante como un inoculante bacteriano, un azúcar y una enzima.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Efectos de la DNDF (fibra detergente neutra digestible) de QTL en el cromosoma 9 del maíz (*Zea mays*). Identificación de un QTL fuerte para la digestibilidad en el cromosoma 9. Se indica el porcentaje de DNDF del rastrojo de maíz.
- Figura 2: Posiciones de loci marcadores para QTL de ensilaje. SeqCapture ha encontrado marcadores con base en AGPv02 y WGS (secuenciación del genoma completo) de la línea de QTL y la comparación con la referencia PH207.
- Figura 3: Región genética finamente mapeada de QTL de ensilaje por marcadores moleculares en diferentes genotipos recombinantes.
- Figura 4: Alineación de la secuencia de nucleótidos de un gen de referencia F35H y un gen F35H mutado de acuerdo con una realización de la invención.

Descripción detallada de la invención

- Antes de describir el presente sistema y método de la invención, debe entenderse que esta invención no se limita a sistemas y métodos o combinaciones particulares descritos, ya que tales sistemas, métodos y combinaciones pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen tanto los referentes en singular como en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

- Los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido por" tal como se utilizan en este documento son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene" y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método adicionales no mencionados. Se apreciará que los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido por" tal como se utilizan en el presente documento comprenden los términos "que consiste en", "consiste" y "consiste en", así como los términos "que consiste esencialmente en", "consiste esencialmente" y "consiste esencialmente en".

La mención de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de los respectivos intervalos, así como los puntos finales mencionados.

- El término "aproximado" o "aproximadamente", como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de +/- 20 % o menos, preferiblemente +/- 10 % o menos, más preferiblemente +/- 5 % o menos, y aún más preferiblemente +/- 1 % o menos y del valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para realizar en la invención divulgada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximada" o "aproximadamente" también se describe de forma específica y preferiblemente.

- Mientras que los términos "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más o al menos uno o unos miembros de un grupo de miembros, es claro en sí mismo, por medio de una mayor ejemplificación, el término abarca, entre otras cosas una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 , etc. de dichos miembros, y hasta todos de dichos miembros.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica a la que

pertenece esta invención. A modo de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención. Trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de tecnología de ADN recombinante incluyen Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (con actualizaciones periódicas) ("Ausubel et al. 1992"); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990; PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995); Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual; y Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987). Los principios generales de la microbiología se exponen, por ejemplo, en Davis, B. D. et al., Microbiology, 3a ed., Harper & Row publishers, Filadelfia, Pensilvania (1980).

En los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a "una realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, la aparición de la frase "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no se refiere necesariamente a la misma realización, pero puede. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como será evidente para un experto en la materia a partir de esta divulgación, en una o más realizaciones. Además, aunque algunas realizaciones descritas en el presente documento incluyen algunas pero no otras características incluidas en otras realizaciones, las combinaciones de características de diferentes realizaciones están destinadas a estar dentro del alcance de la invención y forman diferentes realizaciones, como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, en las reivindicaciones adjuntas, cualquiera de las realizaciones reivindicadas puede usarse en cualquier combinación.

En la siguiente descripción detallada de la invención, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma, y en los que se muestran a modo de ilustración únicamente realizaciones específicas en las que se puede poner en práctica la invención. Debe entenderse que pueden utilizarse otras realizaciones y pueden realizarse cambios estructurales o lógicos sin apartarse del alcance de la presente invención. La siguiente descripción detallada, por lo tanto, no debe tomarse en un sentido limitativo, y el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Los elementos (características) y realizaciones preferidas de esta invención se establecen a continuación. Cada uno de los elementos y realizaciones de la invención así definidos puede combinarse con cualquier otro elemento y/o realizaciones a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otro rasgo o característica o elemento indicados como preferidos o ventajosos.

Como se usa en este documento, "maíz" se refiere a una planta de la especie *Zea mays*, preferiblemente *Zea mays ssp mays*.

Como se usa en este documento, "sorghum" se refiere a una planta del género *Sorghum*, e incluye, sin limitación *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense*, *Sorghum bicolor x Sorghum sudanense*, *Sorghum x alnum* (*Sorghum bicolor x Sorghum halepense*), *Sorghum bicolor x Sorghum halepense*, *Sorghum x drummondii*, *Sorghum halepense* y/o *Sorghum proproinquum*.

Como se usa en este documento, "caña de azúcar" se refiere a una planta de la especie *Saccharum officinarum*.

El término "planta" incluye plantas enteras, incluidos los descendientes o descendientes de las mismas. El término "parte de la planta" incluye cualquier parte o derivado de la planta, incluidos tejidos o estructuras vegetales particulares, células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de células o tejidos vegetales a partir de los cuales se pueden regenerar plantas, callos de plantas, grupos de plantas y células vegetales que están intactos en plantas o partes de plantas, tales como semillas, granos, mazorcas, flores, cotiledones, hojas, tallos, yemas, raíces, puntas de raíces, rastrojos y similares. Las partes de plantas pueden incluir partes o derivados de plantas procesadas, que incluyen flores, aceites, extractos, etc. En ciertas realizaciones la parte o derivado de planta como se menciona en el presente documento es rastrojo.

Rastrojo, como se usa en este documento, tiene su significado habitual conocido en la técnica. A modo de orientación adicional, y sin limitación, el rastrojo puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en hojas y tallos de cultivos de campo, tales como el maíz o el sorgo, que comúnmente se dejan en un campo después de cosechar el grano, o como caña de azúcar. El rastrojo también puede incluir mazorcas (por ejemplo, el núcleo central de una mazorca de maíz, sin los granos). El rastrojo también puede excluir las mazorcas. El rastrojo también puede incluir vainas o cascarillas (por ejemplo, la cubierta exterior frondosa de una mazorca de maíz). El rastrojo también puede excluir vainas o cascarillas. El rastrojo es similar a la paja, el residuo que queda después de que cualquier grano de cereal o pasto haya sido cosechado en la madurez para su semilla. Puede ser pastoreado directamente por el ganado

o secado para su uso como forraje. El rastrojo (de maíz) se puede usar como alimento, ya sea pastoreado como forraje, picado como ensilaje para usarlo más tarde como forraje, o recolectado para uso forrajero directo (no ensilado). El forraje de maíz generalmente se ensila en regiones más frías, pero se puede cosechar durante todo el año en los trópicos y alimentar a los animales como forraje verde. En el caso de uso de ensilaje, es habitual que toda la planta (grano y rastrojo juntos) se corte en pedazos que luego se trituran entre rodillos durante la cosecha. Además de los tallos, hojas, cáscaras y mazorcas que quedan en el campo, también pueden quedar núcleos de grano de la cosecha. Estos granos sobrantes, junto con el rastrojo de maíz, sirven como fuente adicional de alimento para el ganado en pastoreo.

En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta comprende, consiste en, o consiste esencialmente en uno o más, preferiblemente todos entre, tallos, hojas y mazorcas. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta son hojas. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta son tallos. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta son mazorcas. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta comprende, consiste en, o consiste esencialmente en uno o más, preferiblemente todos entre, tallos y hojas. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta comprende, consiste en, o consiste esencialmente en uno o más, preferiblemente todos, entre tallos y mazorcas. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una o más, preferiblemente todos, entre hojas y mazorcas. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta no es material de propagación (funcional), tal como germoplasma, semilla o embrión de planta u otro material a partir del cual se puede regenerar una planta. En ciertas realizaciones, la parte o derivado de la planta no comprende órganos reproductores masculinos y femeninos (funcionales). En determinadas realizaciones, la parte o el derivado de la planta es o comprende material de propagación, pero material de propagación que no se usa o no se puede usar (más) para producir o generar nuevas plantas, tal como material de propagación que se ha convertido química, mecánicamente o de otro modo en no funcionales, por ejemplo mediante tratamiento térmico, tratamiento con ácido, compactación, trituración, troceado, ensilaje, etc.

Como se usa en el presente documento, "digestibilidad" se refiere y se mide como porcentaje de producto (tal como una planta de maíz, sorgo o caña de azúcar o parte o derivado de una planta, incluidos, por ejemplo, materia seca, materia orgánica o pared celular del producto) absorbido en el tracto digestivo animal (Barrière et al. 2003). Se han desarrollado métodos biológicos y químicos para evaluar la digestibilidad del maíz y otros cultivos forrajeros (Van Soest et al., 1963). La fibra detergente neutra (NDF), el residuo después de eliminar el contenido soluble de las células, es un indicador importante de la pared celular y la celulosa de las plantas. La digestibilidad *in vitro* de la NDF (IVNDFD) de los forrajes es una estimación de la digestibilidad de la pared celular asumiendo que la parte del material vegetal que no es NDF es completamente digerible (Méchin et al., 2000). Además, se ha informado que el uso de NIRS mide con precisión las características de digestibilidad en muchos cultivos forrajeros, incluido el maíz (Lübbert et al., 1997a, b; Zimmer et al., 1990). En ciertas realizaciones, el animal es un mamífero. En ciertas realizaciones, el animal es un rumiante. En ciertas realizaciones, el animal es un herbívoro. En ciertas realizaciones, el animal es un mamífero herbívoro.

La digestibilidad mejorada a la que se hace referencia en el presente documento se refiere al aumento de la digestibilidad de una planta o parte de una planta o derivado que tiene una característica de acuerdo con la invención, tal como una mutación, marcador, SNP o QTL, como se describe en este documento en otro lugar, en comparación con una planta o parte de una planta o derivado que no tenga tal característica. En determinadas realizaciones, una digestibilidad mejorada o aumentada se refiere a un aumento en el DNDF medio en al menos un 1 %, tal como al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 6 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 9 % o al menos un 10 %, preferiblemente al menos el 2 %, más preferiblemente al menos el 3 %, tal como al menos el 4 %.

El término "locus" (plural loci) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma en el que, por ejemplo, se encuentra un QTL, un gen o un marcador genético. Como se usa en el presente documento, el término "locus de rasgos cuantitativos" o "QTL" tiene su significado habitual conocido en la técnica. Por medio de orientación adicional, y sin limitación, un QTL puede referirse a una región de ADN que está asociada con la expresión diferencial de un rasgo fenotípico cuantitativo en al menos un trasfondo genético, por ejemplo, en al menos una población reproductora. La región del QTL engloba o está íntimamente ligada al gen o genes que afectan al rasgo en cuestión. Un "alelo de un QTL" puede comprender múltiples genes u otros factores genéticos dentro de una región genómica contigua o grupo de enlace, tal como un haplotipo. Un alelo de un QTL puede indicar un haplotipo dentro de una ventana específica en la que dicha ventana es una región genómica contigua que puede definirse y rastrearse con un conjunto de uno o más marcadores monomórficos y/o polimórficos. Un haplotipo se puede definir por la huella digital única de los alelos en cada marcador dentro de la ventana especificada. Un QTL puede codificar para uno o más alelos que afectan la expresividad de un fenotipo distribuido continuamente (cuantitativo). En ciertas realizaciones, el QTL como se describe en el presente documento puede ser homocigoto. En ciertas realizaciones, el QTL como se describe en el presente documento puede ser heterocigoto.

Como se usa en el presente documento, el término "alelo" o "alelos" se refiere a una o más formas alternativas, es decir, diferentes secuencias de nucleótidos, de un locus.

Como se usa en el presente documento, el término "alelos mutantes" o "mutación" de alelos incluye alelos que tienen una o más mutaciones, tales como inserciones, eliminaciones, codones de parada, cambios de base (por ejemplo,

transiciones o transversiones) o alteraciones en uniones de empalme/sitios de señal de empalme, que pueden o no dar lugar a productos genéticos alterados. Las modificaciones en los alelos pueden surgir en regiones codificantes o no codificantes (por ejemplo, regiones promotoras, exones, intrones o uniones de empalme).

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "introgresión", "introgresado" e "que introgressa" se refieren tanto a un proceso natural como artificial mediante el cual fragmentos cromosómicos o genes de una especie, variedad o variedad de cultivo se trasladan al genoma de otra especie, variedad o variedad de cultivo mediante cruzamiento de esas especies. El proceso puede completarse opcionalmente mediante retrocruzamiento con el padre recurrente. Por ejemplo, la introgresión de un alelo deseado en un locus específico puede transmitirse al menos a una progenie a través de un cruce sexual entre dos padres de la misma especie, en la que al menos uno de los padres tiene el alelo deseado en su genoma. Alternativamente, por ejemplo, la transmisión de un alelo puede ocurrir por recombinación entre dos genomas donantes, por ejemplo, en un protoplasto fusionado, en el que al menos uno de los protoplastos donantes tiene el alelo deseado en su genoma. El alelo deseado puede detectarse, por ejemplo, mediante un marcador que está asociado con un fenotipo, en un QTL, un transgén o similar. En cualquier caso, la descendencia que comprende el alelo deseado puede retrocruzarse repetidamente con una línea que tenga un ambiente genético deseado y seleccionarse para el alelo deseado, para dar como resultado que el alelo se fije en un ambiente genético seleccionado. "Fragmento de introgresión" o "segmento de introgresión" o "región de introgresión" se refiere a un fragmento cromosómico (o parte o región cromosómica) que se ha introducido en otra planta de la misma especie o de especies relacionadas, ya sea de forma artificial o natural, tal como por técnicas de cruzamiento o reproducción tradicional, tal como retrocruzamiento, es decir, el fragmento introgresado es el resultado de métodos de reproducción a los que se refiere el verbo "introgressar" (tal como retrocruzamiento). Se entiende que el término "fragmento de introgresión" nunca incluye un cromosoma completo, sino solo una parte de un cromosoma. El fragmento de introgresión puede ser grande, por ej., incluso tres cuartos o la mitad de un cromosoma, pero es preferiblemente más pequeño, tal como aproximadamente 50 Mb o menos, tal como aproximadamente 30 Mb o menos, aproximadamente 20 Mb o menos, aproximadamente 25 Mb o menos, aproximadamente 10 Mb o menos, aproximadamente 9 Mb o menos, aproximadamente 8 Mb o menos, aproximadamente 7 Mb o menos, aproximadamente 6 Mb o menos, aproximadamente 5 Mb o menos, aproximadamente 4 Mb o menos, aproximadamente 3 Mb o menos, aproximadamente 2.5 Mb o 2 Mb o menos, aproximadamente 1 Mb (igual a 1,000,000 de pares de bases) o menos, o aproximadamente 0.5 Mb (igual a 500,000 pares de bases) o menos, tal como aproximadamente 200,000 pb (igual a 200 kilopares de bases) o menos, aproximadamente 100,000 pb (100 kb) o menos, aproximadamente 50,000 pb (50 kb) o menos, aproximadamente 25,000 pb (25 kb) o menos.

Se dice que un elemento genético, un locus, un fragmento de introgresión, un QTL o un gen o alelo que confiere un rasgo (tal como digestibilidad mejorada) es "obtenible de" o puede "obtenerse de" o "derivable de" o puede "derivarse de" o "tal como está presente en" o "como se encuentra en" una planta o parte de una planta como se describe en este documento en otra parte si puede transferirse de la planta en la que está presente a otra planta en la que no está presente (tal como como una línea o variedad) utilizando técnicas tradicionales de reproducción sin que resulte en un cambio fenotípico de la planta receptora aparte de la adición del rasgo conferido por el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, QTL, gen o alelo. Los términos se usan indistintamente y el elemento genético, el locus, el fragmento de introgresión, el QTL, el gen o el alelo pueden transferirse a cualquier otro ambiente genético que carezca del rasgo. No solo se pueden usar los componentes que comprenden el elemento genético, el locus, el fragmento de introgresión, el QTL, el gen o el alelo, sino también la progenie/descendientes de dichas plantas que han sido seleccionadas para retener el elemento genético, el locus, el fragmento de introgresión, el QTL, el gen o el alelo, se pueden usar y están incluidos en este documento. El experto en la materia puede determinar si una planta (o ADN genómico, célula o tejido de una planta) comprende el mismo elemento genético, locus, fragmento de introgresión, QTL, gen o alelo que puede obtenerse de dicha planta utilizando una o más técnicas conocidas en el arte, tales como ensayos fenotípicos, secuenciación del genoma completo, análisis de marcadores moleculares, mapeo de rasgos, descripción cromosómica, pruebas de alelismo y similares, o combinaciones de técnicas. Se entenderá que también pueden incluirse plantas transgénicas o modificadas genéticamente.

Tal como se usan en este documento, los términos "transformación" y "modificación transgénica" se usan todos en este documento como sinónimos de la transferencia de moléculas de ácido nucleico aisladas y clonadas al ADN, generalmente el ADN cromosómico o el genoma, de otro organismo/especie o del mismo organismo/especie pero en un lugar que difiere del lugar en el que la molécula de ácido nucleico se encuentra naturalmente en el ADN cromosómico o genoma.

"Introducción" en el sentido de la presente invención incluye integración estable o transitoria por medio de transformación que incluye transformación mediada por Agrobacterium, transfección, microinyección, bombardeo biolístico, inserción utilizando tecnología de edición de genes tal como sistemas CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas, en particular CRISPR/Cas9 o CRISPR/Cpf1), CRISPR/CasX o CRISPR/CasY), TALEN, nucleasas o meganucleasas de dedos de zinc, recombinación homóloga opcionalmente mediante una de las tecnologías de edición de genes mencionadas a continuación, incluida preferiblemente una plantilla de reparación, modificación de genes endógenos utilizando mutagénesis aleatoria o dirigida tal como TILLING o la tecnología de edición de genes mencionada anteriormente, etc.

Los "organismos transgénicos" u "modificados genéticamente" (GMO) como se usan en este documento son organismos cuyo material genético ha sido alterado usando técnicas generalmente conocidas como "tecnología de

ADN recombinante". La tecnología de ADN recombinante abarca la capacidad de combinar moléculas de ADN de diferentes fuentes en una sola molécula *ex vivo* (por ejemplo, en un tubo de ensayo). Esta terminología generalmente no cubre los organismos cuya composición genética ha sido alterada por cruzamiento convencional o por "mutagénesis", ya que estos métodos son anteriores al descubrimiento de las técnicas de ADN recombinante. "No transgénico", tal como se usa en este documento, se refiere a plantas y productos alimenticios derivados de plantas que no son "transgénicos" u "organismos modificados genéticamente" como se definió anteriormente.

"Transgén" o "exógeno" se refiere a una molécula de ácido nucleico o un locus genético que comprende una secuencia de ADN, tal como un gen recombinante, que se ha introducido en el genoma de una planta mediante transformación, tal como la transformación mediada por *Agrobacterium*. Una planta que comprende un transgén integrado de forma estable en su genoma se denomina "planta transgénica". "Endógeno" se refiere a una molécula de ácido nucleico o un locus genético que ocurre naturalmente en el genoma de una planta. "Edición de genes" o "edición del genoma" se refiere a una modificación genética en la que se inserta, elimina, modifica o reemplaza ADN o ARN en el genoma de un organismo. La edición de genes puede comprender mutagénesis dirigida o no dirigida (aleatoria). La mutagénesis dirigida se puede lograr, por ejemplo, con nucleasas de diseño, tal como por ejemplo con meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas basadas en efectores similares a activadores de transcripción (TALEN) y el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interesparadas (CRISPR/Cas). Estas nucleasas crean roturas de doble cadena específicas del sitio (DSB) en las ubicaciones deseadas del genoma. Las roturas de doble cadena inducidas se reparan mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la recombinación homóloga (HR) o la reparación dirigida por homología (HDR), lo que da como resultado mutaciones dirigidas o modificaciones del ácido nucleico. El uso de nucleasas de diseño, opcionalmente junto con una plantilla de reparación/plantilla de recombinación, es particularmente adecuado para generar eliminaciones o inactivaciones de genes. En ciertas realizaciones, se desarrollan nucleasas de diseño que inducen específicamente una mutación en el gen F35H, como se describe en este documento en otra parte, para generar un F35H mutado o una eliminación del gen F35H. En determinadas realizaciones, se desarrollan nucleasas de diseño, en particular sistemas CRISPR/Cas específicos de ARN que se dirigen específicamente al ARNm de F35H, tal como para escindir el ARNm de F35H y generar una desactivación del gen/ARNm/proteína de F35H. Los sistemas de administración y expresión de los sistemas de nucleasas de diseño son bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la nucleasa o la nucleasa dirigida/específica del sitio/buscadora de blancos es, comprende, consiste esencialmente o consiste en un sistema o complejo CRISPR/Cas (modificado), una proteína Cas (modificada), un dedo de zinc (modificado), una nucleasa con dedos de zinc (modificada) (ZFN), un efector similar al factor de transcripción (TALE) (modificado), una nucleasa efectora similar al factor de transcripción (modificada) (TALEN), o una meganucleasa (modificada). En determinadas realizaciones, dicha nucleasa (modificada) o nucleasa dirigida/específica del sitio/buscadora de blancos es, comprende, consiste esencialmente en o consiste en una nucleasa guiada por ARN (modificada). Se entenderá que en ciertas realizaciones, las nucleasas pueden tener codones optimizados para la expresión en plantas. Como se usa en el presente documento, el término "direccionamiento" de una secuencia de ácido nucleico seleccionada significa que una nucleasa o complejo de nucleasa actúa de una manera específica de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, en el contexto del sistema CRISPR/Cas, el ARN guía es capaz de hibridarse con una secuencia de ácido nucleico seleccionada. Como se usa en el presente documento, "hibridación" o "que hibrida" se refiere a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno puede ocurrir por apareamiento de bases de Watson Crick, enlaces de Hoogsteen o de cualquier otra manera específica de la secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura dúplex, tres o más cadenas que forman un complejo de múltiples cadenas, una única cadena que se hibrida consigo misma o cualquier combinación de éstas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de PGR o la escisión de un polinucleótido por una enzima. Una secuencia capaz de hibridarse con una secuencia dada se denomina "complemento" de la secuencia dada.

La edición de genes puede implicar la expresión transitoria, inducible o constitutiva de los componentes o sistemas de edición de genes. La edición de genes puede implicar la integración genómica o la presencia episomal de los componentes o sistemas de edición de genes. Los componentes o sistemas de edición de genes pueden proporcionarse en vectores, tales como plásmidos, que pueden administrarse mediante vehículos de administración apropiados, como se conoce en la técnica. Los vectores preferidos son los vectores de expresión.

La edición de genes puede comprender la provisión de plantillas de recombinación, para efectuar la reparación dirigida por homología (HDR). Por ejemplo, un elemento genético puede reemplazarse mediante la edición de genes en la que se proporciona una plantilla de recombinación. El ADN puede cortarse secuencia arriba y/o secuencia abajo de una secuencia que necesita ser reemplazada. Como tal, la secuencia a reemplazar se corta del ADN. A través de HDR, la secuencia extirpada se reemplaza luego por la plantilla. En ciertas realizaciones, el alelo de QTL de la invención como se describe en el presente documento puede proporcionarse en/como una plantilla. Al diseñar el sistema de manera que se introduzcan roturas de doble cadena secuencia arriba y/o secuencia abajo de la región correspondiente en el genoma de una planta que no comprende el alelo de QTL, esta región se corta y puede reemplazarse con la plantilla que comprende el alelo de QTL de la invención. De esta forma, la introducción del alelo de QTL de la invención en una planta no necesita implicar múltiples retrocruzamientos, en particular en una planta de antecedentes genéticos específicos. De manera similar, el F35H mutado de la invención se puede proporcionar en/como una plantilla. Sin embargo, más ventajosamente, el F35H mutado de la invención puede generarse sin el uso de una plantilla de

recombinación, sino únicamente a través de la acción de la endonucleasa que conduce a una rotura de ADN bicatenario que es reparada por NHEJ, lo que da como resultado la generación de inserciones/eliminaciones.

En determinadas realizaciones, la modificación o mutación del ácido nucleico se efectúa mediante un sistema de nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (modificado) (TALEN). Los efectores similares a activadores de transcripción (TALE) se pueden diseñar para unir prácticamente cualquier secuencia de ADN deseada. Ejemplos de métodos de edición del genoma utilizando el sistema TALEN se pueden encontrar, por ejemplo, en Cermak T. Doyle EL. Christian M. Wang L. Zhang Y. Schmidt C, et al., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: e82; Zhang F. Cong L. Lodato S. Kosuri S. Church GM. Arlotta P Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol.* 2011; 29: 149-153 y las patentes de los Estados Unidos n.º 8,450,471, 8,440,431 y 8,440,432. Por medio de orientación adicional, y sin limitación, los TALE de origen natural o "TALE de tipo silvestre" son proteínas de unión a ácido nucleico secretadas por numerosas especies de proteobacterias. Los polipéptidos TALE contienen un dominio de unión a ácido nucleico compuesto por repeticiones en tándem de polipéptidos monoméricos altamente conservados que tienen predominantemente 33, 34 o 35 aminoácidos de longitud y que difieren entre sí principalmente en las posiciones de los aminoácidos 12 y 13. En realizaciones ventajosas, el ácido nucleico es ADN. Tal como se usa en el presente documento, el término "monómeros polipeptídicos" o "monómeros TALE" se utilizará para referirse a las secuencias polipeptídicas repetitivas altamente conservadas dentro del dominio de unión al ácido nucleico TALE y el término "residuos dobles variables repetidos" o "RVD" se utilizará para referirse a los aminoácidos altamente variables en las posiciones 12 y 13 de los monómeros polipeptídicos. Tal como se proporciona a lo largo de la divulgación, los residuos de aminoácidos de los RVD se representan usando el código IUPAC de una sola letra para aminoácidos. Una representación general de un monómero TALE que está comprendido dentro del dominio de unión al ADN es X1-11-(X12X13)-X14-33 o 34 o 35, en el que el subíndice indica la posición del aminoácido y X representa cualquier aminoácido. X12X13 indican los RVD. En algunos monómeros polipeptídicos, el aminoácido variable en la posición 13 falta o está ausente y en dichos monómeros polipeptídicos, los RVD constan de un único aminoácido. En tales casos, los RVD pueden representarse alternativamente como X*, en el que X representa X12 y (*) indica que X13 está ausente. El dominio de unión al ADN comprende varias repeticiones de monómeros TALE y esto se puede representar como (X1-11-(X12X13)-X14-33 o 34 o 35)_z, donde en una realización ventajosa, z es al menos 5 a 40. En otra realización ventajosa, z es al menos 10 a 26. Los monómeros TALE tienen una afinidad de unión a nucleótidos que está determinada por la identidad de los aminoácidos en sus RVD. Por ejemplo, los monómeros polipeptídicos con una RVD de NI se unen preferiblemente a la adenina (A), los monómeros polipeptídicos con una RVD de NG se unen preferiblemente a la timina (T), los monómeros polipeptídicos con una RVD de HD se unen preferiblemente a la citosina (C) y los monómeros polipeptídicos con una RVD de NN se unen preferiblemente tanto a la adenina (A) como a la guanina (G). En otra realización más de la invención, los monómeros polipeptídicos con un RVD de IG se unen preferiblemente a T. Por lo tanto, el número y el orden de las repeticiones del monómero polipeptídico en el dominio de unión del ácido nucleico de un TALE determina su especificidad objetivo de ácido nucleico. En aún otras realizaciones de la invención, los monómeros polipeptídicos con un RVD de NS reconocen los cuatro pares de bases y pueden unirse a A, T, G o C. La estructura y función de los TALE se describen adicionalmente, por ejemplo, en Moscou et al., *Science* 326:1501 (2009); Boch et al., *Science* 326: 1509-1512 (2009); y Zhang et al., *Nature Biotechnology* 29:149-153 (2011).

En determinadas realizaciones, la modificación o mutación del ácido nucleico se efectúa mediante un sistema de nucleasa con dedos de zinc (ZFN) (modificado). El sistema de ZFN utiliza enzimas de restricción artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión al ADN con dedos de zinc con un dominio de escisión de ADN que se puede diseñar para apuntar a las secuencias de ADN deseadas. Los ejemplos de métodos de edición del genoma utilizando ZFN se pueden encontrar, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7,241,573, 7,241,574, 7,585,849, 7,595,376, 6,903,185, y 6,479,626. Por medio de orientación adicional, y sin limitación, la tecnología de dedo de zinc (ZF) artificial involucra matrices de módulos de ZF para apuntar a nuevos sitios de unión al ADN en el genoma. Cada módulo de dedo en una matriz de ZF que se dirige a tres bases de ADN. Una matriz personalizada de dominios de dedos de zinc individuales se ensambla en una proteína de ZF (ZFP). Las ZFP pueden comprender un dominio funcional. Las primeras nucleasas con dedos de zinc (ZFN) sintéticas se desarrollaron fusionando una proteína de ZF con el dominio catalítico de la enzima de restricción de tipo IIS FokI (Kim, Y. G. et al., 1994, Chimeric restriction endonuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 883-887; Kim, Y. G. et al., 1996, Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1156-1160). Se puede lograr una mayor especificidad de escisión con una menor actividad fuera del objetivo mediante el uso de heterodímeros de ZFN emparejados, cada uno de los cuales se dirige a diferentes secuencias de nucleótidos separadas por un espaciador corto (Doyon, Y. et al., 2011, Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat. Methods* 8, 74-79). Las ZFP también se pueden diseñar como activadores y represores de la transcripción y se han utilizado para dirigirse a muchos genes en una amplia variedad de organismos.

En determinadas realizaciones, la modificación del ácido nucleico se efectúa mediante una meganucleasa (modificada), que son endodesoxirribonucleasas caracterizadas por un gran sitio de reconocimiento (secuencias de ADN bicatenario de 12 a 40 pares de bases). Se puede encontrar un ejemplo de método para usar meganucleasas en las patentes de los Estados Unidos n.º: 8,163,514; 8,133,697; 8,021,867; 8,119,361; 8,119,381; 8,124,369; y 8,129,134.

En determinadas realizaciones, la modificación del ácido nucleico se efectúa mediante un sistema o complejo CRISPR/Cas (modificado). Con respecto a la información general sobre los sistemas CRISPR/Cas, sus componentes y el suministro de dichos componentes, incluidos métodos, materiales, vehículos de suministro, vectores, partículas y su fabricación y uso, incluidas las cantidades y formulaciones, así como las células eucariotas que expresan Cas9CRISPR/Cas9, eucariotas que expresan Cas-9 CRISPR/Cas, tales como un ratón, se hace referencia a: las patentes de los Estados Unidos n.º 8,999,641, 8,993,233, 8,697,359, 8,771,945, 8,795,965, 8,865,406, 8,871,445, 8,889,356, 8,889,418, 8,895,308, 8,906,616, 8,932,814, 8,945,839, 8,993,233 and 8,999,641; las publicaciones de patente de los Estados Unidos US 2014-0310830 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/105,031), US 2014-0287938 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/213,991), US 2014-0273234 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/293,674), US2014-0273232 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/290,575), US 2014-0273231 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/259,420), US 2014-0256046 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/226,274), US 2014-0248702 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/258,458), US 2014-0242700 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/222,930), US 2014-0242699 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/183,512), US 2014-0242664 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/104,990), US 2014-0234972 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/183,471), US 2014-0227787 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/256,912), US 2014-0189896 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/105,035), US 2014-0186958 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/105,017), US2014-0186919 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/104,977), US 2014-0186843 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/104,900), US 2014-0179770 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/104,837) y US 2014-0179006 A1 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/183,486), US 2014-0170753 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/183,429); US 2015-0184139 (solicitud de patente de los Estados Unidos con serial n.º 14/324,960); 14/054,414 solicitudes de patente europea EP 2 771 468 (EP13818570.7), EP 2 764 103 (EP13824232.6), y EP 2 784 162 (EP14170383.5); y publicaciones de patente PCT WO 2014/093661 (PCT/US2013/074743), WO 2014/093694 (PCT/US2013/074790), WO 2014/093595 (PCT/US2013/074611), WO 2014/093718 (PCT/US2013/074825), WO 2014/093709 (PCT/US2013/074812), WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667), WO 2014/093635 (PCT/US2013/074691), WO 2014/093655 (PCT/US2013/074736), WO 2014/093712 (PCT/US2013/074819), WO 2014/093701 (PCT/US2013/074800), WO 2014/018423 (PCT/US2013/051418), WO 2014/204723 (PCT/US2014/041790), WO 2014/204724 (PCT/US2014/041800), WO 2014/204725 (PCT/US2014/041803), WO 2014/204726 (PCT/US2014/041804), WO 2014/204727 (PCT/US2014/041806), WO 2014/204728 (PCT/US2014/041808), WO 2014/204729 (PCT/US2014/041809), WO 2015/089351 (PCT/US2014/069897), WO 2015/089354 (PCT/US2014/069902), WO 2015/089364 (PCT/US2014/069925), WO 2015/089427 (PCT/US2014/070068), WO 2015/089462 (PCT/US2014/070127), WO 2015/089419 (PCT/US2014/070057), WO 2015/089465 (PCT/US2014/070135), WO 2015/089486 (PCT/US2014/070175), PCT/US2015/051691, PCT/US2015/051830. También se hace referencia a las solicitudes provisionales de patente de los Estados Unidos 61/758,468; 61/802,174; 61/806,375; 61/814,263; 61/819,803 y 61/828.130, presentadas el 30 de enero de 2013; 15 de marzo de 2013; 28 de marzo de 2013; 20 de abril de 2013; 6 de mayo de 2013 y 28 de mayo de 2013 respectivamente. También se hace referencia a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 61/836,123, presentada el 17 de junio de 2013. Se hace referencia adicionalmente a las solicitudes de patentes provisionales de los Estados Unidos 61/835,931, 61/835,936, 61/835,973, 61/836,080, 61/836,101, y 61/836,127, cada uno presentado el 17 de junio de 2013. Se hace referencia adicional a las solicitudes de patente provisionales de los Estados Unidos 61/862,468 y 61/862,355 presentadas el 5 de agosto de 2013; 61/871,301 presentada el 28 de agosto de 2013; 61/960,777 presentada el 25 de septiembre de 2013 y 61/961,980 presentada el 28 de octubre de 2013. Se hace referencia aún más a: PCT/US2014/62558 presentado el 28 de octubre de 2014, y las solicitudes de patente provisionales de los Estados Unidos con seriales n.º: 61/915,148, 61/915,150, 61/915,153, 61/915,203, 61/915,251, 61/915,301, 61/915,267, 61/915,260, y 61/915,397, cada una presentada el 12 de diciembre de 2013; 61/757,972 y 61/768,959, presentada el 29 de enero de 2013 y 25 de febrero de 2013; 62/010,888 y 62/010,879, ambas presentadas el 11 de junio de 2014; 62/010,329, 62/010,439 y 62/010,441, cada una presentada el 10 de junio de 2014; 61/939,228 y 61/939,242, cada una presentado el 12 de febrero de 2014; 61/980,012, presentada el 15 de abril de 2014; 62/038,358, presentada el 17 de agosto de 2014; 62/055,484, 62/055,460 y 62/055,487, cada uno presentada el 25 de septiembre de 2014; y 62/069,243, presentada el 27 de octubre de 2014. Se hace referencia a la solicitud PCT que designa, entre otros, a la solicitud de los Estados Unidos, No. PCT/US14/41806, presentada el 10 de junio de 2014. Se hace referencia a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 61/930,214 presentada el 22 de enero de 2014. Se hace referencia a la solicitud PCT que designa, entre otros, a la solicitud de los Estados Unidos, n.º PCT/US14/41806, presentado el 10 de junio de 2014. También se hace mención a la solicitud de los Estados Unidos 62/180,709, 17-Jun-15, PROTECTED GUIDE RNAS (PGRNAS); solicitud de los Estados Unidos 62/091,455, presentada el 12-Dic-14, PROTECTED GUIDE RNAS (PGRNAS); solicitud de los Estados Unidos 62/096,708, 24-Dic-14, PROTECTED GUIDE RNAS (PGRNAS); solicitudes de los Estados Unidos 62/091,462, 12-Dic-14, 62/096,324, 23-Dic-14, 62/180,681, 17-Jun-2015, y 62/237,496, 5-Oct- 2015, DEAD GUIDES FOR CRISPR TRANSCRIPTION FACTORS; solicitud de los Estados Unidos 62/091,456, 12-Dic-14 y 62/180,692, 17-Jun-2015, ESCORTED AND FUNCTIONALIZED GUIDES FOR CRISPR-CAS SYSTEMS; solicitud de los Estados Unidos 62/091,461, 12-Dic-14, DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR GENOME EDITING AS TO HEMATOPOETIC STEM CELLS (HSCs); solicitud de los Estados Unidos 62/094,903, 19-Dic-14, UNBIASED IDENTIFICATION OF DOUBLE-STRAND BREAKS AND GENOMIC REARRANGEMENT BY GENOME-WISE INSERT CAPTURE SEQUENCING; solicitud de

los Estados Unidos 62/096,761, 24-Dic-14, ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED ENZYME AND GUIDE SCAFFOLDS FOR SEQUENCE MANIPULATION; solicitud de los Estados Unidos 62/098,059, 30-Dic-14, 62/181,641, 18-Jun-2015, y 62/181,667, 18-Jun-2015, RNATARGETING SYSTEM; solicitud de los Estados Unidos 62/096,656, 24-Dic-14 y 62/181,151, 17-Jun-2015, CRISPR HAVING OR ASSOCIATED WITH DESTABILIZATION DOMAINS; solicitud de los Estados Unidos 62/096,697, 24-Dic-14, CRISPR HAVING OR ASSOCIATED WITH AAV; solicitud de los Estados Unidos 62/098,158, 30-Dic-14, ENGINEERED CRISPR COMPLEX INSERTIONAL TARGETING SYSTEMS; solicitud de los Estados Unidos 62/151,052, 22-Abr-15, CELLULAR TARGETING FOR EXTRACELLULAR EXOSOMAL REPORTING; solicitud de los Estados Unidos 62/054,490, 24-Sep-14, DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING PARTICLE DELIVERY COMPONENTS; solicitud de los Estados Unidos 61/939,154, 12-FEB-14, SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; solicitud de los Estados Unidos 62/055,484, 25-Sep-14, SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; solicitud de los Estados Unidos 62/087,537, 4-Dic-14, SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; solicitud de los Estados Unidos 62/054,651, 24-Sep-14, DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO; solicitud de los Estados Unidos 62/067,886, 23-Oct-14, DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO; solicitudes de los Estados Unidos 62/054,675, 24-Sep-14 y 62/181,002, 17-Jun-2015, DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN NEURONAL CELLS/TISSUES; solicitud de los Estados Unidos 62/054,528, 24-Sep-14, DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN IMMUNE DISEASES OR DISORDERS; solicitud de los Estados Unidos 62/055,454, 25-Sep-14, DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING CELL PENETRATION PEPTIDES (CPP); solicitud de los Estados Unidos 62/055,460, 25-Sep-14, MULTIFUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES AND/OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES; solicitud de los Estados Unidos 62/087,475, 4-Dic-14 and 62/181,690, 18-Jun-2015, FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; solicitud de los Estados Unidos 62/055,487, 25-Sep-14, FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; solicitud de los Estados Unidos 62/087,546, 4-Dic-14 y 62/181,687, 18-Jun-2015, MULTIFUNCTIONAL CRISPR COMPLEXES AND/OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES; y solicitud de los Estados Unidos 62/098,285, 30-Dic-14, CRISPR MEDIATED IN VIVO MODELING AND GENETIC SCREENING OF TUMOR GROWTH AND METASTASIS. Se hace mención a las solicitudes de los Estados Unidos 62/181,659, 18-Jun-2015 y 62/207,318, 19-Agosto-2015, ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS, ENZYME AND GUIDE SCAFFOLDS OF CAS9 ORTHOLOGS AND VARIANTS FOR SEQUENCE MANIPULATION. Se hace mención a las solicitudes de los Estados Unidos 62/181,663, 18-Jun-2015 y 62/245,264, 22-Oct-2015, NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS, solicitudes de los Estados Unidos 62/181,675, 18-Jun-2015, y documento de abogado n.º 46783.01.2128, presentado el 22-Oct-2015, NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS, solicitud de los Estados Unidos 62/232,067, 24-Sep-2015, solicitud de los Estados Unidos 62/205,733, 16-Agosto-2015, solicitud de los Estados Unidos 62/201,542, 5-Agosto-2015, solicitud de los Estados Unidos 62/193,507, 16-Jul-2015, y solicitud de los Estados Unidos 62/181,739, 18-Jun-2015, cada una titulada NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS y de la solicitud de los Estados Unidos 62/245,270, 22-Oct-2015, NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS. También se hace mención a la solicitud de los Estados Unidos 61/939,256, 12-Feb-2014, y el documento WO 2015/089473 (PCT/US2014/070152), 12-Dic-2014, cada uno titulado ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED GUIDE COMPOSITIONS WITH NEW ARCHITECTURES FOR SEQUENCE MANIPULATION. También se hace mención a la PCT/US2015/045504, 15-Agosto-2015, solicitud de los Estados Unidos 62/180,699, 17-Jun-2015, y a la solicitud de los Estados Unidos 62/038,358, 17-Agosto-2014, cada una titulada GENOME EDITING USING CAS9 NICKASES. Solicitud de patente europea EP3009511. Se hace referencia además a Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., & Zhang, F. Science Feb 15; 339(6121): 819-23 (2013); RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini LA. Nat Biotechnol Mar; 31(3): 233-9 (2013); One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. Wang H., Yang H., Shivalila CS., Dawlaty MM., Cheng AW., Zhang F., Jaenisch R. Cell, Mayo 9; 153(4): 910-8 (2013); Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, Platt RJ, Scott DA, Church GM, Zhang F. Nature. 2013 Agosto 22; 500(7463): 472-6. doi: 10.1038/Nature12466. Epub 2013 Agosto 23; Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. Ran, FA., Hsu, PD., Lin, CY., Gootenberg, JS., Konermann, S., Trevino, AE., Scott, DA., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. Cell Agosto 28. pii: S0092-8674(13)01015-5. (2013); DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, FA., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, TJ., Marraffini, LA., Bao, G., & Zhang, F. Nat Biotechnol doi: 10.1038/nbt.2647 (2013); Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Ran, FA., Hsu, PD., Wright, J., Agarwala, V., Scott, DA., Zhang, F. Nature Protocols Nov; 8(11): 2281-308. (2013); Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Shalem, O., Sanjana, NE., Hartenian, E., Shi, X., Scott, DA., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, BL., Root, DE., Doench, JG., Zhang, F. Science Dic 12. (2013). [Epub ya disponible]; Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Nishimasu, H., Ran, FA., Hsu, PD., Konermann, S., Shehata, SI.,

Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. Cell Feb 27. (2014). 156(5): 935-49; Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. Wu X., Scott DA., Kriz AJ., Chiu AC., Hsu PD., Dadon DB., Cheng AW., Trevino AE., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp PA. Nat Biotechnol. (2014) Abr 20. doi: 10.1038/nbt.2889; CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling, Platt et al., Cell 159(2): 440-455 (2014) DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014; Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, Hsu et al, Cell 157, 1262-1278 (Junio 5, 2014) (Hsu 2014); Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system, Wang et al., Science. 2014 Enero 3; 343(6166): 80-84. doi:10.1126/science.1246981; Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, Doench et al., Nature Biotechnology 32(12): 1262-7 (2014) publicado en línea el 3 de Septiembre de 2014; doi: 10.1038/nbt.3026, e In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9, Swiech et al, Nature Biotechnology 33, 102-106 (2015) publicado en línea el 19 de Octubre de 2014; doi: 10.1038/nbt.3055, Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System, Zetsche et al., Cell 163, 1-13 (2015); Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems, Shmakov et al., Mol Cell 60(3): 385-397 (2015); C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector, Abudayyeh et al, Science (2016) publicado en línea en Junio 2 de 2016 doi: 10.1126/science.aaf5573.

En ciertas realizaciones, el sistema o complejo CRISPR/Cas es un sistema CRISPR/Cas de clase 2. En ciertas realizaciones, dicho sistema o complejo CRISPR/Cas es un sistema o complejo CRISPR/Cas de tipo II, tipo V o tipo VI. El sistema CRISPR/Cas no requiere la generación de proteínas personalizadas para secuencias específicas, objetivo sino que una sola proteína Cas puede ser programada por una guía de ARN (ARNg) para reconocer un objetivo de ácido nucleico específico, en otras palabras, la proteína enzimática Cas puede ser reclutada para un locus objetivo de ácido nucleico específico (que puede comprender o consistir en ARN y/o ADN) de interés usando dicha guía corta de ARN.

En general, el sistema CRISPR/Cas o CRISPR es tal como se usa en este documento en los documentos anteriores se refiere colectivamente a las transcripciones y otros elementos involucrados en la expresión de o el direccionamiento de la actividad de los genes asociados a CRISPR ("Cas"), incluidas las secuencias que codifican un gen Cas y uno o más de, una secuencia tracr (CRISPR de activación trans) (por ejemplo, ARNtracr o un ARNtracr parcialmente activo), una secuencia compañera tracr (que abarca una "repetición directa" y una repetición directa parcial procesada por ARNtracr en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), una secuencia guía (también conocida como "espaciadora" en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), o "ARN(s)" como se usa ese término en este documento (por ejemplo, ARN(s) para guiar a Cas, tal como Cas9, por ejemplo, ARN CRISPR y, cuando corresponda, ARN transactivador (tracr) o un ARN guía único (ARNgu) (ARN quimérico)) u otras secuencias y transcripciones de un locus de CRISPR. En general, un sistema CRISPR se caracteriza por elementos que promueven la formación de un complejo CRISPR en el sitio de una secuencia objetivo (también denominado protoespaciador en el contexto de un sistema CRISPR endógeno). En el contexto de la formación de un complejo CRISPR, "secuencia objetivo" se refiere a una secuencia para la cual se diseña una secuencia guía para que tenga complementariedad, donde la hibridación entre una secuencia objetivo y una secuencia guía promueve la formación de un complejo CRISPR. Una secuencia objetivo puede comprender cualquier polinucleótido, tal como polinucleótidos de ADN o ARN.

En ciertas realizaciones, el ARNg es un ARN guía quimérico o un ARN guía único (ARNgu). En ciertas realizaciones, el ARNg comprende una secuencia guía y una secuencia compañera tracr (o repetición directa). En ciertas realizaciones, el ARNg comprende una secuencia guía, una secuencia compañera tracr (o repetición directa) y una secuencia tracr. En ciertas realizaciones, el sistema o complejo CRISPR/Cas como se describe en el presente documento no comprende y/o no depende de la presencia de una secuencia tracr (por ejemplo, si la proteína Cas es Cpf1).

Como se usa en el presente documento, el término "ARNcr" o "ARN guía" o "ARN guía único" o "ARNgu" o "uno o más componentes de ácido nucleico" de una proteína efectora del locus de CRISPR/Cas, según corresponda, comprende cualquier secuencia polinucleotídica que tenga complementariedad suficiente con una secuencia de ácido nucleico objetivo para hibridar con la secuencia de ácido nucleico objetivo y dirigir la unión específica de la secuencia de un complejo de direccionamiento de ácido nucleico a la secuencia de ácido nucleico objetivo. En algunas realizaciones, el grado de complementariedad, cuando se alinea de forma óptima utilizando un algoritmo de alineación adecuado, es aproximadamente o superior al 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97,5 %, 99 %, o más. El alineamiento óptimo se puede determinar con el uso de cualquier algoritmo adecuado para alinear secuencias, cuyos ejemplos no limitantes incluyen el algoritmo de Smith-Waterman, el algoritmo de Needleman-Wunsch, algoritmos basados en la transformada de Burrows-Wheeler (por ejemplo, el alineador de Burrows Wheeler), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies; disponible en www.novocraft.com), ELAND (Illumina, San Diego, CA), SOAP (disponible en soap.genomics.org.cn) y Maq (disponible en maq.sourceforge.net). La capacidad de una secuencia guía (dentro de un ARN guía dirigido a ácido nucleico) para dirigir la unión específica de secuencia de un complejo dirigido a ácido nucleico a una secuencia de ácido nucleico objetivo puede evaluarse mediante cualquier ensayo adecuado.

Se puede seleccionar una secuencia guía y, por lo tanto, un ARN guía dirigido a ácidos nucleicos para dirigirse a cualquier secuencia de ácido nucleico objetivo. La secuencia objetivo puede ser ADN. La secuencia objetivo puede ser ADN genómico. La secuencia objetivo puede ser ADN mitocondrial. La secuencia objetivo puede ser cualquier secuencia de ARN. En algunas realizaciones, la secuencia objetivo puede ser una secuencia dentro de una molécula

de ARN seleccionada del grupo que consiste en ARN mensajero (ARNm), pre-ARNm, ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), micro-ARN (miARN), ARN pequeño de interferencia (ARNpi), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN nucleolar pequeño (ARNnop), ARN bicatenario (ARNbc), ARN no codificante (ARNnc), ARN largo no codificante (ARNlnc) y ARN citoplasmático pequeño (ARNcp). En algunas realizaciones preferidas, la secuencia objetivo puede ser una secuencia dentro de una molécula de ARN seleccionada del grupo que consiste en ARNm, pre-ARNm y ARNr. En algunas realizaciones preferidas, la secuencia objetivo puede ser una secuencia dentro de una molécula de ARN seleccionada del grupo que consiste en ARNnc y ARNlnc. En algunas realizaciones más preferidas, la secuencia objetivo puede ser una secuencia dentro de una molécula de ARNm o una molécula de pre-ARNm.

En ciertas realizaciones, el ARNg comprende un bucle de tallo, preferiblemente un bucle de tallo único. En ciertas realizaciones, la secuencia de repetición directa forma un bucle de tallo, preferiblemente un bucle de tallo único. En ciertas realizaciones, la longitud del espaciador del ARN guía es de 15 a 35 nt. En ciertas realizaciones, la longitud del espaciador del ARN guía es de al menos 15 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la longitud del espaciador es de 15 a 17 nt, por ejemplo, 15, 16 o 17 nt, de 17 a 20 nt, por ejemplo, 17, 18, 19 o 20 nt, de 20 a 24 nt, por ejemplo, 20, 21, 22, 23 o 24 nt, de 23 a 25 nt, por ejemplo, 23, 24 o 25 nt, de 24 a 27 nt, por ejemplo, 24, 25, 26 o 27 nt, de 27 a 30 nt, por ejemplo, 27, 28, 29 o 30 nt, de 30 a 35 nt, por ejemplo, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nt, o 35 nt o más. En realizaciones particulares, el sistema CRISPR/Cas requiere un ARNtracr. La secuencia de "ARNtracr" o términos análogos incluye cualquier secuencia de polinucleótidos que tenga suficiente complementariedad con una secuencia de ARNcr para hibridar. En algunas realizaciones, el grado de complementariedad entre la secuencia de ARNtracr y la secuencia de ARNcr a lo largo de la más corta de las dos cuando se alinea de manera óptima es aproximadamente o más de aproximadamente 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97.5 %, 99 % o superior. En algunas realizaciones, la secuencia tracr es aproximadamente o más de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 o más nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia tracr y la secuencia de ARNg están contenidas en un solo transcrito, de modo que la hibridación entre los dos produce un transcrito que tiene una estructura secundaria, tal como una horquilla. En una realización de la invención, el transcrito o la secuencia polinucleotídica transcrita tiene al menos dos o más horquillas. En realizaciones preferidas, la transcripción tiene dos, tres, cuatro o cinco horquillas. En otra realización de la invención, el transcrito tiene como máximo cinco horquillas. En una estructura de horquilla, la parte de la secuencia 5' de la "N" final y secuencia arriba del bucle puede corresponder a la secuencia compañera tracr, y la parte de la secuencia 3' del bucle corresponde entonces a la secuencia tracr. En una estructura de horquilla, la parte de la secuencia 5' de la "N" final y secuencia arriba del bucle puede corresponder alternativamente a la secuencia tracr, y la parte de la secuencia 3' del bucle corresponde a la secuencia compañera tracr. En realizaciones alternativas, el sistema CRISPR/Cas no requiere un ARNtracr, como saben los expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, el ARN guía (capaz de guiar a Cas a un locus objetivo) puede comprender (1) una secuencia guía capaz de hibridar con un locus objetivo y (2) una secuencia de repetición directa o compañera tracr (en orientación 5' a 3', o alternativamente en orientación 3' a 5', dependiendo del tipo de proteína Cas, como es conocido por el experto en la materia). En realizaciones particulares, la proteína CRISPR/Cas se caracteriza porque hace uso de un ARN guía que comprende una secuencia guía capaz de hibridar con un locus objetivo y una secuencia de repetición directa, y no requiere un ARNtracr. En realizaciones particulares, donde la proteína CRISPR/Cas se caracteriza porque hace uso de un ARNtracr, la secuencia guía, la compañera tracr y la secuencia tracr pueden residir en un solo ARN, es decir, un ARNgu (dispuesto en una orientación de 5' a 3' o alternativamente dispuesto en una orientación de 3' a 5'), o el ARN tracr puede ser un ARN diferente al ARN que contiene la guía y la secuencia compañera tracr. En estas realizaciones, la tracr se hibrida con la secuencia compañera tracr y dirige el complejo CRISPR/Cas a la secuencia objetivo.

Por lo general, en el contexto de un sistema endógeno dirigido a ácidos nucleicos, la formación de un complejo dirigido a ácidos nucleicos (que comprende un ARN guía hibridado con una secuencia objetivo y complejado con una o más proteínas efectoras dirigidas a ácidos nucleicos) da como resultado una modificación (tal como escisión) de una o ambas cadenas de ADN o ARN en o cerca (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 o más pares de bases) de la secuencia objetivo. Como se usa en el presente documento, el término "secuencia o secuencias asociadas con un locus de interés objetivo" se refiere a secuencias cercanas a la secuencia objetivo (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 o más pares de bases de la secuencia objetivo, en el que la secuencia objetivo está comprendida dentro de un locus de interés objetivo). El experto conocerá los sitios de corte específicos para sistemas CRISPR/Cas seleccionados, en relación con la secuencia objetivo, que como se sabe en la técnica puede estar dentro de la secuencia objetivo o, alternativamente, 3' o 5' de la secuencia objetivo.

En algunas realizaciones, la proteína efectora dirigida a ácidos nucleicos no modificada puede tener actividad de escisión de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la nucleasa, tal como se describe en el presente documento, puede dirigir la escisión de una o ambas cadenas de ácido nucleico (ADN, ARN o híbridos, que pueden ser de una o dos cadenas) en la ubicación de o cerca de una secuencia objetivo, tal como dentro de la secuencia objetivo y/o dentro del complemento de la secuencia objetivo o en secuencias asociadas con la secuencia objetivo. En algunas realizaciones, la proteína efectora dirigida a ácidos nucleicos puede dirigir la escisión de una o ambas cadenas de ADN o ARN dentro de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 o más pares de bases del primer o último nucleótido de una secuencia objetivo. En algunas realizaciones, la escisión puede ser roma (por ejemplo, para Cas9, tal como SaCas9 o SpCas9). En algunas realizaciones, la escisión se puede escalar (por ejemplo, para Cpf1), es decir, generar extremos cohesivos. En algunas realizaciones, la escisión es un corte

escalonado con una saliente 5'. En algunas realizaciones, la escisión es un corte escalonado con una saliente 5' de 1 a 5 nucleótidos, preferiblemente de 4 o 5 nucleótidos. En algunas realizaciones, el sitio de escisión está secuencia arriba del PAM. En algunas realizaciones, el sitio de escisión está secuencia abajo del PAM. En algunas realizaciones, la proteína efectora dirigida a ácidos nucleicos que puede estar mutada con respecto a una enzima correspondiente de tipo silvestre, de modo que la proteína efectora mutada dirigida a ácidos nucleicos carece de la capacidad de escindir una o ambas cadenas de ADN o ARN de un polinucleótido objetivo que contiene una secuencia objetivo. Como ejemplo adicional, se pueden mutar dos o más dominios catalíticos de una proteína Cas (por ejemplo, RuvC I, RuvC II y RuvC III o el dominio HNH de una proteína Cas9) para producir una proteína Cas mutada que carece sustancialmente de toda actividad de escisión de ADN. En algunas realizaciones, se puede considerar que una proteína efectora dirigida a ácidos nucleicos carece sustancialmente de toda actividad de escisión de ADN y/o ARN cuando la actividad de escisión de la enzima mutada es de no más del 25 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0.1 %, 0.01 % o menos de la actividad de escisión del ácido nucleico de la forma no mutada de la enzima; un ejemplo puede ser cuando la actividad de escisión del ácido nucleico de la forma mutada es nula o insignificante en comparación con la forma no mutada. Como se usa en este documento, el término Cas "modificada" generalmente se refiere a una proteína Cas que tiene una o más modificaciones o mutaciones (incluyendo mutaciones puntuales, truncamientos, inserciones, eliminaciones, quimeras, proteínas de fusión, etc.) en comparación con la proteína Cas de tipo silvestre de la que se deriva. Por derivada se entiende que la enzima derivada se basa en gran medida, en el sentido de que tiene un alto grado de homología de secuencia con una enzima de tipo silvestre, pero que ha sido mutada (modificada) de alguna manera como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento.

En una realización particular, una proteína efectora mutada de direccionamiento de ácido nucleico basada en el sistema CRISPR como se describió anteriormente que carece de la capacidad de escindir una o ambas cadenas de ADN o ARN de un polinucleótido objetivo que contiene una secuencia objetivo puede fusionarse con otras herramientas como otras nucleasas, nickasas, recombinasas, transposasas, editores de bases o complejos moleculares que incluyen estas herramientas. Un "editor de bases", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o un fragmento de la misma que tiene la misma actividad catalítica que la proteína de la que se deriva, dicha proteína o fragmento de la misma, sola o cuando se proporciona como complejo molecular, se denomina complejo de edición de bases en el presente documento, tiene la capacidad de mediar en una modificación de base dirigida, es decir, la conversión de una base de interés que da como resultado una mutación puntual de interés. Preferiblemente, al menos un editor de base en el contexto de la presente invención está enlazado temporal o permanentemente a al menos un efector específico del sitio, u opcionalmente a un componente de al menos un complejo efector específico del sitio (por ejemplo, dominio de reconocimiento de ADN del sistema CRISPR, dedos de zinc o efectores TAL). El enlace puede ser covalente y/o no covalente.

Múltiples publicaciones han demostrado la conversión dirigida de bases, principalmente citidina (C) en timina (T), utilizando una nickasa CRISPR/Cas9 o una nucleasa no funcional unida a un dominio de citidina desaminasa, polipéptido catalítico de edición de ARNm de apolipoproteína B (APOBEC1), por ejemplo, APOBEC derivado de rata. La desaminación de la citosina (C) es catalizada por las citidina desaminasas y da como resultado uracilo (U), que tiene las propiedades de apareamiento de bases de timina (T). La mayoría de las citidina desaminasas conocidas operan en el ARN, y los pocos ejemplos que se sabe que aceptan ADN requieren ADN monocatenario (mc). Los estudios sobre el complejo de ADN objetivo dCas9 revelan que al menos nueve nucleótidos (nt) de la cadena de ADN desplazada se desaparean tras la formación del complejo 'R-bucle' de ARN-ADN guía de Cas9 (Jore et al., Nat. Struct. mol. Biol., 18, 529-536 (2011)). De hecho, en la estructura del complejo R-bucle de Cas9, los primeros 11 nt del protoespaciador en la cadena de ADN desplazada están desordenados, lo que sugiere que su movimiento no está muy restringido. También se ha especulado que las mutaciones inducidas por la nickasa Cas9 en las citosinas en la cadena que no es plantilla podrían surgir de su accesibilidad por las enzimas citosina desaminasas celulares. Se razonó que un subconjunto de este tramo de ADNmc en el R-bucle podría servir como sustrato eficaz para una citidina desaminasa unida a dCas9 para efectuar la conversión directa y programable de C a U en el ADN (Komor et al., citado anteriormente). Recientemente, Goudelli et al., ((2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature, 551(7681), 464) describieron editores de base de adenina (ABE) que median la conversión de A•T en G•C en el ADN genómico.

Cualquier complejo de edición de bases de acuerdo con la presente invención puede comprender por lo menos una citidina desaminasa, o un fragmento catalíticamente activo de la misma. Al menos un complejo de edición de bases puede comprender la citidina desaminasa, o un dominio de la misma en forma de un fragmento catalíticamente activo, como editor de bases.

En otra realización, al menos una primera modificación de base dirigida es una conversión de cualquier nucleótido C, A, T o G, a cualquier otro nucleótido. Cualquiera de los nucleótidos C, A, T o G puede intercambiarse de forma dirigida al sitio mediante la mediación de un editor de base, o un fragmento catalíticamente activo del mismo, a otro nucleótido. Por lo tanto, al menos un complejo de edición de bases puede comprender cualquier editor de bases, o un dominio editor de bases o un fragmento catalíticamente activo del mismo, que puede convertir un nucleótido de interés en cualquier otro nucleótido de interés de forma dirigida.

En ciertas realizaciones, la secuencia objetivo para CRISPR/Cas debe asociarse con un PAM (motivo adyacente al protoespaciador) o PFS (secuencia o sitio flanqueante del protoespaciador); es decir, una secuencia corta reconocida por el complejo CRISPR. Los requisitos precisos de secuencia y longitud para el PAM difieren de acuerdo con la

enzima CRISPR utilizada, pero los PAM suelen ser secuencias de 2 a 5 pares de bases adyacentes al protoespaciador (es decir, la secuencia objetivo). Se dan ejemplos de secuencias PAM en la sección de ejemplos a continuación, y el experto en la materia podrá identificar secuencias PAM adicionales para usar con una enzima CRISPR dada. Además, la modificación del dominio de interacción con PAM (PI) puede permitir la programación de la especificidad de PAM, mejorar la fidelidad del reconocimiento del sitio objetivo y aumentar la versatilidad de Cas, por ej., Cas9, plataforma de modificación del genoma. Las proteínas Cas, tales como las proteínas Cas9, pueden modificarse para alterar su especificidad PAM, por ejemplo, como se describe en Kleinstiver BP et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. Nature. 2015 Jul 23;523(7561):481-5. doi: 10.1038/nature14592. En algunas realizaciones, el método comprende permitir que un complejo CRISPR se una al polinucleótido objetivo para efectuar la escisión de dicho polinucleótido objetivo modificando así el polinucleótido objetivo, en el que el complejo CRISPR comprende una enzima CRISPR complejada con una secuencia guía hibridada con una secuencia objetivo dentro de dicho polinucleótido objetivo, en el que dicha secuencia guía está unida a una secuencia compañera tracr que a su vez se hibrida con una secuencia tracr. El experto en la materia comprenderá que otras proteínas Cas pueden modificarse de manera análoga.

La proteína Cas a la que se hace referencia en el presente documento, tal como, sin limitación, la proteína Cas9, Cpf1 (Cas12a), C2c1 (Cas12b), C2c2 (Cas13a), C2c3, Cas13b, puede proceder de cualquier fuente adecuada y, por lo tanto, puede incluir diferentes ortólogos, procedentes de una variedad de organismos (procariotas), como está bien documentado en la técnica. En ciertas realizaciones, la proteína Cas es Cas9 (modificada), preferiblemente Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) (modificada) o Cas9 *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (modificada). En ciertas realizaciones, la proteína Cas es Cpf1 (modificada), preferiblemente *Acidaminococcus* sp., tal como Cpf1 de *Acidaminococcus* sp. BV3L6 (AsCpf1) o Cpf1 de *Lachnospiraceae bacterium*, *Lachnospiraceae bacterium* MA2020 o *Lachnospiraceae bacterium* MD2006 (LbCpf1). En ciertas realizaciones, la proteína Cas es C2c2 (modificada), preferiblemente C2c2 *Leptotrichia wadei* (LwC2c2) o C2c2 de *Listeria newyorkensis* FSL M6-0635 (LbFSLC2c2). En ciertas realizaciones, la proteína Cas (modificada) es C2c1. En ciertas realizaciones, la proteína Cas (modificada) es C2c3. En ciertas realizaciones, la proteína Cas (modificada) es Cas13b.

En determinadas realizaciones, la modificación del ácido nucleico se efectúa mediante mutagénesis aleatoria. Las células u organismos pueden exponerse a mutágenos tales como radiación UV o productos químicos mutagénicos (tales como, por ejemplo, metanosulfonato de etilo (EMS)), y luego se seleccionan los mutantes con las características deseadas. Los mutantes se pueden identificar, por ejemplo, mediante TILLING (focalización de lesiones locales inducidas en genomas). El método combina mutagénesis, tal como mutagénesis que usa un mutágeno químico tal como metanosulfonato de etilo (EMS) con una técnica de detección de ADN sensible que identifica mutaciones de una sola base/mutaciones puntuales en un gen objetivo. El método TILLING se basa en la formación de heterodúplex de ADN que se forman cuando múltiples alelos se amplifican mediante PCR y luego se calientan y enfrían lentamente. Se forma una "burbuja" en el desajuste de las dos cadenas de ADN, que luego es escindida por nucleasas de una sola cadena. Luego, los productos se separan por tamaño, tal como por HPLC. Véase también McCallum et al. "Targeted screening for induced mutations"; Nat Biotechnol. 2000 abril; 18 (4): 455-7 y McCallum et al. "Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics"; Plant Physiol. 2000 junio; 123 (2): 439-42.

El ARN de interferencia (ARNi) es un proceso biológico en el que las moléculas de ARN inhiben la expresión o la traducción génica, al neutralizar las moléculas de ARNm específicas. Dos tipos de moléculas pequeñas de ácido ribonucleico (ARN), microARN (miARN) y ARN pequeño de interferencia (ARNpi), son fundamentales para el ARN de interferencia. Los ARN son los productos directos de los genes, y estos pequeños ARN pueden unirse a otras moléculas específicas de ARN mensajero (ARNm) y aumentar o disminuir su actividad, por ejemplo, evitando que un ARNm se traduzca en una proteína. La vía del ARNi se encuentra en muchos eucariotas, incluidos los animales, y la inicia la enzima Dicer, que escinde moléculas largas de ARN bicatenario (ARNbc) en fragmentos cortos de doble cadena de ARNpi de aproximadamente 21 nucleótidos (ARN pequeños de interferencia). Cada ARNpi se desenrolla en dos ARN monocatenarios (ARNmc), la cadena pasajera y la cadena guía. La cadena pasajera se degrada y la cadena guía se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Los miARN maduros son estructuralmente similares a los ARNpi producidos a partir de ARNbc exógeno, pero antes de alcanzar la madurez, los miARN primero deben sufrir una modificación postranscripcional extensa. Un miARN se expresa a partir de un gen codificador de ARN mucho más largo como un transcrito primaria conocida como pri-miARN que se procesa, en el núcleo celular, en una estructura de bucle de tallo de 70 nucleótidos llamada pre-miARN por el complejo del microprocesador. Este complejo consta de una enzima RNasa III llamada Drosha y una proteína de unión a ARNbc DGCR8. La porción de ARNbc de este pre-miARN está unida y es escindida por Dicer para producir la molécula de miARN madura que puede integrarse en el complejo RISC; por lo tanto, miARN y ARNpi comparten la misma maquinaria celular secuencia abajo. Un ARN corto de horquilla o ARN pequeño de horquilla (vector de ARNph/horquilla) es una molécula artificial de ARN con un giro de horquilla cerrado que se puede utilizar para silenciar la expresión del gen objetivo a través de ARN de interferencia. El resultado mejor estudiado es el silenciamiento génico postranscripcional, que ocurre cuando la cadena guía se empareja con una secuencia complementaria en una molécula de ARN mensajero e induce la escisión por Argonauta 2 (Ago2), el componente catalítico del RISC. Como se usa en el presente documento, una molécula de ARNi puede ser un ARNpi, un ARNph o un miARN. Se entenderá que las moléculas de ARNi se pueden aplicar como tales a/en la planta, o se pueden codificar mediante vectores apropiados, a partir de los cuales se expresa la molécula de ARNi. Los sistemas de administración y expresión de moléculas de ARNi, tales como ARNpi, ARNph o miARN son bien conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "homocigoto" se refiere a una célula o planta individual que tiene los mismos alelos en uno o más o todos los loci. Cuando el término se usa con referencia a un locus o gen específico, significa que al menos ese locus o gen tiene los mismos alelos. Como se usa en el presente documento, el término "homocigoto" significa una condición genética que existe cuando alelos idénticos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos. Como se usa en el presente documento, el término "heterocigoto" se refiere a una célula o planta individual que tiene diferentes alelos en uno o más o todos los loci. Cuando el término se usa con referencia a un locus o gen específico, significa al menos que ese locus o gen tiene alelos diferentes. Como se usa en el presente documento, el término "heterocigoto" significa una condición genética que existe cuando diferentes alelos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos. En ciertas realizaciones, el QTL y/o uno o más marcadores como se describe en el presente documento es/son homocigotos. En ciertas realizaciones, el QTL y/o uno o más marcadores como se describe en el presente documento son heterocigóticos. En ciertas realizaciones, el alelo de QTL y/o uno o más alelos de marcadores como se describe en el presente documento es/son homocigotos. En ciertas realizaciones, el alelo de QTL y/o uno o más alelos de marcadores como se describe en el presente documento son heterocigotos.

Un "marcador" es (medio para encontrar una posición en a) un mapa genético o físico, o bien vínculos entre marcadores y loci de rasgos (loci que afectan a los rasgos). La posición que detecta el marcador puede conocerse mediante la detección de alelos polimórficos y su mapeo genético, o bien por hibridación, emparejamiento de secuencias o amplificación de una secuencia que ha sido mapeada físicamente. Un marcador puede ser un marcador de ADN (detecta polimorfismos de ADN), una proteína (detecta la variación en un polipéptido codificado) o simplemente un fenotipo heredado (tal como el fenotipo 'céreo'). Se puede desarrollar un marcador de ADN a partir de una secuencia de nucleótidos genómicos o a partir de secuencias de nucleótidos expresadas (por ejemplo, a partir de un ARN empalmado o un ADNc). De acuerdo con la tecnología de marcadores de ADN, el marcador puede consistir en cebadores complementarios que flanquean el locus y/o sondas complementarias que se hibridan con alelos polimórficos en el locus. El término locus del marcador es el locus (gen, secuencia o nucleótido) que detecta el marcador. "Marcador" o "marcador molecular" o "locus marcador" también se puede utilizar para indicar una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que es suficientemente única para caracterizar un locus específico en el genoma. Cualquier rasgo polimórfico detectable puede usarse como marcador siempre que se herede de manera diferencial y muestre un desequilibrio de ligamiento con un rasgo fenotípico de interés.

Los marcadores que detectan polimorfismos genéticos entre miembros de una población están bien establecidos en la técnica. Los marcadores se pueden definir por el tipo de polimorfismo que detectan y también por la tecnología de marcador utilizada para detectar el polimorfismo. Los tipos de marcadores incluyen, entre otros, por ejemplo, detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), detección de marcadores de isozimas, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP), detección de repeticiones de secuencia simple (SSR), detección de secuencias variables amplificadas del genoma de la planta, detección de replicación de secuencias autosostenida o detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los SNP se pueden detectar, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN, métodos de amplificación específicos de secuencia basados en PCR, detección de polimorfismos de polinucleótidos mediante hibridación específica de alelo (ASH), hibridación dinámica específica de alelo (DASH), balizas moleculares, hibridación de micromatrices, ensayos de ligasa de oligonucleótidos, endonucleasas Flap, endonucleasas 5', extensión de cebador, polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) o electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). La secuenciación del ADN, como la tecnología de pirosecuenciación, tiene la ventaja de poder detectar una serie de alelos SNP enlazados que constituyen un haplotipo. Los haplotipos tienden a ser más informativos (detectan un mayor nivel de polimorfismo) que los SNP.

Un "alelo marcador", alternativamente un "alelo de un locus marcador", puede referirse a una de una pluralidad de secuencias de nucleótidos polimórficas encontradas en un locus marcador en una población. Con respecto a un marcador de SNP, el alelo se refiere a la base de nucleótidos específica presente en ese locus de SNP en esa planta individual.

"Mapeo fino" se refiere a métodos mediante los cuales la posición de un QTL puede determinarse con mayor precisión (restringido) y mediante los cuales se reduce el tamaño del fragmento de introgresión que comprende el QTL. Por ejemplo, se pueden crear líneas casi isogénicas para el QTL (QTL-NIL), que contienen diferentes fragmentos superpuestos del fragmento de introgresión dentro de un ambiente genético uniforme del padre recurrente. Dichas líneas se pueden usar para mapear en qué fragmento se encuentra el QTL y para identificar una línea que tenga un fragmento de introgresión más corto que comprenda el QTL.

La "selección asistida por marcadores" (de MAS) es un proceso mediante el cual se seleccionan plantas individuales basándose en genotipos marcadores. La "contraselección asistida por marcadores" es un proceso mediante el cual se utilizan genotipos marcadores para identificar plantas que no se seleccionarán, lo que les permite eliminarlas de un programa de mejoramiento o plantación. La selección asistida por marcadores utiliza la presencia de marcadores moleculares, que están enlazados genéticamente a un locus particular o a una región cromosómica particular (por ejemplo, fragmento de introgresión, transgén, polimorfismo, mutación, etc.), para seleccionar plantas por la presencia del locus o región específicos (fragmento de introgresión, transgén, polimorfismo, mutación, etc.). Por ejemplo, un marcador molecular ligado genéticamente a un QTL de digestibilidad como se define en el presente documento puede usarse para detectar y/o seleccionar plantas que comprenden el QTL en el cromosoma 9. Cuanto más cercano sea el vínculo genético del marcador molecular con el locus (por ejemplo, alrededor de 7 cM, 6 cM, 5 cM, 4 cM, 3 cM, 2 cM,

1 cM, 0.5 cM o menos), es menos probable que el marcador se disocie del locus a través de la recombinación meiótica. Del mismo modo, cuanto más cerca estén enlazados dos marcadores entre sí (por ejemplo, dentro de 7 cM o 5 cM, 4 cM, 3 cM, 2 cM, 1 cM o menos), es menos probable que los dos marcadores se separen entre sí (y es más probable que se segreguen conjuntamente como una unidad). La "puntuación LOD" (logaritmo (base 10) de probabilidades) se refiere a una prueba estadística que se utiliza a menudo para el análisis de vínculos en poblaciones de animales y plantas. La puntuación LOD compara la probabilidad de obtener los datos de la prueba si los dos loci (loci de marcadores moleculares y/o un locus de rasgos fenotípicos) están realmente enlazados, con la probabilidad de observar los mismos datos por pura casualidad. Las puntuaciones LOD positivas favorecen la presencia de enlazamiento y una puntuación LOD superior a 3.0 se considera evidencia de enlazamiento. Una puntuación LOD de +3 indica una probabilidad de 1000 a 1 de que el enlace que se observa no se produjo por casualidad.

Un "haplotipo marcador" se refiere a una combinación de alelos en un locus marcador.

Un "locus marcador" es una ubicación cromosómica específica en el genoma de una especie en la que se puede encontrar un marcador específico. Se puede usar un locus marcador para rastrear la presencia de un segundo locus enlazado, por ejemplo, uno que afecta la expresión de un rasgo fenotípico. Por ejemplo, se puede usar un locus marcador para controlar la segregación de alelos en un locus ligado genética o físicamente.

Una "sonda marcadora" es una secuencia o molécula de ácido nucleico que puede usarse para identificar la presencia de un locus marcador, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de locus marcador, mediante hibridación de ácidos nucleicos. Las sondas marcadoras que comprenden 30 o más nucleótidos contiguos del locus marcador ("toda o una parte" de la secuencia del locus marcador) pueden usarse para la hibridación de ácidos nucleicos. Alternativamente, en algunos aspectos, una sonda marcadora se refiere a una sonda de cualquier tipo que sea capaz de distinguir (es decir, genotipar) el alelo particular que está presente en un locus marcador.

El término "marcador molecular" puede usarse para referirse a un marcador genético o un producto codificado del mismo (por ejemplo, una proteína) usado como punto de referencia cuando se identifica un locus enlazado. Un marcador puede derivarse de secuencias de nucleótidos genómicos o de secuencias de nucleótidos expresadas (por ejemplo, de un ARN empalmado, un ADNc, etc.), o de un polipéptido codificado. El término también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos complementarias o que flanquean las secuencias marcadoras, tales como ácidos nucleicos usados como sondas o pares de cebadores capaces de amplificar la secuencia marcadora. Una "sonda de marcador molecular" es una secuencia o molécula de ácido nucleico que puede usarse para identificar la presencia de un locus marcador, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de locus marcador. Alternativamente, en algunos aspectos, una sonda marcadora se refiere a una sonda de cualquier tipo que sea capaz de distinguir (es decir, genotipar) el alelo particular que está presente en un locus marcador. Los ácidos nucleicos son "complementarios" cuando se hibridan específicamente en solución, por ejemplo, de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Algunos de los marcadores descritos en el presente documento también se denominan marcadores de hibridación cuando se ubican en una región indel, como la región no colineal descrita en el presente documento. Esto se debe a que la región de inserción es, por definición, un polimorfismo frente a una planta sin la inserción. Por lo tanto, el marcador solo necesita indicar si la región indel está presente o ausente. Puede usarse cualquier tecnología de detección de marcador adecuada para identificar dicho marcador de hibridación, por ejemplo, la tecnología SNP se usa en los ejemplos proporcionados en este documento.

Los "marcadores genéticos" son ácidos nucleicos que son polimórficos en una población y cuyos alelos pueden detectarse y distinguirse mediante uno o más métodos analíticos, por ejemplo, RFLP, AFLP, isozima, SNP, SSR y similares. Los términos "marcador molecular" y "marcador genético" se usan indistintamente en este documento. El término también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos complementarias a las secuencias genómicas, tales como los ácidos nucleicos utilizados como sondas. Los marcadores correspondientes a polimorfismos genéticos entre miembros de una población pueden detectarse mediante métodos bien establecidos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, métodos de amplificación específicos de secuencia basados en PCR, detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), detección de marcadores de isozimas, detección de polimorfismos de polinucleótidos mediante hibridación específica de alelo (ASH), detección de secuencias variables amplificadas del genoma de la planta, detección de replicación de secuencia autosostenida, detección de repeticiones de secuencia simple (SSR), detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o detección de polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP). También se conocen métodos bien establecidos para la detección de etiquetas de secuencia expresada (EST) y marcadores SSR derivados de secuencias EST y ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).

Un "polimorfismo" es una variación en el ADN entre dos o más individuos dentro de una población. Un polimorfismo tiene preferiblemente una frecuencia de al menos el 1 % en una población. Un polimorfismo útil puede incluir un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), una repetición de secuencia simple (SSR) o un polimorfismo de inserción/eliminación, también denominado en el presente documento "indel". El término "indel" se refiere a una inserción o eliminación, en la que se puede hacer referencia a una línea que tiene un nucleótido o fragmento de ADN insertado en relación con una segunda línea, o se puede hacer referencia a la segunda línea como que tiene un nucleótido eliminado o un fragmento de ADN con respecto a la primera línea.

La "distancia física" entre loci (por ejemplo, entre marcadores moleculares y/o entre marcadores fenotípicos) en el mismo cromosoma es la distancia física real expresada en bases o pares de bases (pb), kilobases o kilopares de bases (kb) o megabases o mega pares de bases (Mb).

5 La "distancia genética" entre loci (por ejemplo, entre marcadores moleculares y/o entre marcadores fenotípicos) en el mismo cromosoma se mide por la frecuencia de entrecruzamiento o frecuencia de recombinación (RF) y se indica en centimorgans (cM). Un cM corresponde a una frecuencia de recombinación del 1 %. Si no se pueden encontrar recombinantes, la RF es cero y los loci están físicamente muy juntos o son idénticos. Cuanto más separados estén dos loci, mayor será la RF.

10 Un "mapa físico" del genoma es un mapa que muestra el orden lineal de puntos de referencia identificables (incluidos genes, marcadores, etc.) en el ADN cromosómico. Sin embargo, a diferencia de los mapas genéticos, las distancias entre puntos de referencia son absolutas (por ejemplo, medidas en pares de bases o fragmentos genéticos contiguos aislados y superpuestos) y no se basan en la recombinación genética (que puede variar en diferentes poblaciones).

15 Un alelo se correlaciona "negativamente" con un rasgo cuando está enlazado a él y cuando la presencia del alelo es un indicador de que un rasgo deseado o una forma de rasgo no ocurrirá en una planta que comprende el alelo. Un alelo se correlaciona "positivamente" con un rasgo cuando está enlazado a él y cuando la presencia del alelo es un indicador de que el rasgo deseado o la forma del rasgo ocurrirán en una planta que comprende el alelo.

Un centimorgan ("cM") es una unidad de medida de frecuencia de recombinación. Un cM es igual a un 1 % de probabilidad de que un marcador en un locus genético se separe de un marcador en un segundo locus debido al entrecruzamiento en una sola generación.

20 Como se usa en el presente documento, el término "intervalo cromosómico" designa un intervalo lineal contiguo de ADN genómico que reside en la planta en un solo cromosoma. Los elementos genéticos o genes ubicados en un solo intervalo cromosómico están físicamente enlazados. El tamaño de un intervalo cromosómico no está particularmente limitado. En algunos aspectos, los elementos genéticos ubicados dentro de un solo intervalo cromosómico están enlazados genéticamente, típicamente con una distancia de recombinación genética de, por ejemplo, menor o igual a 20 cM, o alternativamente, menor o igual a 10 cM. Es decir, dos elementos genéticos dentro de un solo intervalo cromosómico se recombinan con una frecuencia menor o igual al 20 % o al 10 %.

30 El término "estrechamente enlazado", en la presente solicitud, significa que la recombinación entre dos loci enlazados se produce con una frecuencia igual o inferior al 10 % (es decir, están separados en un mapa genético por no más de 10 cM). Dicho de otra manera, los loci estrechamente enlazados segregan conjuntamente al menos el 90 % del tiempo. Los loci marcadores son especialmente útiles con respecto al objeto de la divulgación actual cuando demuestran una probabilidad significativa de segregación conjunta (enlazamiento) con un rasgo deseado (por ejemplo, resistencia a la mancha gris de la hoja). Los loci estrechamente enlazados, como un locus marcador y un segundo locus, pueden mostrar una frecuencia de recombinación entre locus del 10 % o menos, preferiblemente aproximadamente 9 % o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 8 % o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 7 % o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 6 % o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 5 % o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 4 % o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 3 % o menos, y aún más preferiblemente aproximadamente 2 % o menos. En realizaciones altamente preferidas, los loci relevantes muestran una frecuencia de recombinación de aproximadamente 1 % o menos, por ejemplo, aproximadamente 0.75 % o menos, más preferiblemente aproximadamente 0.5 % o menos, o aún más preferiblemente aproximadamente 0.25 % o menos. Dos loci que están localizados en el mismo cromosoma y a tal distancia que la recombinación entre los dos loci se produce con una frecuencia inferior al 10 % (por ejemplo, aproximadamente 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0.75 %, 0.5 %, 0.25 % o menos) también se dice que son "próximos" entre sí. En algunos casos, dos marcadores diferentes pueden tener las mismas coordenadas en el mapa genético. En ese caso, los dos marcadores están tan próximos entre sí que se produce una recombinación entre ellos con una frecuencia tan baja que es indetectable.

50 "Vinculación" se refiere a la tendencia de los alelos a segregarse juntos más a menudo de lo esperado por casualidad si su transmisión fuera independiente. Por lo general, el enlazamiento se refiere a alelos en el mismo cromosoma. La recombinación genética ocurre con una frecuencia aleatoria asumida en todo el genoma. Los mapas genéticos se construyen midiendo la frecuencia de recombinación entre pares de rasgos o marcadores. Cuanto más cerca estén los rasgos o marcadores entre sí en el cromosoma, menor será la frecuencia de recombinación y mayor el grado de enlazamiento. Se considera que los rasgos o marcadores están enlazados en este documento si generalmente se segregan conjuntamente. Una probabilidad de 1/100 de recombinación por generación se define como una distancia en el mapa genético de 1.0 centiMorgan (1.0 cM). El término "desequilibrio de enlazamiento" se refiere a una segregación no aleatoria de loci o rasgos genéticos (o ambos). En cualquier caso, el desequilibrio de enlazamiento implica que los loci relevantes están dentro de una proximidad física suficiente a lo largo de un cromosoma para que se segreguen juntos con una frecuencia mayor que la aleatoria (es decir, no aleatoria). Los marcadores que muestran desequilibrio de enlazamiento se consideran enlazados. Los loci enlazados se segregan conjuntamente más del 50 % del tiempo, por ejemplo, desde aproximadamente el 51 % hasta aproximadamente el 100 % del tiempo. En otras palabras, dos marcadores que se segregan conjuntamente tienen una frecuencia de recombinación inferior al 50 % (y, por definición, están separados por menos de 50 cM en el mismo grupo de enlazamiento). Como se usa en este

documento, el enlazamiento puede ser entre dos marcadores, o alternativamente entre un marcador y un locus que afecta un fenotipo. Un locus marcador puede estar "asociado con" (enlazado a) un rasgo. El grado de enlazamiento de un locus marcador y un locus que afecta a un rasgo fenotípico se mide, por ejemplo, como una probabilidad estadística de segregación conjunta de ese marcador molecular con el fenotipo (por ejemplo, una estadística F o puntuación LOD).

Como se usa en el presente documento, el término "identidad de secuencia" se refiere al grado de identidad entre cualquier secuencia de ácido nucleico dada y una secuencia de ácido nucleico objetivo. El porcentaje de identidad de secuencia se calcula determinando el número de posiciones coincidentes en secuencias de ácido nucleico alineadas, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de nucleótidos alineados y multiplicando por 100. Una posición coincidente se refiere a una posición en la que aparecen nucleótidos idénticos en la misma posición en secuencias de ácido nucleico alineadas. El porcentaje de identidad de secuencia también se puede determinar para cualquier secuencia de aminoácidos. Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia, una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos objetivo se compara con la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos identificada utilizando el programa BLAST 2 Sequences (BI2seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene BLASTN y BLASTP. Esta versión independiente de BLASTZ se puede obtener del sitio web de Fish & Richardson (World Wide Web en fr.com/blast) o del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica del gobierno de los Estados Unidos (World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov). Las instrucciones que explican cómo usar el programa BI2seq se pueden encontrar en el archivo Léame que acompaña a BLASTZ. BI2seq realiza una comparación entre dos secuencias utilizando el algoritmo BLASTN o BLASTP.

BLASTN se usa para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Para comparar dos secuencias de ácidos nucleicos, las opciones se establecen de la siguiente manera: -i se establece en un archivo que contiene la primera secuencia de ácido nucleico que se va a comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se establece en un archivo que contiene la segunda secuencia de ácido nucleico que se va a comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se establece en blastn; -o se establece en cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); -q se establece en -1; -r se establece en 2; y todas las demás opciones se dejan en su configuración predeterminada. El siguiente comando generará un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias: C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2. Si la secuencia objetivo comparte homología con cualquier parte de la secuencia identificada, el archivo de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si la secuencia objetivo no comparte homología con ninguna parte de la secuencia identificada, el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineada, se determina una longitud contando el número de nucleótidos consecutivos de la secuencia objetivo presentada en alineación con la secuencia de la secuencia identificada comenzando con cualquier posición coincidente y terminando con cualquier otra posición coincidente. Una posición coincidente es cualquier posición en la que se presenta un nucleótido idéntico tanto en la secuencia objetivo como en la identificada. Los huecos presentados en la secuencia objetivo no se cuentan porque los huecos no son nucleótidos. Asimismo, no se cuentan los huecos presentados en la secuencia identificada ya que se cuentan los nucleótidos de la secuencia objetivo, no los nucleótidos de la secuencia identificada. El porcentaje de identidad sobre una longitud particular se determina contando el número de posiciones coincidentes sobre esa longitud y dividiendo ese número por la longitud y luego multiplicando el valor resultante por 100. Por ejemplo, si (i) una secuencia objetivo de ácido nucleico de 500 bases se compara con una secuencia de ácido nucleico en cuestión, (ii) el programa BI2seq presenta 200 bases de la secuencia objetivo alineadas con una región de la secuencia en cuestión en la que la primera y la última bases de esa región de 200 bases son coincidencias, y (iii) el número de coincidencias sobre esas 200 bases alineadas es 180, entonces la secuencia objetivo de ácido nucleico de 500 bases contiene una longitud de 200 y una identidad de secuencia sobre esa longitud del 90 % (es decir, $180 / 200 \times 100 = 90$). Se apreciará que diferentes regiones dentro de una única secuencia objetivo de ácido nucleico que se alinea con una secuencia identificada pueden tener cada una su propio porcentaje de identidad. Se observa que el valor de identidad porcentual se redondea a la décima más cercana. Por ejemplo, 78.11, 78.12, 78.13 y 78.14 se redondean a 78.1, mientras que 78.15, 78.16, 78.17, 78.18 y 78.19 se redondean a 78.2. También se observa que el valor de longitud siempre será un número entero.

Una "secuencia de ácido nucleico aislada" o "ADN aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no se encuentra en el entorno natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped bacteriana o en el genoma nuclear o plástido de una planta. Cuando se hace referencia a una "secuencia" en el presente documento, se entiende que se hace referencia a la molécula que tiene tal secuencia, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico. Una "célula huésped" o una "célula huésped recombinante" o "célula transformada" son términos que se refieren a una nueva célula individual (u organismo) que surge como resultado de la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico en dicha célula. La célula huésped es preferiblemente una célula vegetal o una célula bacteriana. La célula huésped puede contener el ácido nucleico como una molécula que se replica extracromosómicamente (episomal), o comprende el ácido nucleico integrado en el genoma nuclear o plástido de la célula huésped, o como cromosoma introducido, por ejemplo, minicromosoma.

Cuando se hace referencia a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ADN genómico) que tiene una "identidad de secuencia sustancial con" una secuencia de referencia o que tiene una identidad de secuencia de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de referencia, en una realización dicha secuencia de nucleótidos se considera sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos dada y puede identificarse usando condiciones de hibridación

rigurosas. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico comprende una o más mutaciones en comparación con la secuencia de nucleótidos dada, pero aún puede identificarse usando condiciones de hibridación rigurosas. Pueden usarse "condiciones de hibridación rigurosas" para identificar secuencias de nucleótidos, que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos dada. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia objetivo se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Normalmente, se elegirán condiciones rigurosas en las que la concentración de sal sea de aproximadamente 0.02 molar a pH 7 y la temperatura sea de al menos 60 °C. Reducir la concentración de sal y/o aumentar la temperatura aumenta la rigurosidad. Las condiciones rigurosas para las hibridaciones de ARN-ADN (transferencias Northern que utilizan una sonda de, por ejemplo, 100 nt) son, por ejemplo, aquellas que incluyen al menos un lavado en 0.2X SSC a 63 °C durante 20 min, o condiciones equivalentes. Las condiciones rigurosas para la hibridación de ADN-ADN (transferencias Southern que utilizan una sonda de, por ejemplo, 100 nt) son, por ejemplo, aquellas que incluyen al menos un lavado (generalmente 2) en 0.2X SSC a una temperatura de al menos 50 °C, usualmente aproximadamente alrededor de 55 °C, durante 20 min, o condiciones equivalentes. Véase también Sambrook et al. (1989) y Sambrook y Russell (2001). Los ejemplos de condiciones de hibridación muy rigurosas son condiciones en las que principalmente solo se someten a hibridación aquellas moléculas de ácido nucleico que tienen al menos un 90 % o al menos un 95 % de identidad de secuencia. Tales condiciones de hibridación altamente rigurosas son, por ejemplo: 4 x SSC a 65 °C y múltiples lavados posteriores en 0.1 x SSC a 65 °C durante aproximadamente 1 hora. El término "condiciones de hibridación de alta rigurosidad" tal como se utiliza en este documento también puede significar: hibridación a 68 °C en fosfato de sodio 0.25 M, pH 7.2, SDS al 7 %, EDTA 1 mM y BSA al 1 % durante 16 horas y, posteriormente, lavar dos veces con 2 x SSC y SDS al 0.1 % a 68 °C. Preferiblemente, la hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas. Condiciones de hibridación menos rigurosas son, por ejemplo: hibridación en 4 x SSC a 37 °C y posterior lavado múltiple en 1 x SSC a temperatura ambiente.

Como se usa en el presente documento, F35H (entrada de enzima ExPASy EC 1.14.13.88) se refiere al gen o proteína flavonoide 3',5'-hidroxilasa. F35H también se conoce como F3'5'H, F3',5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450 o flavanona, NADPH:oxígeno oxidoreductasa. F35H cataliza la siguiente reacción: flavanona + 2 NADP + 2 O(2) $\rightleftharpoons$ 3',5'-dihidroflavanona + 2 NADP(+) + 2 H(2)O.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección de la presencia de un alelo de QTL (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) asociado con una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad mejorada del rastrojo, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción;

en el que la digestibilidad mejorada se refiere a una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b) o c) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica; y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3;
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar el material genético a partir de al menos una célula de la planta o parte de la planta, y la detección en dicho material genético de la presencia de un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad mejorada del rastrojo, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H tal (como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección de la presencia de un alelo de QTL (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) asociado con una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, y seleccionar una planta de maíz o parte de una planta de maíz en la que el alelo de QTL está presente.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, detectando en dicho material genético la presencia de un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, y seleccionar una planta de maíz o parte de una planta de maíz en la que el alelo de QTL está presente.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección de la presencia de un alelo de QTL (tal como en el material genético aislado de la planta o parte de la planta) que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción;

en el que la digestibilidad mejorada se refiere a una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b) o c) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica; y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3;
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, y la detección en dicho material genético de la presencia de un alelo de QTL que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección de la presencia de un alelo de QTL (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que

conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, y seleccionar una planta o parte de la planta en la que está presente el alelo de QTL.

5 En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, detectar en dicho material genético la presencia de un alelo de QTL que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene una mutación que conduce a la expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, y seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz en la que está presente el alelo de QTL.

15 En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende y/o está flanqueado por los alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01.

En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende el alelo marcador (molecular) de ma61134xxx.

20 En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en un intervalo cromosómico que comprende y/o está flanqueado por los alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01.

25 En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en un intervalo cromosómico que comprende el alelo marcador de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en los que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

30 En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección (tal como como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) la presencia de una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción;

35 en el que la digestibilidad mejorada se refiere a una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b) o c) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica; y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3;
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

55 En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, y detectar en dicho material genético la presencia de una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) de la presencia de una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, y seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz en el que está presente la mutación en dicho F35H.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, detectar en dicho material genético la presencia de una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación, preferiblemente una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción, y seleccionar una planta de maíz o parte de una planta de maíz en la que está presente una mutación en dicho F35H.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende opcionalmente (tal como en material aislado de la planta o parte de la planta) analizar el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, y la detección de la expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H o para una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida;

en el que la digestibilidad mejorada se refiere a una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b) o c) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica; y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3;
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material de al menos una célula de la planta o parte de la planta, y opcionalmente analizar el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 en dicho material, y/o detectar la expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H o para una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida en dicho material.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende analizar (tal como en material aislado de la planta o parte de la planta) el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, y seleccionar una planta o parte de una planta de maíz en la que se reduce o elimina la expresión del ARNm y/o proteína F35H o la actividad enzimática de F35H o se reduce la actividad enzimática de F35H.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material de al menos una célula de la planta o parte de la

planta, analizar el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 en dicho material y/o detectar la expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H o para una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida en dicho material, y seleccionar una planta o parte de la planta en la que se reduce o elimina la expresión del ARNm y/o la proteína F35H o la actividad enzimática de F35H o se reduce la actividad enzimática de F35H.

En ciertas realizaciones, si el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) del F35H, en particular el F35H de tipo silvestre o nativo, está alterado, entonces la planta o parte de la planta tiene una digestibilidad mejorada. En ciertas realizaciones, si el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) del F35H, en particular el F35H de tipo silvestre o nativo, está alterado en comparación con un nivel de expresión de referencia, entonces la planta o parte de la planta tiene una digestibilidad mejorada. En ciertas realizaciones, si el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) del F35H, en particular el F35H de tipo silvestre o nativo, está alterado en comparación con el nivel de expresión de referencia en una planta o parte de la planta de referencia, entonces la planta o parte de la planta tiene digestibilidad mejorada. En ciertas realizaciones, la planta de referencia (o parte de la planta) es la línea endogámica de maíz PH207, como se describe en "Draft Assembly of Elite Inbred Line PH207 Provides Insights into Genomic and Transcriptome Diversity in Maize", Hirsch et al., Plant Cell. 2016 Nov; 28(11): 2700-2714. Publicada en línea el 1 de noviembre de 2016. doi: 10.1105/tpc.16.00353, o una planta de maíz que comprende el alelo de QTL que comprende la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre o nativa (no mutada) de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 (por ejemplo, derivada de PH207), preferiblemente la planta de referencia (o parte de la planta) se deriva de una línea casi isogénica.

Como se usa en el presente documento, los niveles de expresión alterados (proteína y/o ARNm) se refieren a niveles de expresión disminuidos de aproximadamente al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 30 %, más preferiblemente al menos un 50 %, tal como al menos un 20 %, 40 %, 60 %, 80 % o más, tal como al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o más.

En realizaciones particulares, si el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) del F35H, en particular el F35H de tipo silvestre o nativo, se reduce o la expresión está (sustancialmente) ausente o eliminada, entonces la planta de maíz o parte de una planta de maíz tiene digestibilidad mejorada. En ciertas realizaciones, si el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) del F35H, en particular el F35H de tipo silvestre o nativo, se reduce o la expresión está (sustancialmente) ausente o eliminada en comparación con un nivel de expresión de referencia, entonces la planta de maíz o parte de una planta de maíz tiene digestibilidad mejorada. En ciertas realizaciones, si el nivel de expresión (proteína y/o ARNm) del F35H, en particular el F35H de tipo silvestre o nativo, se reduce o la expresión está (sustancialmente) ausente o eliminada en comparación con el nivel de expresión de referencia en una planta de maíz o parte de una planta de maíz de referencia, entonces la planta de maíz o la parte de una planta de maíz tiene una digestibilidad mejorada. En ciertas realizaciones, la planta de referencia (o parte de la planta) es la línea endogámica de maíz PH207, como se describe en "Draft Assembly of Elite Inbred Line PH207 Provides Insights into Genomic and Transcriptome Diversity in Maize", Hirsch et al., Plant Cell. 2016 Nov; 28(11): 2700-2714. Publicada en línea el 1 de noviembre de 2016. doi: 10.1105/tpc.16.00353, o una planta de maíz que comprende el alelo de QTL que comprende la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre o nativa (no mutada) de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 (por ejemplo, derivada de PH207), preferiblemente la planta de referencia (o parte de la planta) se deriva de una línea casi isogénica.

Como se usa en el presente documento, los niveles de expresión reducidos (proteína y/o ARNm) se refieren a niveles de expresión reducidos de aproximadamente al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 30 %, más preferiblemente al menos un 50 %, tal como al menos un 20 %, 40 %, 60 %, 80 % o más, tal como al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o más. La expresión está (sustancialmente) ausente o eliminada si los niveles de expresión se reducen al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %. En ciertas realizaciones, la expresión está (sustancialmente) ausente, si no se puede detectar ninguna proteína y/o ARNm, en particular la proteína y/o ARNm de tipo silvestre o nativo, tal como mediante métodos de detección estándar, que incluyen, por ejemplo, PCR (cuantitativa), transferencia Northern, transferencia Western, ELISA, etc.

En un aspecto, la invención se refiere al método anterior para identificar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende detectar (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) la presencia de uno o más alelos marcadores (moleculares) asociados con una digestibilidad mejorada, siendo dicho alelo marcador (molecular) el alelo marcador molecular ma61134xxx, y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en los que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, y la detección en dicho material genético de la presencia de uno o más alelos marcadores (moleculares) asociados con una digestibilidad mejorada, siendo dicho alelo marcador (molecular) el alelo marcador molecular ma61134xxx, y /o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en los que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta o una parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) la presencia de uno o más alelos marcadores (moleculares) asociados con una mejor digestibilidad, siendo dicho alelo marcador (molecular) el alelo marcador molecular ma61134xxx, y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en los que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada, y seleccionar una planta de maíz o parte de una planta de maíz en el que están presentes uno o más alelos marcadores (moleculares).

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, detectar en dicho material genético la presencia de uno o más alelos marcadores (moleculares) asociados con una digestibilidad mejorada, siendo dicho alelo marcador (molecular) el alelo marcador molecular ma61134xxx, y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en los que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada, y seleccionar una planta de maíz o parte de una planta de maíz en la que uno o más alelos marcadores (moleculares) están presentes.

En un aspecto, la invención se refiere al método anterior para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) para detectar la presencia del alelo marcador molecular ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, y detectar en dicho material genético la presencia del alelo marcador molecular ma61134xxx, y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende la detección (tal como en material genético aislado de la planta o parte de la planta) para detectar la presencia del alelo marcador molecular ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada, y seleccionando una planta de maíz o una parte de una planta de maíz en la que está presente uno o más alelos marcadores (moleculares).

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, o para seleccionar una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, que comprende aislar material genético de al menos una célula de la planta o parte de la planta, detectar en dicho material genético la presencia del alelo marcador molecular de ma61134xxx, y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada, y seleccionar una planta o parte de la planta en la que está presente uno o más alelos marcadores (moleculares).

Se entenderá que en los métodos descritos anteriormente, cuando está presente el alelo de QTL o el alelo marcador (molecular), entonces se identifica que la planta o parte de la planta tiene una digestibilidad mejorada.

Los métodos para detectar la presencia de un alelo de QTL o un alelo marcador (molecular) como se describe en el presente documento son conocidos en la técnica. Sin limitación, la detección puede abarcar o comprender secuenciación, métodos basados en hibridación (tales como hibridación (dinámica) específica de alelo, balizas moleculares, micromatrices de SNP), métodos basados en enzimas (tales como PCR, KASP (PCR competitiva específica de alelo), RFLP, ALFP, RAPD, endonucleasa Flap, extensión del cebador, 5'-nucleasa, ensayo de ligadura de oligonucleótidos), métodos de amplificación posterior basados en las propiedades físicas del ADN (tal como polimorfismo de conformación de cadena sencilla, electroforesis en gel con gradiente de temperatura, cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante, fusión de alta resolución de todo el amplicón, uso de proteínas de unión a errores de emparejamiento de ADN, SNPlex, ensayo de nucleasa de Surveyor), etc.

En la presente solicitud se describe un método, tal como un método para generar/producir una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o una digestibilidad mejorada de una planta o parte de una planta, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo, que comprende introducir o introgresar en el genoma de una planta o parte de una planta un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada y que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450 que tiene una mutación.

La presente solicitud divulga además un método, tal como un método para generar/producir una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta o parte de una planta, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo, que comprende introducir o introgresar en el genoma de una planta o parte de una planta un alelo de QTL que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450 que tiene una mutación. Dicha mutación puede conducir a una expresión alterada del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o la mutación conduce a una proteína F35H que tiene actividad enzimática alterada tras la traducción, más preferiblemente la mutación conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de dicho gen y/o la proteína F35H, para eliminar o inactivar de dicho gen o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción o una proteína F35H que tiene actividad enzimática aumentada tras la traducción.

Además del método descrito para generar/producir una planta o parte de una planta y/o para mejorar la digestibilidad de una planta o parte de una planta, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo, el alelo de QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende y/o está flanqueado por alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, y/o el alelo de QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende el alelo marcador (molecular) de ma61134xxx, y/o el alelo de QTL está ubicado en un intervalo cromosómico que comprende y/o está flanqueado por los alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y

ma61125s01, y/o el alelo de QTL está ubicado en un intervalo cromosómico que comprende el alelo marcador de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

Además, se divulga un método, tal como un método para generar/producir una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta o parte de una planta, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo, que comprende introducir en el genoma de una planta o parte de una planta un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada y que comprende el alelo marcador de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso para un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

Alternativamente, la presente solicitud describe un método, tal como un método para generar/producir una planta o parte de una planta que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta o parte de una planta, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo, que comprende introducir en el genoma de una planta o parte de una planta un alelo de QTL que comprende el alelo marcador de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En un aspecto, la invención se refiere a un método, tal como un método para generar/producir una planta de maíz o una parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta o parte de una planta, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo, que comprende introducir o introgresar en el genoma de una planta de maíz o parte de una planta de maíz una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción;

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

En un aspecto, la invención se refiere a un método, tal como un método para generar/producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, preferiblemente la digestibilidad del rastrojo, que comprende introducir en el genoma de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, en particular en una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450, una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción;

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;
- 10 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.
- 15 En un aspecto, la invención se refiere a un método, tal como un método para generar/producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, preferiblemente la digestibilidad del rastrojo, que comprende alterar un gen endógeno que codifica un gen de flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450, preferiblemente eliminar un gen endógeno que codifica un gen de flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450;
- 20

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- 25 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;
- 30 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.
- 35 En un aspecto, la invención se refiere a un método, tal como un método para generar/producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, preferiblemente la digestibilidad del rastrojo, que comprende reducir la expresión del ARNm del gen que codifica un gen de flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H codificada, preferiblemente la inactivación de la expresión del ARNm del gen que codifica un gen de flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H codificada;
- 40

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

- 45 en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;
- 50 (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.
- 55

En un aspecto, la invención se refiere a un método, tal como un método para generar/producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo

mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, preferiblemente la digestibilidad del rastrojo, que comprende eliminar o reducir o inhibir la expresión del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450 y/o la proteína F35H, reduciendo la actividad enzimática de un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 o inhibiendo la proteína F35H, o aumentando la actividad enzimática de un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450;

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;
- 15 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.
- 20 En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un método, tal como un método para generar/producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad, preferiblemente la digestibilidad del rastrojo, de una planta o parte de la planta, que comprende
- 25 A. introducir en una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno de la planta o parte de la planta que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450 una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de dicho gen y/o de la proteína F35H, para una eliminación o inactivación de dicho gen o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción; o
- 30 B. introducir en el genoma de la planta o parte de la planta un primer ADN bicatenario y un segundo ADN bicatenario, en el que las secuencias de nucleótidos de las cadenas codificantes del primer y segundo ADN son complementos inversos entre sí, de modo que un transcrito del primer ADN y un transcrito del segundo ADN son capaces de hibridarse para formar un ARN bicatenario, en el que la cadena codificante del primer o segundo ADN comprende:
- a. al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8; o
- 35 b. una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8; o
- 40 C. un ARN bicatenario, en el que una cadena corresponde a:
- a. al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8, en la que T se reemplaza por U; o
- 45 b. una secuencia de nucleótidos que es complementaria con al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8, en la que T se reemplaza por U; o
- 50 D. introducir en la planta o la parte de la planta un sistema CRISPR/Cas específico de ARN, tal como un sistema CRISPR/Cas13a, dirigido contra o direccionado a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H o, en el genoma de la planta o parte de la planta una o más secuencias de polinucleótidos que codifican (y expresan o son capaces de expresar) dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN; o
- 55

E. introducir en la planta o parte de la planta un compuesto químico o un anticuerpo que altere (o sea capaz de alterar) la actividad enzimática de la proteína F35H al interactuar con dicha F35H, preferiblemente reduciendo (o siendo capaz de reducir) la actividad enzimática de la proteína F35H o inhibiendo (o siendo capaz de inhibir) la actividad enzimática de la proteína F35H o aumentando (o siendo capaz de aumentar) la actividad enzimática de la proteína F35H al interactuar con dicha F35H.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un método, tal como un método para generar/producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, y/o para mejorar la digestibilidad, preferiblemente la digestibilidad del rastrojo, de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, que comprende regenerar una planta a partir de las planta o partes de las planta modificadas anteriormente mencionadas.

En un aspecto, la invención se refiere a una planta de maíz o parte de una planta de maíz que comprende un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción;

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas;

en el que la planta de maíz o parte de la planta de maíz no se obtiene exclusivamente mediante un proceso esencialmente biológico.

En ciertas realizaciones, la mutación conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de dicho gen y/o la proteína F35H, a una eliminación o inactivación de dicho gen o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida o aumentada tras la traducción. La inactivación o eliminación de F35H puede efectuarse, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos de mutagénesis descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende y/o está flanqueado por los alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01.

En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende el alelo marcador de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en un intervalo cromosómico que comprende y/o está flanqueado por los alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01.

En ciertas realizaciones, el alelo de QTL está ubicado en un intervalo cromosómico que comprende el alelo marcador de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador

directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En un aspecto, la invención se refiere a una planta de maíz o parte de una planta de maíz que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción;

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas;

en el que la planta de maíz o parte de una planta de maíz no se obtiene exclusivamente mediante un proceso esencialmente biológico.

En una realización determinada, la invención se refiere a una planta de maíz o parte de una planta de maíz que comprende el alelo marcador de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, preferiblemente en el que uno o más alelos marcadores moleculares son detectables por un ácido polinucleico, tal como un ácido polinucleico específico del alelo (marcador molecular), adecuado para la hibridación como cebador directo y cebador inverso con un locus en el intervalo cromosómico que se segrega conjuntamente con la digestibilidad mejorada.

En un aspecto, la invención se refiere a una planta de maíz o parte de una planta de maíz que comprende

A. un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción, más preferiblemente una mutación que conduce a una eliminación o inactivación de dicho gen, o que ha reducido o eliminado la expresión del ARNm y/o la proteína de un gen de F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción o una proteína F35H que tiene actividad enzimática aumentada tras la traducción; o

B. un primer ADN bicatenario (establemente integrado) y un segundo ADN bicatenario (establemente integrado), en el que las secuencias de nucleótidos de las cadenas codificantes del primer y segundo ADN son complementos inversos entre sí, de modo que un transcrito del primer ADN y un transcrito del segundo ADN son capaces de hibridarse para formar un ARN bicatenario, en el que la cadena codificante del primer o segundo ADN comprende:

a. al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8, o

b. una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8; o

C. un ARN bicatenario, en el que una cadena corresponde a:

a. al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al

menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8, en la que T se reemplaza por U; o

- 5 b. una secuencia de nucleótidos que es complementaria de al menos 19 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8 o de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 70 % o al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8, en la que T se reemplaza por U; o

- 10 D. un sistema CRISPR/Cas específico de ARN, tal como un sistema CRISPR/Cas13a, dirigido contra o direccionado a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una o más secuencias de polinucleótidos que codifican (y expresan o son capaces de expresar) dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN; o

E. un compuesto químico o un anticuerpo que altera (o es capaz de alterar) la actividad enzimática de la proteína F35H al interactuar con dicho F35H, preferiblemente reduciendo (o siendo capaz de reducir) la actividad enzimática de la proteína F35H o inhibiendo (o siendo capaz de inhibir) la proteína F35H al interactuar con dicho F35H o aumentar (o ser capaz de aumentar) la proteína F35H al interactuar con dicho F35H;

- 15 en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

- 20 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
 (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
 (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
 (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
 25 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3; y
 (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas;

en el que la planta de maíz o parte de una planta de maíz no se obtiene exclusivamente mediante un proceso esencialmente biológico.

- 30 En ciertas realizaciones, la planta no es una variedad de planta.

Además, en la presente solicitud se divulga un método para obtener, generar o producir una planta o parte de una planta, tal como una planta o parte de una planta de maíz o sorgo o caña de azúcar, preferiblemente una planta de maíz o parte de una planta de maíz, que comprende (a) proporcionar una primera planta que tiene un alelo de QTL, tal como un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada como se describe en este documento en otro lugar, 35 opcionalmente en el que dicho alelo de QTL está ubicado en un intervalo cromosómico, preferiblemente en el cromosoma 9, que comprende y está flanqueado por los alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, (b) cruzar dicha primera planta con una segunda planta, tal como una segunda planta que no tenga dicho alelo de QTL, (c) seleccionar plantas de la progenie que tengan dicho alelo de QTL, y opcionalmente (d) cosechar dicha parte de la planta de dicha progenie.

En ciertas realizaciones, el alelo de QTL comprende uno o más de los alelos marcadores como se describe en este documento en otra parte.

En ciertas realizaciones, el alelo de QTL comprende un gen F35H mutado como se describe en este documento en otra parte.

- 45 Además, se divulga un método para obtener o generar o producir una planta o parte de una planta, tal como una planta o parte de una planta de maíz o sorgo o caña de azúcar, preferiblemente una planta o parte de una planta de maíz, que comprende (a) proporcionar una primera planta que tiene un alelo marcador (molecular), tal como un alelo marcador (molecular) asociado con una digestibilidad mejorada como se describe en este documento en otro lugar, 50 opcionalmente en el que dicho alelo marcador (molecular) está ubicado en un intervalo cromosómico, preferiblemente en el cromosoma 9, que comprende y está flanqueado por alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01; (b) cruzar dicha primera planta con una segunda planta, tal como una segunda planta que no tenga dicho alelo marcador (molecular), (c) seleccionar plantas de la progenie que tengan dicho alelo marcador (molecular), y opcionalmente (d) cosechar dicha parte de la planta de dicha progenie.

Además, se describe un método para obtener, generar o producir una planta o parte de una planta, tal como una planta o parte de una planta de maíz, sorgo o caña de azúcar, que comprende (a) proporcionar una primera planta que tiene un gen F35H mutado o una primera planta en la que la expresión del ARNm y/o la proteína de un gen F35H está alterada, tal como se describe en este documento en otro lugar, preferiblemente reducida o (sustancialmente) eliminada o ausente, tal como se describe en este documento en otro lugar, opcionalmente en el que dicho gen F35H mutado está ubicado en un intervalo cromosómico, preferiblemente en el cromosoma 9, que comprende y está flanqueado por los alelos marcadores (moleculares) de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01, (b) cruzar dicha primera planta con una segunda planta, tal como una segunda planta que no tiene dicho gen F35H mutado, (c) seleccionar plantas de la progenie que tienen dicho gen F35H mutado, y opcionalmente (d) cosechar dicha parte de la planta de dicha progenie.

En los métodos divulgados anteriormente para obtener o generar o producir una planta o parte de una planta, el alelo de QTL, el alelo marcador y/o la mutación de F35H en la primera planta está presente en un estado homocigoto, y/o el alelo de QTL, el alelo marcador y/o la mutación de F35H en la primera planta está presente en un estado heterocigoto, y/o el alelo de QTL, el alelo marcador y/o la mutación de F35H en la segunda planta está presente en un estado heterocigoto, y/o el alelo de QTL, el alelo marcador, y/o la mutación de F35H en la segunda planta no está presente, y/o se selecciona la progenie en la que el alelo de QTL, el alelo marcador y/o F35H mutado está presente en un estado homocigoto, y/o se selecciona la progenie en la que el alelo de QTL, el alelo marcador y/o el F35H mutado está presente en un estado heterocigoto.

En ciertas realizaciones, los métodos para obtener plantas o partes de plantas como se describe en el presente documento de acuerdo con la invención, tales como los métodos para obtener plantas o partes de plantas que tienen digestibilidad mejorada, involucran o comprenden transgénesis y/o edición de genes y/o edición de bases, tales como la inclusión de CRISPR/Cas, TALEN, ZFN, meganucleasas; mutagénesis (inducida), que puede o no ser una mutagénesis aleatoria, tal como TILLING. En ciertas realizaciones, los métodos para obtener plantas o partes de plantas como se describe en el presente documento de acuerdo con la invención, tales como los métodos para obtener plantas o partes de plantas que tienen una digestibilidad mejorada, implican o comprenden aplicaciones de ARNi, que pueden o no ser, comprender o implican aplicaciones transgénicas. Por ejemplo, las aplicaciones no transgénicas pueden implicar, por ejemplo, la aplicación de componentes de ARNi tales como ARNip bicatenario a plantas o superficies de plantas, como por ejemplo un aerosol. No se requiere una integración estable en el genoma de la planta.

En ciertas realizaciones, los métodos para obtener plantas o partes de plantas como se describe en el presente documento de acuerdo con la invención, tales como los métodos para obtener plantas o partes de plantas que tienen una digestibilidad mejorada, no implican ni comprenden transgénesis, edición de genes, edición de bases y/o mutagénesis.

El experto en la materia entenderá que el producto del gen F35H de tipo silvestre o no mutado es un producto del gen funcional que tiene actividad enzimática, como se define en este documento en otra parte. El experto en la materia comprenderá además que las variaciones de secuencia descritas anteriormente para el F35H de tipo silvestre no incluyen cambios de marco o mutaciones sin sentido.

Como se usa en el presente documento, el F35H mutado o la mutación en el F35H puede comprender o puede referirse a cualquier tipo de mutación de F35H. En determinadas realizaciones, la mutación altera la expresión de la proteína y/o el ARNm de F35H de tipo silvestre o nativo. En determinadas realizaciones, la mutación reduce o elimina la expresión de la proteína y/o el ARNm F35H (de tipo silvestre o nativo), como se describe en otra parte del presente documento. Las mutaciones pueden afectar la transcripción y/o la traducción. Las mutaciones pueden ocurrir en exones o intrones. Pueden producirse mutaciones en elementos reguladores, tales como promotores, potenciadores, terminadores, aislantes, etc. Pueden producirse mutaciones en secuencias codificantes. Pueden producirse mutaciones en los sitios de señal de empalme, tal como los sitios donantes o aceptores de empalme. Las mutaciones pueden ser mutaciones de cambio de marco. Las mutaciones pueden ser mutaciones sin sentido. Las mutaciones pueden ser por inserción o eliminación de uno o más nucleótidos. Las mutaciones pueden ser mutaciones no conservadoras (en las que uno o más aminoácidos de tipo silvestre se sustituyen por uno o más aminoácidos de tipo no silvestre). Las mutaciones pueden afectar o alterar la función de la proteína F35H, tal como la actividad enzimática. Las mutaciones pueden reducir o (sustancialmente) eliminar la función de la proteína F35H, tal como la actividad enzimática. Función reducida, tal como actividad enzimática reducida, puede referirse a una reducción de aproximadamente al menos 10 %, preferiblemente al menos 30 %, más preferiblemente al menos 50 %, tal como al menos 20 %, 40 %, 60 %, 80 % o más, tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o más. La función (sustancialmente) eliminada, tal como la actividad enzimática (sustancialmente) eliminada, puede referirse a una reducción de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %. Las mutaciones pueden ser mutaciones negativas dominantes. En ciertas realizaciones, las mutaciones se evalúan con referencia a la línea endogámica de maíz PH207, como se define en este documento en otra parte.

En ciertas realizaciones, la mutación de F35H es una inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia codificante. En ciertas realizaciones, la mutación de F35H es una mutación sin sentido. En ciertas realizaciones, la mutación de F35H da como resultado una expresión alterada del gen F35H. En ciertas realizaciones, la mutación de F35H da como resultado la eliminación del gen F35H o la inactivación del ARNm y/o la proteína F35H. En ciertas realizaciones, la

mutación da como resultado un cambio de marco de la secuencia codificante de F35H. En ciertas realizaciones, la mutación da como resultado una secuencia de proteína alterada codificada por el gen F35H.

En ciertas realizaciones, la mutación de F35H es una inserción, preferiblemente en un exón, preferiblemente una inserción en el primer exón, de uno o más nucleótidos, preferiblemente una inserción de cambio de marco. En ciertas realizaciones, la inserción es de 187 nucleótidos o aproximadamente 187 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la inserción está entre la posición 97 y 98 del gen F35H representado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. El experto en la materia es capaz de determinar la posición correspondiente en homólogos u ortólogos de F35H. En ciertas realizaciones, la inserción comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10. En ciertas realizaciones, el F35H mutado comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11.

La expresión del ARNm y/o la proteína F35H puede reducirse o eliminarse mutando el propio gen F35H (incluido el elemento codificador, no codificante y regulador). Los métodos para introducir mutaciones se describen en este documento en otra parte. Alternativamente, la expresión del ARNm y/o la proteína F35H puede reducirse o eliminarse (específicamente) interfiriendo con la transcripción y/o traducción, tal como para disminuir o eliminar la transcripción o traducción de ARNm y/o proteína. Alternativamente, la expresión del ARNm y/o la proteína F35H puede reducirse o eliminarse (específicamente) interfiriendo con la estabilidad del ARNm y/o la proteína, tal como para reducir la estabilidad del ARNm y/o la proteína. Por ejemplo, la (estabilidad) del ARNm puede reducirse por medio de ARNi, como se describe en este documento en otra parte. También se puede usar miARN para afectar la (estabilidad) del ARNm. En determinadas realizaciones, una expresión reducida de F35H que se consigue reduciendo la estabilidad del ARNm o de la proteína también se incluye en el término F35H "mutado". En ciertas realizaciones, una expresión reducida de F35H que se logra reduciendo la estabilidad del ARNm o de la proteína no se incluye en el término F35H "mutado".

En ciertas realizaciones, los alelos marcadores (moleculares) que están asociados con una digestibilidad mejorada como se describe en el presente documento se definen como sigue:

ma61134xxx es una inserción de uno o más nucleótidos entre la posición 134254381 y 134254382 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, preferiblemente una inserción como se establece en la SEQ ID NO: 12; y/o

ma61070s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 121588825 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o T, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 13; y/o

ma30168s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 139452428 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 14; y/o

ma50827s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 127454426 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en SEQ ID NO: 15; y/o

ma16983s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 137363784 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en SEQ ID NO: 16; y/o

ma17117s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 132038900 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 17; y/o

ma61125s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 135947973 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 18;

preferiblemente cuando PH207 se refiere a línea endogámica de *Zea mays* como se describe en "Draft Assembly of Elite Inbred Line PH207 Provides Insights into Genomic and Transcriptome Diversity in Maize", Hirsch et al., Plant Cell. 2016 Nov; 28(11): 2700-2714. Publicado el 1 de noviembre de 2016. doi: 10.1105/tpc.16.00353.

En ciertas realizaciones, la inserción asociada con el alelo marcador de ma61134xxx es una inserción de cambio de marco. En ciertas realizaciones, la inserción asociada con el alelo marcador de ma61134xxx es una inserción de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10. En ciertas realizaciones, el alelo marcador de ma61134xxx comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos (contigua) de la SEQ ID NO: 12

En ciertas realizaciones, el alelo marcador de ma61070s01 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos (contigua) de la SEQ ID NO: 13

En ciertas realizaciones, el alelo marcador de ma30168s02 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos (contigua) de la SEQ ID NO: 14

En ciertas realizaciones, el alelo marcador de ma50827s01 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos (contigua) de la SEQ ID NO: 15.

En ciertas realizaciones, el alelo marcador de ma16983s02 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos (contigua) de la SEQ ID NO: 16.

- 5 En ciertas realizaciones, el alelo marcador de ma17117s01 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos (contigua) de la SEQ ID NO: 17

En ciertas realizaciones, el alelo marcador de 61125s01 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos (contigua) de la SEQ ID NO: 18

- 10 En un aspecto, la invención se refiere al uso de uno o más de los marcadores (moleculares) descritos en el presente documento para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada. En un aspecto, la invención se refiere al uso de uno o más de los marcadores (moleculares) descritos en el presente documento que pueden detectar al menos un alelo marcador de diagnóstico para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada. En un aspecto, la invención se refiere a la detección de uno o más de los alelos marcadores (moleculares) descritos en el presente documento para identificar una planta de
15 maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada.

Los alelos marcadores de la invención, como se describe en el presente documento, pueden ser alelos marcadores de diagnóstico que se pueden utilizar para identificar o seleccionar plantas de maíz o partes de plantas de maíz que tienen una digestibilidad mejorada, preferiblemente una digestibilidad de rastrojo mejorada.

- 20 Además, la presente solicitud divulga un ácido polinucleico (aislado) que comprende un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente, o el complemento o el complemento inverso de un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente. Tal ácido polinucleico que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos, preferiblemente al menos 15 nucleótidos contiguos o al menos 20 nucleótidos contiguos de un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente, o el complemento o el complemento inverso de un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente, y/o tal ácido polinucleico que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos, preferiblemente
25 al menos 15 nucleótidos contiguos o al menos 20 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, o el complemento o el complemento inverso de cualquiera de las SEQ ID NOs: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y/o el ácido polinucleico es capaz de discriminar entre un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente y un alelo marcador no molecular, tal como para hibridar específicamente con un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente, y/o el ácido polinucleico es capaz de hibridarse con un fragmento de nucleótido único o una sección de cualquiera de las SEQ ID NOs: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, o el complemento o el complemento inverso de cualquiera de las SEQ ID NOs: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Se entenderá que una sección o fragmento único se refiere preferiblemente a una sección o fragmento que comprende el SNP o los respectivos alelos marcadores como se describió anteriormente (tal como los alelos marcadores de ma61070s01, ma30168s02, ma50827s01, ma16983s02, ma17117s01 o ma61125s01), o una sección o fragmento que comprende
35 la unión 5' o 3' del inserto de un alelo marcador como se describió anteriormente o una sección o fracción comprendida dentro del inserto de un alelo marcador como se describió anteriormente (tal como el alelo marcador de ma61134xxx). Además, se describe que el ácido polinucleico o el complemento o el complemento inverso del mismo no hibrida (sustancialmente) ni se une al ADN (genómico) que se origina en la línea endogámica de maíz PH207, y/o la secuencia del ácido polinucleico o el complemento o el complemento inverso del mismo no se produce o no está presente en la línea endogámica de maíz PH207.
40

La presente solicitud divulga un ácido polinucleico capaz de hibridarse específicamente con un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente, o el complemento del mismo, o el complemento inverso del mismo.

- 45 Tal ácido polinucleico se hibrida específicamente con cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NOs: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, o el complemento o el complemento inverso del mismo, y/o el ácido polinucleico es un cebador, y/o el ácido polinucleico es una sonda, y/o el ácido polinucleico es un ácido polinucleico específico del alelo, tal como un cebador o sonda específico de alelo, y/o el ácido polinucleico comprende al menos 15 nucleótidos, como tal 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos, como al menos 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos, tal como al menos 100, 200, 300 o 500 nucleótidos.

- 50 Se entenderá que "hibridar específicamente" significa que el ácido polinucleico se hibrida con el alelo marcador (molecular) (tal como en condiciones de hibridación rigurosas, como se define en este documento en otra parte), pero no se hibrida (sustancialmente) con un ácido polinucleico que no comprende el alelo marcador o es (sustancialmente) incapaz de usarse como cebador de PCR. Por ejemplo, en una lectura adecuada, la señal de hibridación con el alelo marcador o la amplificación por PCR del alelo marcador es al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces más fuerte o más que la señal de hibridación con un alelo no marcador, o cualquier otra secuencia.

- 55 Además, la presente solicitud divulga un kit que comprende dichos ácidos polinucleicos, tales como cebadores (que comprenden cebadores directos y/o inversos) y/o sondas. El kit puede comprender además instrucciones de uso.

Se entenderá que en realizaciones relacionadas con un conjunto de cebadores directos e inversos, solo uno de ambos cebadores (directo o inverso) puede necesitar ser capaz de discriminar entre un alelo marcador (molecular) como se describió anteriormente y un alelo no marcador, y por lo tanto puede ser único. El otro cebador puede o no ser capaz de discriminar entre un alelo marcador (molecular) de la invención y un alelo no marcador y, por lo tanto, puede ser único.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir material vegetal ensilado o alimento para animales que tiene una digestibilidad mejorada, que comprende (a) cultivar la planta de acuerdo con la presente invención, (b) cosechar la planta o partes de la planta, (c) opcionalmente, trocear y/o triturar la planta, y (c) ensilar la planta, opcionalmente añadiendo un estimulante tal como un inoculante bacteriano, un azúcar y una enzima. Además, la invención se refiere a un material vegetal ensilado o alimento animal producido por dicho método.

En la presente solicitud, se divulga también un método para producir biogás o bioetanol, que comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar la planta o las partes de la planta de acuerdo con la presente invención o el material vegetal ensilado de acuerdo con la presente invención, y (b) producir biogás o bioetanol a partir de la planta o del material vegetal ensilado.

Los aspectos y realizaciones de la invención se apoyan además en los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se llevó a cabo un experimento de QTL sobre la digestibilidad del rastrojo en dos poblaciones de DH (haploide doble). En ambas poblaciones se identificó un QTL con fuerte efecto en la misma posición cromosómica en el cromosoma 9 (Fig. 1). La región de QTL parece no contener ninguno de los genes caracterizados conocidos del metabolismo de la lignina.

El análisis de marcadores usando genotipado de SNP de alta densidad con una matriz de SNP no mostró polimorfismos entre la línea que alberga el alelo positivo del QTL y otras líneas disponibles comercialmente. Aprovechando este efecto, se llevó a cabo un experimento de captura de secuencias utilizando una línea portadora de QTL y una línea de control. Como en ese momento, la única secuencia de referencia genómica era AGPv02, se desarrollaron sondas para la captura de secuencias sobre esta referencia. El análisis de datos resultó ser muy difícil debido a la alta repetitividad de la región y en parte a la baja similitud entre la región en B73 (AGPv02) y el alelo de QTL. A partir de este experimento, se desarrolló un marcador, ma60405s01, que mostraba un polimorfismo entre las dos líneas en la región de QTL.

Con el fin de identificar otros marcadores preferiblemente polimórficos, se realizó una secuenciación del genoma completo (WGS) de una línea portadora de QTL. Se seleccionaron estructuras que cubrían el objetivo y se compararon con el genoma de referencia de PH207 ("Draft Assembly of Elite Inbred Line PH207 Provides Insights into Genomic and Transcriptome Diversity in Maize", Hirsch et al., Plant Cell. Nov de 2016; 28(11): 2700-2714. Publicado en línea el 1 de nov de 2016. doi: 10.1105/tpc.16.00353). Se pudieron identificar tres marcadores polimórficos más (ma61126d01, ma61134xxx y ma61125s01, véase la Fig. 2). Sus alelos específicos de QTL son únicos y no se pueden detectar en ninguna línea KWS utilizada para el mejoramiento de maíz para ensilaje.

El mapeo fino del QTL ha reducido la región primero a 16.7 MB y en la última etapa hasta aprox. 719 kb en la referencia PH207 (véase la Fig. 3 y la Tabla 1). La Figura 3 muestra dos familias de recombinantes derivados de los cruces de la línea QTL (B) con una línea que no porta el QTL (A). El DNDF indicado es la media de todos los miembros de la familia con o sin QTL respectivamente. El marcador que mejor se asocia con el fenotipo en los últimos recombinantes es ma61134xxx. Representa una inserción de 187 pb en un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa del citocromo P450 (llamado F35H, véase la Fig. 4). Esta inserción provoca un alargamiento del extremo terminal N de la proteína y un codón de terminación temprano que probablemente conduce a la eliminación del gen. El gen correspondiente de AGPv02 se expresa en hojas y tallo. Se encuentra al comienzo del metabolismo de los flavonoides tomando recursos de la ruta metabólica de la lignina.

Tabla 1: Lista de marcadores para QTL de ensilaje o el gen como tal.

marcador	cromosoma	mapa genético [posición en cM]	PH207-público [posición en pb]
ma61070s01	9		121588825
ma50827s01	9		127454426
ma17117s01	9		132038900
ma60405s01	9	55,054	133444836
ma61134xxx	9	55,98	134254381
ma61125s01	9	56,224	135947973

marcador	cromosoma	mapa genético [posición en cM]	PH207-público [posición en pb]
ma16983s02	9		137363784
ma30168s02	9		139452428

Dentro de la región de 133,4-135,9 MB del cromosoma 9 en PH207, se comprobaron todos los demás genes hipotéticos derivados de la anotación interna del fabricante de PH207 en busca de polimorfismo entre la línea de QTL y PH207. De más de 100 genes, solo el descrito mostró un polimorfismo. 79 genes eran idénticos. El resto fue en su mayoría repetitivo o solo parcialmente representado en el ensamblaje de la línea de QTL.

El marcador capilar ma61134xxx podría convertirse en un par de marcadores KASP dominantes y en un marcador KASP codominante, los tres están disponibles para uso rutinario.

El marcador de diagnóstico más importante ma61134xxx está dirigido a la inserción en el gen causante. La inserción está presente en el genotipo que porta el QTL de ensilaje y está ausente en la línea de referencia PH207. En PH207 la siguiente secuencia no está presente en el gen (SEQ ID NO: 10):

```
CTTCTGCCCAGAAGCGGGCCAGACATTTGAGATTGGGTATTCAAAAATTCAAAAGATTAAAGA
ATTAGTGTCTAACGCTATTTTATGCAATACATTATTGACAAATTAGTGTCTAACACTATAG
ATCACCAAAAACATGGGTATTCAATGAATACCCATGAAACCCCCCTGGGCCCGCCCATG
```

El experto en la materia es capaz de diseñar marcadores para sistemas de marcadores conocidos que permitan detectar la presencia o ausencia de la inserción.

Además, un experto en la técnica también puede encontrar marcadores para sistemas de marcadores conocidos que son adecuados para el análisis adicional de la región de QTL para ensilaje, así como marcadores con valor de diagnóstico que se basan, por ejemplo, en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o InDels (véase el ejemplo de la Tabla 2).

Tabla 2: Alelos marcadores en la línea de QTL

Marcador	Alelo de la línea de QTL
ma61070s01	T (comprendido en la SEQ ID NO: 13)
ma50827s01	A (comprendido en la SEQ ID NO: 15)
ma17117s01	A (comprendido en la SEQ ID NO: 17)
ma61134xxx	cttctgcccagaagcgggcccagacatttgagattgggtattcaaa aattcaaaagattaaagaatttagtggttctaacgctatTTTTATGCA atacattattgacaaatttagtggttctaacactatagatcaccaaaa acatgggtattcaatgaatacccatgaaacccccctgggcccgcgc atg (SEQ ID NO: 10, comprendida en la SEQ ID NO: 12)
ma61125s01	G (comprendido en SEQ ID NO: 18)
ma16983s02	G (comprendido en SEQ ID NO: 16)
ma30168s02	G (comprendido en SEQ ID NO: 14)

En conclusión, la presente invención describe la identificación de un haplotipo marcador que abarca 3,8 MB de PH207 (véase la Fig. 2) y describe el genotipo de la línea de QTL en la región objetivo: El conjunto de marcadores identificados durante el mapeo (véase las tablas 1 y 2) se puede usar para integrar el QTL positivo en cualquier ambiente genético relevante. Lo más importante es el marcador de diagnóstico para la inserción, que es la mutación funcional. Sin embargo, el uso de marcadores fuera del gen en la región flanqueante estrechamente ligada al gen también puede usarse para identificar el genotipo de la línea de QTL. El haplotipo único de marcadores (vease la Fig. 2) se puede usar para aplicaciones asistidas por marcadores, es decir, para la introgresión de rasgos a través de retrocruzamiento o mejoramiento progresivo y para monitorizar la presencia del haplotipo único de ensilaje. Además, los marcadores desarrollados pueden utilizarse para aumentar la variación genética en esta región cromosómica y mantener el alelo ventajoso del ensilaje. Además se describe la identificación de un gen para el objetivo: El conocimiento del gen y la inserción encontrada (mutación funcional) se puede utilizar para aumentar la variabilidad genética en este locus mediante labranza o edición del genoma o modificación genética para mejorar aún más el efecto.

Listado de secuencias

<110> KWS SAAT SE

<120> Plantas con digestibilidad mejorada y haplotipos marcadores

<130> KWS0277EP

<160> 18

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4215

<212> ADN

<213> Zea mays

10 <400> 1

```

atgcagctcg cggcgttggtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgctt cctctgcctc      60
ctctccacg tggctctccg ctgctgctg caccctcctt ctgccgcctc ttctccggg      120
cgccgcgggc agctcccgcc ggggccaccg ggctgcca tctcggcgc gctgccactc      180
gtgggcccag ccccgcacgc cggcctggcc gcgctggcgc gcaagtacgg tcccatcatg      240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgctgt cccgcgcgc ggcgcggaag      300
ttcctcaagg cgctggacgc gcggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgccgcggac      360
atcacgtacg ggccgcagaa catggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg      420
cggaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggctgctgtg      480
cggcgcggcg aggccggcca cgtgctgcgc ggctggtggc aggcggccgc ggccgcgagg      540
cccgctgctg tgccggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca      600
gtgagcaagc ggggtgttcga cgcgcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc      660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcat ttggaaagaa aagaacatat      720
ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttcg ataaagtttg taaaaaaat      780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt      840
ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac      900
ttaatgcgat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct      960
tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca     1020
tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg     1080
tctatagttg ttgtatatat ttattaagg acaccctcca acgtggtggt gtgtagtggt     1140
ggaaggtggt atttgtaaata tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggt     1200
gatgatatta tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtcctcta     1260
ttgcaaatagc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa     1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa     1380

```

ES 2 922 902 T3

caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt tttcatgcat ggaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgctga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgctgaccgg cacgggcatg ttcaacatca gcgacttogt gccggcgctg	1620
gcgcgtctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaccg cgcgcgccag	1740
ggccgcccgg acttcgtcga cgggctccgc gccacgatgg acgccggcgc cgcgcgccag	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gcctcatctt cgtaagctcc	1860
ctgctttttc ctgcgcccca accatgcac ccatatgca cttatatattt acacttgctc	1920
ggttttctt tagtaactaa ctaatccgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctc acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg tgttaggtgg agatagtgga tcgagttgtt ggaaagacaa tatcaaaacc	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccaccttg tttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaata tggttccaat gttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttccga gtagcacatc caggttgggt tcgatcctct cgagggcgaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccctccga ctagtgacag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaaaaaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tcctaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagttta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatata ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttttcaagg gatttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttcctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttgagat	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcctagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaatc gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg	3120
ataccaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc tgaaaataac tgatcgtcac catccgtgaa tctaactttc gacacactgt	3240

ES 2 922 902 T3

taccaaatcc ttogtcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat	3300
tttttgtcac taattaacca cactgttctt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt	3360
gtgaagcagt gttgccgtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac	3420
ttgtaccatc gaacgccgcg cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagtcactg	3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actatttctt	3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggcggttacg	3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtggcg atggcggaga tgctcaagaa cccgaccgtc	3660
atggcgcgcg cgcaggagga gctggaccgc gcggtgggcc ggggccggcg cctggaggag	3720
tcggacctgc cgggcctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcggtgcac	3780
ccgtccacgc cgctcagcct cccgcacttc tccttgagcg cctgcgacga cgtcgacggc	3840
taccgcgtcc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg ccgggacccg	3900
gaggcctggg agaggcccct cgacttcgc cccgagcgct tcctgcccgg gggcgcgcg	3960
gagaaggctc accccctggg gaactgcttc gagctcatcc cgttcggcgc cggccggagg	4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttogtgcagt acttcctggg cagctgctg	4080
cacgcgttcg actggcgctt gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc	4140
ggcctgcgc tgcccaaggc agtgccgctc cgcgcgctc ccacgccacg gctcgtgccg	4200
gaagcctatg cctga	4215

<210> 2

<211> 1584

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADNc de la SEQ ID NO: 1

<400> 2

atgcagctcg cggcgttgtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgctt cctctgcctc	60
ctcctccacg tggctctccg ctgctgctg caccctcctt ctgccgcctc ttctccggg	120
cggcgggggc agctcccgcg ggggccaccg ggcttgccga tctcggcgc gctgccactc	180
gtgggcccag ccccgcacgc cggcctggcc gcgctggcgc gcaagtacg tcccatcatg	240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgtcgt ccccgcgcg ggcgcggacg	300
ttcctcaagg cgctggacgc gcggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cggcgggac	360
atcacgtacg ggcggcagaa catggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg	420
cggaagctcg ccagcgtgca cctgctggc gcgcgcgcgc tcgcggaactg ggctgctgtg	480
cggcgggggc aggcgggcca cgtgctgcgc ggcgtggcgg aggcggccgc ggccggcagg	540
cccgtcgtcg tgccggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca	600

ES 2 922 902 T3

```

gtgagcaagc ggggtgttga cgcgcagggg gacgactcga acagatacaa ggacatgac 660
gtgtcgctgc tgaccggcac gggcatgttc aacatcagcg acttcgtgcc ggcgctggcg 720
cgtctggacc tgcagggcgt gcaggcgaag ctgcggcgcg tccaccgcca gttcgacggc 780
ctcatcacca agctgctggc cgagcacgcc gcgacggcgc cggaccgcgc gcgccagggc 840
cgcccggaact tcgtcgaccg gctccgcgcc acgatggacg cgggcgcgcg cgccgacgac 900
gagagcggcg agaccatcac cgaggtcaac atcaagggcc tcatcttcga catgttcacg 960
gcgggtacgg acacgtcgtc gatcatcgtg gagtgggcga tggcggagat gctcaagaac 1020
ccgaccgtca tggcgcgcg gcaggaggag ctggaccgcg cgggtgggcg gggccggcg 1080
ctggaggagt cggacctgcc cggcctcccc tacctgcagg cgggtgtgcaa ggaggccatg 1140
cggctgcacc cgtccacgcc gctcagcctc ccgcacttct ccttgacgc ctgcgacgac 1200
gtcgacggct accgcgtccc ggccaacacc cgcctgctcg tcaacgtctg ggccatcggc 1260
cgggaccgcg aggcctggga gaggccctc gaattccgcc ccgagcgtt cctgccggg 1320
ggcggcgcg agaaggtcga cccctgggg aactgcttcg agctcatccc gttcggcgcc 1380
ggccggagga tctgcgcggg gaagctggcg ggcattgtgt tcgtgcagta cttcctgggc 1440
acgtgctgc acgcgttcga ctggcgctg cctgacggcg aggagaagct ggacatgagc 1500
gagacgttcg gcctcgctt gcccaaggca gtgcgcgtcc gcgccgtcgc cagccacgg 1560
ctcgtgccgg aagcctatgc ctga 1584

```

<210> 3

<211> 527

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 3

```

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1           5           10           15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
20           25           30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
35           40           45

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
50           55           60

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
65           70           75           80

```

ES 2 922 902 T3

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
 85 90 95
 Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
 100 105 110
 Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
 115 120 125
 Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala
 130 135 140
 Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala Cys Val
 145 150 155 160
 Arg Arg Gly Glu Ala Gly His Val Leu Arg Gly Val Ala Glu Ala Ala
 165 170 175
 Ala Ala Gly Arg Pro Val Val Val Pro Glu Leu Leu Val Cys Ala Leu
 180 185 190
 Ala Asn Ile Val Gly Gln Ile Thr Val Ser Lys Arg Val Phe Asp Ala
 195 200 205
 Gln Gly Asp Asp Ser Asn Arg Tyr Lys Asp Met Ile Val Ser Leu Leu
 210 215 220
 Thr Gly Thr Gly Met Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Ala Leu Ala
 225 230 235 240
 Arg Leu Asp Leu Gln Gly Val Gln Ala Lys Leu Arg Arg Val His Arg
 245 250 255
 Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu His Ala Ala Thr
 260 265 270
 Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Pro Asp Phe Val Asp Arg Leu
 275 280 285
 Arg Ala Thr Met Asp Ala Gly Ala Ala Ala Asp Asp Glu Ser Gly Glu
 290 295 300
 Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met Phe Thr
 305 310 315 320
 Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met Ala Glu
 325 330 335

ES 2 922 902 T3

Met Leu Lys Asn Pro Thr Val Met Ala Arg Ala Gln Glu Glu Leu Asp
340 345 350

Arg Ala Val Gly Arg Gly Arg Arg Leu Glu Glu Ser Asp Leu Pro Gly
355 360 365

Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Leu Asp Ala Cys Asp Asp
385 390 395 400

Val Asp Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val
405 410 415

Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Glu Arg Pro Leu Asp Phe
420 425 430

Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro
435 440 445

Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
450 455 460

Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly
465 470 475 480

Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys
485 490 495

Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro
500 505 510

Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala
515 520 525

<210> 4

<211> 5903

<212> ADN

5 <213> Sorgo bicolor

<400> 4

cccctacgat gtatatgtag ctggtctgaa aacgggttaaa taataaaaaa agataacaac 60

ggccccgaga ttctgagtac acagcgcttc atcaccaata taataaccgt cgtgctcgcg 120

gaggcatcct tagcttgggc aggtcctcct ccctagctag ctagcacagt aacgccacca 180

tgaagctcgc cgcgttgtgc accgaccccg tcgtgctctc ctgcgccttc ctctgcctcc 240

ES 2 922 902 T3

tectccacct cgetctccgg tccctgctgc acccttcttc tgccgectct tectctggcc	300
gccgcgccgg gcccgccggc caccctccgc cggggccacc gggcctgccg atcctcggcg	360
cgtctgccact cgtcgccct gccccgcatg ccggcctggc cgcgtggcg cgcaggtacg	420
gtcccatcat gtacctgaag atgggcacga cgggcgtcgt ggtggcgtcg tcccgtgcg	480
cggcgaagac gttcctcaag gcgctggacg cgaagtacgc caaccggccg gcggtggcga	540
gcgccgccga catcacgtac cggcgccaga acatggtgtt cgcggactac gggcccaagt	600
ggaagctgat gcggaagctc gccagcgtgc acctgctcgg ggcgcgcgcg ctgcgcgact	660
gggcgtgctg gcggcgcgac gaggcggcc acctgctcgg cggcgtggcg gaggcggccg	720
cggcccgggc gcccgctcgc gtgcgggagc tgctcgtgtg cgcgtcgcg aacatcgtcg	780
ggcagatcac cgtcagcaag cgggtgttcg acgcgcaggg ggatgactca aacagggtgag	840
gatcgtatcaa agctgcatga aatcctatca acaagacaat gaccatatat atataaggca	900
taaaatccaa gttcatttcg aaaggaaagc acatgttttt cttccaaaat ttcattgatta	960
tcgggtgcct taagttggga tgaggtttac aatatctttg aatgggacta gtgagatcag	1020
ttgaactagt tatccttaat taatgcaatg cttgacggaa tgaacatcag cagaccgtta	1080
atgcggaaaag ccggggataa aaaaattaaa aagttcagct aggaagctgc tgtcatcggg	1140
tacgtatgag aagactgaag aatcggcatg acgagcactt agtactggca tttagccgga	1200
atgtccttgt tagtgagag agtcgtcac caaaacctga aagcgaagg agagcgatcg	1260
aaacggcccc tccatcgaca aataataagg agaactctgt catttttcat gcatgcattc	1320
atggaaaaaa cacaaactga tcaagtattt ttctgtctaa catataataa ttctgatacc	1380
atatatgcgt gctgcgtgct gcgtgctgcg tgcaggatca aggacatgat cgtgtcgtg	1440
ctgacgggca cgggcatgtt caacatcagc gacttcgtgc cggcgtggc gcgtctggac	1500
ctgcaggggc tgcaggccaa gctgcggcgg atccaccacc agttcgacgg cctcatcacc	1560
aagctgctgg ccgagcacgc cgcgacggcg gcggaccgcg cgcgccaggg ccgccaggac	1620
ttcgtcgaca ggtccgcgc cccgatggac gccggcgccg acgacgagag cggcgagacc	1680
atcaccgagg tcaacatcaa ggccctcatc ttctgaagct ctgcgtctct ttatatcttc	1740
ctcaccacca acctctcttc atgcatttat attttaattg cttgcttccc ttggttgcta	1800
actaaccaac tactaatctg tcgtagctgc aaaaatatgt aatactactg caacaatcga	1860
tcattggccat gggttaactga atcatatact cctccatcc caaattgtaa gtcattccaa	1920
gaattttgaa gagtcaaact ttcaaagtt tgaccaaatt tatatgataa aataataatt	1980
attatgatac caactaaata tcattagatt cttccttaat tatattttca tagtatactc	2040
atcttacgtt acaaatctta gtatttcact ctataatttt ggtcaaacgt gaaaatgctt	2100
tgactctcca agattcttgg aatgacttac aatttgagat ggaggaggta tatcttcgct	2160

ES 2 922 902 T3

gaaaatgaag tgcacggcat tttggtgtga cataggagct aagctaagct aagctagtag	2220
ccaccggacc taacggagca ctgacactga ccgaaagctc agcgtgttag gtgaagctgc	2280
tagtggagtt gttggaaaga caatatcaaa atcacaatct cgaactcatg agatgatgtg	2340
gggcctgcag ggccggtttt gagtcctcca tgatggtgat agctcaaggc ttgtttggtt	2400
caaacattac tagagcaaaa tatggttcaa acattaattg ctaaccgttg aagagtagaa	2460
tgcatatata tgctgtcat gccatggttt tatgagaaga tgcttactat atatttttat	2520
tagataacaa tagggatcac tagatttaat tatctgccga gagaacatac agatttaatc	2580
caacctaaat tcacccccgt ctcttgttc tcacggtgga aatatatagt gggtaaactg	2640
acaaaaaagg catttggttc ctatactttg ttggaacata tttttaattt gttaggctat	2700
atagcataca gatccaacaa attccaccca taaaatatct atcaatacgc ataaaagtag	2760
tttaaggaaa tctagaaata ttggaaccac tactagctag aatctgtatg ttttcctagg	2820
attttaattc ctacgaatag aactaaaata tgtaaggaaa acatttcctc atcatatttt	2880
gcaccaaaaa aaattctatc gatgcataaa tagtaaaaca cgaaaaatgt tgggacaata	2940
gggacttatt taccccaagg gaaccaaagc acctaaaaat tatacatttc ctgaaggaaa	3000
tttagatagt agttccaaga aaaactagaa aagtgggtggc atagatatgc taggggaattc	3060
attccctaag ggaatgagaa tgtatgaaaa ttatacaatt tcaaataagc tctaaagata	3120
aagaggattt ctcttttctg gaacaaacaa aatatgaaag tgccctccaa gatcttattg	3180
agtcaacttt tatagaatta tatattgttt ttattatttt taagatggcg tgcaaatca	3240
agtctaaatt attcagtga agcctcgaga ttctttaagg attaaaaata agtgaagcgg	3300
ttaagattta atcaggaaaa cgatattgga ctctgtcct ccaaccaaac ttgattatga	3360
cgttttagct taatgttcac tttgtagacg tcggatatat agggatgcca accgaaagga	3420
aaaggctgac gttttaacaa actgcacata tatgttacca gaactcgaat agcagctttg	3480
taagtctcta gaatgttga gtagttaaca acgtgataga cgatgtaaca cctggaccat	3540
gttattatgt catttcctag aagaattgta atcaaatcta ttaattaatc aagcaaagaa	3600
ttgaaagcta taaatggctt aaggcaacat ctggttgtga gttgtgtgat taattattgg	3660
tgaatgtcgt gtcagcacta acattattaa ggtcagctc aatgcatagt ttcattgacac	3720
agttaccaag actataaact aggtaaccga gccacaagag tttcatgggg atgaaactcc	3780
tctctcatct gatgaaactc cttcatttaa tgactctgcc aactcagcaa ttttgcttat	3840
gtggcaccat atttaatgtg catgacactc tcataaaaca tgcattgaga ctggcctaag	3900
ggggtgttta gtgtggact ctttagatcg tctactaggt cgtagatcgg tggggaattt	3960
acttctattt gggataaacc acatagaatt tcatggatct agagaggaat ggaggacgag	4020

ES 2 922 902 T3

```

aggatgtgtt atatactgaa ccataccttt ggggttggcg gagaagcgcg tggtcgagggc 4080
agtggcggtg gcggaactttc cgtcgctggc agtgcctccc tctcgatcgg tctagggtta 4140
gatggggact cgcggcattg tagcgggtgaa ccttgtaact tgtgctctag cctccaccct 4200
ctcttttata cactgcgcga caggggcctg gcagccaagt tattgggcta gacgcccccg 4260
atcagggcgt ggtcaagggt ccggccaagt ctttggactt gggccagtgg agatcaatct 4320
aacatttagt tccccataaa atacaaaatg tcaactactt tggaatgatg aaatgcaaaa 4380
tatcaaaaaa ttcaggttag atccatcaa aatgcagaat ttattgctct cattatagcc 4440
tcttgagact tttttggact tttttggcct cttgaggcca aaatacaaaa tagagaataa 4500
ccacattttt gttaaaattt ttgcatagta tttattttta ttatgtaaaa taatacacca 4560
aaactcagaa ttttttggga tggaggggga actaaacacc ccgtgaatct agtcggcaca 4620
atgactcaag caatgaaacc actactgttt cagtataagg ttggaaca ctgttctcaa 4680
cataacatcg cattgactct ctctttgtgg gctgtgtggc tttgtgggtc agcttgattg 4740
gagctcotta acatatataa catacactgt gcctgctgat gctgaggttg tactgtcatc 4800
aaacacacta aaacagtgca ccacaccctt caataatgtc aggtcaaaact atataaccag 4860
cttatattat atacagtgtt aaacttaaac ccaacccaac gatataataa tcacttgcac 4920
atacttcaaa accatgtata tatatctcgt tgaaaaaat tataggagta ataatgtttg 4980
cgtgcgcgcg atcgctgctt tgcattgcag caggacatgt tcacggcggg cacggacacg 5040
tcgtccatca tcgtggagtg ggcgatggcg gagatgctca agaaccctgc cgtgatggcg 5100
cgcgcgcagg aggagctgga ccgcgtggtg ggcgcgggcc gccgcctgga ggagtcggac 5160
ctgccagacc tcccctacct gcaggccgtc tgcaaggagg ccattggggt gcacccgtcg 5220
acgccgtca gccctccgca cttctccttc gacgcctgcg acgacgacgt cgcgcgggc 5280
ggctaccgcg tcccgcccaa ccccggctg ctcattcaaa tctgggccat cggccgggac 5340
ccggcgcggt ggaagaagcc cctggagtgc cggcccgagc ggttcctgcc gggcgggcggc 5400
gccgagaagg tcgaccgat ggggaactgc ttcgagctca tcccgttcgg cgcgggcagg 5460
aggatctgcg ccgggaagct ggccggcatg gtgttcgtgc agtacttcct gggcacgctg 5520
ctgcacgcgt tcgactggag cttgcctgac ggcgaggaga agctggacat gagcgagacg 5580
ttcggcctcg cgtgcctaa ggctgtgcg ctcgcgcggc tcgtcacgcc acggtcctg 5640
ccggaagcct acgcctgagc tagctgtcag tggttcgcgt gtgttgttgt tgcttcctg 5700
catacgtaca taacttgta tgaatcctac acttgcatg gttgcctagt accagtattt 5760
gaaattatat acggaccttg catggtttca gttttttgac acaaccgatg atggttgatc 5820
agaagacgga tctgtagagt tgttctttaa caatgcgcta acctatataa caagggactg 5880
tttggttttc catgactaaa att 5903

```

<210> 5

<211> 1599

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADNc de la SEQ ID NO: 4

<400> 5

ES 2 922 902 T3

```

atgaagctcg ccgcgttggtg caccgacccc gtcgtgctct cctgcgcctt cctctgcctc      60
ctcctccacc tcgtctctccg gtccctgctg cacccttctt ctgccgcctc ttcctctggc      120
cgccgcgcgg gcgccggcgg ccacctcccg ccggggccac cgggcctgcc gatcctcggc      180
gcgtgccac tcgtcgccc tgcccgcgt gcccgcctgg ccgcgctggc gcgcaagtac      240
ggtcccatca tgtacctgaa gatgggcacg acgggcgtcg tggtggtgctc gtccccgtgc      300
ggcggaaga cgttcctcaa ggcgctggac gcgaagtacg ccaaccggcc ggcggtggcg      360
agcgccgcgg acatcacgta ccggcgccag aacatggtgt tcgcggacta cgggcccagg      420
tggaagctga tcggaagct cgccagcgtg cacctgctcg gggcgcgcg cctcgccgac      480
tggcgctgctg tcgggcgcga cgaggccggc cacctgctcc gcggcgtggc ggagcgggcc      540
gcggcccggc ggcccgtcgt cgtgccggag ctgctcgtgt gcgcgctcgc caacatcgtc      600
gggcagatca ccgtcagcaa gcgggtgttc gacgcgcagg gggatgactc aaacagggtac      660
aaggacatga tcgtgtcgt gctgacgggc acgggcatgt tcaacatcag cgacttcgtg      720
ccgcgctggt cgctctgga cctgcagggc gtgcaggcca agctgcggcg gatccaccac      780
cagttcgacg gcctcatcac caagctgctg gccgagcacg ccgcgacggc ggcggaccgc      840
gcgcgccagg gccgccagga cttcgtcgac aggtccgcgc ccacgatgga cgccggcgcc      900
gacgacgaga gcggcgagac catcaccgag gtcaacatca agggcctcat cttcgacatg      960
ttcacggcgg gcacggacac gtcgtccatc atcgtggagt gggcgatggc ggagatgctc     1020
aagaacccgt ccgtgatggc gcgcgcgcag gaggagctgg accgcgtggt gggcccgggc     1080
cgccgcctgg aggagtcgga cctgcccagc ctcccctacc tgcaggccgt ctgcaaggag     1140
gccatgcggc tgcacccgtc gacgcgcgtc agcctccgc acttctcctt cgacgcctgc     1200
gacgacgacg tcgccgccgg cggctaccgc gtcccggcca acacccggct gctcatcaac     1260
atctgggcca tcggccggga cccggcggcg tggaagaagc ccctggagtt ccggcccgag     1320
cggttcctgc cgggcggcgg cgccgagaag gtcgaccgga tggggaactg cttcgagctc     1380
atcccgttcg gcgccggcag gaggatctgc gccgggaagc tggccggcat ggtgttcgtg     1440
cagtacttcc tgggcacgct gctgcacgcg ttcgactgga gcttgccctga cggcgaggag     1500
aagctggaca tgagcgagac gttcggcctc gcgtgccta aggctgtgcc gctccgcgcc     1560
gtcgtcacgc cagggtcgt gccggaagcc tacgcctag      1599

```

<210> 6
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> Sorgo bicolor
 <400> 6

5

ES 2 922 902 T3

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

ES 2 922 902 T3

210		215		220
Val 225	Ser	Leu	Leu	Thr
			Gly 230	Thr
			Gly	Met
			Phe	Asn
			Ile	Ser
			Asp	Phe
			Val	240
Pro	Ala	Leu	Ala	Arg
			Leu	Asp
			Leu	Gln
			Gly 250	Val
			Gln	Ala
			Lys	Leu
			Arg	255
Arg	Ile	His	His	Gln
			Phe	Asp
			Gly 265	Leu
			Ile	Thr
			Lys	Leu
			Ala	Glu
			270	
His	Ala	Ala	Thr	Ala
			Ala	Asp
			Arg 280	Ala
			Arg	Gln
			Gly	Arg
			Gln	Asp
			Phe	285
Val	Asp	Arg	Leu	Arg
			Ala	Thr
			Met 295	Asp
			Ala	Gly
			Ala	Asp
			Asp	Glu
			Ser	300
Gly	Glu	Thr	Ile	Thr
			Glu 310	Val
			Asn	Ile
			Lys	Gly
			Leu	Ile
			Phe	Asp
			Met	320
Phe	Thr	Ala	Gly	Thr
			Asp 325	Thr
			Ser	Ser
			Ile	Ile
			Val	Glu
			Trp	Ala
			Met	335
Ala	Glu	Met	Leu	Lys
			Asn 340	Pro
			Ser	Val
			Met 345	Ala
			Arg	Ala
			Gln	Glu
			Glu	350
Leu	Asp	Arg	Val	Val
			Gly 355	Arg
			Gly	Arg
			Arg 360	Leu
			Glu	Glu
			Ser	Asp
			Leu	365
Pro	Ser	Leu	Pro	Tyr
			Leu 370	Gln
			Ala	Val
			Cys	Lys
			Glu 380	Ala
			Met	Arg
			Leu	
His	Pro	Ser	Thr	Pro
			Leu 385	Ser
			Leu	Pro
			His	Phe
			Ser 395	Phe
			Asp	Ala
			Cys	400
Asp	Asp	Asp	Val	Ala
			Ala 405	Gly
			Gly	Tyr
			Arg 410	Val
			Pro	Ala
			Asn	Thr
			Arg	415
Leu	Leu	Ile	Asn	Ile
			Trp 420	Ala
			Ile	Gly
			Arg 425	Asp
			Pro	Ala
			Ala	Trp
			Lys	
Lys	Pro	Leu	Glu	Phe
			Arg 435	Pro
			Glu	Arg
			Phe 440	Leu
			Pro	Gly
			Gly 445	Gly
			Gly	Ala
Glu	Lys	Val	Asp	Pro
			Met 450	Gly
			Asn	Cys
			Phe	Glu
			Leu 460	Ile
			Pro	Phe
			Gly	

ES 2 922 902 T3

Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val
465 470 475 480

Gln Tyr Phe Leu Gly Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Ser Leu Pro
485 490 495

Asp Gly Glu Glu Lys Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu
500 505 510

Pro Lys Ala Val Pro Leu Arg Ala Val Val Thr Pro Arg Leu Val Pro
515 520 525

Glu Ala Tyr Ala
530

<210> 7

<211> 3752

<212> ADN

5 <213> Sorgo bicolor

<400> 7

atatagcttg tctgagttcc gagtacgcag ccgcaggagc gcagcgtgct gcagggtgca	60
acgcctcatc aggaatataa agccgtcgtc caggagacac ccttagcttg ggaaggctct	120
cctccctggc acagcacagt agcacgccac catgcagctc gccgcgttgt gcatcgaccc	180
cctcgtgctc tcctgcgcct tcctctgcct cctcctccac gtcgcgtcc gctccctgct	240
gcacccttct tctgcctcgt cctccggccg ccgcggcggc caccaccagc tcccgcggg	300
gccaccggga ctaccgatcc tcggcgcgct gccactcgtc ggcccagccc cgcacgcggg	360
cctggccgcg ctggcgcgca agtacggtcc catcatgtac ctgaagatgg gcacgacggg	420
cgctcgtggtg gcgtcgtccc cgggcgcggc gaggacgttc ctcaaggcgc tggacgcgaa	480
gtacgccaac cggccggcggt tggcgagcgc gcccgacatc acgtacgggt gccagaacat	540
ggtgttcgcc aactacgggc ccaagtggaa gctgatgcgg aagctcgcca gcgtgcacct	600
gctcggggcg cgcgcgctcg cggactgggc gcacgtgcgg cgcgacgagg ccggccacct	660
gctccgcggc gtggcgagg cggccgcggc ccggcgggcc gtcgtcgtgc cggagggtgct	720
ggtgtgcgcc ctgcgaata tcgtcgggca gatcaccgtg agtaagcggg tgttcgacgc	780
acagggggac gagtccaaca ggtcagaact gaaccgaaag gccttttcag tgaatagaat	840
cgctcaccaa aatacgaatg tgaaatatgt gtgtgcagg tacaaggacat gatcgtgtca	900
ctgctgactg gcgcgggact gttcaacatc agcgacttcg tgccggcgct ggcgcgtctg	960
gacctgcagg gcgtgcaggc caagctgcgg cgtgtgcacc accagttcga cggcctcatc	1020
accaagctgc tggccgagca cgcgcgcgac gcccgggacc gcgcgcgcga cggccgccag	1080
gacttcgtcg acaggctccg cgcgcgcatt gacgcggcg ctgacgacga gagcggcgag	1140

ES 2 922 902 T3

accatcacccg aggtcaacat caagggcctc atcttcgtaa gctcgccttc ctcacctcag	1200
ctacatacat atatactctt tccttccttc cattgccttc gttgttttat caagtaaagt	1260
aatgcattcc gtcgcggtaa gaatgtaaga tatgcagcag ctagtaccga tcatgaaaga	1320
aagtaactga gaatcttggt ctcaaaaataa ggcattggtt agttccgaaa aaaatttacc	1380
aaaaatttta gccgttaaata taaatcttgc ggcatatata tggagtatta aagatatata	1440
aataaaaatt aattacatag tttgcctgta atttatgaga cgaaccttta aacctagtta	1500
gtttataatt ggacaatatt tgtcaaataa aaataaaaat gctacagtat ctgaaattcc	1560
aaaattttgt caactgaaca aggccttaga tgcatttagg ccattgttgg tttcaaagt	1620
taaagtttat cgctcgacac atcgaatgtt tagtacacat gcatagagta ctaaatatag	1680
actatttatg aaactaaaaa cacagctaga gagtaatttg cgagatgaat cttttaaacc	1740
taattaatct atgattagac attaattgtt aaataagatg aaaatgttac aaccaacca	1800
agcaccocct tacgtcgtcg cgttggtgcg gccgagcag agagttaggt ggactagtgg	1860
gttggtggaa agtgacgac gaagcgaag cacacattag ctcgagctga tatgtttggt	1920
ttatggtcta attcataccg tgagggcctg caggttctga gtcttcatg attagtcaag	1980
gtgatatcgg tagctgatgg ctttgtttgg taccaaagtg cagactagag caaaatatgg	2040
ttcaaagtgt gataacattt ggtaccgtga agtgaataga atacctaccg gttgtgccat	2100
ggttgtcctc aaaattcatg tttttttaat accccatcta ttttaatta caagacattt	2160
tgacttttct agataaattg atttttctat gtatctagat atagtgtcta tctaaatgta	2220
tagtaaaagt tacatatatt taaaaaagct aaacatttta taattagaat agggggagta	2280
tataattaaa agagagtatc tgtttatagt gatatttctc aagtacagtc cacatacaga	2340
atgcaccgag accattctaa aacctcaaac atgttgcaaa gatctaattgt tctggaacca	2400
aaatatatga actgaatatc gacgattgaa tcattgggtt caacaaatat tgtagatttc	2460
aggatctatg accattgatc catcaagttg gacgcttgac ttctccgcag ctaccaatgg	2520
tgacgtcaat gacctggagt taatatctct acggagattt actcgtcctt gcacaaggat	2580
gaccttatcg tggccatgaa aatagacata tagacaatgt agggtttata tagaataatc	2640
actaataaga ataagatgag attgaataac atccaaacag tgtcggatct actcatttgg	2700
ttaattggta actttacca caaaacactg aagtaattcg tgtccattta attttttccg	2760
tcctatacaa tgtttgcatg caacgcaccc aggcattgtt caccgccccg acggacacat	2820
cgtcgatcat cgtggagtgg gcgatgtctg aaatgctcaa gaacccgccc gtcattggac	2880
gagcgagga ggagctggac cgcacggtcg gccggggccg ccgcctggaa gagtcggacc	2940
tgcccagcct ccctacctg caggccgtct gcaaggaggc catgcccgtg caccctcg	3000

ES 2 922 902 T3

cgccgctcag cctcccgcac ttctccttcg acgcctgcga cgacgtcggc ggccgctacc	3060
gcgtcccggc caacacccgg ctgctcatca acgtctgggc catcggccgg gaccggcgca	3120
cgtgggaggc gccctcagag ttccggccag agcggttcct gccgggggcc gcggcggaga	3180
aggtcgaccc gatggggaac tacttcgagc tcaccccctt cggcgccggc cggaggatct	3240
gcgcggggaa gctggccggc atggtgttcg tgcagtactt cctgggcacg ctgctgcacg	3300
cgttcaactg gcgcctcgcc gacggcgagg agctggacat gcgcgagacg ttccggctca	3360
cgtgcctaa ggccgtaccg ctccgcgcca ttgtcacgcc gcggctcctg ccggaagcct	3420
atgcttgagt tagttgtcac ttgtcagtct cagtccgcgc tgtggaagga tgatcgggaag	3480
gtttgtgctt gccaacctgc atacatatc tgtttatatg tttttttata gaaactacat	3540
ggtattcatc atatacaca acgcacatct ctctatgctt aattgcaagg catttgatat	3600
ggaaaatcca ccttggtatc aatagtttga caactactga tcttactgaa caaatgatta	3660
ttccgggtcca ttaaaatgaa cttttacagg cagttttgta agaccgttca tgtgcttcaa	3720
cttcaagcag taaggcctca tttggttgca tc	3752

<210> 8

<211> 1584

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADNc de la SEQ ID NO: 7

<400> 8

atgcagctcg ccggttgtg catcgacccc ctggtgctct cctgcgcctt cctctgcctc	60
ctcctccacg tcgcgtccg ctccctgctg cacccttctt ctgcctcgtc ctccggccgc	120
cgcggcggcc accaccagct ccgcgcgggg ccacggggac taccgatcct cggcgcgctg	180
ccactcgctc gccagcccc gcacgcgggc ctggccgcgc tggcgcgcaa gtacggtccc	240
atcatgtacc tgaagatggg cacgacgggc gtcgtggtgg cgtcgtcccc gggcgcggcg	300
aggacgttcc tcaaggcgtt ggacgcgaag tacgccaaac ggccggcggt ggcgagcgcc	360
gccgacatca cgtacgggtg ccagaacatg gtgttcgccca actacgggcc caagtggaag	420
ctgatgcgga agctcgccag cgtgcacctg ctccggggcg gcgcgctcgc ggactgggcg	480
cacgtgcggc gcgacgaggc cggccacctg ctccgcggcg tggcggaggc ggccgcggcc	540
cggcggcccc tcgtcgtgcc ggaggtgctg gtgtgcgccc tcgccaatat cgtcgggcag	600
atcacogtga gtaagcgggt gttcgacgca cagggggacg agtccaacag gtacaaggac	660
atgatcgtgt cactgctgac tggcgcggga ctgttcaaca tcagcgactt cgtgccggcg	720
ctggcgcgtc tggacctgca gggcgtgcag gccaaagtgc ggcgtgtgca ccaccagttc	780
gacggcctca tcaccaagct gctggccgag cacgcgcgca cggccgcgga ccgcgcgcgc	840

10

ES 2 922 902 T3

```

gacggccgcc aggacttcgt cgacaggctc cgcgccgccca ttgacgccgg cgtgacgac      900
gagagcggcg agaccatcac cgagggtcaac atcaagggcc tcatcttcga catgttcacg      960
gcgggcacgg acacatcgtc gatcatcgtg gagtgggcga tgtctgaaat gctcaagaac     1020
ccgcccgctca tggcacgagc gcaggaggag ctggaccgca cggtcggccg cggccgccgc     1080
ctggaagagt cggacctgcc cagcctcccc tacctgcagg ccgtctgcaa ggaggccatg     1140
cggctgcacc cgtcgacgcc gctcagcctc ccgcacttct ccttcgacgc ctgcgacgac     1200
gtcggcggcg gctaccgctg cccggccaac acccggtctg tcatcaacgt ctgggccatc     1260
ggccgggacc cggcgacgtg ggaggcgccc ctcgagtctc gccagagcg gttcctgccg     1320
ggggccgcgg cggagaaggt cgaccgatg ggaactact tcgagctcat ccccttcggc     1380
gccggccgga ggatctgcgc cgggaagctg gccggcatgg tgttcgtgca gtacttctg     1440
ggcacgctgc tgcacgcgtt caactggcgc ctccgcgacg gcgaggagct ggacatgcgc     1500
gagacgttcg ggctcacgct gcctaaggcc gtaccgctcc gcgccattgt cagccgcgg     1560
ctcctgccgg aagcctatgc ttga                                           1584

```

<210> 9

<211> 527

<212> PRT

5 <213> Sorgho bicolor

<400> 9

```

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Ile Asp Pro Leu Val Leu Ser Cys Ala
 1              5              10              15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
      20              25              30

Ser Ser Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gly His His Gln Leu Pro
      35              40              45

Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly
      50              55              60

Pro Ala Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro
      65              70              75              80

Ile Met Tyr Leu Lys Met Gly Thr Thr Gly Val Val Val Ala Ser Ser
      85              90              95

Pro Gly Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Lys Tyr Ala
      100             105             110

```

ES 2 922 902 T3

Asn	Arg	Pro	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Gly	Cys	Gln	115	120	125
Asn	Met	Val	Phe	Ala	Asn	Tyr	Gly	Pro	Lys	Trp	Lys	Leu	Met	Arg	Lys	130	135	140
Leu	Ala	Ser	Val	His	Leu	Leu	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Trp	Ala	145	150	155
His	Val	Arg	Arg	Asp	Glu	Ala	Gly	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Glu	165	170	175
Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Pro	Val	Val	Val	Pro	Glu	Val	Leu	Val	Cys	180	185	190
Ala	Leu	Ala	Asn	Ile	Val	Gly	Gln	Ile	Thr	Val	Ser	Lys	Arg	Val	Phe	195	200	205
Asp	Ala	Gln	Gly	Asp	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	Lys	Asp	Met	Ile	Val	Ser	210	215	220
Leu	Leu	Thr	Gly	Ala	Gly	Leu	Phe	Asn	Ile	Ser	Asp	Phe	Val	Pro	Ala	225	230	235
Leu	Ala	Arg	Leu	Asp	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Ala	Lys	Leu	Arg	Arg	Val	245	250	255
His	His	Gln	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Ala	Glu	His	Ala	260	265	270
Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Gln	Asp	Phe	Val	Asp	275	280	285
Arg	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Asp	Ala	Gly	Ala	Asp	Asp	Glu	Ser	Gly	Glu	290	295	300
Thr	Ile	Thr	Glu	Val	Asn	Ile	Lys	Gly	Leu	Ile	Phe	Asp	Met	Phe	Thr	305	310	315
Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Ile	Ile	Val	Glu	Trp	Ala	Met	Ser	Glu	325	330	335
Met	Leu	Lys	Asn	Pro	Pro	Val	Met	Ala	Arg	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp	340	345	350
Arg	Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Ser	Asp	Leu	Pro	Ser	355	360	365

ES 2 922 902 T3

Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro
 370 375 380
 Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Phe Asp Ala Cys Asp Asp
 385 390 395 400
 Val Gly Gly Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Ile Asn
 405 410 415
 Val Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Ala Thr Trp Glu Ala Pro Leu Glu
 420 425 430
 Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Ala Ala Ala Glu Lys Val Asp
 435 440 445
 Pro Met Gly Asn Tyr Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg
 450 455 460
 Ile Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu
 465 470 475 480
 Gly Thr Leu Leu His Ala Phe Asn Trp Arg Leu Ala Asp Gly Glu Glu
 485 490 495
 Leu Asp Met Arg Glu Thr Phe Gly Leu Thr Leu Pro Lys Ala Val Pro
 500 505 510
 Leu Arg Ala Ile Val Thr Pro Arg Leu Leu Pro Glu Ala Tyr Ala
 515 520 525

<210> 10
 <211> 187
 <212> ADN
 <213> Zea mays

5

<400> 10

cttctgccca gaagcgggcc cagacatttg agattgggta ttcaaaaatt caaaagatta 60
 aagaatttag tgttctaacg ctattttatg caatacatta ttgacaaatt agtgtttctaa 120
 cactatagat caccaaaaac atgggtattc aatgaatacc catgaaaccc ccctgggccc 180
 gcccatg 187

<210> 11
 <211> 4402
 <212> ADN
 <213> Zea mays

10

<400> 11

atgcagctcg cggcgttgtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgcctt cctctgcctc 60

ES 2 922 902 T3

ctcctccacg tggctctccg ctgctgctg caccctcctt ctgccagaa gcgggccag	120
acatttgaga ttgggtattc aaaaattcaa aagattaaag aatttagtgt tctaacgcta	180
ttttatgcaa tacattattg acaaattagt gttctaacac tatagatcac caaaaacatg	240
ggtattcaat gaatacccat gaaaccccc tgggcccgcc catgcttctg ccgcctcttc	300
ctccgggcgc cgcgggcagc tcccggcggg gccaccgggc ctgccgatcc tcggcgcgct	360
gccactcgtg ggcccagccc cgcacgccgg cctggccgcg ctggcgcgca agtacgggcc	420
catcatgtac ctgaagatgg gcacggccgg cgtggtggtg gcgtcgtccc cgcgcgcg	480
gcggacgttc ctcaaggcgc tggacgcgcg gtacgccaac cggccggccg tggcgagcgc	540
cgcggacatc acgtacgggc ggcagaacat ggtgttcgcg gactacgggc ccaagtggaa	600
gctgatgcgg aagctcgcca gcgtgcacct gctcggcgcg cgcgcgctcg cggactgggc	660
gtgcgtgcgg cgcggcgagg ccggccacgt gctgcgcggc gtggcgaggg cggccgcggc	720
cggcaggccc gtcgtcgtgc cggagctgct cgtgtgcgcc ctgcccaaca tcgtcgggca	780
gatcacagtg agcaagcggg tgttcgacgc gcagggggac gactcgaaca ggtgaggatg	840
ggaggtccat gaaatcctac cagctgtgag catgcataaa agttcatttg gaaagaaaag	900
aacatatattt tcttaciaat ttatgcttac tgtttcttta agtttcgata aagtttgtaa	960
aaaaaattta ggctagtttg aaactccatt taggatttct attttccaaa gaaaaataaa	1020
cgaatttctc ttgaaaaaat gaaaattctt tagaaaaata ggttctcaaa ctagccctca	1080
ataaaactta atgcgatcgt tttctctgac tctcattcat ctttctctgg ttatctaatt	1140
gggtccttga gagatgagtt tacctgcttg tcctttatta ttgcaaagac aacatatctg	1200
atgcacatgg aacattggtg cacatggtgc acatatgaaa tcatcaccac tcattttaaa	1260
tctaacgtct atagttgttt gatataattt attaaggaca ccctccaacg tgggtggtgtg	1320
tagtggtgga aggtgttatt tgtaaatga ataatcaact agagacgtta gatctaaaat	1380
gagtggatgat gatttaatat gtgcaccatg tgcaccagtc ttctatgtgc accagatatg	1440
tcctctattg caaatgctag acggaacacc agctagcact agcagactgt ttatgtggaa	1500
agaaaaaact taaaaagatc agctaggaag ctgctgtcat ctgtacgtat atatggtgaa	1560
gactgaacaa tctgcatgac aagcaaaact tagcttaaaa gcgaaaagag cgatggaaac	1620
ggccgctcga taaataatta atgagagtct tgggattttt catgcatgga aaaaaacaaa	1680
gctggcattt ttcatctaata ataatatata acgctgatat catattgcgt gcagatacaa	1740
ggacatgatc gtgtcgtcgc tgaccggcac gggcatgttc aacatcagcg acttcgtgcc	1800
ggcgctggcg cgtctggacc tgcagggcgt gcaggcgaag ctgcggcgcg tccaccgcca	1860
gttcgacggc ctcatcacca agctgctggc cgagcacgcc gcgacggccg cggaccgcgc	1920

ES 2 922 902 T3

gcgccagggc	cgcccggact	tcgtcgaccg	gtccgcgcgc	acgatggacg	ccggcgcgcg	1980
cgccgacgac	gagagcggcg	agaccatcac	cgaggtcaac	atcaagggcc	tcctcttcgt	2040
aagctccctg	ctttttcctc	gcccccaacc	atgcctcctc	atatgcactt	atattttaca	2100
cttgctcggg	tttccttttag	taactaacta	atccgtcgca	gtgctgatac	acgtagcact	2160
agtactacag	cgatgggtca	tcggttaactg	aatctaaggt	gcaatagagt	gcacggccgc	2220
gggatcatgg	cgtgacatgg	gagctaagct	aagccagtgg	ccacctaacg	aaggcactga	2280
ccgaaagctc	agtggcgtgt	taggtggaga	tagtggatcg	agttgttgga	aagacaatat	2340
caaaaccact	ctccaattga	tgatgtgtag	ggcctgcagt	gttttgaatc	caccttgttt	2400
ggtcgaaacac	attactagag	tgaaatatgg	ttccaatggt	aattgatagc	gcgaaagggg	2460
ctctagcgtg	atggtttaaac	cttccgagta	gcacatccag	gttgggttcg	atcctctcga	2520
gggcgaattt	tcaagctttg	ttaaaaaat	tatctcgttg	tgccccgtcc	gctctcagga	2580
atcgatattc	tacacgacac	cctccgacta	gtgacagttg	attgactcgt	tagtgatgag	2640
aagccatgct	aaaaaagtgg	agacgtagat	atgatagagg	ttccctttcc	taagcaaacg	2700
tgaatgctat	gaaaattatg	cagtttaaaa	aaaactttaa	agataaacag	gaattctctt	2760
ttttggaaca	aacaatacga	atgcacctcc	aaatatctta	tcgagtcgac	ttttatggaa	2820
ttattgtttt	tgttattttc	aagatgggag	cccaaaatca	catacaaatt	attcagtgaa	2880
tgccctcggg	tttttttatt	agttaagggc	tctcattttt	ttcaagggat	ttttattttt	2940
ttccaaaaga	aaataaacta	atcctcttta	gaaaaatgga	aatctattgg	agaaatgagg	3000
ttcctaaact	agctctaaca	gtgagtcagt	taatcaggag	aagatattag	actcctgtat	3060
agtgtgcagc	aaccacatcc	gattctgacg	tttttagctta	atgttcgcta	tgtagacgtc	3120
gggcataagg	aatgcattgc	taccagaaca	cgaatgacag	ctatgcaagt	ctctagaacg	3180
ttggagtagt	taacaaacgt	gatagatgta	acctctggat	catggtatga	tgtcatttcc	3240
tagactagaa	gaattggtag	tcaaatacga	caaagtcccg	aaagcacact	gggctttcga	3300
cacagtgata	ccaaagatgc	tgaaaagaac	tgaggcacga	taaactgttc	gggtgttggtg	3360
taaacgacca	aagatgctga	aaataactga	tcgtcaccat	ccgtgaatct	aactttcgac	3420
acactgttac	caaatacctc	gtcaaaatta	caggaataat	taaggcgctt	agacgatgat	3480
aaaccatttt	ttgtcactaa	ttaaccacac	tgttctttgc	ttgaccgtga	caaaaaaaaaa	3540
cttttttgtg	aagcagtgtt	gcgtaaaacc	acaaccatca	tgaactcact	tgccctgtca	3600
tatgtacttg	taccatcgaa	cgcgcgcgcg	taagacaatg	caccaccctt	caagtottag	3660
ctcactgata	ccgctaatta	agttagataa	tgtcgattac	tagttgtctt	acttcgaact	3720
atttcttttc	ggcaaaactga	agtaaagaca	acgttttgtt	ccgcaggaca	tgttcacggc	3780
gggtacggac	acgtcgtcga	tcctcgtgga	gtgggcgatg	gcggagatgc	tcaagaaccc	3840

ES 2 922 902 T3

		gaccgtcatg gcgcgcgcgc aggaggagct ggaccgcgcg gtgggcccgg gccgggcct	3900
		ggaggagtgc gacctgcccg gcctccccta cctgcaggcg gtgtgcaagg aggccatgcg	3960
		gctgcacccg tccacgcgc tcagcctccc gcacttctcc ttggacgcct gcgacgacgt	4020
		cgacggctac cgcgtcccgg ccaacacccg cctgctcgtc aacgtctggg ccatcgcccg	4080
		ggacccggag gcctgggaga ggcccctcga cttccgcccc gagcgcttcc tgcccggggg	4140
		cggcgcggag aaggtcgacc ccctggggaa ctgcttcgag ctcaccccg tgcgcgcgg	4200
		ccggaggatc tgcgcgggga agctggcggg catggtgttc gtgcagtact tcctgggcac	4260
		gctgctgcac gcgttcgact ggcgctgcc tgacggcgag gagaagctgg acatgagcga	4320
		gacgttcggc ctgcgcgtgc ccaaggcagt gccgctccgc gccgtcgcca cgccacggct	4380
		cgtgccggaa gcctatgcct ga	4402
	<210> 12		
	<211> 387		
	<212> ADN		
5	<213> Zea mays		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (101)..(287)		
10	<223> inserción de 187 nucleótidos tal como están presentes en la línea de QTL		
	<400> 12		
		accatgcagc tcggggcggt gtgcaccgac ccggtggtgc tgtgcagcgc cttcctctgc	60
		ctcctcctcc acgtggctct ccgctcgctg ctgcaccctc cttctgcca gaagcgggccc	120
		cagacatttg agattgggta ttcaaaaatt caaaagatta aagaatttag tgttctaacg	180
		ctatttttatg caatacatta ttgacaaatt agtgttctaa cactatagat caccaaaaac	240
		atgggtattc aatgaatacc catgaaaccc ccctgggccc gcccatgctt ctgccgcctc	300
		ttcctccggg cgccgcgggc agctcccgcc ggggccaccg ggccctgccga tcctcggcgc	360
		gctgccactc gtgggccag ccccgca	387
	<210> 13		
15	<211> 201		
	<212> ADN		
	<213> Zea mays		
	<220>		
20	<221> característica miscelánea		
	<222> (101)..(101)		
	<223> polimorfismo de un solo nucleótido		
	<400> 13		
25		tgatgaaagc cgtgcaggag taaatagraa amtggagttg tggcgtgara ctctagaatc	60
		caaacgtttt agactcttta gaactaaaac cgaatatata wgttgtgact ttggcactac	120
		tacatatgac gaaggagata ttagtttgga aggtcaagta gtgccctgra aggatacctt	180
		ttggtattta gtatcaatgc t	201
	<210> 14		
	<211> 121		
	<212> ADN		
30	<213> Zea mays		

	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (58)..(58)		
	<223> n e s a, c, g o t		
5	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> polimorfismo de un solo nucleótido		
10	<400> 14		
	caaggaacct aggatggggg cggattcatt aacaaggagg ggggccctaa tcccctgncg	60	
	rtctgcacgg gcaataatct agtcagacc cagggtcagt agaggcggag gacgcgtcac	120	
	g	121	
	<210> 15		
	<211> 121		
15	<212> ADN		
	<213> Zea mays		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
20	<222> (61)..(61)		
	<223> polimorfismo de un solo nucleótido		
	<400> 15		
	cagcacatat tgtgttgaaa tgaatgagca cactgcatcc atatcaccac tggtagacaa	60	
	rggcatagtt taagtcatgt tatgatgtag cgcaccgagc aaggtathtt gacacacata	120	
	a	121	
25	<210> 16		
	<211> 101		
	<212> ADN		
	<213> Zea mays		
30	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (51)..(51)		
	<223> polimorfismo de un solo nucleótido		
	<400> 16		
35	aatgtgggaa gagctggagc agcaaatcta gacgtcattc aagaagtcga rtatgtaaag	60	
	gaagatgcta gaattatata cctccttgaa tgcctccaaa a	101	
	<210> 17		
	<211> 101		
	<212> ADN		
40	<213> Zea mays		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (51)..(51)		
45	<223> polimorfismo de un solo nucleótido		
	<400> 17		
	ctctttctgc agctcgtgat cgagttgtgt gtgtccatt cccaaattat rtatgatcga	60	
	ttagtagcgt taggggttaa ccagtagccg ctgtgtactt g	101	

<210> 18
 <211> 201
 <212> ADN
 <213> Zea mays

5

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (101)..(101)
 <223> polimorfismo de un solo nucleótido

10

<400> 18

```

      --- --
      ttatggggga ggcagattgt cgtggggcgc gggggagggc gagcttgggg gcgccgcaga      60
      gcgagggaca ttgccgagat tgccatggag tgagggcacg rcgagattgc cgcgagggag      120
      agggcgcttg ccgaggcaga ttgccgcggg ggagggggcg ttgccgaggc ggagacgtgg      180
      tgaagccgtg gtggacgccc a                                          201
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada que comprende

a) detección de la presencia de un alelo de QTL, tal como un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H (tal como una mutación por inactivación o eliminación), o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, o

b) detección de la expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H o una proteína F35H no funcional (por ejemplo, proteína F35H truncada) o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida, o

c) detección de la presencia de una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción;

en el que la digestibilidad mejorada se refiere a una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b) o c) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica; y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;

(iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

(iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;

(v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3;

(vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende la detección de la presencia del alelo marcador molecular de ma61134xxx y/o uno o más alelos marcadores moleculares ubicados en un intervalo cromosómico en el cromosoma 9 flanqueado por los alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por los alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01;

en el que ma61134xxx es una inserción de uno o más nucleótidos entre la posición 134254381 y 134254382 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, preferiblemente una inserción como se establece en la SEQ ID NO: 12;

y

ma61070s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 121588825 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o T, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 13; y

ma30168s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 139452428 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 14; y

ma50827s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 127454426 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 15; y

ma16983s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 137363784 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 16; y

ma17117s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 132038900 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 17; y

ma61125s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 135947973 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 18.

3. Una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada que comprende

a) un alelo de QTL asociado con una digestibilidad mejorada, comprendiendo dicho alelo de QTL una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce

- a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción; o
- b) una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o
- 5 una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción; o
- c) una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H o que tiene actividad enzimática reducida; o
- 10 d) una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a, o que hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F35H, o que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a, o que hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F35H; o
- e) un sistema CRISPR/Cas específico de ARN dirigido contra o que se dirige a una secuencia de nucleótidos que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 o una o más secuencias de polinucleótidos que
- 15 codifican dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN;
- en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y
- en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:
- 20 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2;
- 25 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3; y
- (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas;
- en el que la planta de maíz o parte de la planta de maíz no se obtiene exclusivamente mediante un proceso esencialmente biológico.
- 30 4. La planta de maíz o parte de la planta de maíz de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha planta de maíz comprende el alelo marcador de ma61134xxx;
- en la que ma61134xxx es una inserción de uno o más nucleótidos entre la posición 134254381 y 134254382 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, preferiblemente una inserción como se establece en la SEQ ID NO: 12.
- 35 5. La planta de maíz o parte de la planta de maíz de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en la que dicha planta de maíz comprende dicho alelo de QTL, dichos alelos marcadores, teniendo dicha secuencia de nucleótidos del gen que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 que tiene la mutación, dicha molécula de ARNi o dicha secuencia polinucleotídica que codifica la molécula de ARNi, dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN y/o dicha una o más secuencias polinucleotídicas que codifican el sistema CRISPR/Cas específico de ARN como transgén
- 40 o como (gen) endógeno editado.
6. Un método para mejorar la digestibilidad de una planta de maíz o parte de una planta de maíz, que comprende la introducción a través de una integración estable o transitoria por medio de transformación, inserción usando tecnología de edición de genes o modificación usando mutagénesis aleatoria o dirigida en el genoma de la planta o parte de la planta
- 45 (a) una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o de la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción, o
- comprendiendo dicho método
- 50 (b) reducir la expresión del ARNm de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 y/o la proteína F35H, o reducir la actividad enzimática de un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450;
- en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a) o b) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y
- 55 en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;

(iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;

(v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y

5 (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6 (b), que comprende

(a) introducir en una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, o

(b) introducir en la planta o parte de la planta una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a, o que hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una secuencia de polinucleótidos que codifica una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a, o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o

(c) introducir en la planta o parte de la planta un sistema CRISPR/Cas específico de ARN dirigido contra o que se dirige a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una o más secuencias de polinucleótidos que codifican dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN, o

(d) introducir en la planta o parte de la planta un compuesto químico o un anticuerpo que reduzca o inhiba la actividad enzimática de la proteína F35H tras la interacción con dicha F35H.

8. Un método para producir una planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene una digestibilidad mejorada, que comprende

(a) introducir mediante integración estable o transitoria mediante transformación, inserción usando tecnología de edición de genes o modificación mediante mutagénesis aleatoria o dirigida en el genoma de una planta o parte de una planta una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450, que tiene una mutación que conduce a una expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene actividad enzimática reducida tras la traducción, o

(b) introducir mediante modificación utilizando mutagénesis aleatoria o dirigida en una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F35H) del citocromo P450 una mutación que conduce a la expresión reducida o ausente del ARNm del gen y/o la proteína F35H, o una mutación que conduce a una proteína F35H no funcional o una proteína F35H que tiene una actividad enzimática reducida tras la traducción, o

(c) introducir a través de integración estable o transitoria por medio de transformación o inserción utilizando tecnología de edición de genes en la planta o la parte de la planta una molécula de ARNi, dirigida contra, que se dirige a, o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una secuencia de polinucleótidos que codifica una molécula de ARNi dirigida contra, que se dirige a, o que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o

(d) introducir mediante integración estable o transitoria por medio de transformación o inserción utilizando tecnología de edición de genes en la planta o la parte de la planta un sistema CRISPR/Cas específico de ARN, dirigido contra, o que se dirige a, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F35H, o una o más secuencias de polinucleótidos que codifican dicho sistema CRISPR/Cas específico de ARN, o

(e) introducir en la planta o parte de la planta un compuesto químico o un anticuerpo que reduzca la actividad enzimática de la proteína F35H o inhibir la proteína F35H; y

(f) opcionalmente, regenerar una planta a partir de la parte de la planta de cualquiera de (a) a (e);

en el que la digestibilidad mejorada se relaciona con una mayor digestibilidad de la planta de maíz o parte de una planta de maíz que tiene la característica de a), b), c), d) o e) en comparación con una planta de maíz o parte de una planta de maíz que no tiene tal característica, y

en el que el F35H no mutado se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 4 o 7;

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene el ADNc de la SEQ ID NO: 2, 5 u 8;

(iii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9;

(iv) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 u 8;

(v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, 6 o 9; y

(vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos como se define en (i), (ii) o (iii) en condiciones de hibridación rigurosas.

9. Una planta de maíz o parte de una planta de maíz producida o producible por el método de acuerdo con la reivindicación 8.

10. El método, planta o parte de la planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha planta es una planta de maíz, en el que el QTL está ubicado en el cromosoma 9 y comprende y/o está flanqueado por alelos marcadores de ma61070s01 y ma30168s02, preferiblemente por alelos marcadores de ma50827s01 y ma16983s02, más preferiblemente por los alelos marcadores de ma17117s01 y ma61125s01;
- 5 en el que ma61070s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 121588825 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o T, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en SEQ ID NO: 13; y
ma30168s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 139452428 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido
- 10 (SNP) como se establece en SEQ ID NO: 14; y
ma50827s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 127454426 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 15; y
ma16983s02 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 137363784 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido
- 15 (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 16; y
ma17117s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 132038900 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 17; y
- 20 ma61125s01 es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 135947973 del cromosoma 9 con referencia a la línea PH207, en el que dicho nucleótido es A o G, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) como se establece en la SEQ ID NO: 18.
11. El método, planta o parte de la planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mutación es una mutación de cambio de marco o una mutación sin sentido, da como resultado una expresión reducida o ausente de la secuencia de nucleótidos o una actividad enzimática reducida de la proteína codificada, da como resultado una secuencia de proteína alterada codificada por la secuencia de nucleótidos, o es una inserción, eliminación o sustitución de al menos un nucleótido en una región codificante, en una señal de empalme o en un elemento regulador.
- 25 12. Uso del ácido polinucleico que hibrida específicamente con cualquiera de las secuencias de la SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, o el complemento o el complemento inverso del mismo, o un ácido polinucleico específico del alelo, para la identificación de una planta o parte de una planta con digestibilidad mejorada o para la selección de una planta o parte de la planta que tiene una digestibilidad mejorada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, preferiblemente en el método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 30 13. Un método para producir un material vegetal ensilado o alimento para animales que tiene una digestibilidad mejorada, que comprende
- 35 (a) cultivar la planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 y 9, o una planta identificada o identificable mediante el método de las reivindicaciones 1 o 2, o una progenie de la misma que tenga la digestibilidad mejorada como se define en la reivindicación 1,
(b) cosechar la planta o una parte de ella, y
- 40 (c) ensilar la planta o una parte de la misma de (b).
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la parte en la etapa (b) y (c) es rastrojo.
15. Un material vegetal ensilado o alimento para animales producido por el método de la reivindicación 13 o 14.

Figura 1

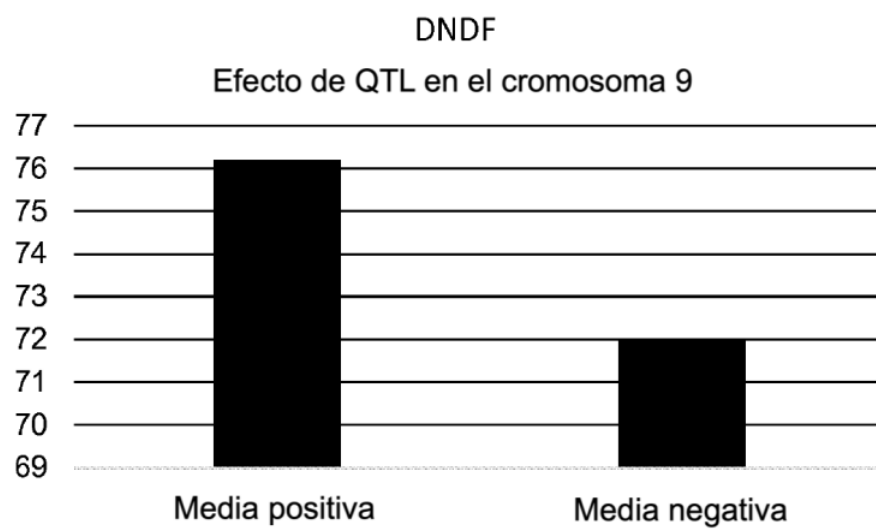


Figura 2

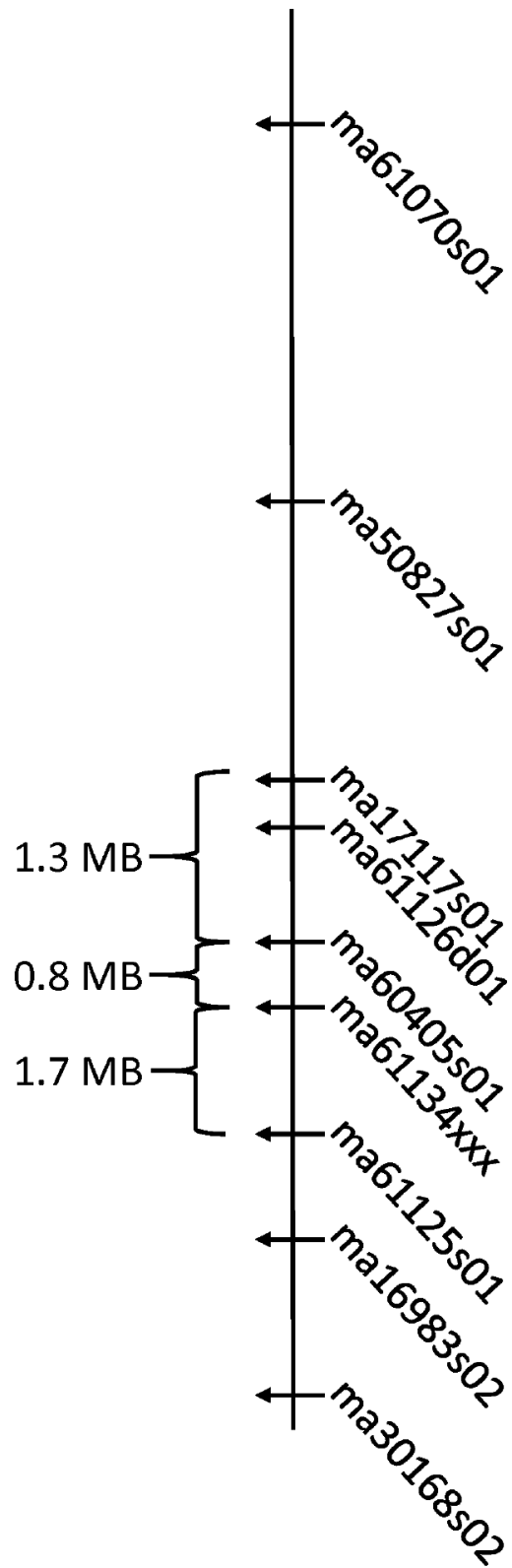


Figura 3

ArbNr	Familia	Individuo		ma61126s01	ma60405s01	PZE-109079170	ma61222s01	ma61218s01	ma61134xxx	ma61225s01	ma61226s01	ma61211s01	ma61125s01
			Media de DNDF por grupo										
WVP17-51917/002	1	1	62,59	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51917/006	1	2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/005	1	3		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/008	1	4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/011	1	5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/012	1	6		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/016	1	7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51919/005	1	8		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51916/009	1	9	67,05	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51917/003	1	10		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51918/001	1	11		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51918/009	1	12		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51918/010	1	13		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51919/011	1	14		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51920/007	1	15		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51920/017	1	16		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51940/003	2	1	57,12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941/009	2	2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941/010	2	3		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941/015	2	4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51943/014	2	5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51945/013	2	6		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51946/003	2	7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51947/008	2	8		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948/001	2	9		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948/005	2	10		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948/007	2	11		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949/002	2	12		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949/011	2	13		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949/016	2	14		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51940/001	2	15	60,67	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51941/008	2	16		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51941/013	2	17		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51941/014	2	18		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51942/006	2	19		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51942/009	2	20		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944/002	2	21		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944/003	2	22		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944/009	2	23		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51945/005	2	24		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51945/006	2	25		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51946/001	2	26		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51946/012	2	27		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51948/011	2	28		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949/003	2	29		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949/012	2	30		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949/017	2	31		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A

Fig. 4:

SEQ ID NO: 1	1	ATGCAGCTCGCGGCGTTGTGCACCGACCCCGTGGTGCTGTGCAGCGCCTT	50
SEQ ID NO: 11	1	ATGCAGCTCGCGGCGTTGTGCACCGACCCCGTGGTGCTGTGCAGCGCCTT	50
SEQ ID NO: 1	51	CCTCTGCCTCCTCCTCCACGTGGCTCTCCGCTCGCTGCTGCACCCTC---	97
SEQ ID NO: 11	51	CCTCTGCCTCCTCCTCCACGTGGCTCTCCGCTCGCTGCTGCACCCTCCTT	100
SEQ ID NO: 1	98	-----	97
SEQ ID NO: 11	101	CTGCCCAGAAGCGGGCCAGACATTGAGATTGGGTATTCAAAATTCAA	150
SEQ ID NO: 1	98	-----	97
SEQ ID NO: 11	151	AAGATTAAAGAATTTAGTGTCTAACGCTATTTTATGCAATACATTATTG	200
SEQ ID NO: 1	98	-----	97
SEQ ID NO: 11	201	ACAAATTAGTGTCTTAACACTATAGATCACCAAAAACATGGGTATTCAAT	250
SEQ ID NO: 1	98	-----CTTCTGCCGCTCTTC	113
SEQ ID NO: 11	251	GAATACCCATGAAACCCCTGGGCCCCCATGCTTCTGCCGCTCTTC	300
SEQ ID NO: 1	114	CTCCGGGCGCGCGGGCAGCTCCCGCGGGGCCACCGGGCCTGCCGATCC	163
SEQ ID NO: 11	301	CTCCGGGCGCGCGGGCAGCTCCCGCGGGGCCACCGGGCCTGCCGATCC	350
SEQ ID NO: 1	164	TCGGCGCGCTGCCACTCGTGGGCCAGCCCGCACCGCGCCTGGCCGCG	213
SEQ ID NO: 11	351	TCGGCGCGCTGCCACTCGTGGGCCAGCCCGCACCGCGCCTGGCCGCG	400
SEQ ID NO: 1	214	CTGGCGCGCAAGTACGTCCTCATCATGTACCTGAAGATGGGCACGGCCGG	263
SEQ ID NO: 11	401	CTGGCGCGCAAGTACGTCCTCATCATGTACCTGAAGATGGGCACGGCCGG	450
SEQ ID NO: 1	264	CGTGGTGGTGGCGTCGTCCCGCGCGCGCGGACGTTCTCAAGGCGC	313
SEQ ID NO: 11	451	CGTGGTGGTGGCGTCGTCCCGCGCGCGCGGACGTTCTCAAGGCGC	500
SEQ ID NO: 1	314	TGGACGCGCGGTACGCCAACCGGCCGGCCGTGGCGAGCGCGCGGACATC	363
SEQ ID NO: 11	501	TGGACGCGCGGTACGCCAACCGGCCGGCCGTGGCGAGCGCGCGGACATC	550
SEQ ID NO: 1	364	ACGTACGGGCGGCAGAACATGGTGTTCGCGGACTACGGGCCCAAGTGGA	413
SEQ ID NO: 11	551	ACGTACGGGCGGCAGAACATGGTGTTCGCGGACTACGGGCCCAAGTGGA	600
SEQ ID NO: 1	414	GCTGATGCGGAAGCTCGCCAGCGTGACCTGCTCGGCGCGCGCGCTCG	463
SEQ ID NO: 11	601	GCTGATGCGGAAGCTCGCCAGCGTGACCTGCTCGGCGCGCGCGCTCG	650
SEQ ID NO: 1	464	CGGACTGGGCGTGCGTGCGGCGCGGAGGCCGCCACGTGCTGCGCGGC	513
SEQ ID NO: 11	651	CGGACTGGGCGTGCGTGCGGCGCGGAGGCCGCCACGTGCTGCGCGGC	700
SEQ ID NO: 1	514	GTGGCGGAGGCGCGCGGCCGAGGCCCGCTCGTCTGCGCGAGCTGCT	563
SEQ ID NO: 11	701	GTGGCGGAGGCGCGCGGCCGAGGCCCGCTCGTCTGCGCGAGCTGCT	750
SEQ ID NO: 1	564	CGTGTGCGCCCTCGCCAACATCGTCGGGCAGATCACAGTGAGCAAGCGGG	613
SEQ ID NO: 11	751	CGTGTGCGCCCTCGCCAACATCGTCGGGCAGATCACAGTGAGCAAGCGGG	800
SEQ ID NO: 1	614	TGTTGACGCGCAGGGGACGACTCGAACAGGTGAGGATGGGAGGTCCAT	663
SEQ ID NO: 11	801	TGTTGACGCGCAGGGGACGACTCGAACAGGTGAGGATGGGAGGTCCAT	850

Fig. 4 (continuación):

SEQ ID NO: 1	664	GAAATCCTACCAGCTGTGAGCATGCATAAAAGTTCATTTGGAAAGAAAAG	713
SEQ ID NO: 11	851	GAAATCCTACCAGCTGTGAGCATGCATAAAAGTTCATTTGGAAAGAAAAG	900
SEQ ID NO: 1	714	AACATATTTTCTTACAAATTTATGCTTACTGTTTCTTTAAGTTTCGATA	763
SEQ ID NO: 11	901	AACATATTTTCTTACAAATTTATGCTTACTGTTTCTTTAAGTTTCGATA	950
SEQ ID NO: 1	764	AAGTTTGTAAGAAAAAATTTAGGCTAGTTTGAAACTCCATTTAGGATTTCT	813
SEQ ID NO: 11	951	AAGTTTGTAAGAAAAAATTTAGGCTAGTTTGAAACTCCATTTAGGATTTCT	1000
SEQ ID NO: 1	814	ATTTTCCAAAGAAAAATAAACGAATTTCTCTTGAAAAATGAAAAATCTT	863
SEQ ID NO: 11	1001	ATTTTCCAAAGAAAAATAAACGAATTTCTCTTGAAAAATGAAAAATCTT	1050
SEQ ID NO: 1	864	TAGAAAAATAGGTTCTCAAAGTAGCCCTCAATAAACTTAATGCGATCGT	913
SEQ ID NO: 11	1051	TAGAAAAATAGGTTCTCAAAGTAGCCCTCAATAAACTTAATGCGATCGT	1100
SEQ ID NO: 1	914	TTTCTCTGACTCTCATTCATCTTTCTCTGGTTATCTAATTGGGTCCTTGA	963
SEQ ID NO: 11	1101	TTTCTCTGACTCTCATTCATCTTTCTCTGGTTATCTAATTGGGTCCTTGA	1150
SEQ ID NO: 1	964	GAGATGAGTTTACCTGCTTGTCCTTTATTATTGCAAAGACAACATATCTG	1013
SEQ ID NO: 11	1151	GAGATGAGTTTACCTGCTTGTCCTTTATTATTGCAAAGACAACATATCTG	1200
SEQ ID NO: 1	1014	ATGCACATGGAACATTGGTGCACATGGTGCACATATGAAATCATCACCAC	1063
SEQ ID NO: 11	1201	ATGCACATGGAACATTGGTGCACATGGTGCACATATGAAATCATCACCAC	1250
SEQ ID NO: 1	1064	TCATTTTAAATCTAACGCTCTATAGTTGTTTGATATATTTTATTAAGGACA	1113
SEQ ID NO: 11	1251	TCATTTTAAATCTAACGCTCTATAGTTGTTTGATATATTTTATTAAGGACA	1300
SEQ ID NO: 1	1114	CCCTCCAACGTGGTGGTGTGTAGTGGTGGGAAGGTGTTATTGTAAATTGA	1163
SEQ ID NO: 11	1301	CCCTCCAACGTGGTGGTGTGTAGTGGTGGGAAGGTGTTATTGTAAATTGA	1350
SEQ ID NO: 1	1164	ATAATCAACTAGAGACGTTAGATCTAAAATGAGTGGTGATGATTTAATAT	1213
SEQ ID NO: 11	1351	ATAATCAACTAGAGACGTTAGATCTAAAATGAGTGGTGATGATTTAATAT	1400
SEQ ID NO: 1	1214	GTGCACCATGTGCACCAGTCTTCTATGTGCACCAGATATGTCCTCTATTG	1263
SEQ ID NO: 11	1401	GTGCACCATGTGCACCAGTCTTCTATGTGCACCAGATATGTCCTCTATTG	1450
SEQ ID NO: 1	1264	CAAATGCTAGACGGAACACCAGCTAGCACTAGCAGACTGTTTATGTGGAA	1313
SEQ ID NO: 11	1451	CAAATGCTAGACGGAACACCAGCTAGCACTAGCAGACTGTTTATGTGGAA	1500
SEQ ID NO: 1	1314	AGAAAAAACTTAAAAAGATCAGCTAGGAAGCTGCTGTCATCTGTACGTAT	1363
SEQ ID NO: 11	1501	AGAAAAAACTTAAAAAGATCAGCTAGGAAGCTGCTGTCATCTGTACGTAT	1550
SEQ ID NO: 1	1364	ATATGGTGAAGACTGAACAATCTGCATGACAAGCAAACTTAGCTTAAAA	1413
SEQ ID NO: 11	1551	ATATGGTGAAGACTGAACAATCTGCATGACAAGCAAACTTAGCTTAAAA	1600
SEQ ID NO: 1	1414	GCGAAAAGAGCGATGGAAACGGCCGCTCGATAAAATAATTAATGAGAGTCT	1463
SEQ ID NO: 11	1601	GCGAAAAGAGCGATGGAAACGGCCGCTCGATAAAATAATTAATGAGAGTCT	1650
SEQ ID NO: 1	1464	TGGGATTTTTCATGCATGGAAAAAACAAGCTGGCATTTTTCATCTAAT	1513
SEQ ID NO: 11	1651	TGGGATTTTTCATGCATGGAAAAAACAAGCTGGCATTTTTCATCTAAT	1700

Fig. 4 (continuación):

SEQ ID NO: 1	1514	ATAATATATAACGCTGATATCATATTGCGTGCAGATACAAGGACATGATC	1563
SEQ ID NO: 11	1701	ATAATATATAACGCTGATATCATATTGCGTGCAGATACAAGGACATGATC	1750
SEQ ID NO: 1	1564	GTGTCGCTGCTGACCGGCACGGGCATGTTCAACATCAGCGACTTCGTGCC	1613
SEQ ID NO: 11	1751	GTGTCGCTGCTGACCGGCACGGGCATGTTCAACATCAGCGACTTCGTGCC	1800
SEQ ID NO: 1	1614	GGCGCTGGCGCGTCTGGACCTGCAGGGCGTGCAGGCGAAGCTGCGGCGCG	1663
SEQ ID NO: 11	1801	GGCGCTGGCGCGTCTGGACCTGCAGGGCGTGCAGGCGAAGCTGCGGCGCG	1850
SEQ ID NO: 1	1664	TCCACCGCCAGTTCGACGGCCTCATCACCAGCTGCTGGCCGAGCAGGCC	1713
SEQ ID NO: 11	1851	TCCACCGCCAGTTCGACGGCCTCATCACCAGCTGCTGGCCGAGCAGGCC	1900
SEQ ID NO: 1	1714	GCGACGGCCGCGGACCGCGCGGCCAGGGCCGCCCGGACTTCGTGACCG	1763
SEQ ID NO: 11	1901	GCGACGGCCGCGGACCGCGCGGCCAGGGCCGCCCGGACTTCGTGACCG	1950
SEQ ID NO: 1	1764	GCTCCGCGCCACGATGGACGCCGGCGCCGCCGCGGACGACGAGAGCGGCG	1813
SEQ ID NO: 11	1951	GCTCCGCGCCACGATGGACGCCGGCGCCGCCGCGGACGACGAGAGCGGCG	2000
SEQ ID NO: 1	1814	AGACCATCACCGAGGTCAACATCAAGGGCCTCATCTTCGTAAAGCTCCCTG	1863
SEQ ID NO: 11	2001	AGACCATCACCGAGGTCAACATCAAGGGCCTCATCTTCGTAAAGCTCCCTG	2050
SEQ ID NO: 1	1864	CTTTTTCCTCGCCCCCAACCATGCATCATCATATGCACTTATATTTTACA	1913
SEQ ID NO: 11	2051	CTTTTTCCTCGCCCCCAACCATGCATCATCATATGCACTTATATTTTACA	2100
SEQ ID NO: 1	1914	CTTGCTCGGTTTTCCTTTAGTAACTAACTAATCCGTGCGAGCTGCGATAC	1963
SEQ ID NO: 11	2101	CTTGCTCGGTTTTCCTTTAGTAACTAACTAATCCGTGCGAGCTGCGATAC	2150
SEQ ID NO: 1	1964	ACGTAGCACTAGTACTACAGCGATGGGTTCATCGGTAAGTGAATCTAAGGT	2013
SEQ ID NO: 11	2151	ACGTAGCACTAGTACTACAGCGATGGGTTCATCGGTAAGTGAATCTAAGGT	2200
SEQ ID NO: 1	2014	GCAATAGAGTGCACGGCCGCGGATCATGGCGTGACATGGGAGCTAAGCT	2063
SEQ ID NO: 11	2201	GCAATAGAGTGCACGGCCGCGGATCATGGCGTGACATGGGAGCTAAGCT	2250
SEQ ID NO: 1	2064	AAGCCAGTGGCCACCTAACGAAGGCACTGACCGAAAGCTCAGTGGCGTGT	2113
SEQ ID NO: 11	2251	AAGCCAGTGGCCACCTAACGAAGGCACTGACCGAAAGCTCAGTGGCGTGT	2300
SEQ ID NO: 1	2114	TAGGTGGAGATAGTGGATCGAGTTGTTGAAAAGACAATATCAAAACCACT	2163
SEQ ID NO: 11	2301	TAGGTGGAGATAGTGGATCGAGTTGTTGAAAAGACAATATCAAAACCACT	2350
SEQ ID NO: 1	2164	CTCCAATTGATGATGTGTAGGGCTGCAGTGTGTTGAATCCACCTTGTTT	2213
SEQ ID NO: 11	2351	CTCCAATTGATGATGTGTAGGGCTGCAGTGTGTTGAATCCACCTTGTTT	2400
SEQ ID NO: 1	2214	GGTCGAACACATTACTAGAGTGAAATATGGTTCCAATGTTAATTGATAGC	2263
SEQ ID NO: 11	2401	GGTCGAACACATTACTAGAGTGAAATATGGTTCCAATGTTAATTGATAGC	2450
SEQ ID NO: 1	2264	GCGAAAGGGTCTCTAGCGTAATGGTTAAACCTTCCGAGTAGCACATCCAG	2313
SEQ ID NO: 11	2451	GCGAAAGGGTCTCTAGCGTAATGGTTAAACCTTCCGAGTAGCACATCCAG	2500
SEQ ID NO: 1	2314	GTTGGGTTTCGATCCTCTCGAGGGCGAATTTTCAAGCTTTGTTAAAAAAAT	2363
SEQ ID NO: 11	2501	GTTGGGTTTCGATCCTCTCGAGGGCGAATTTTCAAGCTTTGTTAAAAAAAT	2550

Fig. 4 (continuación):

SEQ ID NO: 1	2364	TATCTCGTTGTGCCCCGTCCGCTCTCAGGAATCGATATTCTACACGACAC	2413
SEQ ID NO: 11	2551	TATCTCGTTGTGCCCCGTCCGCTCTCAGGAATCGATATTCTACACGACAC	2600
SEQ ID NO: 1	2414	CCTCCGACTAGTGACAGTTGATTGACTCGTTAGTGATGAGAAGCCATGCT	2463
SEQ ID NO: 11	2601	CCTCCGACTAGTGACAGTTGATTGACTCGTTAGTGATGAGAAGCCATGCT	2650
SEQ ID NO: 1	2464	AAAAAAGTGGAGACGTAGATATGATAGAGGTTCCCTTTCCTAAGCAAACG	2513
SEQ ID NO: 11	2651	AAAAAAGTGGAGACGTAGATATGATAGAGGTTCCCTTTCCTAAGCAAACG	2700
SEQ ID NO: 1	2514	TGAATGCTATGAAAATTATGCAGTTTAAAAAAACTTTAAAGATAAACAG	2563
SEQ ID NO: 11	2701	TGAATGCTATGAAAATTATGCAGTTTAAAAAAACTTTAAAGATAAACAG	2750
SEQ ID NO: 1	2564	GAATTCTCTTTTTTGGAAACAAACAATACGAATGCACCTCCAAATATCTTA	2613
SEQ ID NO: 11	2751	GAATTCTCTTTTTTGGAAACAAACAATACGAATGCACCTCCAAATATCTTA	2800
SEQ ID NO: 1	2614	TCGAGTCGACTTTTATGGAATTATGTTTTTGTATTCTAAGATGGGAG	2663
SEQ ID NO: 11	2801	TCGAGTCGACTTTTATGGAATTATGTTTTTGTATTCTAAGATGGGAG	2850
SEQ ID NO: 1	2664	CCCAAATCACATACAAATTATTCAGTGAATGCCTCGGTGTTTTTTTATT	2713
SEQ ID NO: 11	2851	CCCAAATCACATACAAATTATTCAGTGAATGCCTCGGTGTTTTTTTATT	2900
SEQ ID NO: 1	2714	AGTTAAGGGCTCTCATTTTTTTCAAGGGATTTTTATTTTTTCCAAAAGA	2763
SEQ ID NO: 11	2901	AGTTAAGGGCTCTCATTTTTTTCAAGGGATTTTTATTTTTTCCAAAAGA	2950
SEQ ID NO: 1	2764	AAATAAACTAATCCTCTTTAGAAAAATGGAAATCTATTGGAGAAATGAGG	2813
SEQ ID NO: 11	2951	AAATAAACTAATCCTCTTTAGAAAAATGGAAATCTATTGGAGAAATGAGG	3000
SEQ ID NO: 1	2814	TTCTAACTAGCTCTAACAGTGAGTCAGTTAATCAGGAGAAGATATTAG	2863
SEQ ID NO: 11	3001	TTCTAACTAGCTCTAACAGTGAGTCAGTTAATCAGGAGAAGATATTAG	3050
SEQ ID NO: 1	2864	ACTCCTGTATAGTGTGCAGCAACCACATCCGATTCTGACGTTTTAGCTTA	2913
SEQ ID NO: 11	3051	ACTCCTGTATAGTGTGCAGCAACCACATCCGATTCTGACGTTTTAGCTTA	3100
SEQ ID NO: 1	2914	ATGTTTCGCTATGTAGACGTCGGGCATAGGGAATGCATTGCTACCAGAACA	2963
SEQ ID NO: 11	3101	ATGTTTCGCTATGTAGACGTCGGGCATAGGGAATGCATTGCTACCAGAACA	3150
SEQ ID NO: 1	2964	CGAATGACAGCTATGCAAGTCTCTAGAACGTTGGAGTAGTTAACAAACGT	3013
SEQ ID NO: 11	3151	CGAATGACAGCTATGCAAGTCTCTAGAACGTTGGAGTAGTTAACAAACGT	3200
SEQ ID NO: 1	3014	GATAGATGTAACCTCTGGATCATGGTATGATGTCATTTCTAGACTAGAA	3063
SEQ ID NO: 11	3201	GATAGATGTAACCTCTGGATCATGGTATGATGTCATTTCTAGACTAGAA	3250
SEQ ID NO: 1	3064	GAATTGGTAGTCAAATCGAGCAAAGTCCGAAAGCACACTGGGCTTTCGA	3113
SEQ ID NO: 11	3251	GAATTGGTAGTCAAATCGAGCAAAGTCCGAAAGCACACTGGGCTTTCGA	3300
SEQ ID NO: 1	3114	CACAGTGATACCAAAGATGCTGAAAAGAACTGAGGCACGATAAACTGTTT	3163
SEQ ID NO: 11	3301	CACAGTGATACCAAAGATGCTGAAAAGAACTGAGGCACGATAAACTGTTT	3350
SEQ ID NO: 1	3164	GGTGTGGTGTAACGACCAAAGATGCTGAAAATAACTGATCGTCACCAT	3213
SEQ ID NO: 11	3351	GGTGTGGTGTAACGACCAAAGATGCTGAAAATAACTGATCGTCACCAT	3400

Fig. 4 (continuación):

SEQ ID NO: 1	3214	CCGTGAATCTAACTTTCGACACACTGTTACCAAATCCTTCGTCAAATTA	3263
SEQ ID NO: 11	3401	CCGTGAATCTAACTTTCGACACACTGTTACCAAATCCTTCGTCAAATTA	3450
SEQ ID NO: 1	3264	CAGGAATAATTAAGGCGCTTAGACGATGATAAACCATTTTGTCTACTAA	3313
SEQ ID NO: 11	3451	CAGGAATAATTAAGGCGCTTAGACGATGATAAACCATTTTGTCTACTAA	3500
SEQ ID NO: 1	3314	TTAACCACACTGTTCTTTGCTTGACCGTGACAAAAAACTTTTGTG	3363
SEQ ID NO: 11	3501	TTAACCACACTGTTCTTTGCTTGACCGTGACAAAAAACTTTTGTG	3550
SEQ ID NO: 1	3364	AAGCAGTGTTGCCGTAAACCACAACCATCATGAACTCACTTGCCCTGTCA	3413
SEQ ID NO: 11	3551	AAGCAGTGTTGCCGTAAACCACAACCATCATGAACTCACTTGCCCTGTCA	3600
SEQ ID NO: 1	3414	TATGTACTTGTACCATCGAACGCCGCGCTAAGACAATGCACCACCCTT	3463
SEQ ID NO: 11	3601	TATGTACTTGTACCATCGAACGCCGCGCTAAGACAATGCACCACCCTT	3650
SEQ ID NO: 1	3464	CAAGTCTTAGCTCACTGATACCGCTAATTAAGTTAGATAATGTCGATTAC	3513
SEQ ID NO: 11	3651	CAAGTCTTAGCTCACTGATACCGCTAATTAAGTTAGATAATGTCGATTAC	3700
SEQ ID NO: 1	3514	TAGTTGTCTTACTTCGAACATTTCTTTTCGGCAAACGAAGTAAAGACA	3563
SEQ ID NO: 11	3701	TAGTTGTCTTACTTCGAACATTTCTTTTCGGCAAACGAAGTAAAGACA	3750
SEQ ID NO: 1	3564	ACGTTTGTGTTCCGCAGGACATGTTACGGCGGGTACGGACACGTCGTCGA	3613
SEQ ID NO: 11	3751	ACGTTTGTGTTCCGCAGGACATGTTACGGCGGGTACGGACACGTCGTCGA	3800
SEQ ID NO: 1	3614	TCATCGTGGAGTGGGCGATGGCGGAGATGCTCAAGAACCCGACCGTCATG	3663
SEQ ID NO: 11	3801	TCATCGTGGAGTGGGCGATGGCGGAGATGCTCAAGAACCCGACCGTCATG	3850
SEQ ID NO: 1	3664	GCGCGCGCGCAGGAGGAGCTGGACCGCGCGGTGGGCCGGGGCCGGCGCCT	3713
SEQ ID NO: 11	3851	GCGCGCGCGCAGGAGGAGCTGGACCGCGCGGTGGGCCGGGGCCGGCGCCT	3900
SEQ ID NO: 1	3714	GGAGGAGTCGGACCTGCCCGGCCTCCCTACCTGCAGGCGGTGTGCAAGG	3763
SEQ ID NO: 11	3901	GGAGGAGTCGGACCTGCCCGGCCTCCCTACCTGCAGGCGGTGTGCAAGG	3950
SEQ ID NO: 1	3764	AGGCCATGCGGCTGCACCCGTCACGCCGCTCAGCCTCCCGCACTTCTCC	3813
SEQ ID NO: 11	3951	AGGCCATGCGGCTGCACCCGTCACGCCGCTCAGCCTCCCGCACTTCTCC	4000
SEQ ID NO: 1	3814	TTGGACGCCTGCGACGACGTCGACGGCTACCGCGTCCCGGCCAACACCCG	3863
SEQ ID NO: 11	4001	TTGGACGCCTGCGACGACGTCGACGGCTACCGCGTCCCGGCCAACACCCG	4050
SEQ ID NO: 1	3864	CCTGCTCGTCAACGTCTGGGCCATCGGCCGGGACCCGGAGGCCTGGGAGA	3913
SEQ ID NO: 11	4051	CCTGCTCGTCAACGTCTGGGCCATCGGCCGGGACCCGGAGGCCTGGGAGA	4100
SEQ ID NO: 1	3914	GGCCCCTCGACTTCCGCCCCGAGCGCTTCCTGCCCGGGGCGGCGCGGAG	3963
SEQ ID NO: 11	4101	GGCCCCTCGACTTCCGCCCCGAGCGCTTCCTGCCCGGGGCGGCGCGGAG	4150
SEQ ID NO: 1	3964	AAGGTCGACCCCTGGGGAAGTCTTCGAGCTCATCCCGTTCGGCGCCGG	4013
SEQ ID NO: 11	4151	AAGGTCGACCCCTGGGGAAGTCTTCGAGCTCATCCCGTTCGGCGCCGG	4200
SEQ ID NO: 1	4014	CCGGAGGATCTGCGCGGGGAAGCTGGCGGGCATGGTGTTCGTGCAGTACT	4063
SEQ ID NO: 11	4201	CCGGAGGATCTGCGCGGGGAAGCTGGCGGGCATGGTGTTCGTGCAGTACT	4250

Fig. 4 (continuación):

SEQ ID NO: 1	4064	TCCTGGGCACGCTGCTGCACGCGTTTCGACTGGCGCCTGCCTGACGGCGAG	4113
SEQ ID NO: 11	4251	TCCTGGGCACGCTGCTGCACGCGTTTCGACTGGCGCCTGCCTGACGGCGAG	4300
SEQ ID NO: 1	4114	GAGAAGCTGGACATGAGCGAGACGTTTCGGCCTCGCGCTGCCCAAGGCAGT	4163
SEQ ID NO: 11	4301	GAGAAGCTGGACATGAGCGAGACGTTTCGGCCTCGCGCTGCCCAAGGCAGT	4350
SEQ ID NO: 1	4164	GCCGCTCCGCGCCGTCGCCACGCCACGGCTCGTGCCGGAAGCCTATGCCT	4213
SEQ ID NO: 11	4351	GCCGCTCCGCGCCGTCGCCACGCCACGGCTCGTGCCGGAAGCCTATGCCT	4400
SEQ ID NO: 1	4214	GA	4215
SEQ ID NO: 11	4401	GA	4402